

**UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA**

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS  
COMBUSTIBLES (MAGNA, PREMIUM Y DIÉSEL)  
MEDIANTE BIOENSAYOS UTILIZANDO “*Artemia  
franciscana*” COMO BIOINDICADOR.**

TESIS  
Para obtener el grado de  
**Ingeniero Ambiental**

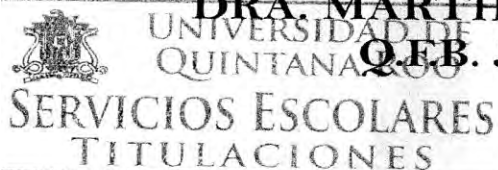


PRESENTA  
**LEDESMA VEGA OMAR DE JESÚS**

DIRECTOR DE TESIS  
**DR. VICTOR HUGO DELGADO BLAS**

ASESORES  
**M. C. RUSSELL GIOVANNI UC PERAZA**  
**DR. JOSÉ MANUEL CARRIÓN JIMÉNEZ**

**DRA. MARTHA ANGÉLICA GUTIÉRREZ AGUIRRE**  
**Q.F.B. JOSÉ LUIS GONZÁLEZ BUCIO**



CHETUMAL, QUINTANA ROO, MÉXICO, MAYO DE 2011




UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS  
COMBUSTIBLES (MAGNA, PREMIUM Y DIÉSEL)  
MEDIANTE BIOENSAYOS UTILIZANDO "*Artemia  
franciscana*" COMO BIOINDICADOR.


INGENIERO AMBIENTAL

COMITÉ DE TESIS

DIRECTOR:

  
DR. VÍCTOR HUGO DELGADO BLAS

ASESOR:

  
M. C. RUSSELL GIOVANNI UC PERAZA

ASESOR:

  
DR. JOSÉ MANUEL CARRIÓN JIMÉNEZ



UNIVERSIDAD DE  
QUINTANA ROO  
SERVICIOS ESCOLARES  
TITULACIONES



CHETUMAL, QUINTANA ROO, MÉXICO, MAYO DE 2017

## DEDICATORIAS

**A dios.-** Por haberme regalado la vida y por tantas bendiciones.

**A mis padres.-** Porque gracias a sus sacrificios logre cumplir este logro el cual es uno de los más grandes e importantes en mi vida, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me forjaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas me motivaron constantemente para alcanzar mis metas y nunca bajar la cabeza al enfrentar grandes retos.

**A mis hermanas.-** Por cuidar de mí y protegerme siempre que las he necesitado, por cada consejo, cada motivación, cada palabra de aliento para seguir adelante y por ser dos grandes ejemplos tanto en lo personal como en lo profesional.

**A mis sobrinos.-** Por cada ocurrencia, por cada risa, por cada abrazo, por cada momento de felicidad que han aliviado muchos pesares.

**A mi tía.-** Por haber sido mi segunda madre, porque nunca dejo de creer en mí y porque sé que donde sea que este está muy orgullosa y feliz de este logro.

**A mi novia.-** Por ser paciente y optimista, por estar presente desde el inicio de este trabajo, siempre apoyando y dando ánimos para cumplir mis sueños y por darme las fuerzas necesarias para llegar a la conclusión de este documento.

**A mis compañeros.-** Porque día a día me llenaron de enseñanzas, por cada momento vivido los cuales hicieron de la carrera una etapa muy grata de recordar, sin cada uno de ustedes nada hubiera sido igual, Gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Dr. Víctor Hugo Delgado Blas**

Primero y como más importante me gustaría agradecer sinceramente a mi asesor de tesis por sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia y su motivación ya que han sido fundamentales para mi formación académica, así como también haberme dado la oportunidad de recurrir a él para realizar esta investigación, de la misma manera por haber tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

### **M.C. Russell Giovanni Uc Peraza y Dr. José Manuel Carrión Jiménez.**

Por haber dedicado su tiempo, conocimiento y valiosa colaboración. Es cierto no ha sido fácil, ni mucho menos, sin embargo gracias a su ayuda la realización de esta exitosa tesis fue una tarea menos complicada.

### **Profesores de la Universidad de Quintana Roo**

M. I. A. Ávila Reveles Juan Carlos, Dr. Canché Uuh José Alfonzo, Dr. Delgado Blas Víctor Hugo, Biól. Flores Castillo Laura Patricia, Q. F. B. González Bucio José Luis, Ing. Guevara Franco José Luis, Dra. Oropeza García Norma Angélica, M. C. Rivero Rodríguez José Martín, Por haber tomado el arduo trabajo de trasmitirme sus diversos conocimientos especialmente del campo y los temas que corresponden a mi profesión. Pero además de eso han sido quienes han sabido orientarme por el camino correcto, y quienes se han esforzado a ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro.

### **Universidad de Quintana Roo**

Por haberme abierto las puertas de este prestigioso templo del saber y cuna de buenos profesionales, por acogerme 5 años de mi vida y empaparme de sus conocimientos y valores para poder ser alguien de bien en la sociedad.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE GENERAL .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS .....	VIII
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
MARCO TEÓRICO .....	5
Combustibles.....	5
Gasolinas .....	6
Diésel.....	7
Impacto ambiental .....	9
Toxicología.....	10
Exposiciones crónicas.....	10
Exposiciones subcrónicas.....	10
Exposiciones agudas .....	10
Toxicidad.....	11
Dosis Letal Media (DL50) .....	11
Concentración Letal Media (CL50) .....	12
Concentración Efectiva (CE50).....	12
CL50 asintótica .....	12
Concentración de efectos no observados (CENO) .....	12
Concentración de efectos mínimos observables (CEMO).....	12

Nivel de efectos agudos no observados (NEANO).....	12
Biología y ecología de la <i>Artemia</i> .....	12
Clasificación sistemática. ....	12
Morfología y ciclo vital. ....	14
Ecología y distribución natural.....	19
Morfología y metabolismo de los quistes. ....	20
Morfología de los quistes secos (Sorgeloos <i>et al.</i> , 1986) .....	20
Observaciones externas de los quistes en desarrollo.....	22
Metabolismo de los quistes de <i>Artemia</i> en desarrollo.....	22
Tolerancia a la temperatura de los quistes de <i>Artemia</i> .....	24
Eclosión de la <i>Artemia</i> . ....	25
Parámetros críticos para una eclosión óptima.....	25
ANTECEDENTES.....	28
Pruebas de toxicidad con <i>Artemia</i> . ....	28
Pruebas de toxicidad con otros organismos expuestos a diferentes combustibles.....	29
OBJETIVOS .....	31
Objetivo general.....	31
Objetivos particulares .....	31
JUSTIFICACIÓN .....	32
METODOLOGÍA Y MATERIALES.....	33
Eclosión.....	33
Desinfección y decapsulación de los quistes. ....	33
Proceso de eclosión de los quistes de <i>Artemia</i> . ....	34
Preparación de las muestras. ....	37

<b>Preparación de las disoluciones a emplearse. ....</b>	<b>37</b>
<b>Determinación de la CL<sub>50</sub> mediante el método Probit. ....</b>	<b>38</b>
<b>Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>).....</b>	<b>39</b>
<b>Análisis estadístico. ....</b>	<b>40</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>Determinación de la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>). ....</b>	<b>42</b>
<b>Bioensayos exploratorios.....</b>	<b>42</b>
<b>Bioensayos definitivos.....</b>	<b>43</b>
<b>Resultados del Análisis estadístico. ....</b>	<b>50</b>
<b>Determinación de la LOEC y NOEC. ....</b>	<b>54</b>
<b>DISCUSIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>59</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Estado “sombriilla” en la eclosión del quiste y nauplio larvario de la <i>Artemia</i> (1. ojo naupliar, 2. anténula, 3. antena, 4. mandíbula) Salgado Leu, 2001.....	15
<b>Figura 2.-</b> Nauplio en estado 2, con abertura anal presente (Salgado Leu, 2001).....	15
<b>Figura 3.-</b> <i>Artemia</i> macho adulto (Salgado Leu, 2001).....	17
<b>Figura 4.-</b> <i>Artemia</i> hembra adulta (Salgado Leu, 2001) .....	17
<b>Figura 5.-</b> Posición de paseo nupcial o precópula. 1. Hembra, 2. Macho (Salgado Leu, 2001) .....	18
<b>Figura 6.-</b> Ultraestructura de los quistes de <i>Artemia</i> (Sorgeloos <i>et al.</i> , 1986).....	21
<b>Figura 7.-</b> Desarrollo del quiste de <i>Artemia</i> desde la incubación en agua de mar (AM) hasta la liberación del nauplio (Sorgeloos <i>et al.</i> , 1986).....	22
<b>Figura 8.</b> Diagrama esquemático del efecto de las temperaturas del agua sobre el metabolismo del quiste de <i>Artemia</i> para valores comprendidos entre -20 °C y 40 °C (Sorgeloos <i>et al.</i> , 1986).....	25
<b>Figura 9.</b> Desinfección de los quistes de <i>Artemia</i> con cloro (Cloralex).....	34
<b>Figura 10.</b> Artemiero para la eclosión de los quistes de <i>Artemia</i> .....	35
<b>Figura 11.</b> Quistes no eclosionados precipitados al fondo de la pera y nauplios recién eclosionados en la columna de agua.....	36
<b>Figura 12.</b> Bioensayos con los tres diferentes combustibles empleados.....	38
<b>Figura 13.-</b> Ajuste de la recta por el método de mínimos cuadrados para gasolina Magna.....	46



<b>Figura 14.-</b> Ajuste de la recta por el método de mínimos cuadrados para gasolina Premium.....	46
<b>Figura 15.-</b> Ajuste de la recta por el método de mínimos cuadrados para Diésel.....	47
<b>Figura 16.-</b> Probit empírico contra log de la concentración para la gasolina Magna.....	47
<b>Figura 17.-</b> Probit empírico contra log de la concentración para la gasolina Premium.....	48
<b>Figura 18.-</b> Probit empírico contra log de la concentración para el Diésel.....	48
<b>Figura 19.-</b> Normalidad de la variable dependiente y elipse de confianza del 95 %.....	51
<b>Figura 20.-</b> Distribución normal de la variable dependiente clasificada por diferentes niveles de concentración.....	52
<b>Figura 21.-</b> Distribución normal de la variable dependiente clasificada por combustibles.....	52
<b>Figura 22.-</b> Relación entre el tipo de combustible y la mortandad.....	53
<b>Figura 23.-</b> Relación general entre la concentración y la mortalidad en los tres combustibles.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Propiedades físico-químicas de las gasolinas (magna, Premium) y el diésel (Pemex, 1998) .....	7
<b>Tabla 2.-</b> Componentes de las gasolinas (Magna, Premium) y diésel (Pemex, 1998).....	8
<b>Tabla 3.-</b> Clasificación taxonómica de la <i>Artemia</i> (Leach, 1819).....	12
<b>Tabla 4.-</b> Especies y ubicaciones de la <i>Artemia</i> (Sorgeloos <i>et al.</i> 1986).....	13
<b>Tabla 5.-</b> Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad.....	39
<b>Tabla 6.-</b> Primer bioensayo exploratorio, concentración y porcentaje de muertos por combustible 48h.....	42
<b>Tabla 7.-</b> Segundo bioensayo exploratorio, concentración y porcentaje de muertos por combustible a 48 h.....	43
<b>Tabla 8.-</b> Resultados obtenidos durante la realización del bioensayo con <i>Artemia franciscana</i> con la toxicidad de los tres combustibles.....	44
<b>Tabla 9.-</b> Datos de toxicidad para gasolina Magna en <i>Artemia franciscana</i> para el Método Probit.....	44
<b>Tabla 10.-</b> Datos de toxicidad para gasolina Premium en <i>Artemia franciscana</i> para el Método Probit.....	45
<b>Tabla 11.-</b> Datos de toxicidad para Diésel en <i>Artemia franciscana</i> para el Método Probit.....	45
<b>Tabla 12.-</b> Estadística descriptiva de la variable dependiente.....	50

Evaluación de la toxicidad de los combustibles (Magna, Premium, Diésel) mediante bioensayos utilizando "*Artemia franciscana*" como bioindicador.

Omar de Jesús Ledesma Vega

## RESUMEN

Los combustibles tienen una importancia fundamental en el mundo actual y dan un gran poder económico a los países que los poseen, debido a la gran cantidad que es usada diariamente ha generado un sin número de accidentes relacionados a ellos, afectando tanto ecosistemas acuáticos como terrestres dañando irreversiblemente la biodiversidad presente en estos ecosistemas. Por lo que surge la necesidad de evaluar la magnitud de estos accidentes mediante una prueba de toxicidad empleando organismos de prueba susceptibles a diferentes concentraciones, este método se denomina bioensayo. El presente trabajo fue motivado por dos derrames de hidrocarburos que ocurrieron en la ciudad de Chetumal en menos de 1 año. Se realizaron bioensayos con tres combustibles (Diésel, Premium y Magna) utilizando a *Artemia franciscana*, las cuales son una especie cosmopolita y nos aportará información sobre la toxicidad de los combustibles. Los organismos fueron expuestos a cinco diferentes concentraciones nominales de Diésel, Premium y Magna durante un tiempo de 48 h, para determinar la concentración que elimina el 50% de la población expuesta. El combustible con mayor toxicidad de acuerdo a la  $CL_{50}$  a 48 h en *Artemia franciscana* es: la gasolina Magna con 1.11%, posteriormente le siguió la gasolina Premium con 1.36 % y por último el Diésel con una  $CL_{50}$  de 1.57%. Con los resultados obtenidos de la  $CL_{50}$  a 48 h. Se concluye que los tres combustibles son extremadamente tóxicos para *Artemia franciscana*. Por lo tanto, con ayuda de las pruebas ecotoxicológicas realizadas, se demuestra que los derrames, fugas o vertimientos de estos combustibles, pueden representar un riesgo potencial de daño al ambiente acuático.

## INTRODUCCIÓN

Desde 1860 a la fecha los hidrocarburos constituyen un alto porcentaje en energías no renovables a nivel mundial. La obtención de estos recursos demanda el uso de mejores prácticas para el suministro energético; su exploración, explotación y traslado representa una de las mayores contribuciones de contaminación al ambiente (Guerrero Hernández, 2014).

Los combustibles por su vital importancia en la vida diaria se han convertido en un problema muy serio en lo que ha contaminación ambiental se refiere, tanto en medio terrestre, acuático como en la calidad de aire. Debido al consumo excesivo de estos, las empresas productoras se han visto obligadas a elevar la producción de dichos combustibles, lo que ha ocasionado el incremento en la contaminación y de igual manera el aumento en accidentes durante su producción, su traslado y su almacenaje (fugas, derrames, vertimientos accidentales, etc.) y los cuerpos de agua no han sido la excepción a estos accidentes.

En el ambiente marino la mayoría de los hidrocarburos son atribuibles principalmente a las operaciones rutinarias de lastre y a los accidentes eventuales de los buques tanqueros (Dorn *et al.*, 1991; Jacinto y Cabello 1999). Tsvetnenko (1998), indica que el Petróleo Crudo (PC) y sus derivados como son el Diésel 2 (D<sub>2</sub>) y el Diésel 6 (D<sub>6</sub>), Diésel, gasolinas (Magna, Premium) alteran las comunidades biológicas, afectando la conservación de los recursos naturales marinos.

Los ecosistemas acuáticos son el centro de interacción de un gran número de factores bióticos y abióticos que pueden ser modificados drásticamente por algún xenobiótico, la presencia de contaminantes puede provocar la alteración del ecosistema modificando así la composición y distribución de las comunidades bióticas, teniendo como consecuencia la alteración de la dinámica trófica. Por ello, surge la necesidad de investigar y detectar el impacto de la contaminación por compuestos químicos en la calidad de los cuerpos de agua, evaluando los efectos biológicos de los contaminantes sobre los organismos vivos (Bozo *et al.*, 2007).

Debido a la importancia de estos ecosistemas y a la facilidad con la que se modifican al estar en contacto con algún tipo de contaminante, se han realizado diversas pruebas ecotoxicológicas que miden el nivel del daño causado en un área determinada, algunas de estas pruebas son los bioensayos que utilizan especies que tienen una gran relevancia ecológica. Bajo este contexto, sin duda, uno de los grupos más importantes son los organismos zooplantónicos, ya que conforman una de las comunidades más amplias y variadas dentro de los sistemas acuáticos, representados desde los protozoarios hasta los vertebrados en sus diferentes estados larvarios (Ventura-López, 2008).

Dentro de estas especies podemos encontrar a la *Artemia franciscana* un crustáceo que en estado adulto mide entre 17–18 mm, posee un par de apéndices prensiles, ojos pedunculados, 17 pares de apéndices. La hembra adulta posee un ovisaco en el que incuba de 10 a 30 huevecillos generalmente y en condiciones óptimas hasta 70 huevecillos. Presenta un ciclo de vida sexual y asexual. Existen especies bisexuales y especies partenogenéticas en ambas. Pueden presentarse dos alternativas de desarrollo del huevo: uno es el desarrollo de larvas (prenauplio, nauplio) o bien que en condiciones adversas se presente el fenómeno de “Criptobiosis”, en el cual se producen los quistes. Este fenómeno se debe a que la gástrula permanece en este estado en períodos de desecación ambiental; esta gástrula enquistada en condiciones favorables se hidrata y continúa su desarrollo hasta eclosionar el nauplio. Esta capacidad de la *Artemia* en desarrollar huevos resistentes es lo que la ha hecho ser uno de los recursos de alimentación en acuicultura más importantes, pues los quistes pueden conservar su variabilidad durante varios años hasta que se dan las condiciones necesarias para la eclosión (Sorgeloos *et al.*, 1986).

La *Artemia franciscana* al ser una especie cosmopolita nos proporcionará una evaluación de lo que sucede durante un accidente relacionado con estos combustibles, además de que será un estudio pionero en este ámbito debido a que la literatura relacionada a este estudio es muy escasa, pudiéndola usar en el futuro como referencia sobre cualquier estudio donde se utilicen hidrocarburos.

En el presente trabajo se evaluará la toxicidad aguda de los combustibles, gasolina Magna, Premium y Diésel usando organismos de *Artemia franciscana*, los cuales serán expuestos a diferentes concentraciones de esos combustibles, para determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>).

## MARCO TEÓRICO

### Combustibles

Un combustible es cualquier material capaz de liberar energía cuando se oxida de forma violenta con producción de calor, llamas y gases. Supone la liberación de una energía de su forma potencial a una forma utilizable. En general se trata de algo susceptible de quemarse y produce energía calorífica.

Los combustibles se clasifican según su origen en fósiles y no fósiles, en esta ocasión únicamente se hace mención al grupo de los combustibles fósiles los cuales son los de mayor interés para el desarrollo de ésta investigación.

Dentro de los combustibles fósiles existe otra clasificación, que se basa en el estado en el que se encuentren estos: sólido, gaseoso o líquido (ejemplo carbón, hulla, metano e hidrocarburos). Los hidrocarburos son compuestos formados por hidrógeno y carbono; algunos contienen también pequeñas cantidades de otros componentes. Los hidrocarburos se forman a partir de antiguos organismos vivos que fueron enterrados bajo capas de sedimento hace millones de años. Debido al calor y la presión creciente que ejercen las capas de sedimento acumulados, los restos de los organismos se transforman gradualmente en hidrocarburos (Rivas-Meza, 2006).

Desde 1860 a la fecha los hidrocarburos representan un alto porcentaje en energías no renovables a nivel mundial. La extracción de estos recursos exige el uso de más y mejores prácticas para el abastecimiento energético; su exploración, explotación y traslado representa uno de los mayores aportes de contaminación al ambiente (Guerrero-Hernández, 2014).

Los combustibles líquidos derivados del petróleo se componen primordialmente de hidrocarburos, es decir, de moléculas constituidas por átomos de carbono e hidrógeno, arregladas en cadenas con tamaño y formas espaciales distintas. También, pueden contener compuestos oxigenados, principalmente las gasolinas, algunos aditivos que les imparten ciertas cualidades, así como pequeñas

cantidades de azufre, nitrógeno y metales que no pueden eliminarse completamente en los procesos de refinación y se consideran contaminantes.

Las gasolinas Pemex-Magna y Pemex-Premium, así como el Pemex-Diésel, se utilizan primordialmente como carburantes para motores de combustión interna, pero cada uno de ellos con propiedades físicas y composición química distintas, debido al tipo y concentración de los hidrocarburos presentes en cada combustible. Asimismo, su composición química es diferente a lo largo del país ya que depende en gran medida del origen o tipo de petróleo procesado en la refinería, de la cantidad y complejidad de los procesos involucrados en su producción, de la disponibilidad de las distintas corrientes que se utilizan para formularlos, así como de las especificaciones que deban cumplir en una determinada región y periodo del año, aunado a la importación de gasolinas y Diésel de otros países (IMP, 2014).

### **Gasolinas**

La gasolina es un derivado del petróleo, que está constituido por la suma de varios hidrocarburos (moléculas de hidrógeno y carbono). La gasolina es utilizada en todo el mundo porque es el combustible para vehículos automotores más efectivo hasta el momento.

Este combustible es el más demandado entre los productos derivados de la refinación del petróleo. La gasolina comenzó a formar parte de nuestra vida desde que empezó la producción en serie de los automotores, esto ocurrió por ahí de la década de los 20 (Rivas-Meza, 2006).

México importa el 47 % de sus necesidades de gasolina. De la gasolina Pemex-Magna produce el 62 % del total vendido en el país en tanto que de la gasolina Pemex-Premium sólo se produce el 17%, diariamente se venden 138,000 barriles de las gasolinas Premium y Magna en el sur-este del país, el cual, comprende los estados de Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (IMP, 2014).

La gasolina Pemex Magna de índice de octano 87 constituye cerca del 85% del total de gasolinas que se consumen en el país. El resto corresponde a la gasolina Pemex



Premium de índice de octano 92. Dichas gasolinas se componen típicamente de moléculas de hidrocarburos en un rango de 4 a 12 átomos de carbono, formando una mezcla compleja de cientos de ellos, debido a que el mismo número de átomos de carbono puede tener su estructura molecular arreglada de diferentes formas, denominados isómeros.

Como resultado de la complejidad para identificar toda la gama de componentes químicos, la industria petrolera ha propuesto agruparlos en familias. Las familias de hidrocarburos que predominan en las gasolinas son: parafinas, isoparafinas, olefinas, naftenos y aromáticos.

### **Diésel**

La producción de Diésel es menos compleja que la producción de gasolina; pero se trata también de una mezcla de hidrocarburos de composición química no definida en su totalidad. La composición química del Diésel depende en mayor medida del tipo de crudo procesado, debido a que son pocos los procesos químicos destinados a transformar el petróleo crudo en Diésel. El Diésel se obtiene mayormente de procesos de fraccionamiento o destilación. Un volumen importante proviene del proceso de destilación primaria del cual se separa la fracción de hidrocarburos que destilan aproximadamente entre los 175 y 370°C (IMP, 2014).

**Tabla 1.-** Propiedades físico-químicas de las gasolinas (Magna, Premium) y el Diésel (Pemex, 1998).

<b>Propiedades</b>	<b>Magna</b>	<b>Premium</b>	<b>Diésel</b>
Temp. de ebullición (°C)	60-70 (máx. 10% destilación)	70 (Temp. máx. 10% destilación)	ND
Temp. de fusión (°C)	NA	NA	ND
Temp. de inflamación (°C)	Inferior a 0°C	Inferior a 0°C	45 (mínimo) (ASTM-D 93)
Temp. de auto ignición (°C)	Aproximadamente 250°C	Aproximadamente 250°C	254 - 285°C

Densidad relativa de vapor	3.0 – 4.0	3.0 – 4.0	0.87 – 0.95
pH	(IV.6) ND	ND	ND
Peso molecular	ND	ND	ND
Estado físico	Líquido	Líquido	Líquido
Color	Rojo (visual)	Sin Anilina	(2.5 máximo) ASTM-D 1500
Olor	Característico a gasolina	Característico a gasolina	Característico a hidrocarburo
Velocidad de evaporación	ND	ND	ND
Solubilidad en agua a 20°C (g/100 ml)	Insoluble	Insoluble	0.0005
Presión de vapor a 37.8 °C (kPa)	54.0 – 79.0 (7.8 – 11.5 lb/in <sup>2</sup> )	45–54 (6.5-7.8 lb/in <sup>2</sup> )	ND
% de volatilidad	NA	NA	NA
Límites de explosividad inferior-superior	1.3 – 7.1	1.3 – 7.1	0.6 - 6.5
Gravedad específica 20/4 °C	0.700 – 0.770	0.700 – 0.770	-
Viscosidad cinemática a 40°C (mm <sup>2</sup> /s)	-	-	1.9 - 4.1
Densidad a 20°C	720 kg/m <sup>3</sup>	705.7 ± 1.5 kg/m <sup>3</sup>	836.7 ± 7.1 kg/m <sup>3</sup> (Castillo-Hernández et al., 2012)

**Tabla 2.-** Componentes de las gasolinas (Magna, Premium) y Diésel (Pemex, 1998).

<b>Componentes</b>	<b>Magna</b>	<b>Premium</b>	<b>Diésel</b>
Diésel	-	-	100%

Aromáticos	ND	25% Max	30% Max
Azufre	-	-	500 mg/kg
Gasolinas	100%	100%	-
Olefinas	ND	10% Max	-
Benceno	3.0 % MAX	1.0% Max	-
Oxigeno	-	2.7% Max	-

### **Impacto ambiental**

Debido que los combustibles fósiles son quemados fundamentalmente para producir energía y esa energía se utiliza para impulsar automóviles, camiones, aeroplanos, trenes y barcos en todo el mundo; en los procesos industriales, y para proporcionar calor, luz y aire acondicionado a hogares y empresas, el impacto ambiental que este presenta en el mundo es alarmante.

La lluvia ácida y el calentamiento global son dos de los más serios problemas ambientales relacionados con la utilización a gran escala de los combustibles fósiles. Otros problemas de este tipo, como la contaminación del suelo, cuerpos de agua y el vertido de petróleo, están relacionados directamente con la extracción y el transporte de los combustibles fósiles.

La lluvia normalmente tiene un pH ligeramente ácido (pH aprox. 5.6) debido al CO<sub>2</sub> presente en la atmósfera. Cuando la lluvia tiene valores de pH menores a 5.6 se le llama lluvia ácida (Hill y Kolb, 1999).

Cuando los combustibles fósiles son quemados, el azufre, el nitrógeno y el carbono desprendidos se combinan con el oxígeno para formar óxidos. Cuando los óxidos son liberados en el aire, reaccionan químicamente con el vapor de agua de la atmósfera, formando ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido carbónico, respectivamente. Esos vapores de agua que contienen ácidos (conocidos comúnmente como lluvia ácida) entran en el ciclo del agua y, por tanto, pueden perjudicar la calidad biológica de bosques, suelos, lagos y arroyos (Miller, 1999).

El dióxido de carbono es el principal subproducto de la combustión de los combustibles fósiles. Es lo que los científicos llaman un gas invernadero. Los gases

invernadero absorben el calor del Sol reflejado en la superficie de la Tierra y lo retienen, manteniendo la Tierra caliente y habitable para los organismos vivos. No obstante, el rápido desarrollo industrial de los siglos XIX y XX ha provocado un incremento de las emisiones procedentes de la combustión de combustibles fósiles, elevando el porcentaje de dióxido de carbono en la atmósfera en un 28%. Este dramático incremento ha llevado a algunos científicos a predecir un escenario de calentamiento global que puede causar numerosos problemas ambientales, como la destrucción de los sistemas climáticos y la fusión del casquete polar (Rivas-Meza, 2006).

## **Toxicología**

Es la ciencia que estudia las sustancias químicas y los agentes físicos en cuanto que son capaces de producir alteraciones patológicas a los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de tales alteraciones y los medios para contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar tales agentes y valorar su grado de toxicidad (Fernández Espinoza, 2001).

Para la toxicología ambiental las exposiciones se clasifican de acuerdo a la magnitud del período de exposición en (Hernández Yacomelo, 2014)

- **Exposiciones crónicas:** Son las exposiciones que duran entre 10 y 100 % del período de vida del organismo afectado.
- **Exposiciones subcrónicas:** Son exposiciones de corta duración, menores que el 10 % del período vital.
- **Exposiciones agudas:** Efecto letal u otro efecto producido en un tiempo relativamente corto, usualmente dentro de los 4 días para peces, macrovertebrados o macroinvertebrados y periodos más cortos (2 días) para organismos más pequeños, estas exposiciones suceden en un solo evento.

## **Toxicidad**

La toxicidad es la capacidad de una sustancia de causar algún efecto nocivo sobre organismos vivos y depende de varios factores (Gámez y Ramírez, 2008):

- Cantidad administrada o absorbida.
- Vía de ingreso al organismo.
- Distribución a lo largo del tiempo después de su administración.
- Naturaleza y severidad del daño producido.
- Tiempo necesario para producir el efecto.

Existen diversas herramientas para evaluar el efecto de los contaminantes sobre los componentes biológicos de los sistemas acuáticos una de ellas son los bioensayos de ecotoxicidad (Rodríguez *et al.* 1993). Estos nos ayudan a conocer tempranamente, los posibles impactos sobre las comunidades debido a que son utilizados en el monitoreo y control de las perturbaciones en la biocenosis acuática, completando o reemplazando a los métodos analíticos complicados y costosos. Además los bioensayos tienen la ventaja de poder identificar los efectos sinérgicos y antagónicos causados sobre organismos representativos de aguas receptoras imposibles de ser detectados por los métodos analíticos convencionales (Rodríguez *et al.* 1993; Iannacone *et al.* 1998). Estos ensayos han sido recomendados por la Environmental Protection Agency (EPA, 1985), como un complemento ideal de las técnicas analíticas empleadas en la evaluación ambiental. En los bioensayos son comúnmente usados miembros de la red trófica acuática, como peces (Segner *et al.* 1994), artrópodos (Persoone *et al.* 1994; Idoniboye-Obu, 1997), microalgas (Iannacone y Gutiérrez, 1999).

Los bioensayos se dividen en distintos indicadores toxicológicos a continuación se mencionan los más utilizados (Gámez y Ramírez, 2008):

**Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>):** Es la dosis individual de una sustancia que provoca la muerte del 50 % de la población animal debido a la exposición a la sustancia por cualquier vía distinta a la inhalación. Normalmente expresada como miligramos o gramos de material por kilogramo de peso del animal.

**Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>):** Es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte del 50 % de los organismos expuestos a esta durante un periodo determinado de tiempo. El valor de la CL<sub>50</sub> se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen de aire normal (miligramos por litro, mg/l o ppm).

**Concentración Efectiva (CE<sub>50</sub>):** Concentración del tóxico que produce efectos negativos apreciables en el 50 % de la población (pérdida del equilibrio, frecuencia respiratoria, en un tiempo determinado).

**CL<sub>50</sub> asintótica:** Concentración de tóxico a la cual la CL<sub>50</sub> llega hacerse constante para un tiempo de exposición prolongado.

**Concentración de efectos no observados (CENO):** La mayor concentración a la cual no se observa reacción crónica alguna en las especies ensayadas.

**Concentración de efectos mínimos observables (CEMO):** La menor concentración de tóxico a la cual puede observarse algún efecto sobre la especie ensayada.

**Nivel de efectos agudos no observados (NEANO):** Es la mayor concentración del tóxico para la cual la mortalidad registrada es del 10 % o inferior.

## **Biología y ecología de la *Artemia*.**

### **Clasificación sistemática.**

**Tabla 3.-** Clasificación taxonómica de la *Artemia* (Leach, 1819).

Phyllum	Artrópoda
Clase	Crustácea
Subclase	Branchiopoda
Orden	Anostraca
Familia	Artemiidae
Género	<i>Artemia</i>

Experiencias de cruzamiento entre diferentes poblaciones de *Artemia* han demostrado el aislamiento reproductivo de algunos grupos de poblaciones (Barigozzi, 1974; Clark y Bowen, 1976) y esto ha llevado al reconocimiento de especies hermanas (“sibling”) a las que se les han dado nombres diferentes (Bowen *et al.*, 1978).

Entre las cepas bisexuales o zigogénicas de *Artemia* (poblaciones compuestas por individuos machos y hembras) se han descrito hasta la fecha 6 especies hermanas (**Tabla 4**).

**Tabla 4.-** Especies y ubicaciones de la *Artemia* (Sorgeloos *et al.* 1986).

ESPECIE	UBICACIÓN
<i>Artemia salina</i>	Lymington, Inglaterra (extinta)
<i>Artemia tunisiana</i>	Europa
<i>Artemia franciscana</i>	América (Norte, Centro y Sur)
<i>Artemia persimilis</i>	Argentina
<i>Artemia urmiana</i>	Irán
<i>Artemia monica</i>	Mono Lake, CA-USA

Algunas cepas partenogénicas (poblaciones compuestas exclusivamente por hembras; no siendo necesaria la fertilización de los huevos para la reproducción) han sido encontradas en Europa y Asia. Existen importantes diferencias genéticas (por ejemplo en el número de cromosomas y en el tipo de insoenzimas) que hacen muy confusa la clasificación sistemática conjunta bajo el nombre de “*Artemia* partenogénica” (Abreu-Grobois y Beardmore, 1980). Por esta razón fue sugerido en el Primer Simposio Internacional sobre *Artemia* (Corpus Christi, TX-USA, Agosto de 1979) (Persoone *et al.*, 1980) que salvo que las especies “sibling” de cepas partenogénicas puedan ser identificadas (por medio de pruebas de entrecruzamiento con hermanas conocidas), y hasta que la especiación de estos animales sea comprendida de forma más clara, solamente se use la denominación “*Artemia*”.

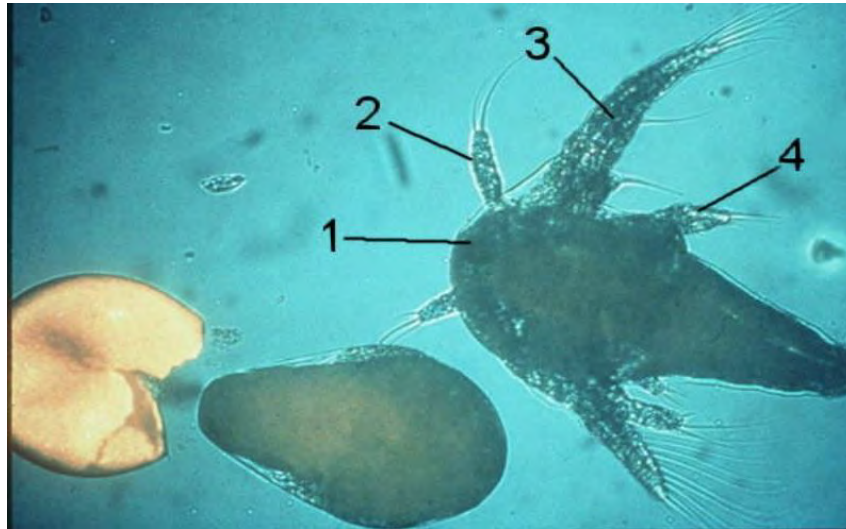
### **Morfología y ciclo vital.**

Sorgeloos *et al.* (1986), argumentan que los lagos salados y estanques de las salinas con poblaciones de *Artemia* se encuentran distribuidos por todo el mundo. En ciertos momentos del año, grandes cantidades de minúsculas partículas marrones (200 - 300  $\mu\text{m}$  de diámetro) aparecen flotando en la superficie del lago y son arrojadas sobre las orillas por la acción de las olas y el viento. Este polvo aparentemente inerte está formado por quistes secos inactivos en estado de criptobiosis (“durmientes”) manteniéndose así tanto tiempo como permanezcan secos.

Una vez puestos en agua de mar, los quistes bicóncavos se hidratan tomando forma esférica y el embrión recobra su metabolismo reversible interrumpido. Tras unas 24 h la membrana externa de los quistes se rompe y aparece el embrión rodeado de la membrana de eclosión. Durante las horas siguientes, el embrión abandona completamente la cáscara del quiste: colgando entretanto de la cáscara vacía a la cual permanece todavía unido. Dentro de la membrana de eclosión se completa el desarrollo del nauplio, sus apéndices comienzan a moverse y en un breve periodo de tiempo la membrana de eclosión se rasga emergiendo el nauplio que nada libremente.

El primer estado larvario (**Fig. 1**), también llamado estado I, mide entre 400 y 500  $\mu\text{m}$  de longitud, tiene un color pardo anaranjado (por acumulación de reservas vitelinas) y posee tres pares de apéndices: el primer par de antenas (también llamadas anténulas y que tienen una función sensorial), el segundo par de antenas (con función locomotora y filtradora) y las mandíbulas (con una función de toma de alimento). Un único ocelo de color rojo también llamado ojo naupliar se encuentra situado en la cabeza entre el primer par de antenas. La cara ventral del animal se encuentra cubierta por un amplio labro que interviene en la toma de alimento (transfiriendo las partículas desde las setas filtradoras hasta la boca). El estado larvario I no se alimenta ya que su aparato digestivo no es todavía funcional (permaneciendo aún cerrados la boca y el ano).





**Figura 1.-** Estado “sombrilla” en la eclosión del quiste y nauplio larvario de la *Artemia* (1. ojo naupliar, 2. anténula, 3. antena, 4. mandíbula) (Salgado-Leu, 2001).

Después de aproximadamente 24 h, el animal muda al segundo estado larvario (también llamado estado II) (**Fig. 2**). Pequeñas partículas alimenticias (tales como células de micro algas, bacterias, detritus) con un tamaño que varía entre 1 y 40  $\mu\text{m}$  son filtradas por el segundo par de antenas, siendo entonces ingeridas por un aparato digestivo ya funcional.



**Figura 2.-** Nauplio en estado 2, con abertura anal presente (Salgado-Leu, 2001).

La larva continúa su crecimiento apareciendo diferenciaciones a lo largo de las 15 mudas. Así van apareciendo unos apéndices lobulares pares en la región torácica que se diferenciarán posteriormente en toracópodos, se desarrollan ojos complejos laterales a ambos lados del ojo naupliar. Desde el estado X en adelante, se producen importantes cambios tanto morfológicos como funcionales por ejemplo: las antenas pierden su función locomotriz y se transforman en elementos de diferenciación sexual. Los futuros machos desarrollan unos apéndices curvados y prensiles mientras que las antenas de las hembras degeneran en apéndices sensoriales.

Los toracópodos están ya completamente formados y presentan 3 partes funcionales: los telopoditos y endopoditos con acciones locomotrices y filtradoras y los exopoditos que actúan como branquias.

Los adultos de *Artemia* miden hasta 10 mm de longitud en las poblaciones bisexuales y hasta 20 mm en las poblaciones partenogenéticas. Los adultos se caracterizan por un cuerpo alargado con dos ojos complejos pedunculados, un aparato digestivo lineal, unas anténulas sensoriales y 11 pares de toracópodos funcionales. El macho posee un par de piezas prensiles musculadas muy características (segundo par de antenas) en la región cefálica mientras que en la parte posterior del tórax se puede observar un par de penes (**Fig. 3**). La hembra de *Artemia* no tiene apéndices distintivos en la región cefálica, pero puede ser fácilmente reconocida por el saco de puesta o útero que está situado inmediatamente detrás del undécimo par de toracópodos (**Fig. 4**).



**Figura 3.-** *Artemia* macho adulto (Salgado-Leu, 2001).



**Figura 4.-** *Artemia* hembra adulta (Salgado-Leu, 2001).

Los huevos se desarrollan en dos ovarios tubulares situados en el abdomen. Una vez maduros, tienen forma esférica y se desplazan hasta el útero a través de dos oviductos.

La precópula de los adultos se inicia cuando el macho sujeta a la hembra entre el útero y el último par de toracópodos, con sus antenas curvadas. Las parejas pueden nadar de esta forma durante largo tiempo en lo que se conoce como posición de monta (“riding position”), para lo cual mueven sus toracópodos de forma sincrónica. La cópula es un rápido acto reflejo: la parte ventral del macho se dobla hacia delante

y uno de los penes es introducido en la abertura del útero fertilizando los huevos (**Fig. 5**). En el caso de las hembras partenogénéticas la fertilización no tiene lugar y el desarrollo embrionario comienza tan pronto como los huevos han llegado al útero.



**Figura 5.-** Posición de paseo nupcial o precópula. 1. Hembra, 2. Macho (Salgado-Leu, 2001).

Los huevos fecundados se desarrollan normalmente en nauplios nadadores (reproducción ovovivípara) que son depositados por la hembra. En condiciones extremas (salinidad elevada, bajos niveles de oxígeno) las glándulas de la cáscara, (órganos parecidos a uvas situados en el útero), entran en actividad y acumulan un producto de secreción de color marrón (hematina). Los embriones solo se desarrollan hasta el estado de gástrula, momento en el cual son rodeados de una gruesa cascara (segregada por las glándulas de la cáscara), entrando en un estado de latencia o diapausa (parada reversible del metabolismo embrionario) y siendo liberados por la hembra (reproducción ovípara) (Sorgeloos *et al.* 1986).

Los quistes generalmente flotan en las aguas hipersalinas y son llevados hasta las orillas donde se acumulan y se secan. Como resultado de este proceso de deshidratación el mecanismo de diapausa es desactivado permitiendo a los quistes

recuperar su posterior desarrollo embrionario, una vez que son hidratados en condiciones óptimas de eclosión.

En condiciones adecuadas esta especie puede vivir varios meses, creciendo de nauplio a adulto en solo 8 días y reproduciéndose a una tasa de hasta 300 nauplios o quistes cada 4 días.

### **Ecología y distribución natural.**

Las poblaciones de *Artemia* se encuentran distribuidas en más de 300 lagos salinos naturales o salinas de construcción artificial a lo largo de todo el mundo y México no es la excepción encontrándose en estados como Baja California, Yucatán, Oaxaca, entre otros. Diferentes cepas geográficas se han adaptado a las condiciones que fluctúan dentro de un amplio margen de temperatura (6–35°C) y composición iónica del biotopo (aguas ricas en cloruros, sulfatos y carbonatos) (Bowen *et al.* 1978; Sorgeloos, 1979).

Esta especie se desarrolla perfectamente en agua de mar, sin embargo, no posee ningún mecanismo de defensa contra los predadores, lo que la convierte en una presa fácil de otras especies carnívoras (peces, crustáceos o insectos). A pesar de ello y por medio de su adaptación fisiológica a biotopos con una elevada salinidad, la *Artemia* ha encontrado un eficaz mecanismo ecológico de defensa contra la predación, así estos animales poseen el sistema osmorregulatorio más eficiente conocido en todo el reino animal (Croghan, 1958); además son capaces de sintetizar eficazmente pigmentos respiratorios (hemoglobina) y poder hacer frente a los bajos niveles de oxígeno disuelto que existen en los ambientes hipersalinos (Gilchrist, 1954); finalmente, estos animales tienen la capacidad de producir quistes en fase de latencia cuando las condiciones ambientales ponen en peligro la supervivencia de la especie.

Como consecuencia de todo ello, la *Artemia* no aparece más que a salinidades donde sus predadores no pueden sobrevivir (> 70 ‰). La *Artemia* muere a

salinidades próximas a la saturación en NaCl (> 260 ‰), a causa del extremo estrés fisiológico y de la toxicidad del agua en esas condiciones.

La *Artemia* es un filtrador no selectivo (Reeve, 1963) y se alimenta tanto de materia orgánica particulada, como de organismos vivos de tamaño apropiado (microalgas y bacterias). De hecho, y debido a la falta de predadores y competidores por el alimento, la *Artemia* produce, a menudo, grandes monocultivos cuya densidad está fundamentalmente regulada por la disponibilidad de alimento. La reproducción ovovivípara (puesta de nauplios) se da principalmente a bajas salinidades, mientras que los quistes (reproducción ovípara) se producen a salinidades por encima de 150 ‰.

Los quistes son la causa de la distribución mundial de *Artemia*. Tanto el viento como las aves acuáticas especialmente los flamencos están considerados como los vectores naturales más importantes de la dispersión. No obstante, el hombre ha sido, en los últimos tiempos, el responsable de algunos trasplantes en Sudamérica y Australia, tanto para producir mejoras en la industria salinera como para su uso en acuicultura (Sorgeloos, 1979). La presencia natural de *Artemia* está confinada a biotopos donde las salinidades son suficientemente altas como para impedir la presencia de predadores o en lugares donde las bajas temperaturas invernales (cuando las salinidades disminuyen por efecto de las fuertes lluvias) aseguran un estado no metabólico de los quistes hidratados (el estado de diapausa del cual no ha sido eventualmente desactivado todavía).

### **Morfología y metabolismo de los quistes.**

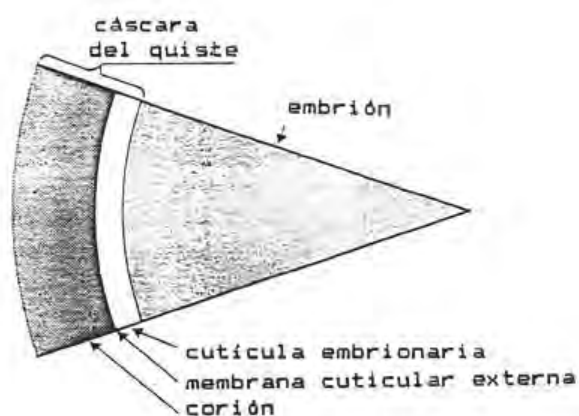
#### **Morfología de los quistes secos (Sorgeloos et al., 1986)**

La cáscara del quiste está formada de tres estructuras (**Fig. 6**):

- El corion (**Fig. 6**): Capa dura formada de lipoproteínas impregnadas de quitina y hematina (producto de descomposición de la hemoglobina; la concentración de hematina determina el color de la cáscara, variando de un marrón pálido a un marrón oscuro). La principal función del corion es la de

proporcionar una protección adecuada al embrión contra rupturas mecánicas y radiaciones (ej. las radiaciones ultravioletas de los rayos solares). Esta capa puede ser completamente eliminada (disuelta) por un tratamiento oxidativo a base de hipoclorito (decapsulación del quiste).

- La membrana cuticular externa (**Fig. 6**): Protege al embrión de la penetración de moléculas mayores que la molécula del CO<sub>2</sub> (membrana compuesta de varias capas y con una función de filtro muy especial, actuando como barrera de permeabilidad).
- La cutícula embrionaria (**Fig. 6**): Una capa transparente y altamente elástica que queda separada del embrión por la membrana cuticular interna (que se transforma en membrana de eclosión durante el proceso de incubación).

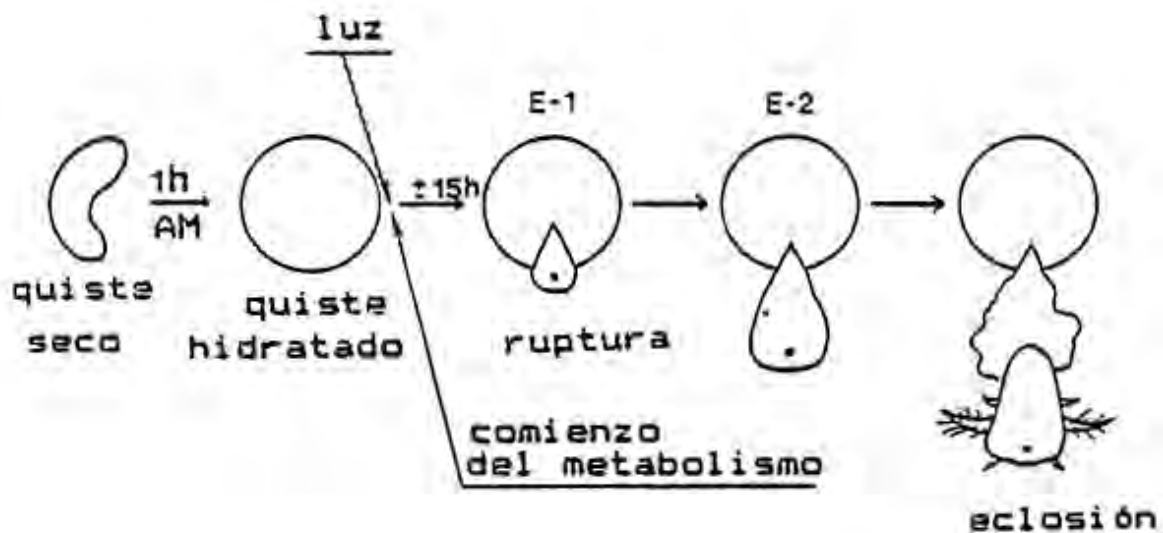


**Figura 6.-** Ultraestructura de los quistes de *Artemia* (Sorgeloos *et al.*, 1986).

El embrión es una fase indiferenciada de gástrula que se encuentra en un estado completamente ametabólico con niveles de humedad inferiores al 10%; por lo que su metabolismo se encuentra en una fase de parada reversible. La viabilidad del embrión se ve afectada cuando los niveles de humedad exceden del 10% (comenzando la actividad metabólica), y cuando los quistes son expuestos al oxígeno (poniéndolos al aire); se produce la formación de radicales libres que destruyen los sistemas enzimáticos específicos de los quistes ametabólicos de *Artemia*.

### Observaciones externas de los quistes en desarrollo.

Cuando se incuban en agua de mar, los quistes bicóncavos se hinchan adoptando una forma esférica en el plazo de 1 a 2 h. Una vez completamente hidratados, el diámetro del quiste ya no varía. Transcurridas de 15 a 20 h desde la hidratación, la cáscara del quiste estalla con lo que se hace visible el prenauplio rodeado de la membrana de eclosión. El embrión deja definitivamente la cáscara y cuelga hacia abajo de la cáscara. A través de la transparencia de la membrana de eclosión se puede seguir la diferenciación del prenauplio hasta el estado I de larva de nauplio, el cual, comienza a mover los apéndices. Poco tiempo después, la membrana de eclosión se romperá liberando la larva nadadora de Artemia (**Fig. 7**).



**Figura 7.-** Desarrollo del quiste de Artemia desde la incubación en agua de mar (AM) hasta la liberación del nauplio (Sorgeloos *et al.*, 1986).

### Metabolismo de los quistes de Artemia en desarrollo.

Los quistes secos son altamente higroscópicos, incorporando agua a gran velocidad, por ejemplo en las primeras horas el volumen del embrión hidratado aumenta más de un 100%. Una vez completamente hidratado se puede iniciar el



metabolismo activo a condición de que los quistes estén suficientemente iluminados. El efecto activador de la luz es esencial para que comience el metabolismo de la mayoría de los quistes. A intensidades de luz demasiado bajas, la tasa de eclosión se retrasa o simplemente no se produce.

El metabolismo aeróbico en el embrión enquistado asegura la conversión de la trealosa, como carbohidrato de reserva, en glicógeno (como fuente de energía) y glicerol que son acumulados por el embrión en la membrana cuticular externa. El incremento en la concentración de un producto altamente higroscópico como es el glicerol, ocasiona un mayor aumento en la asimilación de agua por el embrión a través de la membrana cuticular externa. Como consecuencia de este fenómeno se produce un aumento de la presión osmótica en el interior de la membrana cuticular externa hasta que se alcanza un punto crítico, momento en el cual se produce la ruptura de esta membrana y de la cáscara del quiste (“breaking”). La ruptura de la cáscara va acompañada de la liberación de todo el glicerol al medio de cultivo (Sorgeloos *et al.* 1986).

Dicho de otro modo, el metabolismo de los quistes de *Artemia*, con anterioridad a la ruptura, es un sistema regulatorio hiperosmótico trealosa-glicerol. Esto significa que la ruptura se puede producir en ausencia de sales y que a medida que aumentan los niveles de salinidad en el medio de eclosión, se necesitan mayores concentraciones de glicerol para alcanzar el punto crítico de presión osmótica necesario para que se produzca la ruptura de la cáscara (por diferencia entre la presión osmótica dentro y fuera del quiste). De esta forma cuanto mayor es la salinidad en el medio, mayor cantidad de glicerol tiene que ser producido, alargándose con ello el período de eclosión y de ruptura y disponiendo de menos reservas energéticas para el nauplio (Sorgeloos *et al.* 1986).

Tras la ruptura de la cáscara el embrión entra en contacto directo con el medio externo a través de la membrana de eclosión. En ese momento ya es activo un sistema osmorregulatorio iónico; el desarrollo óptimo hasta larva nauplio libre y nadadora no quedará asegurado hasta que la composición iónica del medio de

eclosión sea similar a la del agua de mar y con un pH comprendido en el intervalo entre 8 y 9.

El embrión empieza entonces a diferenciarse en una larva nauplio móvil. Un enzima de eclosión es segregado en la zona de la cabeza del nauplio. Este debilita la membrana de eclosión a través de la cual el nauplio móvil se libera en el medio de cultivo.

### **Tolerancia a la temperatura de los quistes de *Artemia***

Los quistes secos (con un contenido de humedad entre el 2 y el 5%) son muy resistentes, por ejemplo: la viabilidad de la eclosión no se ve afectada en un intervalo de temperatura entre -273 y 60°C pudiendo tolerar hasta 90°C si las exposiciones son de breve duración (en realidad las exposiciones deberán ser más cortas a medida que la temperatura aumenta).

Los quistes hidratados (completamente hidratados en el medio de cultivo) tienen una tolerancia a la temperatura muy específica (**Fig. 8**):

- Una interrupción del metabolismo (muerte del embrión) se produce por debajo de -18°C y por encima de 40°C.
- Una interrupción reversible del metabolismo se produce (sin que la viabilidad se vea afectada) en un intervalo de temperaturas que varía entre -18°C y 4°C y entre 32°C y 40°C (una exposición de larga duración a este último intervalo de temperaturas ocasiona un retraso progresivo de la tasa de eclosión. Los límites superiores e inferiores de temperatura pueden variar ligeramente de cepa a cepa).
- El metabolismo activo actúa en el intervalo de temperatura entre 4 y 32°C; aunque si bien el porcentaje de eclosión permanece constante, los nauplios eclosionan antes a medida que la temperatura es más alta (Sorgeloos *et al.*, 1986).



**Figura 8.** Diagrama esquemático del efecto de las temperaturas del agua sobre el metabolismo del quiste de *Artemia* para valores comprendidos entre -20 °C y 40 °C (Sorgeloos *et al.*, 1986).

## **Eclosión de la *Artemia*.**

### **Parámetros críticos para una eclosión óptima**

Existe una extensa bibliografía sobre la eclosión de los quistes de *Artemia* (Sorgeloos, 1980). En estos trabajos, la producción de nauplios por incubación de quistes en agua de mar se presenta como un método muy simple. Sin embargo, cuando se trabaja a gran escala y con altas densidades de quistes, algunos parámetros pueden ser críticos para asegurar la eficiencia de eclosión máxima. Los parámetros son los siguientes:

### **Temperatura**

La temperatura se mantiene en un intervalo de 25–30°C. Porque por debajo de 25°C la eclosión es más lenta y por encima de 30°C el metabolismo de los quistes se detiene irreversiblemente. Para mantener la temperatura constante en el medio de eclosión se usan calentadores y termostatos para obtener una producción máxima de nauplios en estado I.

## **Salinidad y pH**

Por razones de conveniencia práctica, se usa mayormente el agua de mar para la eclosión de los quistes. Sin embargo, a una salinidad de 5 ‰ aumenta la tasa de eclosión (ya que se tiene que producir menos glicerol) y se han registrados eficiencias de eclosión más elevadas para algunas cepas de quistes, teniendo los nauplios un mayor contenido energético. A pesar de todo, aconsejamos utilizar agua de mar natural diluida con agua dulce hasta 5 ‰, complementándola con 2 g por litro de NaHCO<sub>3</sub> industrial. Es esencial incrementar las cantidades de tampón cuando se eclosionan grandes densidades de quistes (gran producción de CO<sub>2</sub>), con el fin de mantener los niveles de pH por debajo de 8.0.

La salinidad de los medios de eclosión puede ser fácilmente controlada con la ayuda de un densímetro o de un refractómetro.

## **Oxígeno**

A fin de lograr una eclosión máxima (tanto en tasa como en eficiencia), se recomienda mantener unos niveles de oxígeno por encima de 2 mg/l. Las tasas óptimas de aireación se controlan en función del tamaño del tanque y de la densidad de quistes incubados.

La tasa de aireación se puede determinar fácilmente midiendo el volumen de agua desplazado por las burbujas de aire en una probeta invertida durante un período de tiempo prefijado.

Cuando no es vital alcanzar los niveles aceptables de O<sub>2</sub>, no se recomienda el uso de piedras de aireación, ya que puede inducir la formación de espuma que podría atrapar los nauplios. La formación de espuma no será un problema si los quistes han sido lavados, después de tenerlos una hora en remojo, o si han sido previamente desinfectados.

## **Densidad de quistes**

En vista de los problemas técnicos encontrados en el mantenimiento de altos niveles de oxígeno sin formación de espuma o sin daños mecánicos a los nauplios

eclosionados, se recomienda no sobrepasar densidades de 5 gramos de quistes por litro, especialmente cuando se trabaja con grandes cantidades.

La presencia de una espuma persistente se puede reducir añadiendo unas gotas de algún agente antiespumante no tóxico como son polisiloxanos (siliconas), aceites (minerales, vegetales), y/o polímeros.

### **Iluminación**

La iluminación de los quistes, tras su hidratación, es esencial para lograr una eclosión máxima. Teniendo en cuenta las diferencias que se observan entre las cepas de *Artemia*, es aconsejable para obtener unos resultados óptimos, mantener una iluminación de aproximadamente unos 2000 lux en la superficie del agua. Este nivel de iluminación se logra, principalmente, durante el día en tanques transparentes puestos a la sombra en el exterior. Sin embargo y con el fin de independizarse de las fluctuaciones estacionales, es mejor situar los tanques de eclosión en el interior y proporcionándoles iluminación artificial, por ejemplo, con tubos fluorescentes instalados cerca de la superficie del agua.

### **Desinfección de los quistes**

Para la desinfección de la superficie externa de la cáscara de los quistes que puede estar cubierta con esporas de bacterias y hongos o estar contaminada con impurezas orgánicas se introducen los quistes. Es evidente que a una densidad elevada de quistes en el medio de eclosión a una temperatura alta, el desarrollo bacteriano puede ser considerable, lo que ocasiona que el medio de eclosión se ponga turbio dando como resultado, eventualmente, una mala eclosión. Por otro lado existen bacterias, que pueden ser perjudiciales para las larvas del predador y que pueden ser introducidas en el medio de cultivo de esas larvas junto con los nauplios de *Artemia* recién eclosionados (Sorgeloos *et al.* 1986).

## ANTECEDENTES

Las larvas de *Artemia* han sido utilizadas en bioensayos por numerosos laboratorios de todo el mundo, y los resultados en la determinación de la LC<sub>50</sub> han sido publicados para una serie de toxinas y químicos conocidos (Persoone y Wells, 1987). Es reciente su empleo en el campo de la ecotoxicología, el cual incluye investigaciones de la toxicidad en mezclas de químicos y muestras ambientales, evaluación de riesgos, screening agudo de sustancias químicas, productos alimenticios y farmacéuticos; además, el estudio de la transferencia trófica de contaminantes, ya que desde el punto de vista ecotoxicológico los invertebrados acuáticos juegan un importante papel en la transferencia de alimentos o flujo de energía dentro de la cadena alimentaria de estos ecosistemas, por lo que las alteraciones originadas por la presencia de un agente tóxico en uno de estos grupos pueden en algún grado, interferir con otros componentes interdependientes de la cadena trófica (Sánchez y Barahona, 1995).

### **Pruebas de toxicidad con Artemia.**

Martin Villamil *et al.* (2015) analizaron la toxicidad del metilparabeno (MeP) en *Artemia franciscana*, dada la presencia de este compuesto en zonas costeras y salinas mediterráneas. Para ello, se determinó la toxicidad aguda (CL<sub>50</sub>), así como el efecto crónico (9 días) tras la exposición a dos concentraciones subletales (0,05 y 0,1 mg/l) sobre la supervivencia y el crecimiento. Además, se evaluó el efecto sobre actividad ChE y GST y ratio de RNA/DNA. Los resultados señalan que *A. franciscana* es resistente al MeP (LC<sub>50-24 h</sub> = 131,4 mg/l). El metilparabeno afecta significativamente a la supervivencia y crecimiento en exposiciones crónicas a las concentraciones subletales ensayadas (0,05 y 0,1 mg/l). Además, estas causan alteraciones significativas de la actividad ChE, mientras que no se observa ningún efecto sobre la GST y la ratio RNA/DNA. Estos resultados indican que *A. franciscana* es resistente al MeP, aunque exposiciones crónicas (9 días) a concentraciones subletales sí producen cambios en supervivencia y crecimiento.

Arencibia Carballo *et al.* (2010) presentaron los resultados de la determinación de la LC<sub>50</sub> para 24 h de exposición mediante una prueba de toxicidad aguda en *Artemia franciscana*. Se determinó la toxicidad de los insecticidas piretroides, cipermetrina y permetrina reportándose los valores de 4,72 y 26,7 µg/ml de CL<sub>50</sub> para 24 h respectivamente.

Pacheco Gómez, (2011) determinó la CL<sub>50</sub> a 48 h del extracto metanólico de polvillo de carbón frente a larvas de *Artemia franciscana* a diferentes concentraciones del extracto (1.25, 2.5, 5, 10 y 20 mg/l), utilizándose como blanco dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 20 mg/l. Los resultados fueron procesados con el método Probit, obteniéndose valores de CL<sub>50</sub> de 8.89 y 4.20 mg/l tras exposiciones de 24 y 48 h respectivamente. Se concluyó que el polvillo de carbón es una sustancia potencialmente citotóxica al mostrar una CL<sub>50</sub> menor a 10 mg/l, indicando el grado de peligrosidad de dicho material, especialmente para los ecosistemas marinos y/o estuarinos y para el hábitat de *A. franciscana*.

### **Pruebas de toxicidad con otros organismos expuestos a diferentes combustibles.**

Prada Ríos y Zambrano, (2006) determinaron la susceptibilidad del molusco bivalvo *Anadara tuberculosa* a dos hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno y fluoranteno), clasificados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) debido a su potencial genotóxico y cancerígeno. Se realizaron pruebas de toxicidad aguda, durante 96 h y posteriormente, desarrollaron pruebas de bioacumulación por un período de 30 días. Las concentraciones letales (CL<sub>50</sub> 96 h) equivalen a 8.66 ppm para la prueba realizada con naftaleno y de 113.47 ppm correspondiente al fluoranteno, concluyendo que el hidrocarburo más tóxico fue el naftaleno. El análisis de los niveles de bioacumulación permitió evaluar el ciclo de absorción, retención y excreción de estos hidrocarburos en los organismos, observándose valores que oscilaron entre 0.16 y 3.42 ppm para el naftaleno, mientras para el fluoranteno el rango de acumulación fue entre 194.77 y 1011.30

ppm. Estos resultados evidencian una mayor capacidad de concentración para el fluoranteno, relacionada con sus características fisicoquímicas y de toxicidad.

Jinés-Muñoz, (2012) detectó cambios en el comportamiento de la tilapia nilótica *Oreochromis niloticus*, evaluó las alteraciones histopatológicas de las branquias e hígado y determinó la mortalidad de los peces ante diferentes concentraciones de Diésel. Elaboró un ensayo estático de 96 h con 3 dosis diferentes de Diésel (513, 2050 y 5125 mg/l). Determinó la mortalidad mediante el modelo chi cuadrado, donde la alta sensibilidad de los especímenes se registró a las 96 h, obteniendo como valores promedio de mortalidad de 5.3 (dosis baja), 6.3 (dosis media) y 7 (dosis alta). Mediante el programa estadístico SAS se analizó cuantitativamente las primeras lesiones histopatológicas más sobresalientes, presentando en branquias e hígado degeneración celular y vacuolización lipídica respectivamente con valores de 95.83 y 91.66 para la dosis de 5125 mg/l alcanzando el mayor daño a nivel de ambos órganos; mientras que telangiectasis en branquias y núcleos picnóticos en hígado no difirieron estadísticamente entre procedimientos.

Alayo y Iannacone, (2002) realizaron un ensayo con los rotíferos *Brachionus plicatilis rotundiformis* y *B. plicatilis hepatotomus*, usándolos como una herramienta para evaluar el ambiente acuático y empleando la fracción soluble en agua (FSA) de tres hidrocarburos: Petróleo crudo (PC), Diésel 2 (D<sub>2</sub>) y Diésel 6 (D<sub>6</sub>). Los valores de CL<sub>50</sub> determinados para *B. plicatilis rotundiformis* a 24 y 48 h de exposición de FSA de PC, D<sub>2</sub> y D<sub>6</sub> fueron 0.13, 0.04; 0.65, 0.14 y 4.20, 0.33 mg/L respectivamente. Los valores de CL<sub>50</sub> determinados para *B. plicatilis hepatotomus* a 24 y 48 h de exposición de FSA de PC, D<sub>2</sub> y D<sub>6</sub> fueron 0.23, 0.05; 1.36, 0.13 y 3.47, 1.01 mg/l, entre los 3 hidrocarburos evaluados. El orden de ecotoxicidad disminuyó a 24 y 48 h de exposición para ambas subespecies: petróleo crudo > Diésel 2 > Diésel 6. No encontraron diferencias en la sensibilidad de ambas subespecies de *Brachionus*.



## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de los diferentes tipos de combustibles (Magna, Premium, Diésel) mediante bioensayos de toxicidad aguda utilizando "*Artemia franciscana*" como organismo de prueba.

### Objetivos particulares

- Determinar la CL<sub>50</sub> de las gasolinas Magna, Premium y del Diésel para "*Artemia franciscana*".
- Determinar la mayor toxicidad de los tres combustibles usados para la "*Artemia franciscana*".
- Obtener las unidades de toxicidad, la LOEC y la NOEC.

## JUSTIFICACIÓN

Los derrames de hidrocarburos en el medio acuático se han ido incrementando debido a la demanda de los combustibles fósiles, y la ciudad de Chetumal no ha sido la excepción ya que ha existido registros de dos derrames en poco más de un año, la primera en abril del 2013 (Palma, 2013) y la segunda en mayo del 2014, ambos derrames fueron a causa de fugas en las tuberías que abastecen los dispensadores de gasolina de la empresa “Servimar” (Noticaribe, 2014) ubicada en la Esq. Av. Juárez, Av. Carmen Ochoa de Merino a menos de 300 m de la Bahía de Chetumal, y esta que es considerada desde el 24 de octubre de 1996 como un área natural protegida denominada “Santuario del Manatí” (Morales Vela y González, 1999), debido a la cercanía y a la dirección en que se encuentra este cuerpo de agua y dicha gasolinera, fue inevitable que los hidrocarburos involucrados en el derrame fueran a desembocar a la bahía o al manto freático, lo que posiblemente pudo haber causado daños adversos en la biodiversidad acuática.

Por lo que se pretende realizar bioensayos con *Artemia franciscana* para evaluar la toxicidad de las gasolinas mediante la determinación de la CL<sub>50</sub> a 48 h. La *Artemia franciscana* habita en la superficie de la columna de agua, lo cual indica que sería uno de los primeros organismos que se verían afectados durante el vertimiento de algún combustible, de igual manera es un organismo que se encuentra en el primer eslabón de la cadena alimenticia lo que nos hace pensar que si esta especie se ve afectada por este vertimiento de combustibles, las demás especies dependientes de estas se verán afectadas y así sucesivamente alcanzando la afectación de toda la cadena alimenticia, otro de los motivos de su empleo es la facilidad de obtenerla en forma de quistes, y su facilidad para eclosionarla y mantenerla con vida en el laboratorio, de igual manera se seleccionó debido a que esta especie es considerada como cosmopolita o sea que no es endémica de una región lo cual nos ayuda a darnos una idea global de lo que sucede con los derrames de hidrocarburos alrededor del mundo.

## METODOLOGÍA Y MATERIALES

El presente trabajo se dividió en dos partes para su realización, la primera parte estuvo compuesta por el método mediante el cual se logró la eclosión de la *Artemia franciscana*, posteriormente se determinó la CL<sub>50</sub> en la especie de prueba ya eclosionada.

### **Eclosión.**

#### **Desinfección y decapsulación de los quistes.**

Los quistes de *Artemia franciscana* se desinfectaron y decapsularon mediante el proceso siguiente:

Se colocó 500 ml de agua de garrafón (purificada) en un vaso de precipitado con capacidad de 1 l, se introdujo una manguera hasta el fondo del recipiente conectada a una bomba de aire y se dejó con aireación, posteriormente con ayuda de una balanza analítica se pesó 0.500 g de quistes de *Artemia franciscana* se agregó al vaso de precipitado y se dejó aireando un tiempo aproximado de una hora. Pasado ese tiempo se agregó 200 ml de cloro (cloralex) al recipiente que contenía las *Artemias*, y se dejó de esta manera durante 15 minutos. Este proceso sirvió para mejorar la eficacia en la eclosión de los quistes (**Fig. 9**). Después de transcurridos los 15 minutos se filtró el agua con las *Artemias* y el cloralex en una malla de 0.15 mm de abertura, una vez con los quistes retenidos en la malla, se lavó con abundante agua del glifo para la eliminación de restos del corion de los quistes así como también los residuos del cloro (hasta no sentir su olor).



**Figura 9.** Desinfección de los quistes de *Artemia* con cloro (Cloralex).

### **Proceso de eclosión de los quistes de *Artemia*.**

Se disolvieron 22 g de sal para acuario de la marca Gal en un litro de agua y se agitó hasta tener una solución homogénea, posteriormente la disolución salina (30 ‰) se vertió en una pera de destilación a la cual se le conectó una manguera en el fondo y se puso a airear con ayuda de la bomba de aire.

Una vez que se tuvo el agua en la pera de destilación se agregó los quistes que se encontraban retenidos en la malla, para realizar esto se colocó un embudo sobre la pera de destilación, esto evitó que los quistes caigan fuera de la pera de destilación, se colocó parte de la malla en el embudo y con ayuda de un gotero se lavó la malla

haciendo que los quistes cayeran dentro de la pera de destilación, una vez que se comprobó que la malla ya no contenía ni un quiste retenido, se retiró el embudo y la malla, fue cortado un pedazo de malla y se colocó en el orificio superior de la pera de destilación para evitar que algún tipo de basura u organismo cayera dentro de esta, una vez asegurada la pera de destilación se dejó el agua con los quistes de *Artemia* con aireación constante, iluminada con ayuda de una lámpara y a una temperatura de 26 a 30 °C durante 24 h para su eclosión (**Fig. 10**).



**Figura 10.** Artemiero para la eclosión de los quistes de *Artemia*.

Ya transcurridas las 24 h, aparecieron nauplios en estado I estos se quedaron en el embudo de separación durante 24 h más, con aireación constante e iluminación, a una temperatura de 26 a 30 °C, una vez transcurrido el tiempo se obtuvo los nauplios de *Artemia* en estado II y estos fueron los que se utilizaron para la

realización de los bioensayos, ya que eran de un tamaño recomendable para las exposiciones a los contaminantes (Martin Villamil *et al.* 2015; Arencibia Carballo *et al.* 2010 y Pacheco Gómez, 2011).

Se preparó 2 l más de la disolución salina al 30 ‰, igual como la que se preparó para eclosionar los quistes de *Artemia*, 1350 ml de esta sirvió para hacer las disoluciones de los contaminantes y los 650 ml restantes se utilizó para la separación de los organismos. Se interrumpió el flujo de aire de la pera de destilación donde se eclosionó a las *Artemias* y se esperaron 10 minutos para que los quistes que no eclosionaron se fueran al fondo de la pera (**Fig. 11**). Se colocó una lámpara cerca de la mitad del pera de destilación, esto atrajo a los nauplios y se facilitó la extracción de estos ya que estos son atraídos por la luz. Se extrajo los nauplios en estado II con ayuda de una pipeta de vidrio con capacidad de 10 ml y posteriormente se colocaron en un cristalizador, se repitió este proceso hasta haber trasladado la mayor cantidad posible de los nauplios en estado II.

Durante el periodo de eclosión se midió la temperatura con un termómetro de mercurio y la salinidad se midió con un refractómetro.



**Figura 11.** Quistes no eclosionados precipitados al fondo de la pera y nauplios recién eclosionados en la columna de agua.

### **Preparación de las muestras.**

Para la preparación de las muestras se utilizó 45 cajas Petri de cristal, las cuales se marcaron con ayuda de cinta y de un lapicero, de manera que se pudo diferenciar las 5 concentraciones con sus respectivas réplicas de cada combustible empleado.

Una vez marcadas las cajas Petri y preparada el agua se procedió a colocar 10 individuos de *Artemia* en cada una de las cajas y se le agregó 10 ml de la disolución salina. Esto se realizó con ayuda de la balanza analítica y de un gotero, cada una de las cajas Petri se colocó en la balanza y se le hizo un tareado, seguidamente se empezó a agregar los individuos de *Artemia* que se encontraban en el cristizador, una vez teniendo la cantidad de individuos se completó con el agua de mar artificial a 10 g, dando por hecho que en cada caja Petri había 10 *Artemias* con 10 ml de agua marina artificial.

Posteriormente se les agregó las diferentes disoluciones de cada combustible (Diésel, Magna y Premium).

Para el grupo que se usó como control, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, sin embargo, a estos no se les agregó ningún contaminante y fueron colocados en áreas alejadas de los bioensayos para evitar cualquier tipo de contacto con los contaminantes. Para esto se usó 30 organismos colocados en 3 diferentes cajas Petri.

### **Preparación de las disoluciones a emplearse.**

Con una micropipeta se vertió 5 cantidades de los 3 diferentes combustibles (1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 0.9 ml) en probetas de 100 ml de capacidad y posteriormente se completó y se llevó a 90 ml con ayuda de los 1350 ml de la disolución salina que se preparó anteriormente, una vez teniendo las concentraciones en las probetas, se vertió a peras de destilación con capacidad de 250 ml y se agitó fuertemente para mezclar los combustibles con el agua sin homogenizar, se tomó 10 ml de la disolución con ayuda de una pipeta de vidrio con capacidad de 10 ml, esto se realizó de manera rápida para evitar la separación de los compuestos de la disolución (gasolina y agua). Se depositó los 10 ml contenidos en las pipetas en las cajas Petri, siguiendo el orden de las etiquetas, debido a que cada caja Petri ya contenía 10 ml

de agua marina artificial mediante este proceso se obtuvo las concentraciones en porcentaje.

Una vez agregadas las concentraciones se monitoreó los bioensayos cada 4 h y se registraron el número de muertes por cada muestra (**Fig. 12**).



**Figura 12.** Bioensayos con los tres diferentes combustibles empleados.

Se realizó dos bioensayos exploratorios con los tres combustibles para determinar los intervalos de concentración para realizar los bioensayos definitivos, debido a que no hay antecedentes sobre estos organismos y estos contaminantes en específico.

#### **Determinación de la $CL_{50}$ mediante el método Probit.**

El método Probit, también conocido como Método de Unidades probabilísticas establecido por la Norma Mexicana NMX-AA-087-19975-SCFI, es utilizado para evaluar la relación dosis respuesta de un contaminante sobre un organismo.



### Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>)

Se calculó el log para cada concentración de la gasolina Magna, la gasolina Premium y el Diésel.

Posteriormente, se calculó el valor de Probit Empírico relacionando el porcentaje de mortalidad de cada concentración, con los valores obtenidos de la Norma Oficial Mexicana (Prueba de toxicidad aguda con *Daphnia magna* (crustáceo-cladóceros) método de prueba) **Tabla 5.**

**Tabla 5.-** Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

Se graficó los valores de Probit Empírico en el eje "Y" y los valores de log de la concentración en el eje de las "X", para los 3 contaminantes (gasolina Magna, gasolina Premium y Diésel). Posteriormente se realizó el ajuste de la línea por el método de mínimos cuadrados utilizando la ecuación de la recta:  $y = m x + b$ . Con este método se determinaron los valores de los parámetros  $m$  (pendiente) y  $b$  (ordenada al origen) de la recta que mejor se ajusta a los datos experimentales.

Para obtener el valor de log de la CL<sub>50</sub> de los 3 combustibles, se trazó una recta perpendicular al eje "Y" exactamente en el valor Probit igual a 5 (el valor correspondiente a un % de mortalidad de 50%) y en el punto de intersección con la recta ajustada se proyectó hacia el eje "X".

Con los valores de Log de la CL<sub>50</sub> de cada uno de los contaminantes, se procedió a determinar la concentración letal de los 3 combustibles, que elimina el 50% de los organismos (CL<sub>50</sub>) mediante la siguiente ecuación:

$$CL_{50} = \text{Antilog}_{10} x, (\text{en } y = 5)$$

### **Análisis estadístico.**

Para el análisis de los datos obtenidos de las pruebas de toxicidad aguda, se aplicó previamente un análisis exploratorio (estadística descriptiva), con la finalidad de conocer el comportamiento general de los datos. Posteriormente, se procedió a aplicar el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (combustible y concentración del combustible), con un diseño de bloques completo al azar, con el propósito de analizar las diferencias entre los tres tipos de combustibles evaluados y las diferencias entre las concentraciones, considerando como variable de respuesta la mortalidad de *Artemia franciscana* a 48 h de exposición a los combustibles. El nivel de confianza considerado para este trabajo fue del 95%. Para ello, se procedió a formular las siguientes hipótesis de trabajo:

- Hipótesis nula = H<sub>0</sub>: No se encontró suficiente evidencia para demostrar que la mortalidad es diferente entre los combustibles.
- Hipótesis alterna = H<sub>A</sub>: Existe diferencia significativa de la mortalidad entre los combustibles.
- Hipótesis nula = H<sub>0</sub>: No se encontró suficiente evidencia de la mortalidad entre las diferentes concentraciones de cada combustible.
- Hipótesis alterna = H<sub>A</sub>: Existe diferencia significativa de la mortalidad entre las diferentes concentraciones de cada combustible.

Al denotarse diferencias estadísticas se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el paquete Statistica versión 5.5®.

## RESULTADOS

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

#### Bioensayos exploratorios.

En el primer bioensayo exploratorio las concentraciones fueron demasiado altas (20, 10, 7.5, 5 y 2.5 %), por lo que el 100 % de los organismos se murieron (**Tabla 6**). En el segundo bioensayo exploratorio las concentraciones expuestas fueron más bajas (1.5, 1, 0.130, 0.01 y 0.001%), sin embargo no se obtuvieron las Cl<sub>50</sub> en todos los combustibles, ya que las concentraciones fueron bajas y sobrevivieron la mayoría de los organismos (**Tabla 7**). No obstante, los bioensayos exploratorios ayudaron a formular dos conclusiones importantes para la realización del bioensayo definitivo, la primera fue que la gasolina Magna fue la más tóxica de los tres combustibles y la segunda que la Cl<sub>50</sub> de los combustibles se encontraba en los rangos de 1.8 y 0.9%, por lo que para los bioensayos definitivos se utilizaron las concentraciones de 1.8, 1.6, 1.4, 1.2 y 0.9%.

**Tabla 6.-** Primer bioensayo exploratorio, concentración y porcentaje de muertos por combustible en 48h.

Concentración (%)	Porcentaje de mortalidad		
	Premium	Magna	Diésel
20	76.66	96.6	86.66
10	93.33	100	80
7.5	73.33	93.33	90
5	93.33	96.6	86.66
2.5	76.66	86.66	73.33

Control	0	0	0
---------	---	---	---

**Tabla 7.-** Segundo bioensayo exploratorio, concentración y porcentaje de muertos por combustible a 48 h.

Concentración (%)	Porcentaje de mortalidad		
	Premium	Magna	Diésel
<b>1.5</b>	53.33	63.33	50
<b>1</b>	36.66	46.66	33.33
<b>0.130</b>	23.33	30	26.66
<b>0.1</b>	16.66	16.66	20
<b>0.001</b>	13.33	13.33	13.33
Control	0	0	0

### **Bioensayos definitivos.**

Los valores obtenidos de las pruebas de toxicidad aguda de los tres combustibles muestran que no hubo mortalidad en los controles durante las 48 h que duró la prueba. Las concentraciones nominales de los combustibles de 1.4 % para Magna, 1.6 % para Premium y 1.8 % para Diésel, se presentó más del 50 % de mortalidad. El combustible Magna presenta el mayor porcentaje de mortalidad en comparación a los otros combustibles (**Tabla 8**).

**Tabla 8.-** Resultados obtenidos durante la realización del bioensayo con *Artemia franciscana* con la toxicidad de los tres combustibles.

Concentración (%)	Organismos expuestos.	Gasolina Magna		Gasolina Premium		Diésel	
		Organismos muertos.	Mortalidad (%)	Organismos muertos.	Mortalidad (%)	Organismos muertos.	Mortalidad (%)
1.8	30	29	96.66	23	76.66	20	66.66
1.6	30	25	83.33	20	66.66	14	46.66
1.4	30	19	63.33	14	46.66	11	36.66
1.2	30	14	46.66	10	33.33	9	30
0.09	30	12	40	7	23.33	7	23.33
Control	30	0	0	0	0	0	0

El Probit Empírico para la gasolina Magna de un porcentaje de mortalidad de 97, 83, 63, 47 y 40% fueron de 6.88, 5.95, 5.33, 4.92 y 4.75 respectivamente (**Tabla 9**), para la gasolina Premium para un porcentaje de mortalidad de 77, 67, 47, 33 y 23% fueron de 5.74, 5.44, 4.92, 4.56 y 4.26 respectivamente (**Tabla 10**) y para el Diésel de un porcentaje de mortalidad de 67, 47, 37, 30 y 23% fueron de 5.44, 4.92, 4.67, 4.48 y 4.26 respectivamente (**Tabla 11**).

**Tabla 9.-** Datos de toxicidad para gasolina Magna en *Artemia franciscana* para el Método Probit.

Concentración (%)	Log de la concentración.	Nº de organismos.	Mortalidad observada.	% mortalidad.	Probit Empírico.
1.8	0.25	30	29	96.66	6.88
1.6	0.20	30	25	83.33	5.95
1.4	0.14	30	19	63.33	5.33
1.2	0.07	30	14	46.66	4.92
0.9	-0.04	30	12	40	4.75

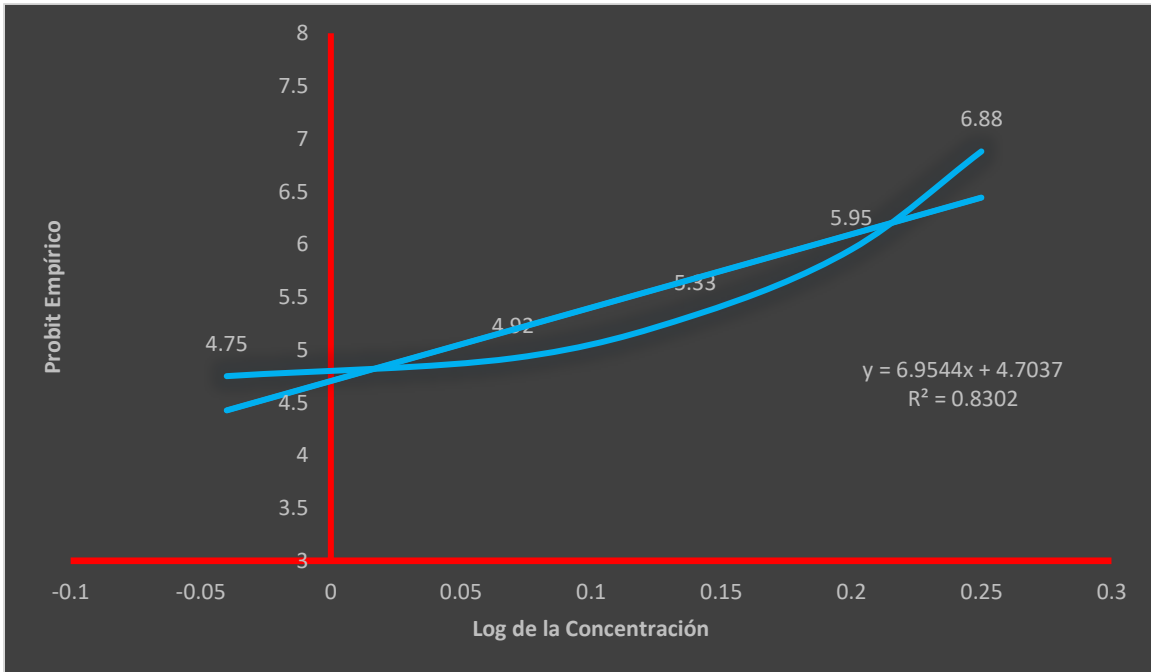
**Tabla 10.-** Datos de toxicidad para gasolina Premium en *Artemia franciscana* para el Método Probit.

Concentración (%)	Log de la concentración.	N <sub>o</sub> de organismos.	Mortalidad observada.	% mortalidad.	Probit Empírico.
1.8	0.25	30	23	76.66	5.74
1.6	0.20	30	20	66.66	5.44
1.4	0.14	30	14	46.66	4.92
1.2	0.07	30	10	33.33	4.56
0.9	-0.04	30	7	23.33	4.26

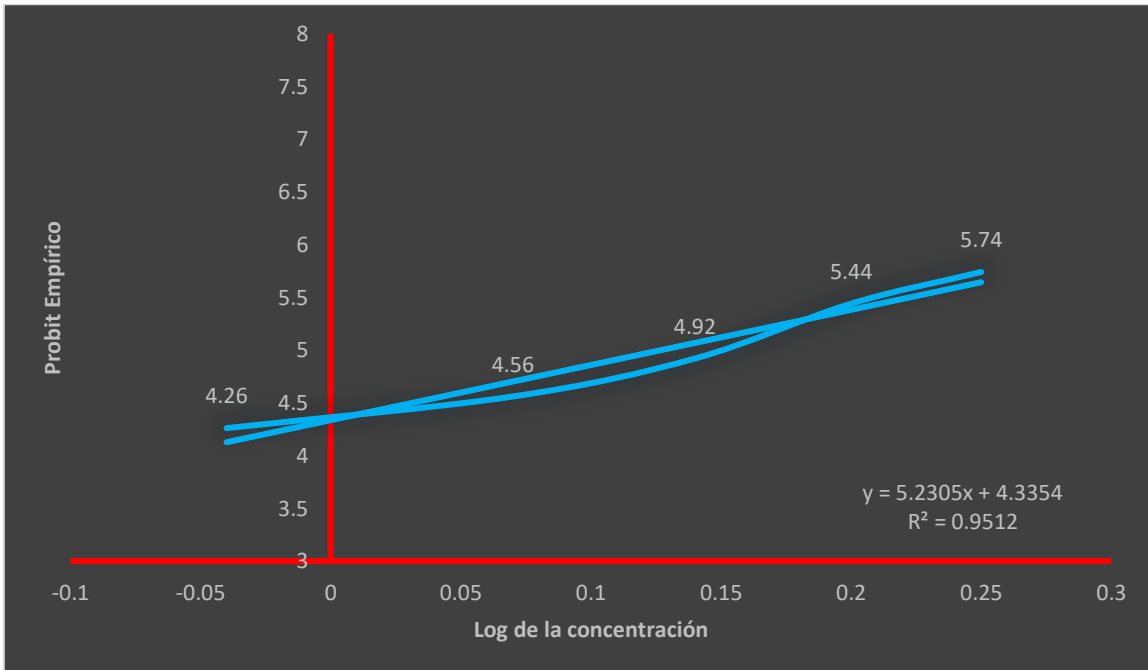
**Tabla 11.-** Datos de toxicidad para Diésel en *Artemia franciscana* para el Método Probit.

Concentración (%)	Log de la concentración.	N <sub>o</sub> de organismos.	Mortalidad observada.	% mortalidad.	Probit Empírico.
1.8	0.25	30	29	66.66	5.44
1.6	0.20	30	25	46.66	4.92
1.4	0.14	30	19	36.66	4.67
1.2	0.07	30	14	30	4.48
0.9	-0.04	30	12	23.33	4.26

El valor de la pendiente (m) para la gráfica de la gasolina Magna fue 6.9544 (**Fig. 13**), el de la gasolina Premium fue 5.2305 (**Fig. 14**) y para Diésel fue 3.7417 (**Fig. 15**) estos valores se utilizaron para el cálculo del Probit Calculado (PC).

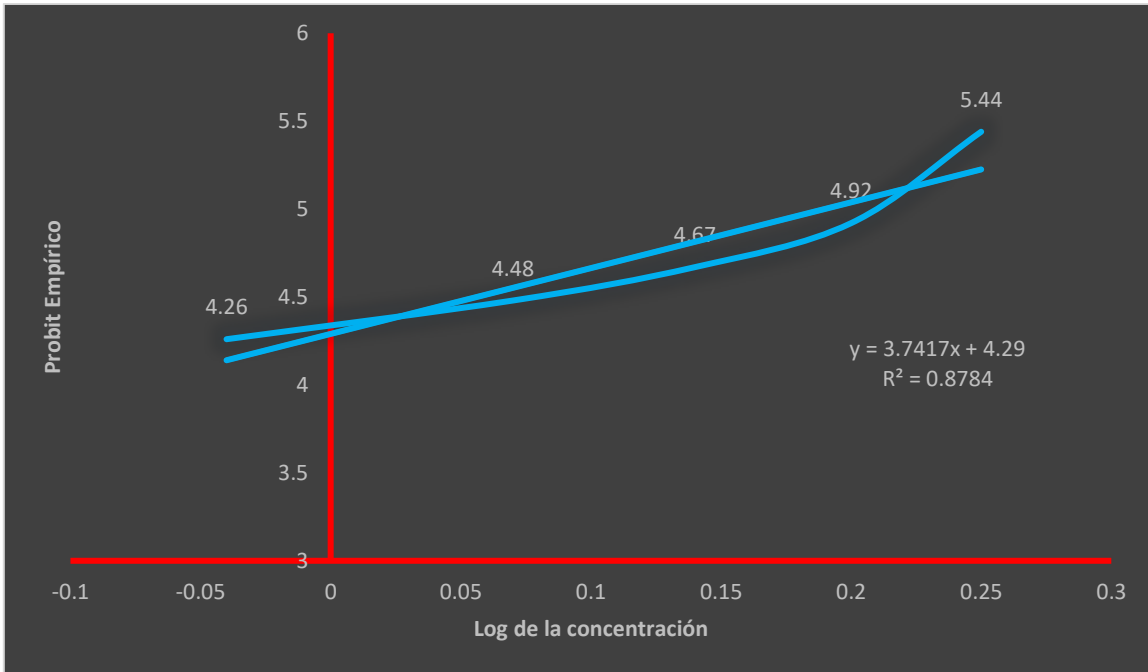


**Figura 13.-** Ajuste de la recta por el método de mínimos cuadrados para gasolina Magna.



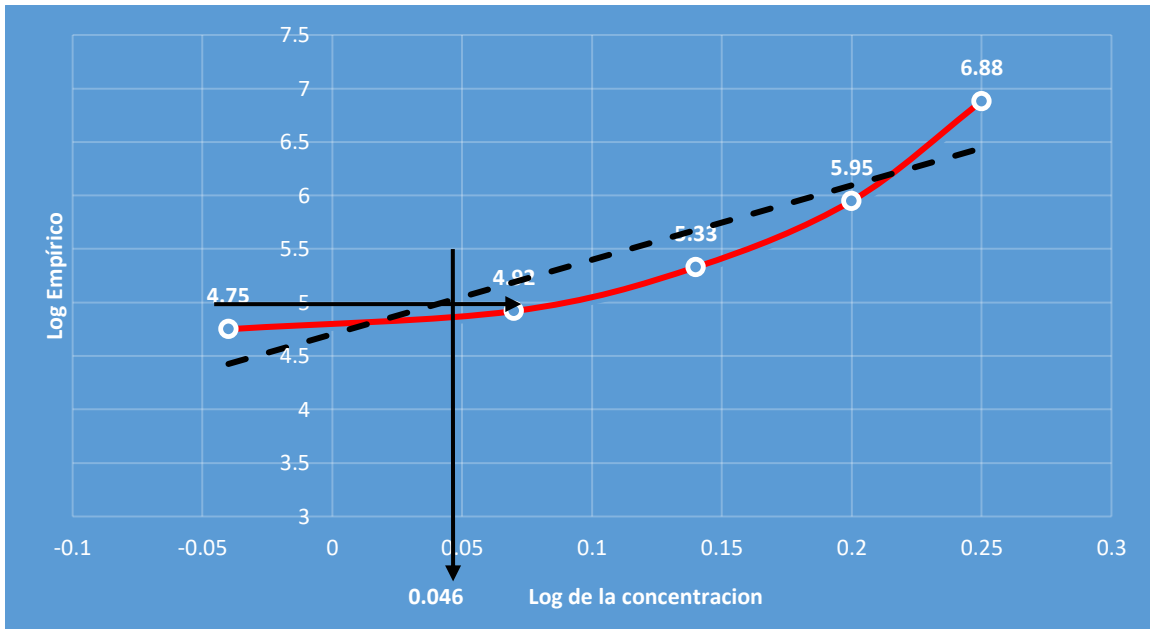
**Figura 14.-** Ajuste de la recta por el método de mínimos cuadrados para gasolina Premium.



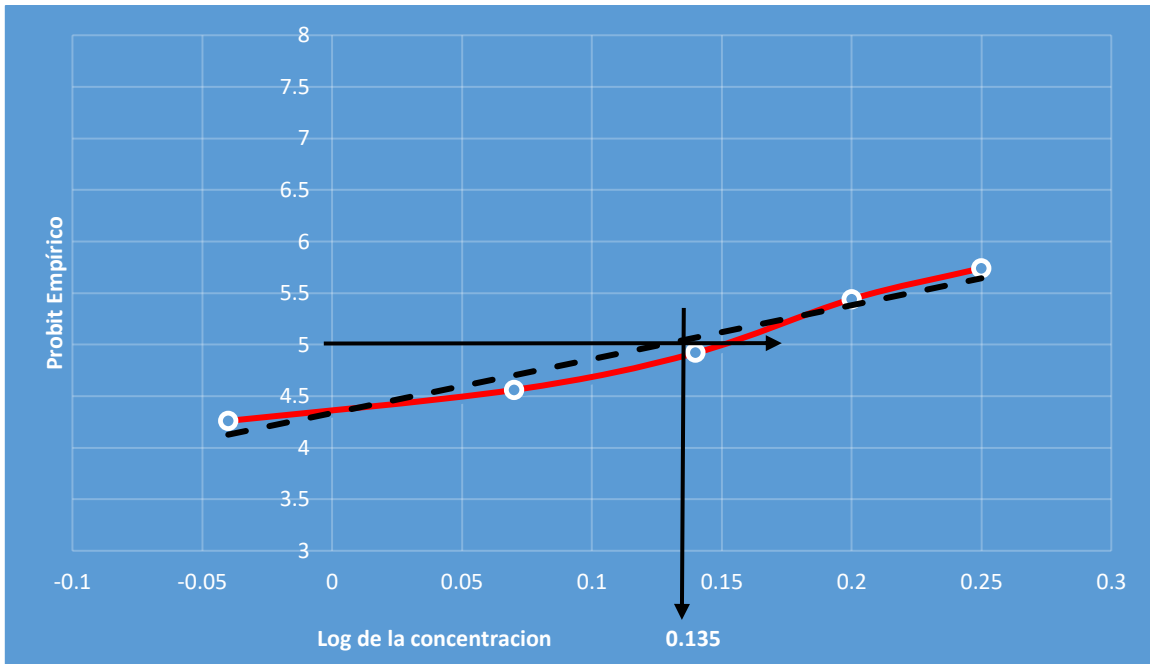


**Figura 15.-** Ajuste de la recta por el método de mínimos cuadrados para Diésel.

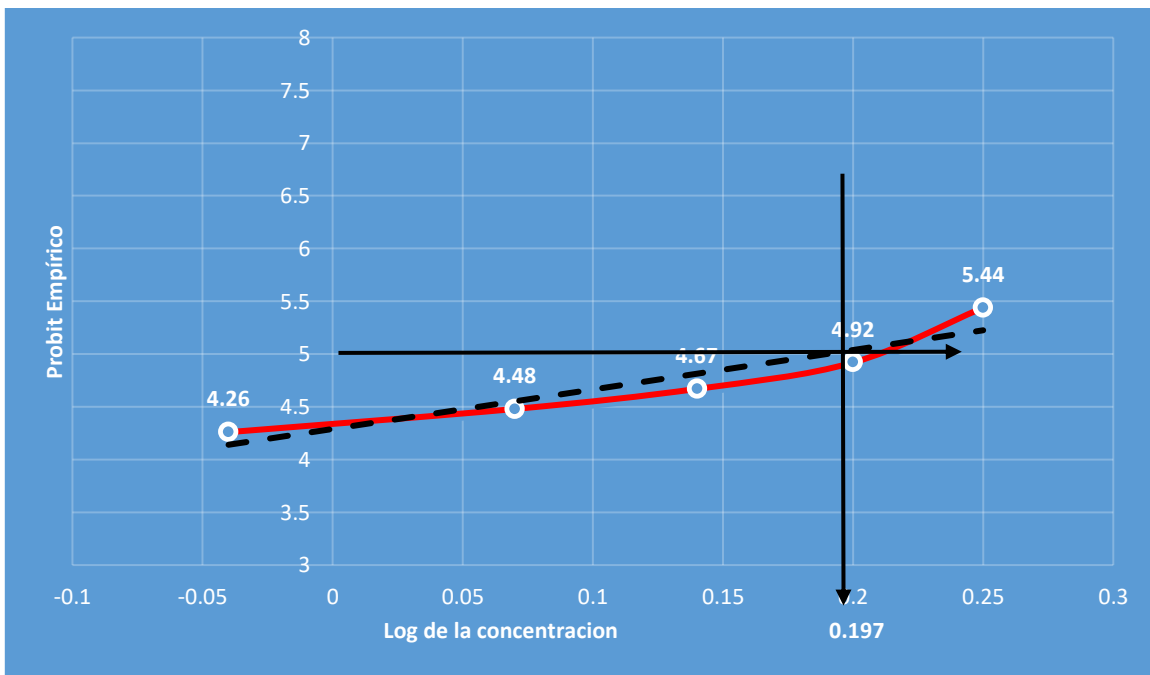
El valor del log de la CL<sub>50</sub> para gasolina Magna fue de 0.046 (**Fig. 16**), el de la gasolina Premium fue 0.135 (**Fig. 17**) y para el Diésel fue 0.197 (**Fig. 18**).



**Figura 16.-** Probit empírico contra Log de la concentración para la gasolina Magna.



**Figura 17.-** Probit empírico contra Log de la concentración para la gasolina Premium.



**Figura 18.-** Probit empírico contra Log de la concentración para el Diésel.

Con los valores de Log de la concentración de cada uno de los contaminantes, se procedió a determinar la concentración letal de los 3 combustibles, que elimina el 50 % de los organismos (CL<sub>50</sub>) mediante la siguiente ecuación:

$$CL_{50} = \text{Antilog}_{10} x, (\text{en } y = 5)$$

Simplificando:

$$x = \log CL_{50} = 0.046$$

Por lo tanto:

$$CL_{50} = \text{Antilog} (0.046) = 1.11 \%$$

El valor de 1.11 % representa la concentración letal media de la gasolina Magna en *Artemia franciscana*.

Simplificando:

$$x = \log \text{ de la concentración} = 0.135$$

Por lo tanto:

$$CL_{50} = \text{Antilog} (0.135) = 1.36 \%$$

El valor de 1.36 % representa la concentración letal media de la gasolina Premium en *Artemia franciscana*.

Simplificando:

$$x = \log \text{ de la concentración} = 0.197$$

Por lo tanto:

$$CL_{50} = \text{Antilog} (0.197) = 1.57 \%$$

El valor de 1.57 % representa la concentración letal media del Diésel en *Artemia franciscana*.

### Resultados del Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos del análisis exploratorio de los datos de mortalidad (variable dependiente) de los tres combustibles utilizados en este bioensayo se muestran en la siguiente tabla:

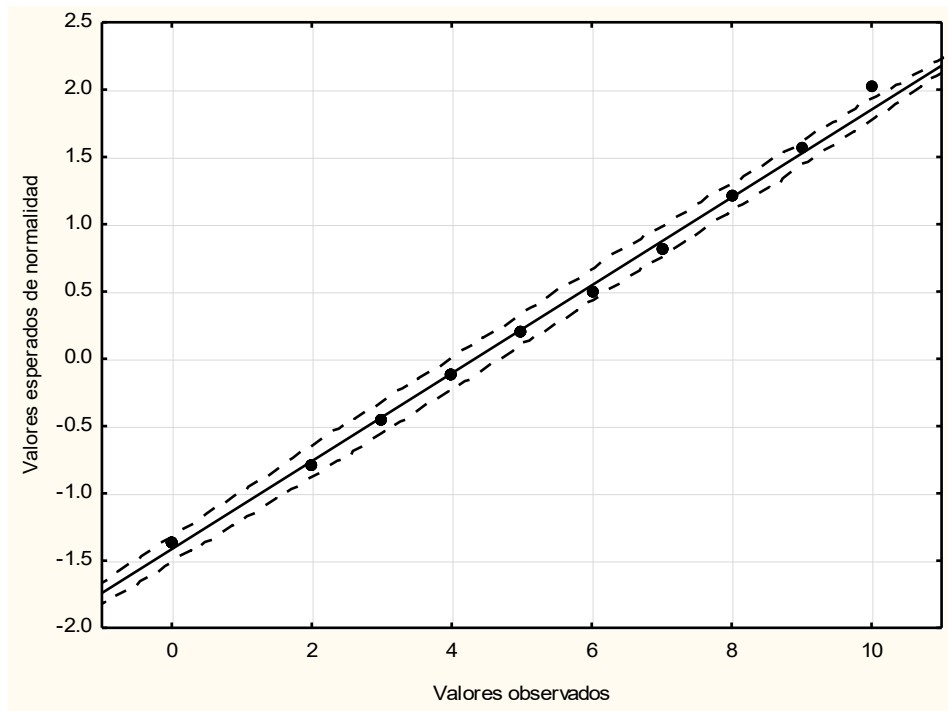
**Tabla 12.-** Estadística descriptiva de la variable dependiente.

*Variable dependiente: Muertos*

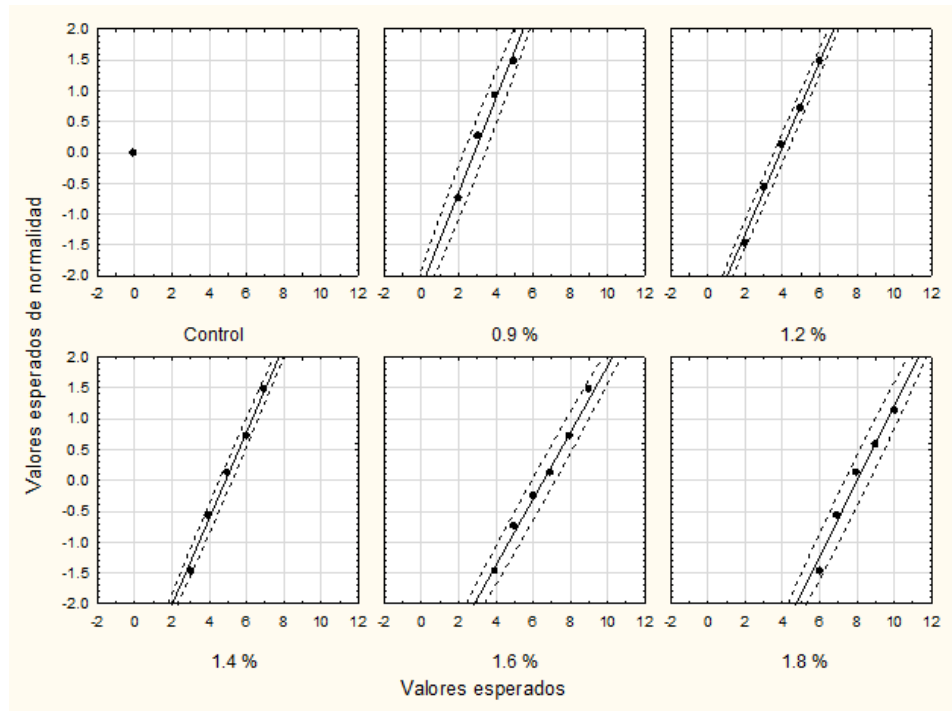
<i>Número de valores.</i>	54
<i>Media.</i>	4.37
<i>Límite de confiabilidad inferior 95%.</i>	3.59
<i>Límite de confiabilidad superior 95%.</i>	5.15
<i>Mediana.</i>	4
<i>Mínimo.</i>	0
<i>Máximo.</i>	10
<i>Amplitud.</i>	10
<i>Varianza.</i>	8.12
<i>Dev. Std.</i>	2.85
<i>Error Std.</i>	0.39

Al analizar los resultados obtenidos de la estadística descriptiva **Tabla 12**, se encontró que la variable dependiente Muertos presenta una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov  $Z = 0.765$ ,  $p = 0.602$ , **Fig.19**). En cuanto al comportamiento normal de la variable dependiente con relación a los diferentes niveles de concentración y a las tres marcas de combustibles (Magna, Premium y Diésel) a los que fueron expuestos los organismos, los valores recaen dentro de la elipse de confianza del 95%. Esto confirma que los valores de la variable dependiente tienen

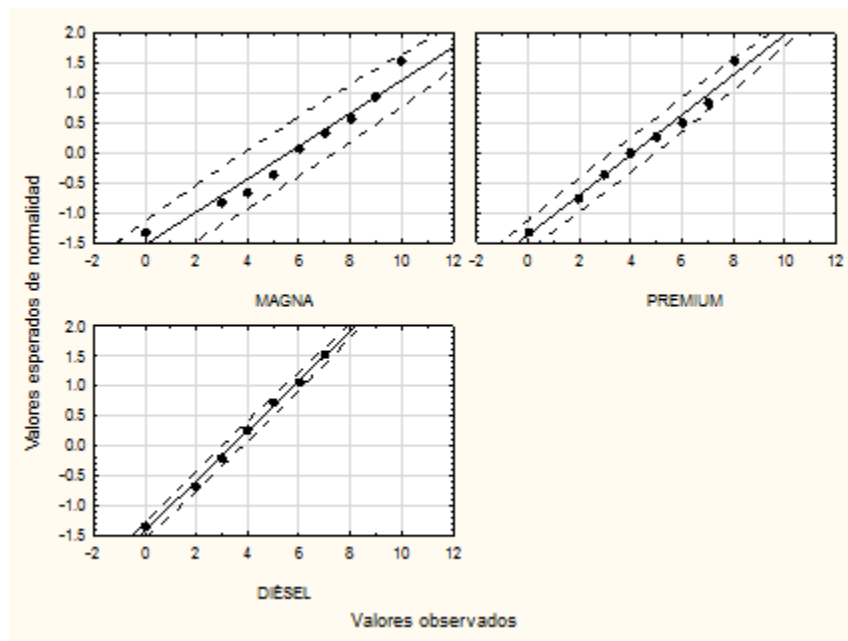
una distribución normal (**Fig.20 y 21**). La condición que se necesita para efectuar el tipo de análisis correcto; paramétrico o no paramétrico, es a partir del comportamiento de los datos, en nuestro caso se aplicó un ANOVA paramétrica debido a que nuestros datos se comportaron normales.



**Figura 19.-** Normalidad de la variable dependiente y elipse de confianza del 95 %.

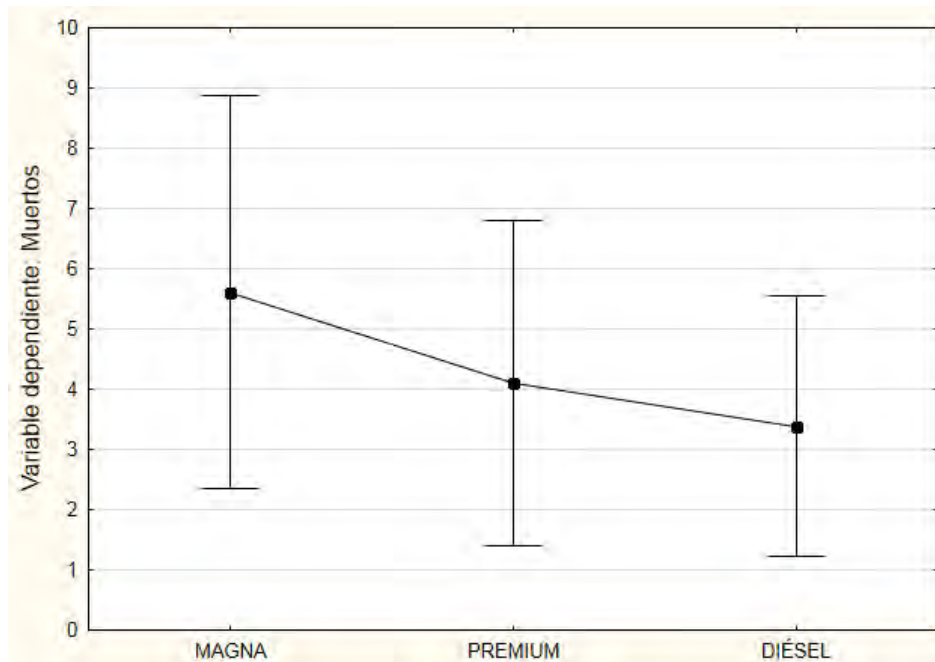


**Figura 20.-** Distribución normal de la variable dependiente clasificada por diferentes niveles de concentración.

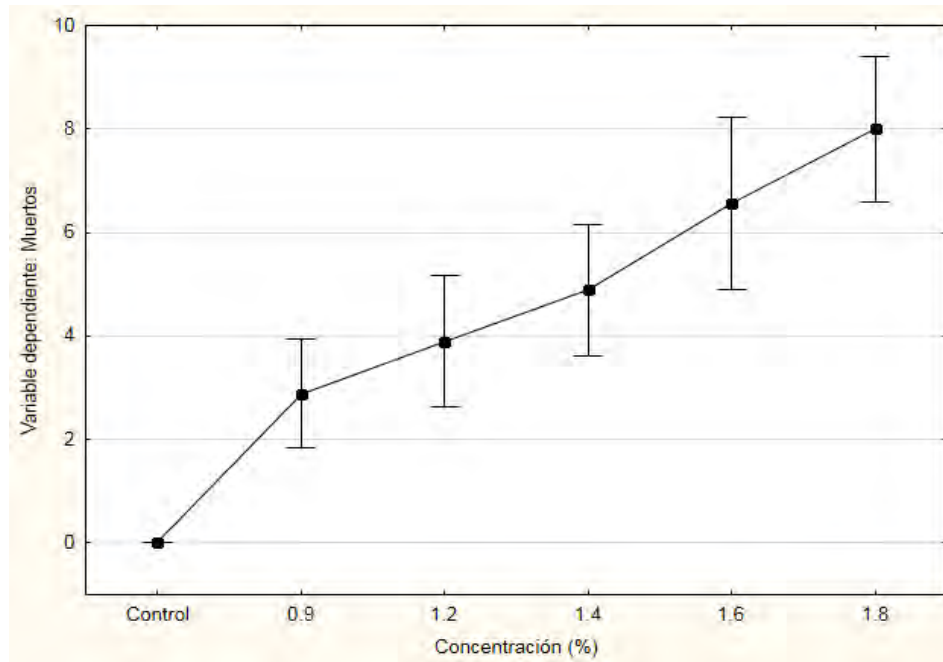


**Figura 21.-** Distribución normal de la variable dependiente clasificada por combustibles.

Al aplicar la prueba de ANOVA, no se encontraron diferencias significativas entre la mortalidad obtenida en los tres tipos de combustibles ( $F = 3.0692$ ;  $p > 0.05$ ) (**Fig. 22**). Además, se logró analizar de forma general el comportamiento de las concentraciones en los tres tipos de combustibles, el análisis de varianza demostró que sí existen diferencias significativas entre la mortalidad de los diversos niveles de concentración ( $F = 47.1122$ ;  $p < 0.05$ ) (**Fig. 23**). Por último, no se encontraron diferencias significativas ( $F = 0.0153$ ;  $p > 0.05$ ) entre las repeticiones en los tres combustibles.



**Figura 22.-** Relación entre el tipo de combustible y la mortalidad.



**Figura 23.-** Relación general entre la concentración y la mortalidad en los tres combustibles.

### **Determinación de la LOEC y NOEC.**

Para la determinación de la concentración más alta de tóxico empleado en un bioensayo que no causa un efecto estadísticamente significativo mortalidad, alteraciones de la reproducción, cambios comportamentales (NOEC) y la concentración más baja de tóxico empleado en un bioensayo que causa un efecto estadísticamente significativo mortalidad, alteraciones de la reproducción, cambios comportamentales, etc. (LOEC), se utilizó la **Tabla 7** en la cual se encuentran los datos obtenidos durante los ensayos exploratorios con las concentraciones más bajas.



**Tabla 7.-** Segundo bioensayo exploratorio, concentración y porcentaje de muertos por combustible.

Concentración (%)	Porcentaje de mortalidad		
	Premium	Magna	Diésel
<b>1.5</b>	53.33	63.33	50
<b>1</b>	36.66	46.66	33.33
<b>0.130</b>	23.33	30	26.66
<b>0.1</b>	16.66	16.66	20
<b>0.001</b>	13.33	13.33	13.33
Control	0	0	0

Se determinó que la LOEC se encuentra entre el 0.130 y el 1 % y la NOEC se encontró a partir de la concentración de 0.01%.

## DISCUSIONES

Existen diversas herramientas para evaluar el efecto de los contaminantes sobre los componentes biológicos de los sistemas acuáticos una de ellas son los bioensayos de ecotoxicidad (Rodríguez *et al.* 1993). Estos ensayos han sido recomendados por la Environmental Protection Agency (EPA, 1985), como un complemento ideal de las técnicas analíticas empleadas en la evaluación ambiental. De los muchos contaminantes que entran al mar, el petróleo es considerado por algunos como el que tiene mayor potencial para alterar el medio natural. Informes sobre efectos de numerosos derrames de crudo en el ambiente marino indican la necesidad de más información básica sobre cómo el petróleo crudo y sus componentes afectan a los organismos en los diferentes niveles de la cadena trófica en los ecosistemas acuáticos (Michalik y Gordon, 1971). Muchos estudios han indicado que la contaminación por petróleo es potencialmente peligrosa para los organismos vivientes a todos los niveles (D' Cruz *et al.* 1988).

En los bioensayos comúnmente se usan organismos de la red trófica acuática, como peces (Segner *et al.*, 1994), artrópodos (Persoone *et al.*, 1994; Idoniboye-Obu, 1997), microalgas (Iannacone y Gutiérrez, 1999), de igual manera se utilizan especies que tienen una gran relevancia ecológica, bajo este contexto, sin duda uno de los grupos más importantes son los organismos zooplanctónicos, ya que conforman una de las comunidades más amplias y variadas dentro de los sistemas acuáticos, representados desde los protozoarios hasta los vertebrados en sus diferentes estados larvarios (Ventura López, 2008).

El potencial de los invertebrados como organismos bioindicadores en ensayos de toxicidad está ampliamente demostrado, la ventaja principal de emplear invertebrados en investigación ecotoxicológica es la de mostrar los efectos del tóxico a nivel individual y sus consecuencias posteriores para niveles superiores de organización biológica - población y comunidad (Widdows, 1995). Por tales razones las *Artemias* juegan un papel importante en el proceso ecológico debido a que contribuyen en la producción secundaria como alimento de invertebrados depredadores, incluyendo larvas de crustáceos.

Actualmente, existe poca bibliografía especializada del impacto de los combustibles sobre los recursos hídricos, siendo los bioensayos de toxicidad un complemento ideal en evaluaciones de impacto ambiental (Iannacone y Alvarino, 1997). Entonces *Artemia franciscana* al ser sensible a la contaminación, puede ser considerada como una especie adecuada para evaluar el efecto de los combustibles sobre los ecosistemas acuáticos.

La evaluación de la toxicidad de los tres combustibles (Magna, Premium y Diésel) en *Artemia franciscana*, ha resultado de gran interés, ya que los datos del presente estudio muestran que los 3 combustibles son altamente tóxicos en esta especie. Lo anterior, significa que estos combustibles sin lugar a dudas causaran efectos adversos a los organismos del sistema acuático, en especial a los organismos que se encuentran en la columna de agua. Esto coincide con otros estudios ecotoxicológicos (Prada Ríos y Zambrano, 2006; Jines Muñoz, 2012; Alayo y Iannacone, 2002) que se han realizado para medir el efecto de los hidrocarburos, los cuales indican que estos son peligrosos para la fauna acuática.

El combustible con mayor toxicidad de acuerdo al valor de la CL<sub>50</sub> a 48 h en *Artemia franciscana* es: la gasolina Magna con 1.11%, posteriormente le siguió la gasolina Premium con 1.36 % y por último el Diésel con una CL<sub>50</sub> de 1.57%. Trabajos realizados con Petróleo crudo indican la gran toxicidad que presenta este hidrocarburo frente a los organismos marinos (Phan *et al.* 1994; Tsvetnenko, 1998; Reish *et al.* 1999); a su vez que el Diésel es menos tóxico (Reish, 1993) debido a la composición química que presenta, sustento que verifica los resultados obtenidos en esta investigación.

Los combustibles evaluados están compuestos por diversas sustancias y obtenidas por diferentes procesos y que uno de los combustibles sea más tóxico que otro, puede ser resultado de esto, al observar la Tabla 2, podemos darnos cuenta de que la gasolina Magna contiene más benceno que los otros dos combustibles, según Figueruelo y Marino (2001), los hidrocarburos aromáticos, concretamente el benceno y tolueno, son los más tóxicos; Cotoruelo (1995) y Wauquier (2004) manifiestan que el benceno presenta una solubilidad alta en el agua, lo cual podría

explicar su alta toxicidad, ya que debido a que no se volatiliza y es soluble en el agua permanece en el ecosistema, ocasionando graves daños en los organismos, en este caso a las *Artemias franciscanas*.

En el presente estudio, la mortalidad obtenida fue contrastada con un ANOVA al 95% de confiabilidad, el cual, no mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tres tipos de combustibles, sin embargo, en los diferentes niveles de concentración fue lo contrario. Esto significa que el comportamiento de la mortalidad de *Artemia franciscana* fue similar en los tres casos, pero con respecto a los diferentes niveles de concentración se puede decir que el efecto fue severo conforme se aumentó la concentración. En el caso de las repeticiones no existieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

Los resultados de los bioensayos pueden ser modificados por parámetros físicos como la temperatura, la concentración de oxígeno y parámetros químicos como el pH (Malagrino y Almeida, 1987). En el presente estudio los niveles de temperatura y pH presentaron variaciones ( $26 \pm 1$  °C y para el pH 7.35-9) y solamente se mantuvo constante la salinidad (30 ppm), debido a que fue el único parámetro controlado. Es probable que el efecto tóxico de los combustibles sea el causante de elevar las concentraciones de pH que aumentaron durante los bioensayos, lo cual sin duda elevó el estrés en los organismos debido a estos viven en un pH menor a 8.0 (Sorgeloos *et al.* 1986).

## CONCLUSIONES

- Los bioensayos ecotoxicológicos mostraron que *Artemia franciscana* fue sensible a los diferentes combustibles expuestos en un periodo de 48 h, esta especie puede ser utilizada como herramienta para la evaluación de riesgos ambientales y como indicador de la calidad del agua.
- El combustible con mayor toxicidad de acuerdo a la CL<sub>50</sub> a 48 h en *Artemia franciscana* es: la gasolina Magna con 1.11%, posteriormente le siguió la gasolina Premium con 1.36 % y por último el Diésel con una CL<sub>50</sub> de 1.57%.
- Se concluye que los tres combustibles son extremadamente tóxicos para *Artemia franciscana*. Por lo tanto, con ayuda de las pruebas ecotoxicológicas realizadas, se demuestra que los derrames, fugas o vertimientos de estos combustibles, representa un potencial daño al ambiente, ocasionando así un grave problema de contaminación de los medios acuáticos.
- La mortalidad obtenida fue contrastada con un ANOVA al 95% de confiabilidad, el cual, no mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tres tipos de combustibles sin embargo en los diferentes niveles de concentración fue lo contrario. Esto significa que el comportamiento de la mortalidad de *Artemia franciscana* fue similar en los tres casos, pero con respecto a los diferentes niveles de concentración se puede decir que el efecto fue severo conforme se aumentó la concentración.
- Los combustibles derivados del petróleo representan un peligro para la vida acuática, ya que si estos son vertidos a un cuerpo de agua tienen la probabilidad de que causen daño, particularmente en aquellas zonas donde se produce, se almacena o se transportan estos combustibles, como es el caso de la zona litoral urbana de la ciudad de Chetumal en la que se han detectado fugas en los ductos que trasladan los combustibles desde su

dispositivo de almacenaje hacia las máquinas dispensadoras en las gasolineras.

## RECOMENDACIONES.

- Se recomienda el empleo de *Artemia franciscana* en bioensayos de ecotoxicidad debido a su fácil manejo, su sensibilidad, su fácil obtención, porque al ser producidas en el laboratorio se pueden determinar sus etapas de vida y por ser una especie de gran importancia ecológica.
- Utilizar organismos de prueba de gran importancia ecológica de la Bahía de Chetumal como: especies de peces, crustáceos, moluscos y plantas acuáticas en los bioensayos, con la finalidad de generar más información ecotoxicológica con los mismos tóxicos evaluados en este trabajo.
- Evaluar el efecto en *Artemia franciscana* con otros contaminantes del agua, de preferencia aquellos de uso común en las actividades agrícolas de la región, sobre todo aquellos cuyo efecto no ha sido documentado (fertilizantes, plaguicidas organoclorados, herbicidas y aceites).
- Realizar bioensayos de tipo crónico o subletal, para conocer más sobre los efectos de los combustibles obtenidos del petróleo sobre sistemas (nervioso, respiratorio, inmune, circulatorio y excretor), órganos, biomasa, crecimiento, comportamiento, reproducción y bioacumulación.
- Evaluar contaminantes en cada etapa de vida de *Artemia franciscana* desde nauplio hasta la etapa adulta.
- Debido a que los combustibles se componen de diversas sustancias, se recomienda realizar la evaluación ecotoxicológica de cada uno de los compuestos que conforman los combustibles para tener una idea más cercana de porque un combustible de los evaluados (Magna, Premium y Diésel) es más tóxico que el otro.

- Para bioensayos ecotoxicológicos con *Artemia franciscana* se recomienda utilizar la metodología empleada en este trabajo para la eclosión de los quistes de *Artemia franciscana*, debido a que en este trabajo se comprobó que dicha metodología resulta ser muy sencilla y eficaz.



## REFERENCIAS

- Abreu-Grobois, F.A.; Beardmore, J.A. 1980. International Study on Artemia. II. Genetic characterization of Artemia populations an electrophoretic approach: 133 - 146. In: The brine shrimp Artemia. Vol. 1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone, G.; Sorgeloos, P.; Roels, O.; Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, 345 pp.
- Alayo, M.; Iannacone, J. 2002. Ensayos ecotoxicológicos con petróleo crudo, Diésel 2 y Diésel 6 con dos subespecies de *Brachionus plicatilis* Müller, 1786 (Rotifera Monogonta)
- Arencibia Carballo, G.; Tizol Correa, R.; Rodríguez, R. 2010 Toxicidad de nauplios de Artemia franciscana a dos piretroides de uso comercial: Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras Enero-diciembre, 2010, vol. 27, No. 1, ISSN 0138-8452, pp. 47-53
- Barigozzi, C. 1974. *Artemia*: A survey of its significance in genetic problems: 221–252. In: Evolutionary Biology. Vol. 7. Dobzhansky, T.; Hecht, M.K.; Steere, W.C. (Eds). Plenum Press, New York, USA, 314 pp.
- Bowen, S.T.; Sterling, G. 1978. Esterase and malate dehydrogenase isozyme polymorphisms in 15 Artemia populations. Comp. Biochem. Physiol., 61B: 593–595.
- Bowen, S.T.; Durkin, J.P.; Sterling, G.; Clark, L.S. 1978. Artemia hemoglobins: genetic variation in parthenogenetic and zygogenetic populations. Biol. Bull., 155: 273–287.
- Bozo, Lorelei, Fernández, Milagro, López, Mariela, Reyes, Rosa, y Suárez, Paula. (2007). Biomarcadores de contaminación química en comunidades microbianas. *Interciencia*, 32(1), 8-13.
- Catillo Hernández P., Caballero Mata P., Mendoza Domínguez A. 2012. Análisis de las propiedades Fisicoquímicas de gasolina y Diésel mexicanos reformulados con etanol.

- Clark, L.S.; Bowen, S.T. 1976. The genetics of *Artemia salina*. VII. Reproductive isolation. J. Hered. , 67(6): 385–388.
- Cotoruelo, L. 1995. Orígenes de la Contaminación Marina. En: Lucena, J. y Pérez, A. Aulas del Mar. Contaminación Marina: Bases Ecológicas, Evaluación de Impactos y Medidas Correctoras. Edit. Universidad de Murcia. 456 pp.
- Croghan, P.C. 1958. The osmotic and ionic regulation of *Artemia salina* (L.). J. exp. Biol., 53(1): 219–233.
- D' cruz, L.; Torres, J. y Gómez, J. 1988. Efecto del Crudo Venezolano (BCF-24) sobre el crecimiento de la diatomea marina tropical *Chaetoceros gracilis* (Thomas, 1966). Rev. Pacífico Sur (Número Especial), 171-178.
- Dorn, P., R. Compernelle y C.H. Meyer, Ch. 1991. Aquatic Hazard assessment of the toxic fraction from the effluent of a petrochemical plant. Environ. Toxicol. Chem. 10: 691\_703.
- EPA. (1985). Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. En W. C. Peltier W.
- Fernández Espinosa A. J., 2001. Especiación química y física de metales en la materia particulada atmosférica: aplicación al estudio de la contaminación ambiental de la ciudad de Sevilla. Universidad de Sevilla, Fundación Focus-Abengoa. 73/562 pp.
- Figueruelo, J. y Marino, M. 2001. Química Física del Medio Ambiente. Ed. Reverté Ed. México. 335 p.
- Gámez Rojas, C. M., Ramirez Riveros, E. J. (2008). Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50-48</sub>) del herbicida roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. Bogotá, Colombia.
- Gilchrist, B.M. 1954. Haemoglobin in *Artemia*. Proc. R. Soc., Series B, 143: 136–146.

- Guerrero Hernández., J. 2014. Atención de derrames de petróleo crudo en el Golfo de México. México D. F.
- Hernández Yacomelo, M., 2014. Riesgo toxicológico en personas expuestas, a suelos y vegetales, con posibles concentraciones de metales pesados, en el sur del atlántico, Colombia. Medellín, Colombia. 115 pp.
- Hill John William, Kolb Doris K. 1999. Química para el Nuevo Milenio. Prentice Hall, México. Octava edición. 704 paginas.
- Iannacone J. y Alvariño L., (1997). Ecotoxicidad aguda del zinc sobre el "guppy" *Poecilia reticulata*. *Wiñay Yachay*. 2(3):63-73.
- Iannacone, J., L. Alvariño y W. Dale. 1998. Pruebas ecotoxicológicas como herramientas para la evaluación del impacto ambiental. *Bol. De Lima (Perú)*. 113: 53-68.
- Iannacone, J. y A. Gutiérrez. 1999. Ecotoxicidad de los agroquímicos lindano y clorpirifos sobre el nematodo *Panagrellus*, la microalga *Chlorella* y el ensayo con *Allium*. *Agri. Téc. (Chile)* 59: 85-94.
- Idoniboye-Obu, B. 1997. Bioelectric action potentials of *Procambarus acutus acutus* (Girrad) in serially diluted solutions of selected C<sub>6</sub> hydrocarbons in water. *Environ. Pollut.* 14: 5-24.
- Instituto Mexicano del Petróleo. (2014). Factores de emisión para los diferentes tipos de combustibles fósiles que se consumen en México. México D.F.
- Jacinto, M.E. y R.J. Cabello. 1999. Niveles de hidrocarburos de petróleo marino costero del Perú. Bahías seleccionadas. Período 1996. *Inf. Progresivo IMARPE* 110: 1\_59.
- Jines Muñoz, C. J. 2012. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de Diésel sobre *Oreochromis niloticus* mediante bioensayos. Guayaquil, Ecuador.
- John Evans; *et al.* 2003. Introducción al análisis de riesgos ambientales. México: Instituto Nacional de Ecología; SEMARNAT, primera edición.

- Leach, W.E. 1819. Entomostraca, Dictionaire des Science Naturelles, 14, pág. 524.
- Malagrino W. y Almeida A., (1987). Estudio comparativo de acao tóxica de um detergente biodegradável sobre *Poecilia reticulata* e *Poecilia vivípara* (Pises: Poecilidade).Revista DAR. 148(47):86-91.
- Martín Villamil, M.; Torres Gavilá, J.; Varó Vaello, I. 2015 Evaluación de la toxicidad de metilparabeno en *Artemia franciscana*: efectos sobre crecimiento, supervivencia y Biomarcadores.
- Michalik, P. y Gordon, D. 1971. Concentration and distribution of oil pollutants Halifax Harbour. Marine Ecol. Lab. Bedford Inst. Dartmouth, N. S. tech. Rep. N° 284.
- Miller, G.T., Living in the Environment: Principles, connections and solutions. Fourth edition, Brooks/ Cole Publishing Company, Pacific Grove, USA 1999.
- Morales Vela, J. B. y L. Medrano González.1999. Variación genética del manatí (*Trichechus manatus*), en el sureste de México y monitoreo con radio-transmisores en Quintana Roo. El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. H164. México D. F.
- Noticaribe. (19 de Mayo de 2014). Obtenido de <http://noticaribe.com.mx/>: <http://noticaribe.com.mx/2014/05/19/derrame-de-combustible-en-chetumal-puede-mas-el-negocio-y-el-dinero-que-la-naturaleza/>
- Pacheco Gómez, J. D. (2011). *Determinación de la toxicidad aguda (CL<sub>50</sub>) del extracto de polvillo de carbón frente a las larvas de Artemia franciscana*. Cartagena, Colombia.
- Palma, J. (24 de Abril de 2013). *Novedades de Quintana Roo*. Obtenido de Novedades: <http://sipse.com/novedades/clausuran-gasolinera-vinculada-a-la-fuga-de-combustibles-en-chetumal-27895.html>
- Persoone, G.; Sorgeloos, P.; Roels, O.; Jaspers, E. (Eds). 1980. Editorial note on the taxonomy of *Artemia*: xvii. In: The brine shrimp *Artemia*. Vol.1, 2, 3. Universa Press, Wetteren, Belgium, 345, 664, 456 pp.

- Persoone, G. y Wells, P. (1987) *Artemia* in aquatic toxicology: a review. *Artemia Research and its Applications*. Vol. I. Morphology, Genetics, Strain characterization, Toxicology. P. Sorgeloos D. A. Bengtson, W. Decler, and E. Jaspers (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, 380 p.
- Persoone, G., C. Janssen y W. De Coen. 1994. Cyst based toxicity test X: comparison of the sensitivity of the acute *Daphnia magna* test and the two crustacean microbioassay for chemicals and wastes. *Chemosphere* 29: 2701-2710.
- Phan, V., V. Gomes y M. Passos. 1994. Avaliação prévia da toxicidade de um efluente simulado derivado de petróleo sobre *Promysis atlantica* (Crustacea, Mysidacea). *Bol. Inst. Ocean. Univer. De São Paulo*. 42: 129-141.
- Prada-Ríos, J. y M. Zambrano. 2006. Toxicidad aguda y bioacumulación de dos hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno y fluoranteno) en *Anadara tuberculosa*. *Boletín Científico CCCP*, (13): 53-64
- Reeve, M.R. 1963. The filter-feeding of *Artemia*. II. In suspension of various particles. *J. exp. Biol.*, 40(1): 207-214.
- Reish, D. 1993. Effects of metals and organic compounds on survival and bioaccumulation in two species of marine gammaridean amphipod, together with a summary of toxicological research on this group. *J. Nat. Hist.* 27: 781-794.
- Reish, D., P. Oshida, A. Mearns y G. Buchman. 1999. Effects of pollution on marine organisms. *Water Environ. Research*. 71: 1100-1115
- Rivas Meza, V. A. (2006). Evaluación técnica sobre la incorporación de nuevos compuestos oxigenados en la preparación de gasolina comercial.
- Rodríguez, J., Correa, M., Escalpez, M. (1993). Aplicación de técnicas de bioensayos a problemas de contaminación ambiental. Caracas, Venezuela.
- Salgado Leu, I. 2001 *La Artemia y su cultivo en el Perú*.

- Sánchez, F.; Barahona, MV. (1995) Toxicidad de 4 insecticidas organoclorados sobre larvas de *Artemia salina* a diferentes edades. *Revista Española de Toxicología* 1995; 12:92-5.
- Segner, H., D. Lenz, W. Hanke y S. Schuurman. 1994. Cytotoxicity of Metals Toward Rainbow trout R1 cell line. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9: 273-280.
- Sorgeloos, P. 1979. The brine shrimp, *Artemia salina*: A bottleneck in Mariculture: 321–324. In: FAO Technical Conference on Aquaculture, Kyoto 1976. Pillay, T.V.R.; Dill, Wm. A. (Eds). Fishing News Books Ltd., Farnham, England, 653 pp.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Lè, P., Tackaert, W., Versichele, D. (1986). Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura. Gent.
- Tsvetnenko, Y. 1998. Derivation of Australian tropical marine water quality criteria for the protection of aquatic life from adverse effects of petroleum hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13: 273 \_284.
- Ventura López, C. 2008. Biología reproductiva de *Ceriodaphnia rigaudi* Richard 1894 (crustacea: anomopoda) y efectos de su exposición a petróleo crudo.
- Villamar Ochoa, C. A. (2000). La *Artemia salina* y su importancia en la producción camaronera. *AquaTIC*.
- Wauquier, J. 2004. El refinado del petróleo, petróleo crudo, productos petrolíferos y esquemas de fabricación. Ed. Diaz de Santos. Madrid, España. 463 p.
- Widdows, J. 1993. Marine and estuarine invertebrate toxicity test. p. 145-163. In: P. Callow (Ed.). *Handbook of Ecotoxicology*. Vol. 1.