



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Básicas e Ingenierías
Área Académica de Biología
Licenciatura en Biología

Evaluación de daño citotóxico y genotóxico por la presencia en agua de hidrocarburos BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos).

Presenta:

Adriana Jaqueline Bañuelos Pérez

Director: Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzun

Mineral de la Reforma, Hidalgo

2025



Mineral de la Reforma, Hgo., a 26 de septiembre de 2025

Número de control: ICBI-D/1717/2025

Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Con Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio, le comunico que el Jurado asignado a la egresada de la Licenciatura en Biología **Adriana Jaqueline Bañuelos Pérez**, quien presenta el trabajo de titulación "**Evaluación de daño citotóxico y genotóxico por la presencia en agua de hidrocarburos BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos)**", ha decidido, después de revisar fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; dicho trabajo en la reunión de sinodales, **autorizar la impresión del mismo**, una vez realizadas las correcciones acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente: Dra. Griselda Pulido Flores

Secretario: Dra. Maritza López Herrera

Vocal: Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzun

Suplente: Dr. Pablo Octavio Aguilar

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Mtro. Gabriel Vergara Rodríguez
Director del ICBI



GVR/YCC

Ciudad del Conhecimento, Carretera Pachuca-Toluca Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 40001
direccion_icbi@uaeh.edu.mx, vergara@uaeh.edu.mx

"Amor, Orden y Progreso"



2025



uaeh.edu.mx

Índice

Resumen	4
1. Introducción	5
2.1 Principales contaminantes en agua	9
2.2 Impacto ambiental generado por hidrocarburos	10
2.3 Hidrocarburos BTEX	12
2.4 Toxicidad de hidrocarburos BTEX	14
2.5 Ecotoxicidad de los BTEX	15
2.5.1 Efectos a la salud humana por Hidrocarburos BTEX	20
2.5.2 Fuentes de exposición	20
2.5.3 Normativas de los BTEX	21
2.6 Evaluación de riesgos	23
2.8 <i>Danio rerio</i> como bioensayo	25
2.9 <i>Vicia faba</i> como bioensayo	26
2.10 Pruebas de genotoxicidad	26
2.10.1 Prueba de micronúcleos	26
2.10.2 Propiedades citogenéticas y moleculares	28
3. Justificación	30
4. Objetivo General	31
4.1 Objetivos Específicos	31
5. Procedimiento experimental	32
5.1 Montaje y calibración de <i>Danio rerio</i>	32
5.2 Evaluación del efecto tóxico en adultos <i>D. rerio</i> por gasolina magna (87 octanos)	34
5.2.1 Curva de toxicidad	34
Análisis estadístico	36
5.3 Evaluación de la genotoxicidad en <i>Danio rerio</i>	36
5.3.1 Inducción de micronúcleos por exposición a BTEX	37
5.3.2 Cuantificación de la fMN espontánea e inducida	37
Análisis estadístico	38
5.4 Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico en <i>Vicia faba</i>	38
5.4.1 Montaje y calibración de <i>Vicia faba</i>	38
5.4.2 Análisis y determinación del índice mitótico espontáneo	41
5.4.2.1 Evaluación de la citotoxicidad en <i>V. faba</i>	41

5.4.3 Evaluación del efecto genotóxico en <i>V. faba</i>	42
6. Análisis y discusión de resultados	43
6.1 Toxicidad en adultos de <i>Danio rerio</i>	43
6.2 Genotoxicidad en adultos de <i>Danio rerio</i>	45
6.3 Citotoxicidad en <i>Vicia faba</i>	49
6.4 Genotoxicidad en <i>Vicia faba</i>	52
Referencias	57

Resumen

La gasolina es una mezcla compleja compuesta principalmente por hidrocarburos aromáticos policíclicos BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), es liberada al ambiente por accidentes o negligencia causando daños a la salud, como afectaciones a los sistemas linfático, hematopoyético, hepático, renal y nervioso; es altamente toxico para sistemas acuáticos; y el metabolismo de estas sustancias puede producir compuestos con potencial genotóxico.

En el presente estudio se evaluó la citotoxicidad y genotoxicidad de la gasolina de 87 octanos (magna) en *Danio rerio* Hamilton, 1822 (pez cebra) y *Vicia faba* Linneo, 1753 (haba), a través de curvas de toxicidad e “Índice mitótico” (IM) como biomarcadores de citotoxicidad y la inducción de la frecuencia de micronúcleos (fMN) como biomarcador de genotoxicidad.

Como resultado, la identificación de la toxicidad en pez cebra fue inconsistente, por lo tanto, se trabajó con la concentración umbral 1.4 mg L^{-1} como concentración experimental más alta (100%) y con dos concentraciones subtóxicas 1.05 mg L^{-1} (75%) y 0.7 mg L^{-1} (50%), mismas concentraciones usadas en abas para comparar su potencia y efectividad con respecto al pez cebra.

Se evaluó un promedio de 21,133 células en *D. rerio* y 7,500 en *V. faba*. En los peces, se observó un efecto genotóxico estadísticamente significativo con una relación concentración-efecto positiva. En cambio, en *V. faba* se detectó una citotoxicidad, evidenciada por una disminución del índice mitótico (IM) de 13.77 en el control a 2.90 en la concentración más alta (100%). Respecto al efecto genotóxico en *V. faba*, se observó una respuesta similar a la de los peces, con un efecto estadísticamente significativo debido a la exposición a gasolina y una relación concentración-efecto positiva.

1. Introducción

La gasolina es el combustible líquido más usado en motores de combustión interna, compuesta por hidrocarburos con un número de carbonos entre 5 y 12 obtenidos por destilación fraccionada del petróleo (Boluda et al., 2019). Químicamente se compone principalmente por benceno, tolueno, etilbenceno y xileno, de ahí el nombre de hidrocarburos BTEX, así como algunas veces plomo, en las industrias de refinación de petróleo y petroquímica, el acrónimo BTX se refiere a mezclas de benceno, tolueno y los tres isómeros de xileno, todos los cuales son hidrocarburos aromáticos. Los isómeros del xileno se distinguen por las designaciones *orto-xileno*, *meta-xileno* y *para-xileno* (ATSDR, 2016).

El uso cotidiano de la gasolina y la alta demanda del transporte vehicular han generado una preocupación ambiental en las ciudades modernas, por los impactos negativos que esta genera como la contaminación del aire, agua y suelo (Unión de Científicos Conscientes, 2023), principalmente con los derrames accidentales en zonas urbanas representando una amenaza para la salud pública y ambiental (Carrión, 2024).

Es un compuesto clasificado como altamente inflamable, por lo que los derrames en suelo y agua representan un riesgo significativo al actuar como acelerador de incendios. En el suelo, su penetración general es de 0.5 a 1 mm, aunque el espesor varía según el tipo de suelo (Okamoto et al., 2020). Además, es considerado hidrofóbico y presenta baja solubilidad en agua, lo que lo clasifica como nocivo para organismos acuáticos y terrestres. Asimismo, impide el crecimiento de plantas al saturar con estos compuestos contaminantes los poros del suelo que normalmente contienen aire (Rodríguez-González et al., 2021).

Los derrames de petróleo y sus derivados como la gasolina, contribuyen a la contaminación del agua al crear una capa que bloquea la entrada de luz solar, inhibiendo el procesos fotosintético de especies vegetales acuáticas y alterando la cadena alimenticia de la que forman parte, estos accidentes no solo afectan a la flora sino también a la fauna, siendo los más vulnerables aves, mamíferos acuáticos, peces, moluscos y crustáceos que habitan cerca de donde se concentra la mancha de petróleo o sus derivados (Calcina, 2024).

Una de las principales actividades antropogénicas contaminantes del suelo y agua es el sector petroquímico, por la extracción, transporte y refinamiento del petróleo y sus derivados, así como fugas accidentales derivadas del mal manejo, estructuras en mal

estado y robo de hidrocarburos, afectando potencialmente a la flora y fauna, poblaciones microbianas, suelo, cuerpos de agua y salud humana por las cualidades cancerígenas, mutagénicas y teratogénicas de sus componentes ya que la parte soluble contiene compuestos polares de bajo peso molecular como hidrocarburos monoaromáticos benceno, tolueno y xileno (BTX) e hidrocarburos poliaromáticos (HAPs), todos ellos nocivos para la biota y/o para la salud humana (Almazan-Castañeda et al., 2024).

Los derrames de hidrocarburos pueden provocar la bioacumulación que es el proceso por el cual las sustancias dañinas se acumulan en los organismos vivos, a medida que son absorbidos y estos no pueden ser eliminados correctamente por el organismo (Rajput et al., 2023). Esta a su vez, puede llevar a la biomagnificación donde los contaminantes se transfieren a niveles superiores de la cadena trófica teniendo como resultado el aumento de la concentración y dispersión de estos contaminantes tóxicos (Saldaña-Serrano et al., 2024).

La biotransformación de compuestos aromáticos en organismos acuáticos y modelos animales genera metabolitos intermedios como fenol, catecol e hidroquinona a partir del benceno, capaces de inducir estrés oxidativo y dañar ADN y proteínas mediante especies reactivas de oxígeno (Bolton, 2016; IARC, 2020).

El tolueno puede oxidarse a benzaldehído como metabolito intermedio (Kang et al., 2021), mientras que el etilbenceno se transforma en 1-feniletanol y acetofenona, compuestos relacionados con efectos tumorigénicos en exposiciones crónicas en roedores (Corton et al., 2018; Dellarco et al., 2021).

Estudios en peces han demostrado que estos procesos metabólicos favorecen la acumulación de metabolitos reactivos y activación de biomarcadores de estrés oxidativo (Hernández-Medina et al., 2022), lo que evidencia un riesgo potencial asociado con la degradación de estos compuestos en la biota acuática.

Los componentes BTEX son homólogos representativos del benceno, los homólogos del benceno son un producto químico de los cuales se ha demostrado su toxicidad en ambientes acuáticos y daños significativos en el crecimiento, desarrollo y reproducción de los organismos del medio, la presencia de estos contaminantes se ha correlacionado con efectos perjudiciales en la fauna, estudios recientes han confirmado que la exposición a estos puede causar daño genotóxico y estrés oxidativo en especies de peces (Xu et al., 2019).

2. Antecedentes

La contaminación es considerada como una problemática ambiental y sociopolítica por lo que se han implementado alternativas como la protección de áreas verdes, programas para el control de emisiones dióxido de carbono (CO₂), creación de leyes que protejan a los ecosistemas e incluso regulación del crecimiento poblacional (Padilla-Santamaría y Ferman-Cano, 2018).

La problemática ha ido incrementando a través del tiempo generando daños en una escala global afectando la biodiversidad y, en consecuencia, la salud humana. Por contaminación ambiental se entiende a la presencia de cualquier agente físico, químico o biológico (o combinación de ellos) en lugares, formas y concentraciones que resulten nocivos para la salud, seguridad y bienestar para los seres vivos en general. Las sustancias químicas pueden encontrarse en los compartimentos ambientales agua, aire y suelo; e incluso, en algunos casos pueden ingresar a los sistemas biológicos (biodisponibilidad) pudiendo generar efectos nocivos a la salud (Palacios y Moreno, 2022).

Generalmente, cada sector industrial está asociado a un grupo de contaminantes químicos y de residuos tóxicos, ejemplo de ello es la asociación de los metales pesados y/o de interés toxicológico a la producción de cemento, minería de metales ferrosos, fundición, metalurgia, combustión de carbono, cromado, pinturas, pigmentos y electrónica entre otros (tabla 1) (Caviedes et al., 2015).

En el caso de hidrocarburos incluyendo a los BTEX, su liberación en el ambiente, puede darse por fugas y derrames accidentales o descargas directas a ríos, lagos o mares, así mismo, otra de las causas que contribuyen a la presencia de estas sustancias tóxicas, se debe a la aplicación de plaguicidas y fertilizantes que contiene este tipo de compuestos peligrosos como solventes, pudiendo dispersarse en agua, suelo y aire (Palacios y Moreno, 2022).

Tabla 1. Principales actividades industriales generadoras de metales pesados
(Caviedes et al., 2015).

Industria	Metales	Contaminación derivada
Minería de metales ferrosos	Cd, Cu, Ni, Cr, Zn	Drenaje ácido de mina, relaves, escombreras
Extracción de minerales	As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	Presencia den las menas como en los subproductos
Fundición	As, Cd, Pb, Ti	Procesado del mineral para obtención de metales
Metalúrgica	Cr, Cu, Mn, Pb, Sb, Zn	Procesado térmico de metales
Aleaciones y aceros	Pb, Mo, Ni, Cu, Cd, As, Te, U, Zn	Fabricación, eliminación y reciclaje de metales, Relaves y escoriales
Gestión de residuos	Zn, Cu, Cd, Pb, Ni, Cr, Hg, Mn	Incineración de residuos o en lixiviados
Corrosión Metálica	Fe, Cr, Pb, Ni, Co, Zn	Inestabilidad de los metales expuestos al medio ambiente
Galvanoplastia	Cr, Ni, Zn, Cu	Los efluentes líquidos de procesos de recubrimiento
Pinturas y pigmentos	Pb, Cr, As, Ti, Ba, Zn	Residuos acuosos procedentes de la fabricación y el deterioro de la pintura vieja
Baterías	Pb, Sb, Zn, Cd, Ni, Hg	Fluido de la pila de residuos, la contaminación del suelo y las aguas subterráneas
Electrónica	Pb, Cd, Hg, Pt, Au, Cr, As, Ni, Mn	Residuos metálicos acuosa y sólida desde el proceso de fabricación y reciclaje
Agricultura y Ganadería	Cd, Cr, Mo, Pb, U, V, Zn, As, Mn, Cu	Contaminación de escorrentía, aguas superficiales y subterráneas, la bioacumulación planta

De acuerdo con la SEMARNAT (2018) en su informe de la situación del medioambiente en México, en 2014 los contaminantes emitidos en mayor proporción (en aire) fueron los COV (compuestos orgánicos volátiles) con 3.4 millones de toneladas; 30.5%, monóxido de carbono (CO; 3.2 millones de toneladas; 28.2% del total) y bióxido de azufre (SO₂; 1.3 millones de toneladas; 11.9%). Por otro lado, las matrices de suelo y agua también son alteradas principalmente por uso desmesurado de pesticidas en cultivos agrícolas, negligencia en los desechos generados por el lavado de contenedores

químicos, manejo inadecuado de desechos orgánicos, industriales y domésticos, así como por descargas de petróleo y/o sus derivados (Andrade et al., 2022).

2.1 Principales contaminantes en agua

De acuerdo con Iberdrola (2021), el agua contaminada provoca más de 500,000 muertes anuales a nivel global y sus principales contaminantes incluye bacterias, virus, parásitos, fármacos, plásticos, desechos fecales, nitratos, fosfatos, fertilizantes, metales pesados, pesticidas e hidrocarburos, la contaminación del agua no siempre es visible por lo que es necesario recurrir en algunas ocasiones al análisis químico y uso de organismos acuáticos como bioindicadores para determinar su calidad.

De igual manera, menciona que las principales causas de contaminación son el calentamiento global, deforestación, actividades agrícolas, industriales y ganaderas, basura y vertido de desechos sólidos, líquidos y biológico infecciosos, así como el tráfico marítimo y derrames de combustibles; generándose filtraciones capaces de llegar a los cuerpos de agua y por lo tanto a la biota asociada. Por ejemplo:

1. Pesticidas: son uno de los más importantes contaminantes por su efectos ecotoxicológicos, su origen en el ambiente es meramente antropogénico por la aplicación directa de ellos en cultivos agrícolas, se caracterizan por sus efectos tóxicos, su alta permanencia ambiental, biodisponibilidad y por bioacumularse sucesivamente en cada organismo hasta alcanzar la concentración letal y biomagnificándose en la cadena trófica con dosis cada vez más elevadas (del Puerto Rodríguez et al., 2014; Zarzuela-Aguilar, 2021).
2. Los metales pesados, de origen natural y antropogénico, alteran procesos bioquímicos y fisiológicos generando intoxicaciones, mutaciones, teratogénicidad, carcinogénesis e incluso la muerte. El plomo (Pb), presente en el ambiente, se bioacumula en plantas y animales, afectando el sistema nervioso central y la síntesis del grupo hemo (Elika Seguridad alimentaria, 2023). La exposición ocurre principalmente por agua contaminada o inhalación de emisiones derivadas de la combustión de hidrocarburos, incorporándose de forma natural o por descargas industriales y mineras (Octavio-Aguilar y Olmos-Palma, 2022). En sistemas acuáticos, los metales se transforman y distribuyen en formas particuladas, coloidales y disueltas, influyendo en procesos de coagulación, sedimentación, adsorción y transporte hacia sedimentos y otras matrices (Reyes et al., 2016).

3. El tercer grupo, más importante dentro de los contaminantes de sistemas acuáticos e incluso aéreos, son los hidrocarburos en donde se incluyen los tipos BTEX, COPs (Compuestos orgánicos persistentes) y COVs (Compuestos orgánicos volátiles), HAPs (Hidrocarburos aromáticos policíclicos), entre otros., que al igual que los ejemplos anteriores son eco-toxicológicamente de gran interés por su persistencia ambiental, su biodisponibilidad, bioacumulación y alta toxicidad (Velásquez, 2017).

La contaminación hídrica por hidrocarburos se refiere a la inmisión en cualquier cuerpo de agua de manera directa o indirecta de derivados del petróleo, con compuestos altamente tóxicos, tienen derivados como el queroseno, aceites, combustibles, parafinas, asfaltos y gasolina (por mencionar los más conocidos), la manera en que contaminan el agua es afectando sus condiciones fisicoquímicas presentando una disminución de oxígeno disponible disuelto por la reducción de la transferencia de este elemento en la fase atmósfera-agua, así mismo disminuye la entrada de luz al agua inhibiendo el crecimiento de especies y la disminución de fijación de nutrientes (Velásquez, 2017).

2.2 Impacto ambiental generado por hidrocarburos

El impacto ambiental generado por la extracción de hidrocarburos incluye la contaminación de fuentes hídricas, aire, suelo, así como el deterioro de la biota, pérdida de la calidad del agua y transformación del paisaje, se estima que entre el 18 y el 59% de la composición de los derivados del petróleo como la gasolina, contienen los hidrocarburos volátiles monoaromáticos benceno, tolueno y xileno (BTX), relacionados directamente con derrames de petróleo o gasolina, efluentes industriales y deposición atmosférica en el medio ambiente acuático (Sayed et al., 2023)

Como ya se ha mencionado, la mayor causa de contaminación en el agua se debe a derrames que puede ocurrir tanto en su extracción como en su uso y transporte. En México existen áreas contaminadas de hidrocarburos principalmente por derrames y actividades de la industria petrolera, ejemplo de ello es el derrame de BP Deepwater Horizon en el Golfo de México en 2010 (figura 1), sin embargo, un gran aporte masivo de estos contaminantes se debe a derrames accidentales resultantes de actividades como la pesca, transporte marítimo y cabotaje (Cavazos-Arroyo et al., 2014).



Figura 1. Mancha petrolera tras el incendio de la plataforma petrolera en el Golfo de México (EFEverde, 2015).

Para el 2022, en México se habían registrado cerca de 2,000 derrames y fugas de moderadas a graves equivalente a casi un tercio de los incidentes ocurridos en 50 años en el Delta del Níger, considerada una de las zonas más contaminadas del mundo (ONEXPO Nacional, 2023). De acuerdo con los datos del Centro de Coordinación y Apoyo a emergencias de PEMEX, se registraron 270 derrames y fugas de alto impacto ambiental de diciembre de 2018 a julio de 2024, afectando directamente al suelo y agua, siendo los estados de Tabasco y Veracruz los más afectados con el 50.7% del total (Animal Político, 2024)

Cuando los suelos son arenosos, limosos o una combinación de ambos, los derrames de hidrocarburos llegan directo a los acuíferos y estos migran verticalmente por efecto de gravedad hasta el nivel estático. El hidrocarburo por diferencia de densidad e incapacidad para desalojar el agua intersticial da origen a los procesos de dispersión y difusión en la zona de agua capilar; la mayor parte de los hidrocarburos se acumulan sobre el nivel del agua y bajo la fuga, por otro lado, los contaminantes viajan en menor volumen disueltos en el agua a través de la zona vadosa y debajo de la zona de fuga permanece la contaminación residual (geomateriales), esta es la sustancia que queda adherida a los

granos del suelo de manera estable y no puede ser removida por ningún procedimiento químico o físico (figura 2) (IMT, 2023).

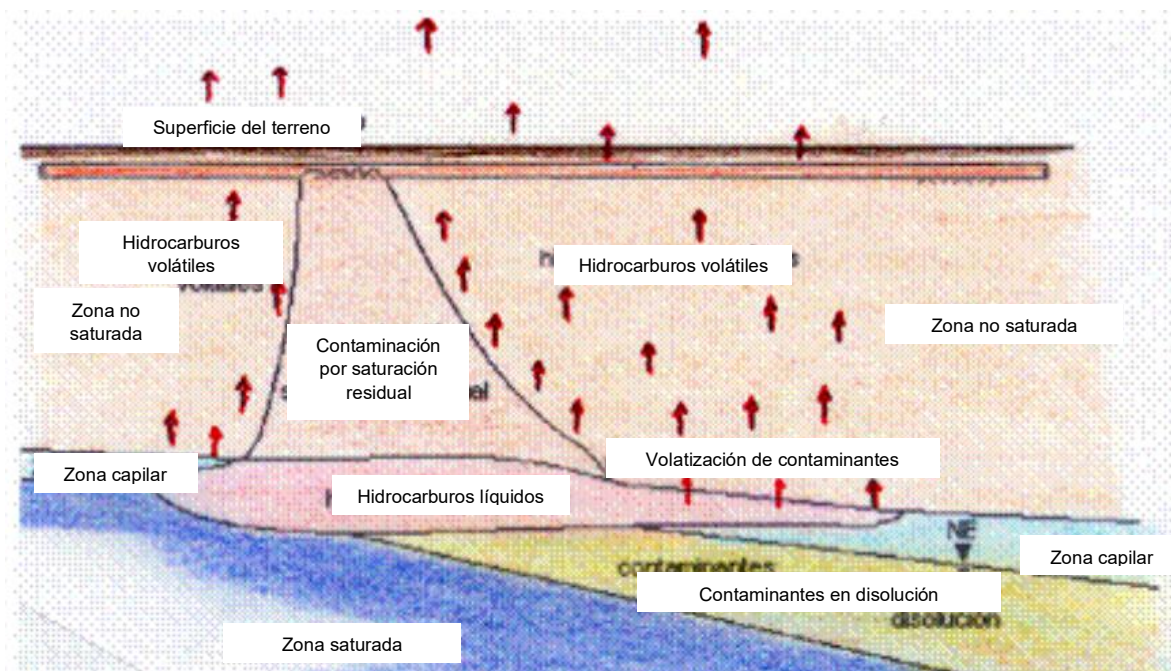


Figura 2. Modelo conceptual de un derrame, procesos de migración y dispersión en el suelo y la atmósfera (modificado de IMT, 2023).

De este modo, conforme viaja el hidrocarburo a través de una región desplaza el aire, pero no el agua, dejando una contaminación residual (figura 2) por debajo del núcleo del derrame y el porcentaje del hidrocarburo que permanece inmóvil puede variar entre 7% y 20% según la naturaleza química del medio (IMT, 2023).

Los hidrocarburos son combustibles fósiles utilizados como generadores de energía, impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, lo cual inicia una serie de procesos físico-químicos simultáneos como la evaporación y penetración, estos procesos dependen de factores como el tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida, para determinar sus efectos ambientales y de salud (Velásquez, 2017).

2.3 Hidrocarburos BTEX

La gasolina es un producto derivado del petróleo crudo, a nivel molecular es posible clasificar sus componentes en cuatro categorías: parafinas, olefinas, cicloparafinas y compuestos aromáticos (Calcina, 2024), estos últimos predominantemente comprendidos

por los hidrocarburos BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) y algunas veces plomo, considerando al benceno como el componente más tóxico (Boluda et al.,2019).

Además de dicho contenido, durante los años 80's, dentro de su composición se incluía múltiples aditivos como el metil ter-butil éter (MTBE), aditivo que favorecía su movilidad ambiental, ya que contaba con afinidad para moverse en tierra hasta llegar a aguas subterráneas aumentando el riesgo de exposición al ingerir el agua contaminada, sin embargo; su uso está prohibido desde 2005 (ATSDR, 2022).

La presencia de estos contaminantes en cuerpos de agua proviene principalmente de derrames en suelos, drenajes o descargas directas. En estaciones de servicio se originan por pequeños derrames en áreas de distribución y por los sedimentos generados en el mantenimiento de rejillas, zonas de almacenamiento, trampas de grasa y sistemas de distribución. También pueden derivarse de fugas en gasoductos y de residuos peligrosos provenientes de autolavados, donde los desarenadores facilitan la infiltración hacia aguas subterráneas (Núñez et al., 2014)

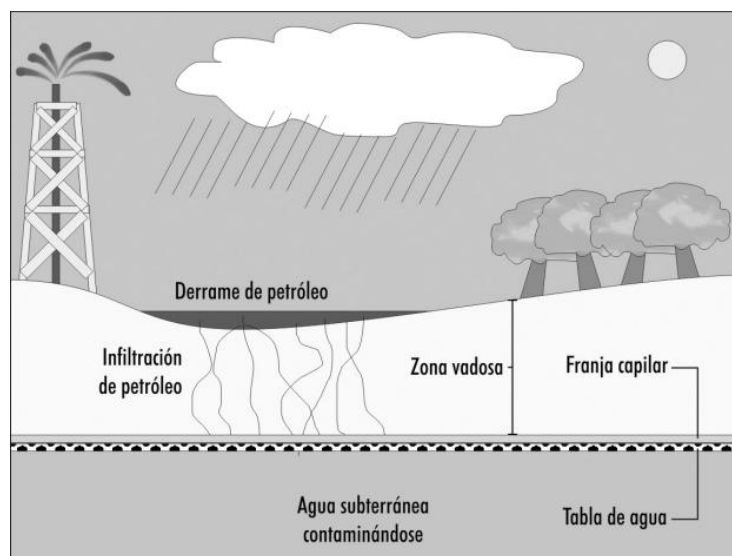


Figura 3. Ejemplificación de los derrames de hidrocarburos (Núñez et al., 2014).

La presencia de gasolina en agua genera una serie de cambios en las características organolépticas del agua teniendo como principal consecuencia pérdida de la calidad de agua para sustentar la vida y así, como el rechazo a su consumo, por lo tanto, su ingesta y consumo representa un riesgo para la salud y la biota en general, así como también puede afectar a la flora y fauna (Alcántar et al.,2020)

Los BTEX son hidrocarburos de petróleo y forman parte de la fracción más hidrosoluble del mismo (<5%), la disolución es un proceso importante ya que a través de esta se transfiere la toxicidad del crudo al agua, por lo tanto, los compuestos más hidrosolubles resultan ser los más tóxicos para la biota (del Brio, 2018).

Los compuestos de alto peso molecular tienen una solubilidad extremadamente baja en el agua, es por esto que se depositan y acumulan en los sedimentos, los hidrocarburos que se depositan en el sedimento pueden transferirse al agua y al aire por circulación geoquímica, en consecuencia, aumenta la contaminación secundaria (del Brio, 2018).

2.4 Toxicidad de hidrocarburos BTEX

De acuerdo con la ATSDR (2019), la toxicidad de cualquier compuesto incluyendo a los hidrocarburos BTEX, describe el grado en el que una sustancia puede causar una disminución de la viabilidad de un individuo, su respuesta depende de factores como: dosis, duración y ruta de exposición, forma y propiedades físico-químicas de la sustancia, así como de factores dependiendo del organismo (especie, edad, sexo, peso y madurez, pool genético, estado inmunológico, hormonal entre otros).

Así mismo, también depende de factores ambientales y/o situacionales como: temperatura, humedad, presión barométrica, influencias geográficas, entre otros, que pueden influir en la cinética, concentración y permanencia ambiental de los contaminantes (EFSA, 2019).

La gasolina está constituida por más de mil compuestos, de los cuales entre 25 y 30% corresponden a hidrocarburos aromáticos, destacando los compuestos BTEX como los más estudiados (Zárate et al., 2015). Según la hoja de seguridad de PEMEX (2015), la gasolina magna (87 octanos) se integra por una mezcla de hidrocarburos aromáticos, olefinas, hexano y tolueno. No obstante, para dichos componentes no se cuenta con un número CAS, designación numérica del *Chemical Abstracts Service* que permite la identificación inequívoca de las sustancias químicas.

En contraste, el etanol (10% en volumen, N° CAS 64-17-5) y el benceno (1% en volumen, N° CAS 71-43-32), sí cuentan con un número CAS asignado, presentes en la gasolina pueden generar efectos tóxicos agudos como mareos, náuseas, cefaleas e irritación cutánea, así como efectos crónicos como dermatitis y alteraciones hepáticas. La exposición ocurre principalmente por inhalación de vapores y partículas, ingestión directa o contacto dérmico (Martel et al., 2016).

Los componentes BTEX presentan mutagenicidad en células germinales en animales de laboratorio, sin registro en humanos, además, los componentes BTEX tras mezclarse con el agua generan una película que impide la penetración de nutrientes y oxígeno al agua, por lo tanto, a los sistemas biológicos, generando anoxia, atribuido a su cualidad hidrofóbica (Alcántar et al.,2020).

El derrame de compuestos BTEX es de gran interés toxicológico por la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, causando una acción neurotóxica (Toledo y Cuevas Diaz, 2010).

De acuerdo con estudios *in vitro*, el benceno podría causar rupturas cromosómicas e interferir en la segregación cromosómica, alteraciones en la médula ósea y disminución de glóbulos rojos (ATSDR, 2016), así mismo, el tolueno ($C_6H_5CH_3$) tiene la capacidad de causar daños neurotóxicos, hepatotóxicos y teratogénicos (Padilla, 2020).

Por otro lado, la exposición crónica al xileno ($C_6H_4(CH_3)_2$) causa efectos nocivos al sistema nervioso generando la pérdida del sentido del equilibrio, hígado y riñones, en animales puede causar sordera y alteración del comportamiento (tabla 2) (ATSDR, 2016).

2.5 Ecotoxicidad de los BTEX

Los hidrocarburos pueden causar efectos directos e indirectos en los organismos acuáticos, los efectos directos pueden clasificarse en letales (muerte del organismo) y subletales pudiendo afectar su fisiología y/o su comportamiento, por otro lado, los indirectos implica las interacciones interespecíficas como la depredación, competencia, mutualismo, comensalismo y parasitismo (figura 4) (del Brio, 2018).

La mayoría de los compuestos derivados del petróleo son de carácter lipofílico como es el caso de la gasolina, esto les permite ser biodisponibles y acumularse en los tejidos grasos de la fauna acuática generando bioacumulación en macroinvertebrados bentónicos y peces, esta bioacumulación puede dar lugar a la biomagnificación a través de los niveles tróficos, de este modo si consideramos que muchas especies de invertebrados forman parte de la dieta humana, esta es otra fuente de exposición al contaminante (Zambrano et al., 2012).

Tabla 2. Información toxicológica de gasolina magna marca PEMEX (modificado de PEMEX, 2015).

Información toxicológica	
Posibles vías de ingreso al organismo	Por inhalación, ingestión y cutánea
Toxicidad aguda	Irritación e hiperemia conjuntival, cefalea, mareo, náuseas, excitación, vértigo, nistagmos, falta de coordinación, desorientación, confusión, ataxia, miosis, delirio, depresión del sistema nervioso central, arritmias, coma. Hemorragia aguda temprana del páncreas, degeneración grasa del páncreas.
Mutagenicidad en células germinales	Mutagénico en animales de laboratorio. No hay estudios que demuestren alteraciones mutagénicas en humanos.
Carcinogenicidad	A3; Carcinógeno animal confirmado, con relevancia desconocida para los humanos.
Toxicidad para la reproducción	No aplica
Toxicidad sistémica específica de órganos blanco – exposición única	Falta de coordinación, inquietud, excitación, confusión, desorientación, vértigo, ataxia, delirio y coma.
Toxicidad sistémica específica de órganos blanco – exposiciones repetidas	Piel: Xerosis dérmica. Digestiva: Vómitos, diarrea. Sistema Nervioso Central: Insomnio, mareos, dolor de cabeza, ataxia, delirio y coma. Hematológico: anemia
Peligro de toxicidad por aspiración	Depresión del sistema nervioso central es la complicación más grave de la exposición aguda
Efectos inmediatos o retardados, así como efectos crónicos producidos por una exposición a corto o largo plazo	Xerosis dérmica, vómitos, diarrea, insomnio, mareos de dolor de cabeza, anemia, síntomas musculares y neurológicos.

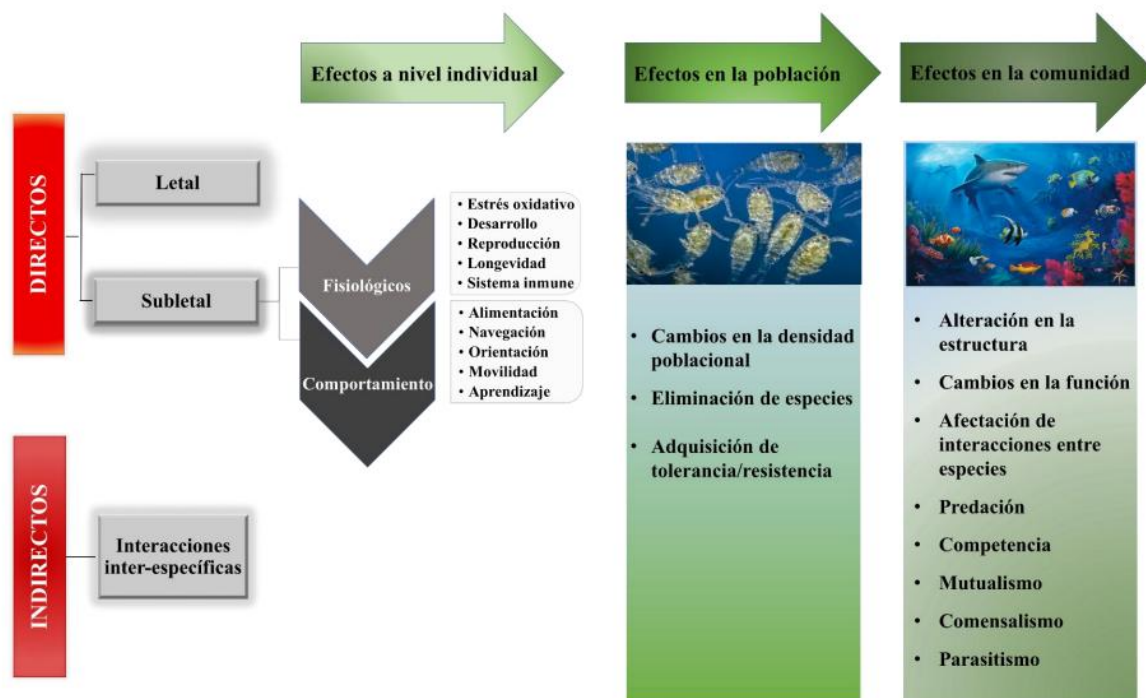


Figura 4. Efectos producidos por los hidrocarburos en el ecosistema (del Brio, 2018).

PEMEX en su hoja de seguridad (2015) menciona especialmente a los sistemas acuáticos reportando registros de efectos agudos y crónicos en *Oncorhynchus mykiss* (Trucha arcoíris) con $NCL_{503} = 10 \text{ mg L}^{-1}$, 96 horas con (fracciones de nafta de isomerización alojadas en agua); en *Daphnia magna* Straus 1820 (pulga de agua) con $C(E)L_{504} = 4,5 \text{ mg L}^{-1}$, 48 horas (fracciones de nafta ligera retenidas en agua); en *Pimephales promelas* Rafinesque 1820 (Carpita cabezona) con $NCL_{503} = 8,2 \text{ mg L}^{-1}$ y 96 horas, finalmente, en *D. magna* CSEO5 = $2,6 \text{ mg L}^{-1}$, 21 días (fracciones de nafta alquilada ligera alojadas en agua) (tabla 3).

En cuanto a su potencial de bioacumulación, los hidrocarburos BTEX pueden ser de alto riesgo, debido a las PFQ de sus componentes, como los alquenos (hidrocarburos insaturados con doble enlace carbono-carbono en su molécula que tienen un Factor de Bioconcentración (FBC) de 10; mientras que los compuestos aromáticos un FBC en un rango de 20-200; y los alcanos en uno de 100 a 1500 (tabla 4) (PEMEX, 2015).

Tabla 3. Ecotoxicidad por exposición aguda y crónica a gasolina magna en organismos acuáticos (modificado de hoja de seguridad PEMEX, 2015).

Ecotoxicidad por exposición		
Organismos	Aguda	Crónica
Acuáticos	NCL50* = 10 mg L ⁻¹ , 96 horas con Trucha arco iris (fracciones de nafta de isomerización alojadas en agua) C(E)L50* = 4,5 mg L ⁻¹ , 48 horas con <i>Daphnia magna</i> (fracciones de nafta ligera retenidas en agua)	NCL50* = 8,2 mg L ⁻¹ , 96 horas con Carpita cabezona (fracciones de nafta alquilatada ligera alojadas en agua) CSEO* = 2,6 mg L ⁻¹ , 21 días con <i>Daphnia magna</i> (fracciones de nafta alquilada ligera alojadas en agua)
Terrestres	No aplica	No aplica

*NCL50: Nivel de carga letal

*E(C)L50: Concentración efectiva del producto cuyo efecto corresponde al 50% de la respuesta máxima.

*5CCSEO: Concentración Sin Efectos Observados.

Tabla 4. Información ecotoxicológica de gasolina magna marca PEMEX (modificado de hoja de seguridad PEMEX, 2015).

Información ecotoxicológica	
Persistencia y degradabilidad	Los contaminantes principales son hidrocarburos, óxidos de nitrógeno y monóxido de carbono. Los componentes individuales de la gasolina se presentan como vapores en el medio ambiente. Su fase de vapor se degrada por reacción con radicales hidroxilos, radicales de nitrato y ozono hasta 10 días. Los componentes individuales de la gasolina sufren biodegradación en suelos y agua.
Potencial de bioacumulación	El potencial de bioconcentración de los principales componentes de la gasolina varía de bajo a alto. Los alquenos tienen valores estimados de Factor de Bioconcentración (FBC) de aproximadamente 10; los aromáticos tienen valores de FBC en el rango de 20-200, mientras que los alcanos C5 y mayores tienen valores de FBC bastante grandes en el rango de 100-1.500

Movilidad en el suelo	Se espera que los componentes de la gasolina tengan una movilidad alta o nula según los valores log K _{oc} (Coeficiente de partición carbón-orgánico) en el rango de 1,81 a 4,56 mL/g ⁻¹
------------------------------	--

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se generan principalmente por la combustión incompleta de carbón, petróleo o gasolina. Son contaminantes prioritarios debido a su toxicidad, incluyendo efectos teratogénicos, mutagénicos y cancerígenos, así como, por su resistencia a la degradación. Esta persistencia les permite bioacumularse en el tejido adiposo de los organismos y causar daño al ADN (Rodríguez-Gonzales et al., 2021).

Del mismo modo, la temperatura puede afectar la solubilidad y viscosidad de los hidrocarburos alterando su biodisponibilidad y tasa de absorción de los organismos, un estudio realizado en *Crassostrea virginica* Gmelin, 1791 (Ostión americano) tras probar dos temperaturas (26 y 30°C) determinó que el tratamiento con mayor temperatura reportó una bioacumulación mayor respecto a los controles, asimismo se observó un efecto negativo en el desarrollo gametogénico y en la tasa de sobrevivencia (Salas et al., 2017).

Otro de los factores influyentes son las propiedades fisicoquímicas como son el coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}), los compuestos con valores log K_{ow} entre 3 y 6 tienden a acumularse más eficientemente, mientras que aquellos fuera de este rango presentan limitaciones en su absorción debido a restricciones en las membranas celulares o alta hidrofobicidad (Carriquiriborde, 2021).

De acuerdo con la HDS de Pemex (2015), el tolueno tiene un log k_{ow}= 2,73 a 20°C, benceno= 2.13, etilbenceno= 3.34 y finalmente los xilenos= 3.15, esto indica que los compuestos son relativamente lipofílicos lo que significa que tienden a acumularse en tejidos grasos y una baja solubilidad en agua.

Cuando los hidrocarburos de petróleo son absorbidos en materiales particulados, sedimentos, y los tejidos de la fauna acuática, ocasionan desequilibrio ecológico, los efectos pueden ser agudos como mortalidad, necrosis, mutagenicidad, asfixia y crónicos como los procesos de biomagnificación y pérdida de la biodiversidad (Argota y Iannacone, 2022).

2.5.1 Efectos a la salud humana por Hidrocarburos BTEX

Según la Environmental Protection Agency (EPA) y la International Agency for Research on Cancer (IARC), el benceno está catalogado como un agente carcinogénico del grupo 1 (IARC, 2018), lo que lo convierte en uno de los componentes más peligrosos de esta mezcla. Por otro lado, los hidrocarburos aromáticos afectan los sistemas linfático, hematopoyético, hepático, renal y nervioso (SN), causando efectos irritantes inmediatos en la piel y mucosas. Las alteraciones en el sistema nervioso pueden detectarse en exposiciones continuas o crónicas, lo que facilita una detección más rápida (Zárate et al., 2015)

2.5.2 Fuentes de exposición

Como ya se mencionó, los BTEX se encuentran y liberan al ambiente como productos de procesos químicos e industriales, así como por situaciones accidentales y/o de negligencia en su uso y manejo, contribuyendo una gran fracción de la mezcla de residuos orgánicos contaminantes del ambiente (suelo, agua y aire).

Las principales fuentes de exposición incluyen gasolina para vehículos motorizados, pinturas, industrias de procesamiento, estos componentes están presentes en las matrices ambientales de agua, aire y suelo, aumentando el riesgo de exposición humana por ingesta, inhalación o absorción cutánea (tabla 5) (Yu et al., 2022).

Tabla 5. Principales rutas de exposición a componentes BTEX (Toledo y Cuevas, 2010).

Benceno	Tolueno	Xileno
La inhalación es la ruta de mayor porcentaje (99%) de exposición de la población en general. El humo de cigarro suministra 1800 µg/día y los fumadores pasivos reciben 50 µg por día. Mientras que la entrada por alimentos y agua es mínima. El benceno también se puede absorber por la piel.	La ruta principal de exposición a tolueno es el aire contaminado de los automotores. El tolueno es el componente mayoritario del humo del tabaco la cantidad de tolueno en el humo de un cigarro sin filtro puede ser de 100 a 200 µg. La entrada por alimentos y agua es mínima.	El aire es la principal ruta de exposición a estos compuestos. La exposición diaria se estima en un rango de 0.05 a 0.5 mg. La exposición puede aumentar cuando el aire está contaminado con humo de cigarro.

Como se menciona en las tablas anteriores, una de las fuentes de exposición más frecuentes son las ocupacionales o laborales, destacando las estaciones de servicio, donde los despachadores de combustible están expuestos directa y continuamente a los componentes de los hidrocarburos como BTEX inhalando los vapores liberados así como salpicaduras accidentales que entran en contacto con la piel, durante la jornada laboral de 8 horas, lo que origina un alto riesgo a la salud (Jacome-Muñoz et al., 2022).

Con la exposición ocupacional se presentan efectos agudos en el momento del contacto ocasionando tos, irritación ocular, dolor de garganta, cefalea, náuseas, mareos, desorientación, confusión y palpitaciones, por otro lado, los efectos crónicos pueden generar cambios de la conducta, alteraciones del estado de ánimo, depresión, irritación, dermatitis, asma, abortos y favorecer el desarrollo de leucemias, anemia aplásica y pancitopenia reversible, así como la muerte en casos extremos (Jacome-Muñoz et al., 2022).

2.5.3 Normativas de los BTEX

Identificar la Normas oficiales que regulen la exposición a agentes químicos peligrosos (AQP) es relevante, porque de ahí se pueden establecer parámetros de referencia ante una exposición y poder determinar un riesgo ecológico potencial.

En el caso de BTEX, existen normativas para regular su uso por distintas agencias nacionales e internacionales, las más reconocidas son la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) y la Administración de Salud y Seguridad Ocupacional de los Estados Unidos (OSHA), que han establecido un “Límite de Exposición Permisible” (PEL) de 1 parte por millón (ppm) para el benceno y un PEL de 100 ppm para tolueno, etilbenceno y xileno (Neitzel, 2021).

Así mismo, la Unión Europea (UE) establece como “Límite de Exposición Laboral” (WEL, por sus siglas en inglés) 1 ppm para el benceno y un WEL de 150 ppm para tolueno, etilbenceno y xileno (Vera, 2021), finalmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido un valor de referencia de 10 microgramos por metro cúbico ($\mu\text{g m}^{-3}$) para el benceno en el aire ambiente (OMS, 2022).

México cuenta con normativas y reglamentos para determinar los niveles de concentración de los componentes BTEX en muestras ambientales y biológicas como:

1. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelo y las especificaciones para su caracterización y remediación.
2. Norma Mexicana NMX-AA-141-SCFI-2002 Suelos- benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) por cromatografía de gases con detectores de espectrometría de masas y fotoionización. Método de prueba.
3. Norma Oficial Mexicana NOM-047-SSA1-1993, encargada de establecer los límites biológicos máximos permisibles de disolventes orgánicos en la persona ocupacionalmente expuesta.
4. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
5. Criterios ecológicos de calidad del agua CC-CCA-001- 1989.

En México se cuenta con políticas ambientales importantes para la regulación y manejo de los hidrocarburos como la gasolina, la NOM-016-CRE-2016 establece las especificaciones de los petrolíferos que deben cumplir las gasolinas regular, premium y diesel, abarcando desde la producción hasta el punto de venta, esta norma se encarga de establecer parámetros técnicos como el octanaje la presión de vapor, el contenido de azufre, la densidad y la cantidad de compuestos oxigenados (CRE, 2016).

El petróleo y sus derivados como la gasolina forman parte importante de la industria energética actual, en medida que es extraído, refinado, transportado, distribuido o consumido, se generan numerosas descargas de contaminantes que impactan directamente al ambiente (Ortega, 2021).

Considerando una tendencia al alza en la demanda, de acuerdo con un informe de la Onexpo Nacional (2024) en abril del mismo año, el consumo diario de gasolina (premium y magna) ascendió a un aproximado de 670,928 barriles diarios y particularmente 535,000 barriles de gasolina magna, lo que representa un aumento del 8.2% en comparación con el mismo mes del año anterior (El Economista, 2024).

Asimismo, considerando a los derrames accidentales durante el transporte, la importación de gasolina tiene un impacto directo con el incremento de la presencia de hidrocarburos en el ambiente, ya que, en 2024 las importaciones de PEMEX y

comercializadores privados ascendió a los 792,385 barriles diarios, equivalente al 60.7 % del consumo total (ENFINFO, 2024).

2.6 Evaluación de riesgos

Según la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de los Estados Unidos (ATSDR), la evaluación de riesgos consiste en recopilar y analizar información sobre los efectos tóxicos de sustancias químicas peligrosas, como los BTEX, con el propósito de determinar la probabilidad de efectos adversos en la salud ante una exposición. Este proceso considera tanto las propiedades del agente como las características del sistema afectado, y parte del principio de que la sola presencia de un compuesto en el ambiente implica un riesgo potencial de daño (ATSDR, 2019).

La evaluación adecuada de probabilidad de riesgos a la salud asociado a una exposición en una situación determinada es el vital para proponer estrategias para limitarlos y controlar los efectos nocivos.

2.7 Ensayos ecotoxicológicos

Los ensayos ecotoxicológicos, contemplan la implementación de técnicas y métodos, sustentados en el uso de organismos en condiciones ambientales (bioindicadores) y/o de laboratorio (bioensayos), a través del uso de biomarcadores de exposición, daño y susceptibilidad, que idealmente debe ser específicos, sensibles, predictivos, rápidos y económicos, estables *in vivo* e *in vitro*, no invasivos y con suficiente relevancia preclínica y clínica, a su vez estos se clasifican de acuerdo a interés a evaluar (tabla 6) (Courchoud y Ji, 2016).

Tabla 6. Clasificación de biomarcadores (modificada de del Brio, 2018).

Clasificación de biomarcadores		
Exposición	Susceptibilidad	Efecto
Hacen referencia a la identificación de un xenobiótico dentro del organismo, el producto de la interacción del xenobiótico y componentes endógenos el producto de la interacción del xenobiótico y componentes endógenos, u otro evento en el sistema	Con indicadores de la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición a un xenobiótico. Son de utilidad en la evaluación de riesgos para identificar individuos sensibles o poblaciones que tienen una susceptibilidad	Cualquier cambio bioquímico, fisiológico u otro tipo dentro de un organismo que puede resultar en un daño establecido o potencial para la salud del organismo. Están relacionados de forma específica con el mecanismo de acción del

biológico relacionado con la exposición. Indican que un organismo o una población está o ha estado expuesto a un tóxico u otro agente estresante.

- Permiten la medición de la dosis interna del compuesto o metabolito tóxico en fluidos corporales como sangre o excretas, orina y aire expirado mediante el análisis químico.

única a la acción de un tóxico

compuesto tóxico y caracterizados para relacionar el grado de modificación del biomarcador con el nivel del efecto adverso.

Ejemplo. Biomarcadores enzimáticos

*Continuación de tabla 6. Clasificación de biomarcadores.

Un bioindicador refiere a la especie o grupo de especies animal, vegetal o microorganismos que presentan un rango estrecho de tolerancia a uno o varios factores medioambientales de origen biótico abiótico. Su presencia o ausencia en un hábitat, así como cualquier cambio fisiológico o morfológico indican un estado particular de su medio ambiente, que se relaciona con su capacidad para sustentar la vida (Morales y Cárdenas, 2015; González-Pérez et al., 2020).

A esta clase de pruebas se les denomina bioensayos, requieren ser calibrados frente a un patrón o tóxico de referencia que puede ser una sustancia orgánica o inorgánica empleada en pruebas de toxicidad con el fin de obtener un control de calidad analítica del organismo a utilizar, estos patrones establecen la sensibilidad frente a las especies bioindicadora (Castañedo et al., 2019).

En el control de calidad analítica es necesario establecer una curva dosis–respuesta durante la fase inicial del método de prueba. Para ello, se recomienda preparar al menos cinco o seis diluciones de un compuesto con pureza $\geq 99\%$, al que se aplican pruebas de toxicidad en una especie específica, con el fin de determinar el intervalo de concentración que produce el efecto esperado. Una vez definida, esta curva puede emplearse como tóxico de referencia (Castañedo et al., 2019).

2.8 *Danio rerio* como bioensayo

Dentro de los organismos acuáticos, los peces son un grupo de organismo ampliamente utilizados en ensayos ecotoxicológicos, considerados los organismos de prueba idóneos, para la realización de ensayos de toxicidad por su posición dentro de la cadena trófica y se pueden realizar una amplia gama de bioensayos en diferentes etapas de desarrollo de su organismo.

De manera particular, *D. rerio* es un ciprínido emparentado con las carpas y los barbos, originario del sudeste asiático, habita mayormente en lagos, ríos y lagunas de la India, sin embargo; es común hallarlo en acuarios, por lo que su adquisición es relativamente sencilla y cuenta múltiples características como el desarrollo embrionario y larval externo que lo vuelve atractivo y popular para la investigación científica, siendo el primer vertebrado en clonarse (Vargas-Vargas, 2017).

Asimismo, es uno de los más utilizados en la actualidad, debido a que presenta grandes ventajas en su uso y manejo como bioensayo, por ejemplo: amplio conocimiento de su fisiología, morfología, embriología y genética, mantenimiento fácil y económico, simple inducción de conducta reproductiva, es ovovivíparo, con amplia descendencia, huevos traslucido y con membranas semipermeables, sensible a cambio fisicoquímicos medioambientales y con varios biomarcadores de exposición y daño de fácil observación y cuantificación (Castillo-Salas et al., 2022).

De la Paz Montt (2012), propone el uso de embriones de *D. rerio* como modelo ideal para evaluar condiciones toxicológicas en cuerpos de agua y mecanismos de inhibición de la eclosión. Esto se debe a sus ventajas: rápido desarrollo, fácil manipulación y cuidado, fecundación externa, transparencia del corion y de las células embrionarias y larvales, así como su cercanía filogenética con mamíferos. Además, permite detectar efectos tóxicos subletales en tiempo real mediante la observación directa de células y tejidos.

En 2013 fue utilizado para evaluar efecto embriotóxico, teratogénico y genotóxico por exposición a arsénico a través de la inducción de micronúcleos (MN) (Scotto et al., 2013). Recientemente, en 2021, *D. rerio* se utilizó como bioensayo en la evaluación de toxicidad letal y subletal de hidrocarburos totales del petróleo, donde se evaluó hipoactividad, escape hacia el fondo e hipoventilación, realizado con base en análisis

estadísticos al exponerlo a diferentes concentraciones de agua contaminada con gasolina (Caja-Molina y Lannacone, 2021).

En el mismo año, se utilizó para la evaluación de efectos genotóxicos y teratogénicos, a través de daños alteraciones en el desarrollo embrionario, malformaciones en columna vertebral y aumento en la frecuencia de eritrocitos micronucleados (Sánchez-Olivares et al., 2021). Por lo anterior, es evidente que esta técnica ha tenido un amplio uso en la toxicología para evaluar la genotoxicidad y embriotoxicidad de sistemas acuáticos.

2.9 *Vicia faba* como bioensayo

V. faba es una planta ampliamente utilizada en bioensayos para evaluar efectos genotóxicos debido a su bajo costo de mantenimiento, fácil experimentación y escasa necesidad tecnológica. Permite analizar daños fisiológicos, morfológicos y genéticos, y resulta especialmente útil en citogenética por contar con solo cuatro cromosomas grandes, fácilmente observables. Además, ofrece biomarcadores confiables de genotoxicidad, como el índice mitótico (IM), las alteraciones cromosómicas (AC) y los micronúcleos (fMN) (Acuña et al., 2020).

2.10 Pruebas de genotoxicidad

La genotoxicidad es la capacidad de un agente de ocasionar daño al material genético como mutaciones y aberraciones cromosómicas (Lerda, 2021). Existen varias pruebas para evaluar la genotoxicidad como las pruebas *in vivo* e *in vitro*, dentro de la que destaca la prueba de micronúcleos, por ser fácil, económica, reproducible y sensible, además de que se utiliza en una gran variedad de organismo incluido el mismo ser humano, en condiciones *in vitro* y/o accidentales (Jaramillo-García et al., 2020).

2.10.1 Prueba de micronúcleos

La prueba de micronúcleos es un método para evaluar daños cromosómicos a través de la detección de estructuras denominadas micronúcleos (Jain et al., 2017)

Los micronúcleos son aberraciones cromosómicas, delimitados por membranas que contiene ADN separado del núcleo primario, se vinculan con la inestabilidad cromosómica y los reordenamientos genómicos. Estas estructuras son asociadas con enfermedades

como el cáncer, la senescencia y el estrés genotóxico, desempeñando un papel importante en la tumorigénesis y la respuesta inmunitaria (Krupina et al., 2021).

La acumulación de micronúcleos se ha utilizado como biomarcador de estrés genotóxico e inestabilidad genética en modelos humanos y no humanos, su formación se debe principalmente a cromosomas rezagados y fragmentos de cromosomas acéntricos que no se incorporan a los núcleos hijos (Krupina et al., 2021).

Su detección se realiza mediante técnicas convencionales como la tinción de Giemsa o mediante el ensayo de micronúcleos con el bloqueo de citocinesis (CBMN) y a través métodos automatizados como el análisis por citometría de flujo (Flow MN Assay), así como la prueba de eritrocitos de mamíferos, entre otras (tabla 7) (Jain et al., 2017)

Tabla 7. Tipos de ensayos de micronúcleos (Sommer et al., 2020)

Tipo de Prueba	Células utilizadas	Objetivo	Características cortas
Ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN)	linfocitos o líneas celulares humanos, roedores, conejos, peces, perros, primates, etc.	• biomonitoreo; • dosimetría biológica; • genotoxicidad in vitro o in vivo; • experimentos biológicos donde se evalúa el daño citogenético.	El Mn se detecta en células binucleadas, donde la citocinesis se detiene mediante la adición de citocalasina B. El MN in vitro e in vivo más popular.
Eritrocitos de mamíferos MN	humanos, roedores, conejos, peces, perros, primates, eritrocitos inmaduros.	• genotoxicidad in vivo de sustancias químicas, fármacos o condiciones nocivas; • biomonitoreo.	La prueba se realiza generalmente en roedores jóvenes, pero es posible la biomonitorización de la población humana mediante análisis de sangre periférica. Cuando se realiza en eritrocitos de sangre periférica, debe considerarse la selección esplénica.

MN bucal	células epiteliales bucales humanas.	• impacto de la nutrición; hábitos de vida, como fumar y beber alcohol; • exposición genotóxica; • exposición citotóxica; • riesgo de envejecimiento acelerado, ciertos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas.	Prueba in vivo, entrante y poco invasiva. Adecuada para biomonitoreo.
MN en otros tipos de células	células de la mucosa nasal, células derivadas de la orina.	• biomonitoreo; • genotoxicidad; • pronóstico de ciertos tipos de cáncer.	No es muy popular, aunque hay nuevas publicaciones.

*Continuación de tabla 7. Tipos de ensayos de micronúcleos

Las células meristemáticas, se dividen activamente y se encuentran en las raíces de las plantas, la muestra se puede recolectar al recortar la punta de las raíces (Sánchez-Zepeda et al., 2019).

La prueba de micronúcleos es una herramienta versátil que emplea distintos biomodelos, destacando el uso de eritrocitos de sangre periférica. En eritrocitos policromáticos (EPC) permite evaluar genotoxicidad y citotoxicidad en 24–48 h, mientras que en eritrocitos normocromáticos (ENC) se aplica en exposiciones crónicas o en especies sin EPC. También pueden utilizarse eritrocitos de médula ósea, cultivos de linfocitos con bloqueo de citocinesis y células epiteliales exfoliadas de distintos tejidos (oral, bronquial, cérvix, vejiga, entre otros), según el bioensayo requerido (Arellano-García et al., 2022).

2.10.2 Propiedades citogenéticas y moleculares

Tradicionalmente los micronúcleos son considerados biomarcadores de daño al ADN que en un principio se catalogaban como estructuras pasivas resultantes de dicho daño ya que la principal razón por la que se forman es el desequilibrio o pérdida de material genético en las células hijas, no obstante, actualmente se consideran otras consecuencias derivadas de este proceso como su participación activa en el inicio y desarrollo del cáncer

y desencadenantes de otras patologías crónico-degenerativas principalmente autoinmunes (Zhao et al., 2021).

Los micronúcleos, al ser independientes del núcleo, presentan alteraciones en la membrana, desincronización del ciclo celular y fallas en la reparación del ADN. Son heterogéneos en tamaño, condensación cromática y tipo de daño genómico, variando también según la presencia o funcionalidad del cinetocoro y la lámina. La lámina regula la expresión e integridad del ADN micronuclear, mientras que el cinetocoro interviene en la unión centromérica y en el movimiento cromosómico durante la mitosis. Si no se eliminan, los micronúcleos pueden reintegrarse al núcleo causando caos genético, o inducir apoptosis, autofagia o senescencia (Bugarín y Arias-Ruiz, 2023).

3. Justificación

La exposición ambiental a la gasolina es un problema creciente por su naturaleza tóxica, atribuida a compuestos como los BTEX (benceno, tolueno y xileno). Esta sustancia compleja y persistente representa una amenaza para la biota y, en particular, para los ecosistemas acuáticos y terrestres. A nivel biológico, el benceno puede causar daños genotóxicos, como rupturas cromosómicas y estrés oxidativo, así como afectar la médula ósea. Su toxicidad se evidencia en la interrupción de procesos vitales en organismos acuáticos, como el intercambio de gases en sus membranas (Quiñónez-Portocarrero y Guano-Guano, 2022).

Sus efectos genotóxicos, reportados en diferentes bioensayos con *Daphnia magna* Strauss, 1820, *Anadara tuberculosa* Sowerby, 1833, y *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792, son un claro ejemplo de su potencial genotóxico, así como de la existencia de una problemática ambiental, biológica y de salud pública. Cabe mencionar que la industria petrolera cuenta con manuales de manejo y protocolos para casos de derrames; sin embargo, la información disponible acerca de las consecuencias ecológicas y biológicas aún es escasa.

Esta investigación busca ampliar el conocimiento ecotoxicológico de los productos de hidrocarburos como la gasolina magna (87 octanos) compuesta principalmente por los BTEX, evaluando su daño genotóxico en ambientes acuáticos y terrestres. Se empleará el pez *D. rerio* para analizar la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica, un indicador de daño cromosómico. De manera análoga, se utilizarán las células meristemáticas de la planta *V. faba* para evaluar los efectos en un medio terrestre. Estos ensayos permitirán obtener una visión más clara del impacto ecológico causado por la exposición a la gasolina y sus derivados.

4. Objetivo General

Evaluar daño citotóxico y genotóxico en *Danio rerio* (pez cebra) y *Vicia faba* (haba) por la presencia de hidrocarburos BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) presentes en agua, para contribuir al conocimiento del daño ecotoxicológico de estos compuestos.

4.1 Objetivos Específicos

1. Establecer la concentración letal media (CL_{50}) en organismos adultos de *D. rerio* por exposición a BTEX presente en agua (87 octanos), a través una curva de toxicidad, para determinar concentraciones subtóxicas experimentales.
2. Establecer daño genotóxico en organismos adultos de *D. rerio* por exposición a BTEX presente en agua (87 octanos), a través de frecuencia de micronúcleos (fMN) en sangre periférica, para contribuir al conocimiento de los efectos y mecanismos de acción de este tipo de compuestos.
3. Establecer daño citotóxico y genotóxico en células meristemáticas de raíces de *V. faba* por exposición a BTEX presente en agua (87 octanos), a través del índice mitótico y la frecuencia de micronúcleos (fMN) para contribuir al conocimiento de los efectos y mecanismos de acción de este tipo de compuestos.

5. Procedimiento experimental

Para establecer la concentración letal media (CL₅₀) en organismos adultos de pez cebra (*D. rerio*) por exposición a BTEX (87 octanos) presentes en agua, primeramente se estableció en condiciones de laboratorio un montaje y calibración de la técnica, en donde se aseguró la inclusión de los organismos experimentales y las condiciones físicas y químicas para su mantenimiento, posteriormente se requirió determinar el efecto tóxico de BTEX (87 octanos) a través de una curva dosis respuesta para encontrar la concentración letal media (CL₅₀) y de ahí determinar dos concentraciones subtóxicas para evaluar el daño genotóxico

5.1 Montaje y calibración de *Danio rerio*

El mantenimiento comenzó a partir de la obtención de los ejemplares, para fines de esta investigación, los organismos debieron cumplir con el criterio de inclusión de ser adultos, de tamaño normal y sanos sin daños morfológicos y/o fisiológicos aparentes; posteriormente pasaron por periodo de acondicionamiento en un lapso de dos semanas. Esto requirió que se acondicionara de manera previa una pecera de 40 litros equipada con un filtro biológico, aeración constante y calentador de 100 Watts con temperatura controlada 27 ± 1 °C con un pH de 6 a 8, idealmente 7.2 para mantener un equilibrio ácido-base en su sangre considerando las condiciones fisicoquímicas indicadas en la tabla 8 (Moreno, 2013).

- Criterio de inclusión: Los peces deben ser adultos, proceder de la misma fuente y población para garantizar la uniformidad. Los peces debían tener la misma edad y un aspecto normal. no debían mostrar signos visibles de enfermedad y estrés, así como estar libres de malformaciones aparentes y no haber sido tratado previamente contra la enfermedad o parásitos en los últimos 14 días antes de la prueba.
- Aclimatación y cuarentena: Todos los peces se mantuvieron en el laboratorio durante al menos 9 días antes de ser utilizados para las pruebas. Las primeras 48 horas constituyeron un período de adaptación. Luego, el pez fue aclimatado durante al menos 7 días en aguas similares a las aguas de ensayo inmediatamente antes del inicio de la prueba.

Si la mortalidad del lote es inferior al 5% de la población en siete días: aceptar el lote; si no se dejan 7 días más hasta obtener como mínimo una supervivencia mayor al 60% del lote,

de este modo ya se puede comenzar con el manejo y uso de los organismos para experimentación (Gaytán y Castillo-Salas et al.,2021).

Tabla 8. Condiciones fisicoquímicas óptimas para el mantenimiento del pez cebra (Sánchez-Olivares, 2021).

Condiciones Fisicoquímicas	Condiciones óptimas	Efectos negativos de malas condiciones
Luz solar	No recomendada de manera directa al acuario	Evaporación, formación de algas, favorece la ovoposición de adultos, en alevines afecta el desarrollo embrionario
Temperatura	27±1° C en acuarios alejados de parrilla, estufa o equipos que produzcan calor	Evaporación, desarrollo de protozoarios, formación de microalgas
pH	7 a 8	No determinado
Dureza (Deutsche Härte)	6-16 ° dH	Metabolismo de los peces
Carbonatos totales KH	3-10° dH	Fluctuaciones pone en riesgo la salud de la población
NO ₂	0.3 - 0.8 mg L ⁻¹ tolerable hasta 1.6 mg L ⁻¹	Demasiados nitritos reducen la capacidad de transporte de oxígeno
Corrientes de aire	Ventanas cerradas o cualquier orificio	Contaminación por polvos o partículas
Instalaciones	Mantenimiento del equipo	Revisión diaria para buen funcionamiento, lugar aislado para evitar el estrés de los peces
Espacio	Suficiente para la manipulación de organismos	Espacio intrapequera: se debe considerar un equilibrio entre capacidad de pecera con peces quedando una proporción de 1 litro-5 peces. Espacio interpeceras: Entre peceras deben tener un espacio de 10 cm. Para realizar observaciones

5.2 Evaluación del efecto tóxico en adultos *D. rerio* por gasolina magna (87 octanos)

Para establecer la concentración letal media (CL_{50}) en organismos adultos de pez cebra (*D. rerio*) por exposición a gasolina magna [BTEX (87 octanos)] presentes en agua, se realizó una curva de toxicidad, en donde los peces se expusieron a la sustancia problema durante un período de 96 horas. Registrándose el porcentaje (%) de individuos muertos a las 24, 48, 72 y 96 horas y, en la medida de lo posible, determinan las concentraciones que matan al 50% de los peces (CL_{50}).

Se utilizaron al menos seis peces en cada concentración de ensayo y en los controles. La sustancia problema se administró al menos, con cinco concentraciones en una serie geométrica como lo señala las “Líneas y directrices de OCDE para el Ensayo de Productos Químicos” (2024). Durante la exposición, el oxígeno disuelto y la temperatura se midieron diariamente de forma continua en cada recipiente de ensayo, temperatura preferiblemente de forma continua hasta determinar un biomarcador de respuesta como la concentración letal media (CL_{50}) y dos concentraciones subtóxicas experimentales.

La literatura recomienda, que cuando en algunos casos la respuesta toxica no es consistente, se debe determinar con la concentración umbral, NOAEL (Nivel sin efecto adverso observable) o LOAEL (Nivel de mínimo efecto tóxico observable) (ATSDR. 2019).

5.2.1 Curva de toxicidad

Para determinar la relación entre la concentración de un compuesto y su consecuente efecto tóxico, y partir de esta determinar dosis subtóxicas experimentales; se tomó como referencia el “Nivel de carga letal” (NCL_{50}) de 10 mg L⁻¹ reportado por la Hoja de Seguridad de PEMEX (2015) en *Oncorhynchus mykiss*, y se administró al menos cinco concentraciones en un serie geométrica entre 0.1 y 10 mg L⁻¹ como lo señala las “Líneas y directrices de OCDE para el Ensayo de Productos Químicos” y la Prueba N° 203 (Peces, Prueba de Toxicidad Aguda OECD, 2019).

Para cada concentración, se utilizaron 4 matraces Erlenmeyer (1 L) donde se colocaron 6 peces adultos por cada uno, 3 matraces por concentración de gasolina y 1 como control concurrente, todos ellos se colocaron en una pecera grande (40 L de capacidad) a baño maría (26° C) durante 24 h y se registró el número de individuos muertos a las 24 h., para establecer un “Índice de toxicidad de referencia” como la “Concentración letal media” (CL_{50})

o la Concentración mínima en donde se ha observado un efecto (LOAEL por sus siglas en inglés) o la “Concentración umbral” que corresponde a la concentración mínima un organismo manifestó un efecto; el cual sirve de criterio para seleccionar concentración experimental para evaluar el daño genotóxico y a partir de esta se establecen al menos dos concentraciones subletales experimentales para la prueba de genotoxicidad, evitando que la toxicidad del compuesto enmascare dichos efectos (Gaytán et al., 2021; Sánchez-Olivares et al., 2021).

La literatura marca que, dependiendo de los resultados iniciales, se pueden probar concentraciones superiores o inferiores hasta encontrar el índice de toxicidad de referencia elegido (Castillo-Salas, 2022), para ello se probaron 16 concentraciones de BTEX para la prueba de toxicidad: 0.5, 0.7, 1.0, 1.4, 1.7, 2, 2.4, 2.5, 2.7, 2.8, 3, 3.5, 3.7, 4 y 5 mg L⁻¹

Al ser un contaminante volátil a temperatura ambiente se construyó un sistema cerrado que recirculara el compuesto evaporado (figura 8), lo cual aseguró la concentración constante durante cada tratamiento.



Figura 8. Sistema cerrado de aireación para tratamientos con compuestos volátiles

Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de la curva de toxicidad se aplicó una correlación lineal ($y = a + bx$) con las concentraciones empleadas (x) y la cuantificación de mortandad (y), esto permitió determinar si el compuesto era tóxico y conocer la CL_{50} .

Cuando el valor de R^2 (coeficiente de relación) es cercano o igual a 1 significa que las predicciones para el modelo son confiables, es decir, es representativo, en caso de ser cercano a 0 las predicciones no son correctas.

Cuando la concentración letal media (LC_{50}) es difícil de determinar por inconsistencias en las respuestas, en algunos casos la literatura recomienda que se puede trabajar con la concentración umbral (Concentración más alta en donde aparece un efecto tóxico) como la concentración experimental máxima (ATSDR, 2008).

5.3 Evaluación de la genotoxicidad en *Danio rerio*

El establecimiento del daño genotóxico en organismos de *D. rerio* por exposición a gasolina magna (87 octanos) presente en agua se realizó a través de la inducción de micronúcleos para determinar la frecuencia de micronúcleos (fMN) en sangre periférica como biomarcador de daño, considerando parámetros como: un diámetro entre 1/16 y 1/3 del diámetro del núcleo principal, no refractario con intensidad de tinción similar o superior a la de los núcleos principales y no se toca con el núcleo para la correcta identificación de las estructuras.

De manera inicial se seleccionaron las concentraciones experimentales a partir de la curva de toxicidad previamente elaborada y posteriormente se evaluó su efecto potencial a través de un tratamiento agudo a organismos adultos de la siguiente forma:

Para el tratamiento experimental de manera inicial se tomó la CL_{50} y en caso de ser necesario la concentración umbral (cuando la toxicidad es inconsistente), y a partir de este se determinó dos concentraciones subletales al diluirla con agua al 75% (25% agua /75% BTEX) y 50 (50% agua /50 BTEX); para cada concentración, se montaron cuatro lotes en matraces de 1 L, tres experimentales y un control negativo con 6 peces cada uno durante 24 h y se mantuvieron a condiciones de temperatura (baño maría) y aireaciones recomendadas (Sánchez-Olivares et al., 2021).

5.3.1 Inducción de micronúcleos por exposición a BTEX

De manera inicial, se montaron cuatro lotes experimentales (tres concentraciones experimentales y un control recurrente), con seis peces por lote por triplicado (18 en total por concentración) los cuales se colocaron en matraces Erlenmeyer de 1 litro por concentración y para el control, cada matraz contenía 500 mL de la solución problema (concentración del contaminante y agua) (Scotto et al., 2013).

Del mismo modo, los matraces se colocaron en baño maría para mantener la temperatura constante por inducción térmica y con aire a través del sistema de aireación cíclica para mantener la exposición constante durante las 48 h de tratamiento, para el control únicamente se conectó a una bomba de aire de manera convencional (Scotto et al., 2013; Sánchez-Olivares, 2021).

5.3.2 Cuantificación de la fMN espontánea e inducida

Al término del tratamiento con gasolina magna (87 octanos), se tomó a cada uno de los organismos sobrevivientes y se le realizó un corte a la altura de médula espinal retirando la cabeza para hacer un frotis con el resto del cuerpo colocando una gota de sangre en un portaobjetos donde se dejan secar a temperatura ambiente durante 15 min (figura 9). Posteriormente las muestras se fijaron con metanol absoluto cubriendo en su totalidad la muestra durante 15 min.

Finalmente, se tiñeron con colorante Giemsa al 10% durante 15 a 20 min terminando con un secado a temperatura ambiente y se colocó un cubreobjetos para su posterior análisis en un microscopio óptico (Scotto et al., 2016; Sánchez-Olivares, 2021).

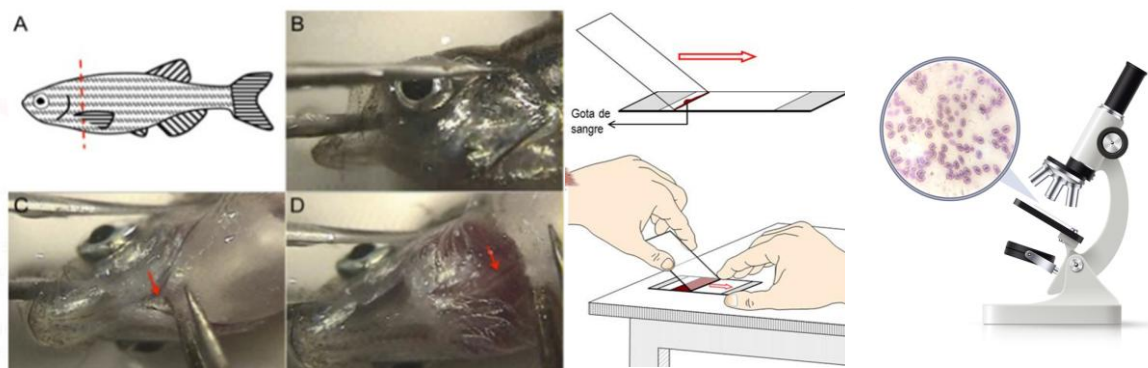


Figura 9. Corte transversal en *D. rerio* para preparación y observación microscópica (Hernández-Lozada, 2023).

Para el análisis microscópico y determinación de la fMN, se analizaron siete campos por muestra con un total de 1500 eritrocitos por concentración bajo un microscopio compuesto con aceite de inmersión a una magnificación de 100x tomando en cuenta como criterios de identificación de micronúcleos: que no fueran refractarios, con intensidad de tinción similar a los núcleos principales y con un diámetro entre 1/16-1/3 de la media del diámetro del núcleo principal (Zalacain y Patiño, 2005).

Se realiza el cálculo de la frecuencia de micronúcleos con la siguiente fórmula:

$$fMN = \frac{\text{Número de micronucleos}}{\text{Número de células analizadas}}$$

Análisis estadístico

La evaluación de las frecuencias calculadas por tratamiento se llevó a cabo para comprobar su distribución mediante la prueba Shaparo-Wilks con el programa PAST (Hammer et al., 2001). Al no resultar normales, el contraste fue realizado mediante una prueba de Chi cuadrada y para determinar la genotoxicidad respecto a los controles se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis y pruebas pareadas de Mann-Whitney; todas mediante el mismo programa.

5.4 Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico en *Vicia faba*

Para establecer daño citotóxico y genotóxico en células meristemáticas de raíces de *V. faba* por exposición a gasolina magna (87 octanos) presente en agua, a través del índice mitótico (IM) y la frecuencia de micronúcleos (fMN), se trataron con las mismas concentraciones empleadas en la genotoxicidad del pez cebra para fines de comparación, de la siguiente forma:

5.4.1 Montaje y calibración de *Vicia faba*

Para establecer las condiciones experimentales en *V. faba* se requirió inducir la germinación en condiciones fisicoquímicas reportadas, en donde se pueda identificar la frecuencia de germinación, así como la frecuencia y etapas de divisiones celulares (índice mitótico espontáneo "IM") (Gaytán, 2006; Sánchez-Zepeda et al., 2019).

5.4.1.1 Germinación

Se lavaron y prepararon 20 semillas de *V. faba* colocándolas en agua y en oscuridad durante 24h, posterior a esto, se distribuyeron en dos charolas, entre dos camas de algodón humedecido con agua, para disminuir su exposición a la luz, durante 10 días con cambio y monitoreo diario del algodón para evitar contaminación o pudredumbre de la semillas, cuando alcanzaron la longitud deseada (3 cm), se prepararon los meristemos para realizar la fijación (Figura 10 y 11).



Figura 10. Montaje de 20 semillas de *V. faba* (haba) para iniciar proceso de germinación bajo condiciones de laboratorio.



Figura 11. Semillas de *V. faba* germinadas

5.4.1.2 Preparaciones microscópicas

Para realizar las preparaciones microscopias se siguió la metodología de acuerdo a lo establecido por Zepeda et al. (2019), con los siguientes pasos:

- **Fijación**

Se realizó un corte de 2-4 mm de meristemo apical y se fijaron con etanol-ácido acético (3:1) colocándolos en frascos envueltos con papel aluminio por un tiempo mínimo de 15 min y hasta 24 h.

- **Deshidratación**

Se maceraron los meristemos con una navaja hasta obtener una consistencia de puré, simultáneamente se colocaron en etanol al 70% durante 15 minutos.

- **Hidrólisis**

Se realizó con ácido clorhídrico (HCL) 5 N a 28° C durante 25 minutos con una agitación continua para eliminar la pared celular, posterior a la hidrólisis se decantó el excedente de HCL y lavaron los meristemos 3 veces con agua destilada.

- **Tinción**

Se colocaron los meristemos en portaobjetos y se les agregó una gota de acetorceína durante 20 minutos en la oscuridad, al término del tiempo se eliminó el exceso de colorante por decantación y se lavaron con ácido acético al 45% 2 veces (figura 12).

- **Montaje**

Finalmente se colocó un cubreobjetos y se realizó un aplastamiento en monocapa “squash” para obtener las laminillas y poder realizar la observación microscópica.



Figura 12. Material empleado en la preparación de los meristemos de *V. faba* para muestra microscópica

5.4.2 Análisis y determinación del índice mitótico espontáneo

Para determinar el índice mitótico espontáneo, se cuantificaron al microscopio al menos 500 células en un aumento de 40x, registrando células en división:

- El índice mitótico espontáneo se calculó como el cociente del número de células en mitosis con el número total de células contadas por 100

$$\frac{\text{Número de células en división}}{\text{Número de células totales}} \times 100$$

5.4.2.1 Evaluación de la citotoxicidad en *V. faba*

Tratamiento

Para poder establecer la citotoxicidad, se pusieron a germinar habas y se establecieron 4 lotes experimentales, 3 con las concentraciones probadas en peces 1.4 mg L⁻¹ (0.14%) considerando esta como el 100% y sus respectivas dosis subtóxicas 1.05 mg L⁻¹ (Dil 75%) y 0.7mg L⁻¹ (Dil50%) y un control negativo concurrente (solución salina al 5%). Posteriormente las habas fueron expuestas en tratamiento durante 4 h y con 2 h de recuperación para evaluar el daño provocado en G2, el cual se expresa con aberraciones cromatídicas y solamente son inducidas por agentes S-independientes (Gaytán, 2006).

Montaje

Al término del tratamiento, se cortaron los meristemas apicales de las raíces de no más de 5 cm de longitud y fueron sujetas a los pasos antes mencionados de fijación, deshidratación, hidrólisis, tinción y montaje (apartado 5.4.1.1).

Análisis microscópico y determinación del efecto citotóxico

Se cuantificaron al menos 500 células por concentración evaluada a un aumento del 40x, registrando las células en división. Se identifica para cada concentración el índice mitótico inducido por tratamientos con BTX, a través del cociente del número de células en mitosis con el número total de células contadas por 100.

La citotoxicidad se determinó al comparar el índice mitótico inducido por los tratamientos contra el índice espontáneo del control negativo a través de la siguiente formula:

$$\frac{IM_{exp}}{IM_{esp}} \times 100$$

Donde: IM_{exp} , índice mitótico experimental e IM_{esp} , índice mitótico espontáneo, y se interpreta como citotoxicidad a cualquier reducción del IM_{exp} >50% con respecto al índice mito de control negativo (IM_{esp}) (Sánchez-Zepeda et al., 2019).

Análisis estadístico

Para determinar el efecto citotóxico de gasolina magna (87 octanos) sobre el índice de viabilidad se trabajó con los porcentajes del IM sometiéndolos a una prueba de ANOVA y así determinar diferencias significativas entre los tratamientos, finalmente se aplicó la prueba de Tukey para establecer en qué tratamiento o tratamientos estaría la diferencia significativa (Beltrán y Gonza, 2017).

5.4.3 Evaluación del efecto genotóxico en *V. faba*

5.4.3.1 Inducción de micronúcleos

De acuerdo con Sánchez-Zepeda et al. (2019), el efecto genotóxico se determinó de manera simultánea al tratamiento para la citotoxicidad por lo tanto en la mismas condiciones y concentraciones antes mencionadas (apartado 5.4.2.1). Así mismo, la preparación de las muestras microscópicas con la misma metodología de apartado 5.4.1.2 de este documento siguiendo la metodología de Zepeda et al., (2019), previamente mencionada.

5.4.3.2 Cuantificación de la fMN espontánea e inducida

La determinación de daño genotóxico se hizo mediante la cuantificación y registro de la frecuencia de micronúcleos inducida (fMN) por los diferentes tratamientos en un promedio de 2500 células por tratamiento, en interfase a un aumento de 40X (Zepeda et al., 2019). El cálculo de la frecuencia se realiza con la siguiente fórmula:

$$fMN = nMN / (nMN + nCM)$$

Donde: **fMN**, frecuencia de micronúcleos; **nMN**, número de micronúcleos y **nCM**; número de células meristemáticas analizadas.

Análisis estadístico

Para determinar el efecto de gasolina magna (87 octanos) sobre el índice de viabilidad se trabajó con los porcentajes del IM sometiéndolos a una prueba de ANOVA para determinar

diferencias significativas entre los tratamientos, finalmente se aplicó la prueba de Tukey para determinar en qué tratamiento o tratamientos estaría la diferencia significativa (Beltrán y Gonza, 2017).

Para la evaluación de las frecuencias de micronúcleos (fMN) calculadas por tratamiento y determinar una distribución normal, se realizó la prueba Shapyyro-Wilks con el programa PAST (Hammer et al., 2001).

6. Análisis y discusión de resultados

6.1 Toxicidad en adultos de *Danio rerio*

Como se puede observar en la tabla 9, se probaron un total de 15 concentraciones de gasolina magna (87 octanos) para determinar su toxicidad en organismos adultos de pez cebra con exposiciones de 24 h, donde se registró una respuesta heterogénea sin consistencia para la mortandad.

Se aplicó una regresión lineal a los datos observados con un valor de R^2 (coeficiente de relación) muy bajo (figura 13), lo cual impidió determinar la concentración letal media (CL_{50}) ($y = 222.8x - 0.0894$, $R^2 = 0.4549$) indicando una correlación lineal positiva y moderada entre las variables de mortalidad y concentración a la que fueron expuestas, teniendo una mortalidad promedio por tratamiento 3.13 ± 2.85 desviación estándar, sin embargo; al ser un resultado moderado, se tomó como concentración de referencia la más alta que mostrara una primera respuesta tóxica denominada concentración umbral [1.4 mg L^{-1} (0.14%)].

Tabla 9. Concentraciones y porcentaje de mortandad en *D. rerio* adulto expuesto por 24h a gasolina magna (87 octanos)

Concentración % (BTEx/agua)	Concentración mg L^{-1} (BTEx/agua)	Tratamiento 1 (Vivos /muertos)	Tratamiento 2 (Vivos /muertos)	Tratamiento 3 (Vivos /muertos)	% Mortandad	$\bar{x} \pm S$
0.05%	0.5	0.00	0.00	0.00	0%	0
0.07%	0.7	0.00	0.00	0.00	0%	0
0.10%	1	0.00	0.00	0.00	0%	0
0.14% *	1.4	0.17	0.17	0.50	28%	0.04
0.17%	1.7	0.00	0.00	0.00	0%	0
0.20%	2	0.17	0.67	0.17	33%	0.08
0.24%	2.4	0.00	0.00	0.00	0%	0
0.25%	2.5	1.00	1.00	1.00	100%	0
0.27%	2.7	0.50	0.67	0.33	50%	0.03
0.28%	2.8	1.00	1.00	1.00	100%	0

0.30%	3	1.00	1.00	1.00	100%	0
0.35%	3.5	0.00	0.00	0.00	0%	0
0.37%	3.7	1.00	1.00	1.00	100%	0
0.40%	4	0.83	0.83	0.83	83%	0
0.50%	5	1.00	0.83	0.67	83%	0.03

Continuación de tabla 9. Concentraciones y porcentaje de mortandad en *D. rerio* adulto expuesto por 24h a gasolina magna.

(*) Concentración umbral

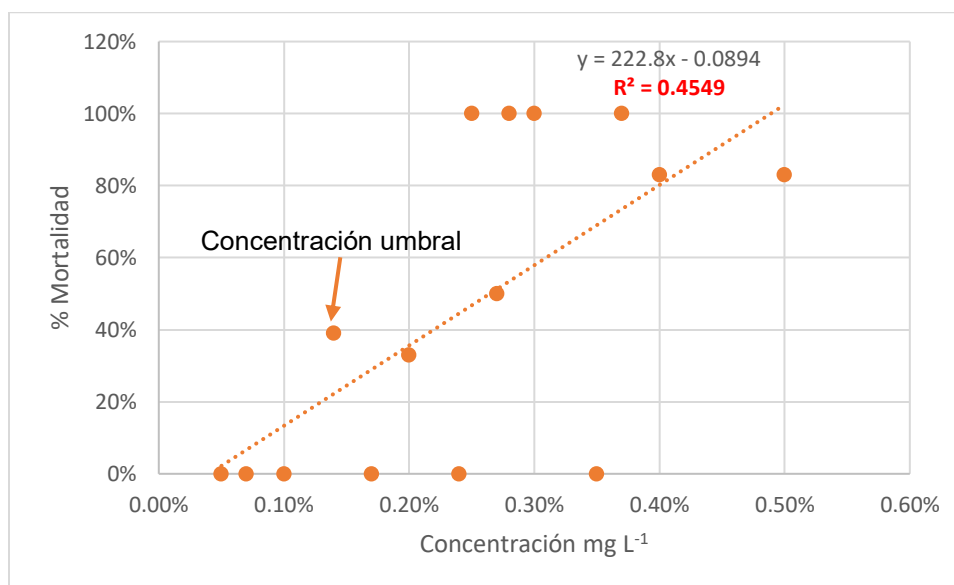


Figura 13. Curva de toxicidad con regresión lineal en peces cebras adultos expuesto a diferentes concentraciones de gasolina magna (87 octanos).

Estos resultados corroboran lo reportado por Alves et al. (2017) tras haber expuesto embriones de *D. rerio* a efluentes finales de agua en gasolineras a una CL₅₀ de durante 96 h en donde el efluente más tóxico alcanzó el 8,9 % (v/v), así como también se observó un retraso significativo en el retraso embrionario-larval con diluciones de ESF (fracciones solubles del efluente) del 10 % y el 20 % de los efluentes de todas las gasolineras, concluyendo con que los componentes presentes en la gasolina y, en consecuencia, en las gasolineras, son tóxicas para los organismos acuáticos.

Ledesma en el 2017, reportó que los componentes de los hidrocarburos BTEX, pueden generar toxicidad crónica en la biota acuática en general a concentraciones >110 ug L⁻¹ y efectos a gran escala en concentraciones > 5.3 mg L⁻¹.

La presencia de los compuestos BTEX en organismos marinos puede causar un crecimiento insuficiente especialmente en peces y crustáceos en edades tempranas, además de narcosis y alteraciones en las membranas celulares lo que genera respuestas

variables entre individuos de una población, esto sugiere un alto impacto en los ecosistemas marinos, se estima que alrededor del 70-75% de la contaminación marina global es resultado de las actividades antropogénicas y que un 90% de los contaminantes es transportado por los ríos al mar (Rodríguez et al., 2014).

Así mismo, un estudio publicado por Nascimento et al. (2020) evaluaron la toxicidad agua de los componentes BTEX, de manera individual y en mezcla como en la gasolina, donde los valores de la CL₅₀, demostró que xileno fue el compuesto más tóxico, seguido de tolueno y benceno. Las combinaciones mostraron efectos no siempre aditivos, lo que complica la predicción de riesgo en mezclas, corroborando la heterogeneidad de los datos obtenidos en el presente trabajo y la dificultad para el establecimiento de una CL₅₀.

Finalmente, un estudio realizado en *Synodontis clarias*, demostró la capacidad de bioacumulación de los componentes BTEX, tras ser expuesto a diferentes concentraciones de estos compuestos en agua, donde se mostró bioacumulación significativa de benceno, tolueno, xileno, etilbenceno (Akinsanya et al., 2019)

6.2 Genotoxicidad en adultos de *Danio rerio*

En esta fase experimental se usó la concentración umbral determinada de la previa curva de toxicidad correspondiente a 1.14 mg L⁻¹ (0.14%), el resultado se tomó como concentración 100% a partir de la cual se realizaron dos diluciones denominadas concentraciones subtóxicas [1.05 mg L⁻¹ (Dil 75%) y 0.70 mg L⁻¹ (Dil 50%)].

Como se puede observar en la tabla IV, se muestran los resultados de la genotoxicidad a partir de la fMN promedio a las concentraciones experimentales probadas con gasolina magna (87 octanos), donde se observa una relación positiva entre la concentración y efecto evaluado, es decir, a mayor concentración mayor frecuencia de micronúcleos promedio observados.

Al aplicar la prueba estadística, se analizó el promedio de micronúcleos (MN) y células por campo. Se determinó que la distribución de los datos no seguía una distribución normal, por lo que se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, identificándose grupos independientes [$X^2 = 51.22$, $p < 0.05$ (2.72E-12)]. Se concluyó que las concentraciones del 100% y 75% no presentan diferencias significativas entre sí, dado que, al considerar un margen de error del 5%, la concentración al 75% se encuentra dentro del rango de aceptación de la concentración al 100%

La diferencia significativa por el aumento de micronúcleos respecto del control de ambas concentraciones, permitió determinar que el compuesto es mutagénico en pez cebra. Sin embargo; la Dil 50% no es estadísticamente significativa diferente del control por lo que se le considera como un débil positivo (tabla 10, figura 14 y 15).

Tabla 10. Frecuencia total y promedio por campo de Mn en *D. rerio* adultos inducidos por exposición aguda (24 h) por gasolina magna (87 octanos).

Concentración	n $\bar{X} \pm S$	Mn $\bar{X} \pm S$	fMn $\bar{X} \pm S$	Test de Mann-Whitney
1.14 mg L⁻¹ (100%)	237.46±155.79	3.81±4.58	1.6±2.9	a
1.05 mg L⁻¹ (Dil 75%)	239.6±174.79	2.71±3.03	1.13±1.74	a
0.7 mg L⁻¹ (Dil 50%)	234.09±184.31	1.08±1.64	0.46±0.89	b
Control	280.87±176.43	0.97±1.97	0.35±1.12	b

n: Células contabilizadas; Mn: micronúcleos contabilizados; fMn: frecuencia de micronúcleos; **Test de Mann-Whitney:** a; concentraciones que no presentan diferencia significativa b y c; diferentes significativamente

El promedio de la frecuencia de micronúcleos inducida (fMN) concuerda con lo esperado por la capacidad genotóxica del benceno y con lo reportado por Urquieta (2023), en donde se evaluaron individuos expuestos de forma laboral, encontrando fMN de 35 en los individuos expuestos y una frecuencia de casi la mitad en un grupo control no expuesto (17.67), sin embargo; en este trabajo el efecto genotóxico fue débil debido a que en el estadístico el valor p no mostró diferencias significativas.

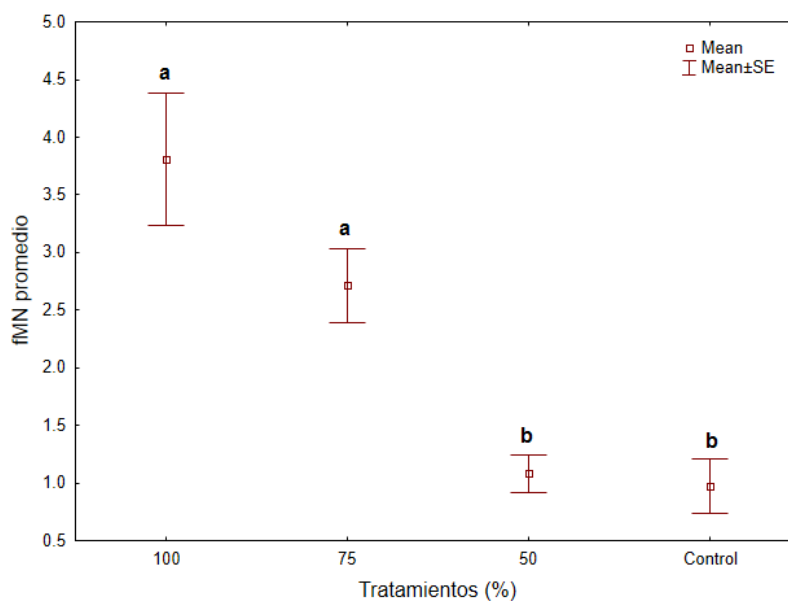


Figura 14. Micronúcleos promedio de dosis umbral y sus dil75 y 50% por exposición a gasolina magna (87 octanos) en adultos de *D. rerio*, donde a y b representan los resultados del Test de Mann-Whitney. Los grupos marcados con la misma letra indican que entre los mismos no existe diferencias significativas.

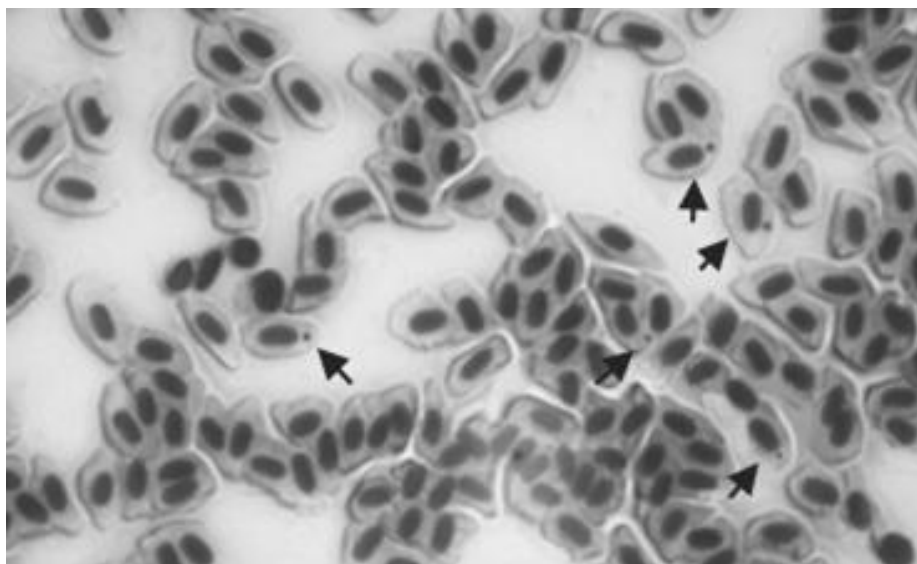


Figura 15. Micronúcleos concentración dosis umbral 1.4 mg L⁻¹ al 75% en adultos de *D. rerio*, por gasolina magna (87 octanos).

Por otra parte, de acuerdo con la ToxFAQs, reportada por la ATSDR (2016), la exposición a gasolina en altos niveles puede causar efectos nocivos al sistema nervioso. Por lo tanto, además de la peligrosidad detectada por la capacidad genotóxica encontrada, se hace necesario investigar efectos neurotóxicos al par de las concentraciones evaluadas en este trabajo.

Lo anterior siendo relevante para la salud y ecología, igualmente, la ATSDR (2016), menciona la importancia de la misma, ya que se ha encontrado gasolina de automóvil en por lo menos 23 de los 1,430 sitios de la Lista de Prioridades Nacionales identificados por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de EE. UU. (USEPA).

Así mismo, es importante recordar que el daño genotóxico evaluado e identificado en el presente trabajo, es de importancia, debido a que este tipo de daño por sí solo se puede asociar con efectos secundarios como daños teratogénicos y carcinogénicos; por lo que es necesario profundizar en estudios que consideren variación intra individuales (edad, sexo, estado de salud, hábitos alimenticios, entre otros) e interespecíficas que pueden generar diferentes respuestas biológicas (Díaz et al., 2013).

Además, los resultados obtenidos en este estudio, han demostrado el potencial genotóxico de la gasolina en organismos acuáticos.

Medeiros et al. (2017) evaluaron la exposición del pez *Centropomus parallelus* a la fracción soluble en agua del petróleo (Water-Soluble Fraction, WSF) en concentraciones del 25% y 50%. Esta fracción corresponde a los compuestos de bajo peso molecular que se disuelven en agua tras un derrame, siendo más biodisponibles y tóxicos para los organismos acuáticos. Los autores encontraron un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos y daño al ADN detectado mediante el ensayo Comet.

Complementariamente, Bettim et al. (2016) expusieron peces neotropicales al agua contaminada con la fracción soluble en agua de la gasolina (Water-Soluble Fraction of Gasoline, WSFG), que corresponde a los compuestos solubles en agua presentes en la gasolina y que son más biodisponibles y tóxicos para los organismos acuáticos, en concentraciones del 1%, 2% y 4%. Los autores registraron un aumento significativo en biomarcadores de estrés oxidativo, como especies reactivas de oxígeno (ROS) y lipoperoxidación (LPO), además de alteraciones en enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT). Estos resultados sugieren que el mecanismo de genotoxicidad observado en ensayos como Comet y micronúcleo podría estar mediado por un desequilibrio redox, que provoca roturas en el ADN y daño cromosómico.

6.3 Citotoxicidad en *Vicia faba*

Para evaluar la citotoxicidad en *V. faba*, se probaron las mismas concentraciones que en *D. rerio* para poder comparar la toxicidad y la genotoxicidad.

De manera inicial se analizó un total de 2,500 células meristemáticas sin tratamiento, registrando la cantidad de las mismas en división (índice mitótico) por cada 500 (figura 16). En promedio se observaron 206 células en división por cada 500 células analizadas en el control, lo que corresponde a un índice mitótico espontáneo de 13.77, en cuanto a las células en tratamiento se obtuvo un IM de 2.90 en la concentración más alta (100 %), así mismo, para cada tratamiento se determinó la desviación estándar (tabla 11).

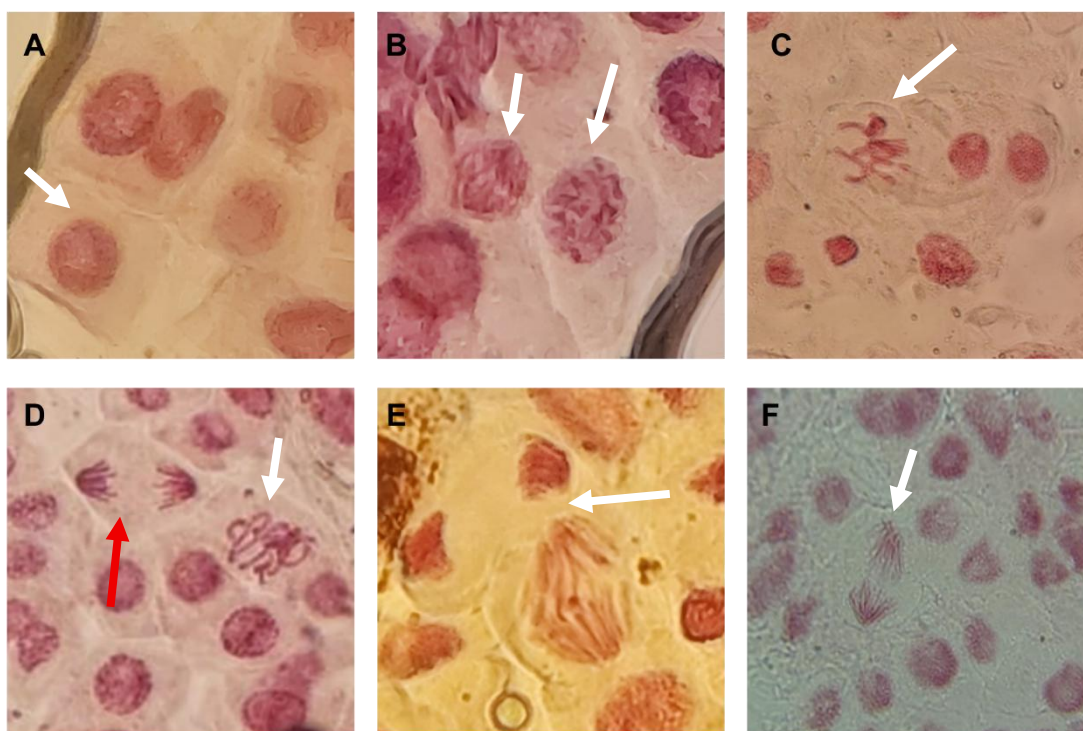


Figura 16. Fases de la división celular de meristemos de *V. faba* sin tratamiento donde; A) interfase; B) profase; C) metafase; D) anafase (flecha roja) y metafase (flecha blanca); E) telofase; F) anafase.

Tabla 11. Desviación estandar y prueba de Tukey, frecuencia de células en división entre los tratamientos por gasolina magna (87 octanos) con dosis umbral y dosis subtóxicas en *V. faba*.

Concentración	Total de células observadas	Células en división ($\bar{x} \pm S$)	Prueba de Tukey			
			100%	75%	50%	Control
1.14 mg L⁻¹ (100%)	2500	72.6 $\pm$ 53.30		0.6724	0.4378	0.001353
1.05 mg L⁻¹ (Dil75%)	2500	100 $\pm$ 31.39	1.611		0.9763	0.008612
0.70 mg L⁻¹ (Dil50%)	2500	109.8 $\pm$ 21.29	2.188	0.5763		0.01683
Control (agua)	2500	206.7 $\pm$ 23.53	6.828	5.433	4.934	

Nota: Las diferencias significativas están resaltadas con color rojo mientras que el color morado representa un débil positivo respecto al control.

Para la evaluación de citotoxicidad en *V. faba*, se probó la normalidad del índice de micronúcleos donde la frecuencia se convirtió en el índice y al índice se le aplicó pruebas de normalidad, por lo que se realizó una prueba de ANOVA logrando determinar hay diferencias significativas entre los tratamientos (F (3,17): 8.157, p 0.0022).

Así mismo mediante la prueba de Tukey, se determinó que en todos los casos los tratamientos tienen menos células en división con respecto al control, lo que sugiere un efecto citotóxico y que este tiene una relación negativa con la concentración, es decir, a mayor concentración menor número de división celular y, por lo tanto, mayor citotoxicidad; sin embargo, es posible observar que la Dil50% es un débil positivo respecto del control (figura 17 y tabla 11).

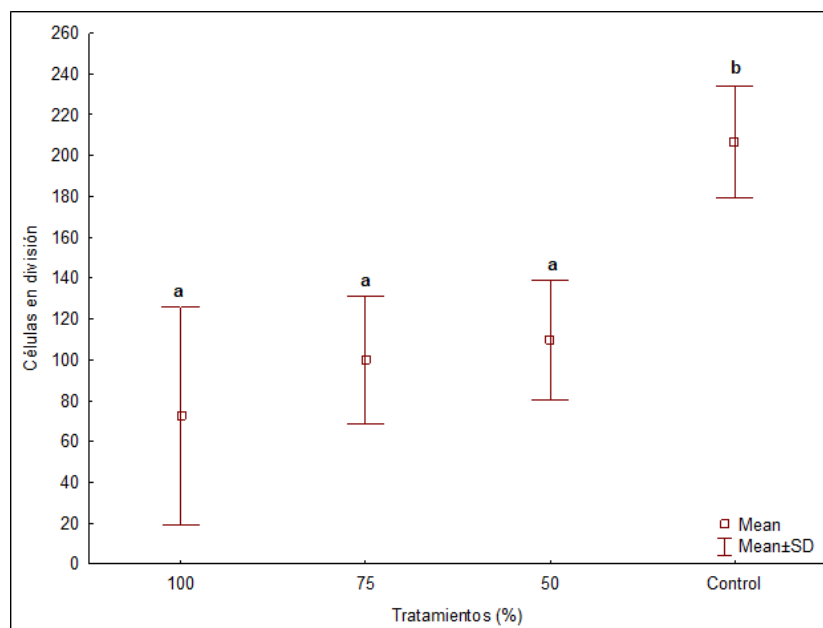


Figura 17. Cantidad de células en división de *V. faba* por exposición a gasolina magna (87 octanos), donde: a) tratamientos y b) control

Los daños causados por derrames de gasolina pueden generar tres principales tipos de afectaciones, de acuerdo con Carvazos et al., (2014) estos se clasifican en daños humanos como las intoxicaciones, al patrimonio teniendo como ejemplo pérdidas materiales y finalmente ecológico donde están implicadas las afectaciones al suelo, cultivos y al agua.

El presente trabajo contribuye a los daños ecológicos, al ver un efecto positivo en el *V. faba*, por lo que en caso de contaminación en algunos terrenos por este tipo de compuestos deben ser sometidos a procesos de biorremediación, recuperando su productividad después de muchos meses o bien otros tantos quedan inhabilitados, abandonados e incluso fungiendo como basureros, de igual forma menciona que, además de las afectaciones al suelo, los derrames de hidrocarburos afectan a los cultivos que en su mayoría son comestibles.

De acuerdo con Sánchez-Zepeda et al., (2019), la variación en el IM es un criterio aceptable de citotoxicidad en todos los sistemas biológicos, puesto que valores del IM por debajo del control negativo pueden indicar que el crecimiento y desarrollo son afectados por el contaminante al que han sido expuestos. En el presente estudio se encontraron diferencias significativas de todos los tratamientos respecto del grupo control, que en promedio tuvo un IM= 13.77 contra el IM de la concentración umbral al 100% = 2.90.

Así mismo, este resultado se corrobora con lo reportado por Gepner en 2022, donde se realizó un estudio en *Allium cepa* (Linneo, 1753) evaluando la citotoxicidad y genotoxicidad de colillas de cigarro, ya que al igual que la gasolina, contiene a los componentes BTEX, posterior a 72 h de exposición los resultados mostraron 58 y 70% de inhibición de crecimiento para 0,5 y 1 g de colillas respectivamente y presentando una disminución del IM con respecto a los controles, por lo que es posible inferir que los componentes BTEX son potencialmente inhibidores de la división celular.

6.4 Genotoxicidad en *Vicia faba*

Es posible observar la presencia de micronúcleos en *V. faba* por la exposición a concentraciones de gasolina magna (87 octanos) en la figura 18, mientras que en la tabla XIII, se aprecia una fMN menor en el control con 1.61 mientras que tanto en la concentración más alta (100%) como en sus respectivas concentraciones subtóxicas, la fMN aumenta significativamente aún en la concentración más baja (Dil 50%) con una fMN de 7.72 y de 12.49 para la concentración al 100% (tabla 13).

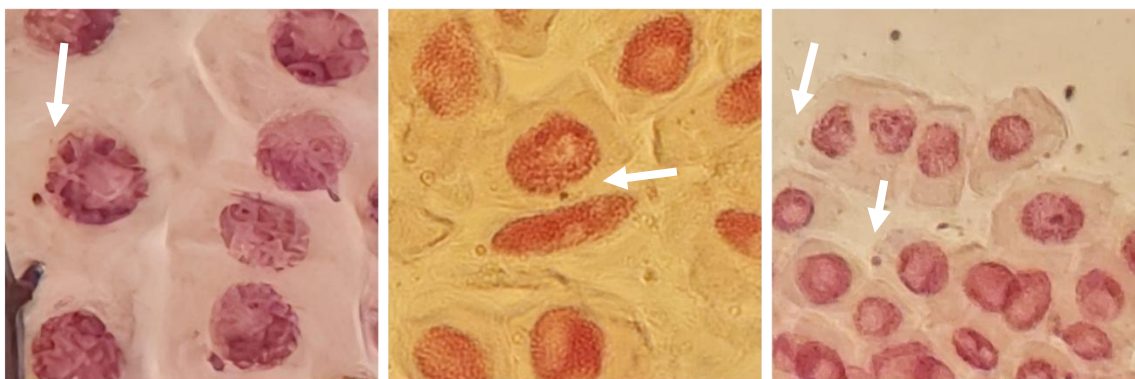


Figura 18. Micronúcleos en células de meristemas de *V. faba* a 40x por exposición a gasolina magna (87 octanos). Fotografía: Adriana J. Bañuelos, 2024.

Tabla 13. Frecuencia de Micronucleos y prueba de Tukey entre los tratamientos por exposición a gasolina magna (87 octanos) en *V. faba*

Concentración	Total células analizadas	# MN	fMN	Prueba de Tukey			
				100%	75%	50%	Control
1.14 mg L⁻¹ (100%)	2500	347	12.19*		0.9971	0.03867	0.0005487
1.05 mg L⁻¹ (Dil75%)	2500	338	11.91*	0.2809		0.05573	0.0007469
0.70 mg L⁻¹ (Dil50%)	2500	209	7.72*	4.307	4.027		0.07417
Control (agua)	2500	41	1.61	7.533	7.29	3.802	

(*) Diferencias significativas ANOVA ($p < 0.05$), la prueba de Tukey, las diferencias significativas están resaltadas en color rojo

Posteriormente se evaluó la normalidad de los datos mediante una prueba de ANOVA donde también se apreciaron diferencias significativas en la cantidad de micronúcleos por tratamiento ($F(3, 17): 12.44, p = 0.0003$).

Finalmente, mediante una prueba de Tukey se determinó que la cantidad de micronúcleos de todos los tratamientos es superior que el control, y el tratamiento al 100% tiene significativamente más micronúcleos que el tratamiento al 50%, por lo que también existe un efecto genotóxico diferencial (tabla 13, figura 19).

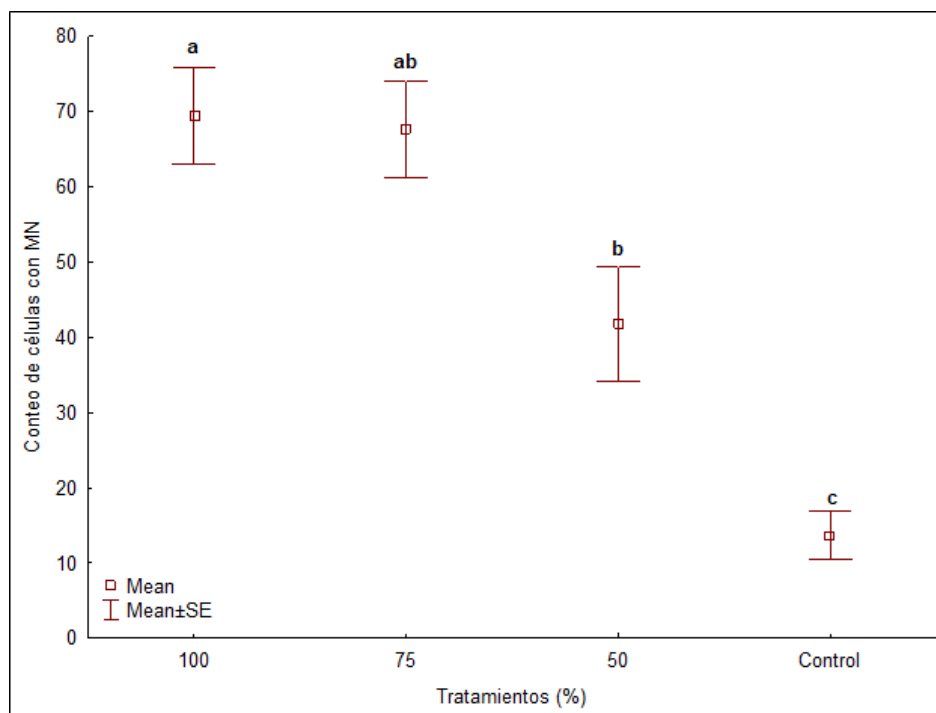


Figura 19. Micronúcleos en células de meristemos de *V. faba* por exposición a gasolina magna (87 octanos) donde ab representa que no existe diferencia significativa entre las concentraciones al 100 y 75%.

El ensayo de micronúcleos es considerado práctico, universalmente validado y tecnológicamente accesible para evaluar inestabilidad genética producida por agentes genotóxicos (Zalacain et al., 2005). El estudio de Acevedo (2006) reveló la existencia de diferencias significativas entre las concentraciones registradas en estaciones de servicio industriales y comerciales, así como entre las diferentes estaciones comerciales por lo que existe un incremento de riesgo cancerígeno superior al admisible.

En el presente estudio se contabilizó la cantidad de micronúcleos presentes en 2500 células luego de una exposición aguda a gasolina magna (87 octanos) donde, al igual que en la determinación del IM, se encontraron diferencias significativas ($F(3, 17): 12.44, p = 0.0003$) respecto del control, de este modo se corrobora lo descrito por Sánchez et al., (2018) en su estudio de genotoxicidad y citotoxicidad por exposición a herbicida (contiene benceno) componentes BTEX, donde de igual forma se presentaron diferencias significativas tras una exposición aguda ($p < 0.05$) con respecto al testigo negativo, igualmente el índice mitótico se modificó, mostrando una menor división dependiente de la concentración y tiempo de recuperación.

Existen pocos estudios dedicados a la evaluación de la genotoxicidad por exposición a gasolina en los sistemas vegetales; por lo cual, el presente estudio podría incentivar al

aumento de los mismos para determinar el verdadero impacto de este contaminante no solo en la salud humana sino también en el ecosistema.

7. Conclusión

Los hidrocarburos derivados del petróleo, específicamente los compuestos BTEX presentes en la gasolina magna (87 octanos), muestran efectos tóxicos y genotóxicos significativos en organismos acuáticos y vegetales, aunque con respuestas diferentes según el bioensayo utilizado.

En el presente estudio, la toxicidad aguda evaluada en *D. rerio* fue inconsistente, lo que impidió determinar una dosis letal media (LD₅₀) estadísticamente válida. No obstante, se utilizó la concentración umbral obtenida como índice toxicológico para evaluar la genotoxicidad en células sanguíneas periféricas. Por su parte, en el bioensayo con *V. faba* sí se determinó la LD₅₀, que sirvió como base para la evaluación genotóxica en células meristemáticas de raíz.

En ambos bioensayos se observó un aumento notable en la frecuencia de micronúcleos, indicador claro de daño genotóxico. La respuesta fue más pronunciada en *V. faba*, donde la frecuencia de micronúcleos alcanzó valores mayores y el índice mitótico disminuyó un 21% bajo la concentración umbral (1.14 mg/L), evidenciando un efecto genotóxico más fuerte en organismos vegetales. Por contraste, la toxicidad aguda fue más evidente en el pez cebra, donde el daño letal se presentó incluso a bajas concentraciones, aunque con respuestas heterogéneas que complicaron la modelación estadística.

Este contraste refleja diferencias en la sensibilidad biológica y los mecanismos de respuesta entre organismos acuáticos y vegetales. Mientras que los peces manifiestan una mayor sensibilidad a efectos letales inmediatos, las plantas exhiben un daño genético acumulativo más detectable, subrayando la importancia de usar modelos múltiples y biomarcadores específicos para una evaluación integrada del riesgo ambiental.

Desde una perspectiva toxicológica y regulatoria, estos resultados demuestran la necesidad de normativas que consideren no solo la toxicidad aguda sino también los efectos genotóxicos subletales, con un enfoque multidisciplinario. También resaltan la importancia de proteger a trabajadores expuestos y evaluar los impactos de la gasolina y sus compuestos derivados en ecosistemas, particularmente en contextos donde la regulación y las medidas de mitigación son limitadas, como en México.

Este estudio aporta valiosa información ecotoxicológica sobre los daños potenciales causados por exposiciones directas e indirectas a BTEX, sirviendo como una base científica para fomentar más investigaciones, mejorar planes de manejo ambiental y promover la implementación de legislación ambiental que asegure un uso y manejo más seguro de estas sustancias para salvaguardar la salud humana y la biodiversidad.

Referencias

- Acuña, S. J. G., Herrera, M. L., Bautista, L. R., & Sánchez, M. (2020). Efecto genotóxico y citotóxico del plomo en meristemos radicales de dos variedades de *Vicia faba* L. y su relación con la domesticación. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 8(2), 73–82. <http://dx.doi.org/10.47808/revistabioagro.v8i2.181>
- Alcántar González, F. S., Elizalde Segovia, R., Olvera Santos, M. G., López Herrera, D., & Cruz Gómez, M. J. (2020). Análisis del contenido de benceno en las gasolinas y estimación de emisiones de este compuesto al ambiente. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 36(2), 322–331. <https://doi.org/10.20937/rica.53402>
- Almazán-Casteñada, P. J., Alarcón, A., García-Barradas, Ó., Mendarte-Alquisira, C., & Ferrera-Cerrato, R. (2024). Fitotoxicidad y fitorremediación de un suelo contaminado con gasolina utilizando plantas de girasol asistidas por bacterias rizosféricas nativas. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 40. <https://doi.org/10.20937/rica.55039>
- Alves, R. N., Mariz, C. F., De Paulo, D. V., & Carvalho, P. S. (2017). Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*. *Chemosphere*, 178, 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.023>
- Andrade, J. (2022). Efectos de la contaminación en las matrices ambientales agua, suelo y atmósfera. En C. Lara-Bustamantes, D. Muñoz, & C. Chicaiza-Ortiz (Eds.), *La investigación científica en diversas ciencias* 15, 115–137). <https://doi.org/10.34893/o5438-7720-2889-r>
- Animal Político. (2024, 2 de abril). Pemex registra 270 derrames y fugas de alto impacto ambiental de 2018 a 2024. *Animal Político*. <https://animalpolitico.com/sociedad/pemex-cifra-derrames-petroleo-alto-impacto>
- Arellano-García, M. E., Torres-Bugarín, O., García-García, M. R., García-Flores, D., Toledano-Magaña, Y., Sanabria-Mora, C. S., & García-Ramos, J. C. (2022). Genomic instability and cyto-genotoxic damage in animal species. En *Updates on Veterinary Anatomy and Physiology* (Serie Veterinary Medicine and Science). ItechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99685>
- Argota, G. P., & Iannacone, J. (2022). Potencial de riesgo ecotoxicológico por hidrocarburos en el ecosistema costero-marino de Ventanilla, Callao-Perú: Parte I. *The Biologiste* (Lima), 20(1), 151-156.
- ATSDR (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades). (2019). *Módulo I: Introducción a la toxicología*. Centers for Disease Control and Prevention. https://www.atsdr.cdc.gov/es/training/toxicology_curriculum/modules/1/es_lecturenotes.html
- ATSDR [Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades]. (2016). Resumen de Salud Pública: Gasolina de automóvil (Automotive Gasoline). Recuperado el 26 de septiembre de 2024, de https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs72.html
- ATSDR [Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades]. (2022). ToxFAQs™: Éter metil tert-butilico (MTBE) (Methyl Tert-Butyl Ether). Recuperado el 26 de septiembre de 2024, de https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts91.html#:~:text=El%20MTBE%20se%20evapora%20r%C3%A1pidamente,llegar%20hasta%20el%20agua%20subterr%C3%A1nea
- ATSR [Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades]. (2019). Módulo III - Introducción a la evaluación de riesgo. Recuperado el 3 de octubre de 2024, de https://www.atsdr.cdc.gov/es/training/toxicology_curriculum/modules/3/es_lecturenotes.html#:~:text=La%20evaluaci%C3%B3n%20de%20riesgo%20es,en%20relaci%C3%B3n%20con%20la%20exposici%C3%B3n
- Akinsanya, B., Isibor, P. O., Kuton, M. P., Dada, E. O., & Saliu, J. K. (2019). Comparative partition coefficients of BTEX and OCPs between host *Synodontis clarias* and parasite *Wenyonia*

- acuminata. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 80(1). <https://doi.org/10.1186/s41936-019-0090-6>
- Beltrán, R., & Gonza, K. (2017). Cytotoxicity and genotoxicity of the waters of the Jequetepeque and Moche Rivers in the Environmental Bioindicator *Vicia faba* L. *Scientia Agropecuaria*, 8(3), 203-213. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.03.03>
- Bettim, F. L., Galvan, G. L., Cestari, M. M., Yamamoto, C. I., & de Assis, H. C. S. (2016). Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline. *Chemosphere*, 144, 1467–1474. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.109>
- Bolton, J. L. (2016). Formation and biological targets of quinones: Cytotoxic versus cytoprotective effects. *Chemical Research in Toxicology*, 29(1), 1–12. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00426>
- Boluda, C. J., Macías, M., & González Marrero, J. (2019). La complejidad química de las gasolinas de automoción. *Ciencia, Ingenierías y Aplicaciones*, 2(2), 51–79. <https://doi.org/10.22206/cyap.2019.v2i2.pp51-79>
- Bugarín, O. T., & Arias-Ruiz, L. F. (2023). Micronúcleos: actualización del papel en la inestabilidad genética, inflamación, envejecimiento y cáncer. Revisión panorámica. *Revista Biomédica (En Línea)*, 34(2), 208-223.
- Caja-Molina, A. V., & Iannaccone, J. (2021). Evaluación del riesgo ambiental por petróleo crudo en las especies acuáticas *Lemna minor*, *Daphnia magna* y *Danio rerio*. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 45(176), 777-794. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1398>
- Calcina, M. A. (2024). *Evaluación del potencial de adsorción de la especie Coffea arábica (cáscara de café) en aguas contaminadas por gasolina de 90 octanos, Cusco-2022* (Tesis de licenciatura). Universidad Continental. <https://hdl.handle.net/20.500.12394/16216>
- Carrión, S. O. J. (2024). *Análisis del impacto ambiental de derrames de gasolina en vehículos particulares en la calidad de suelo de la zona urbana de Comas, Lima, 2023* (Tesis de licenciatura). Universidad Privada del Norte. <https://repositorio.upn.edu.pe/bitstream/handle/11537/39637/TESIS%20Derrames%20de%20gasolina%20y%20calidad%20de%20suelo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Carriquiriborde, P. (2021). Biodisponibilidad, bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación de los contaminantes. En P. Carriquiriborde (Ed.), *Principios de Ecotoxicología* (pp. 62-92). Eulp.
- Castañedo, Z., Águila, E., Marrero, O., Meneses-Marcel, A., Sifontes, S., Seijo, M., & Santana, A. (2019). Bioensayo de toxicidad aguda en tres biomodelos utilizando compuestos de referencia. *Revista de Toxicología*, 36(2), 128-133. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=718016>
- Castillo-Salas, D. L. (2021). Técnicas básicas en toxicología con pez cebra (*Danio rerio*) (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Castillo-Salas, D. L., Gaytán-Oyarzun, J. C., López-Herrera, M., & Sánchez-Olivares, M. A. (2022). Pez cebra (*Danio rerio*): modelo experimental en la evaluación de compuestos xenobióticos. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 10(19), 61-65. <https://doi.org/10.29057/icbi.v10i19.8870>
- Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B., & Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 11(4), 539–552.
- Courchoud, T., & Ji, P. C. (2016). Biomarkers and clinical practice. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 39(1), 5-8. <https://doi.org/10.4321/s1137-6627/2016000100001>

- Corton, J. C., Bus, J. S., & Cox, L. A. (2018). Evaluating the mode of action of ethylbenzene-induced rat tumor responses. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 92, 321–335. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.12.021>
- CRE [Comisión Reguladora de Energía]. (2016). Norma Oficial Mexicana NOM-016-CRE-2016, Especificaciones de calidad de los petrolíferos. Diario Oficial de la Federación. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5450414&fecha=29/08/2016
- De la Paz Montt, J. (2012). Bioensayos con embriones de pez cebra (*Danio rerio*) como herramientas para la determinación de las condiciones toxicológicas de cuerpos de agua y mecanismos de inhibición de eclosión (Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas). Universidad de Chile, Chile.
- Dellarco, V. L., Gift, J. S., & Gentry, P. R. (2021). Mode of action, dose–response, and risk assessment considerations for ethylbenzene carcinogenicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 51(3), 225–246. <https://doi.org/10.1080/10408444.2021.1900742>
- del Brio, J. (2018). Identificación de biomarcadores moleculares de exposición crónica a hidrocarburos en el crustáceo de agua dulce *Hyalella curvispina* como herramientas para la evaluación ambiental en zonas de explotación hidrocarburífera (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Comahue, Argentina.
- del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372-387.
- Díaz, M. E., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz Suarez, J. J., & García-Barradas, O. (2013). Crecimiento de *Casuarina equisetifolia* (Casuarinaceae) en suelo con diésel, y aplicación de bioestimulación y bioaumentación. *Revista de Biología Tropical*, 61(3), 1039-1052. <https://doi.org/10.15517/rbt.v61i3.11779>
- EFEverde, R. (2015). BP pagará 18.700 millones de dólares por el vertido en el Golfo de México. EFEverde. Recuperado el 3 de octubre de 2024, de <https://efeverde.com/bp-pagara-18-700-millones-de-dolares-por-el-vertido-en-el-golfo-de-mexico/>
- EFINFO [Noticiero eficiencia informativa]. (2024). Clipviewer - En el 2024 precio de la gasolina llegó a nivel histórico (p. 3).
- EFSA [Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria]. (2019). Umbral de preocupación toxicológica. Recuperado el 26 de septiembre de 2024, de <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/threshold-toxicological-concern>
- ELIKA [Seguridad alimentaria]. (2023). Plomo. Recuperado el 3 de octubre de 2024, de <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/plomo/#evaluacion>
- El Economista. (2024, 15 de mayo). Consumo de gasolinas en México crece 8.2% en abril. *El Economista*. <https://www.eleconomista.com.mx>
- Gaytán, J. C. (2006). Evaluación ecotoxicológica del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente, a través de la actividad ganadera (Tesis doctoral). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Gepner, K. I. (2022). Estudios de toxicidad aguda, citotoxicidad y genotoxicidad de colillas de cigarrillo mediante bioensayos con *Allium cepa*. En *Resúmenes de las XXXIX Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán* (p. 31). Asociación de Biología de Tucumán. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/210600>
- González-Pérez, Y., González-Díaz, Y., Torres-Bastardo, A., Marín-Sánchez, D., & Castillo-Gart, J. A. (2020). Evaluación ecotoxicológica de los residuales del Laboratorio de Química Analítica. *Tecnología Química*, 40(2), 226-240. <http://scielo.sld.cu/pdf/rtq/v40n2/2224-6185-rtq-40-02-226.pdf>
- Hammer, D., Harper, D., & Ryan, P. (2001). PAST: paquete de programas de estadística paleontológica para enseñanza y análisis de datos. *Paleontología Electronica*, 4(1), 4.

- Hernández-Lozada, A. S. (2023). Evaluación del daño genotóxico por exposición a la bifentrina en Metztlán Hidalgo [Sesión de Congreso]. Congreso Nacional de Genética 2023, Catazajá, México. <https://www.alagenet.org/>
- Hernández-Medina, M., Díaz-Reséndiz, F., & Sánchez, A. (2022). Oxidative stress responses in fish exposed to volatile organic compounds: Biomarker evaluation. *Aquatic Toxicology*, 248, 106202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106202>
- Herrera, J. C. (2007). La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 26-35. <http://rcb.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/14394>
- IARC [International Agency for Research on Cancer]. (2018). Benzene. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 301 p.
- IARC [International Agency for Research on Cancer]. (2020). IARC Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans. Benzene. International Agency for Research on Cancer. <https://publications.iarc.fr/588>
- Iberdrola. (2021). Contaminación del agua. Recuperado el 3 de octubre de 2024, de <https://www.iberdrola.com/sostenibilidad/contaminacion-del-agua#:~:text=Los%20principales%20contaminantes%20del%20agua,resulte%20invisible%20en%20muchas%20ocasiones>
- IMT [Instituto Mexicano del Transporte]. (2023). Metodología para saneamiento de acuíferos profundos por derrame de hidrocarburos. Recuperado el 3 de octubre de 2024, de <https://imt.mx/resumen-boletines.html?IdArticulo=234&IdBoletin=77>
- Jacome-Muñoz, A. N., Navarrete-Arboleda, E. D., Vega-Falcón, V., & Acurio-Padilla, P. E. (2022). Efectos sobre la salud de exposición a gasolina en compañía de petróleo de Ecuador: Health effects of gasoline exposure at Ecuadorian oil company. *Revista Arbitrada Interdisciplinaria de Ciencias de la Salud SALUD Y VIDA*, 6(2), 4-13.
- Jain, A. K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., & Pandey, A. K. (2017). Chromosomal aberrations. In Elsevier eBooks (pp. 69–92). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809252-1.00004-3>
- Jaramillo-García, D. F., Rodríguez-Sosa, N., Salazar-Salazar, M., Hurtado-Montaña, C. A., & Rondón-Lagos, M. (2020). Contaminación del lago de Tota y modelos biológicos para estudios de genotoxicidad. *Ciencia en Desarrollo*, 11(2), 63-83. <https://doi.org/10.19053/01217488.v11.n2.2020.11467>
- Krupina, K., Goginashvili, A., & Cleveland, D. W. (2021). Causes and consequences of micronuclei. *Current Opinion in Cell Biology*, 70, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.01.004>
- Ledesma, V. O. (2017). Evaluación de la toxicidad de los combustibles (Magna, Premium y Diésel) mediante bioensayos utilizando *Artemia franciscana* como bioindicador (Tesis de Ingeniería Ambiental). Universidad de Quintana Roo, México.
- Lerda, D. (2021). Genotoxicidad de la acrilamida y la glicidamida en *Allium cepa*. *Revista Methodo*. [https://doi.org/10.22529/me.2021.6\(2\)](https://doi.org/10.22529/me.2021.6(2)), 03
- Martel Valles, J. F., Cuevas González, E., Benavides Mendoza, A., Valdez Aguilar, L. A., & Foroughbakchik Pournavab, R. (2016). Distribución mineral de plantas de tomate irrigadas con agua contaminada con benceno, diésel y gasolina. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 4(10), 21. <https://doi.org/10.19136/era.a4n10.811>
- Medeiros, L. C. C., Delunardo, F. A. C., Simões, L. N., Paulino, M. G., Vargas, T. S., Fernandes, M. N., Scherer, R., & Chippari-Gomes, A. R. (2017). Water-soluble fraction of petroleum induces genotoxicity and morphological effects in fat snook (*Centropomus parallelus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.031>
- Morales, A., & Cárdenas, E. (2015). Importancia y utilidad de los bioindicadores acuáticos. *Biodiversidad Colombia*, 5, 39-48.
- Nascimento, M. K. S., Loureiro, S., Souza, M. R. D. R., Da Rosa Alexandre, M., & Nilin, J. (2020). Toxicity of a mixture of monoaromatic hydrocarbons (BTX) to a tropical marine

- microcrustacean. Marine Pollution Bulletin, 156, 111272.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111272>
- Neitzel, R. (2021). Recomendaciones y consideraciones para un límite de exposición a ruido recreacional. Revista del Instituto de Salud Pública de Chile, 5(1.1), 5-7.
<https://doi.org/10.34052/rispch.v5i1.1.119>
- Ñústez D. C., Paredes Cuervo, D., & Cubillos Vargas, J. (2014). Bioremediation for degradation of total hydrocarbons present in the sediments of a fuel service station. Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia, 37(1), 20-28.
- Octavio-Aguilar, P., & Olmos-Palma, D. A. (2022). Efectos sobre la salud del agua contaminada por metales pesados. Herreriana, 4(1), 43-47.
- Okamoto, K., Nakagawa, M., Ichikawa, T., Hagiwara, T., & Honma, M. (2020). Induced fire hazards by gasoline spills. Fire Safety Journal, 120, 103112.
<https://doi.org/10.1016/j.firesaf.2020.103112>
- OMS [World Health Organization]. (2022). Fichas de datos químicos: benceno. Recuperado el 3 de octubre de 2024, de <https://www.who.int/publications/m/item/chemical-fact-sheets--benzene>
- Onexpo Nacional. (2024). Consumo de gasolina en México aumenta en 2024. Recuperado de <https://www.onexpo.com.mx/noticias/>
- Onexpo Nacional. (2023, 5 de julio). Miles de derrames petroleros en México. Recuperado de https://www.onexpo.com.mx/NOTICIAS/MILES-DE-DERRAMES-PETROLEROS-EN-MEXICO_60hmQ/
- Ortega Rosas, D. A. (2021). *Transcriptómica comparativa de hígado y branquias del pez plano Achirus lineatus en respuesta a la exposición a petróleo* (Tesis de licenciatura). Universidad del Mar. Biblioteca Virtual de la Universidad del Mar.
<http://localhost:8383/jspui/handle/123456789/710>
- Padilla, C. R. (2020). Intoxicación por tolueno. Medicina Legal de Costa Rica, 37(2), 53-62.
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152020000200053
- Padilla-Santamaría, F., & Ferman-Cano, F. (2018). Contaminación ambiental en México: Responsabilidad política y social. Cadena de Cerebro, 3(1), 64-72.
<https://www.cadenadecerebros.com/single-post/ART-RE-31-01>
- Palacio-Betancur, I. (2009). Aplicación de la prueba de micronúcleos a especies ícticas silvestres frecuentes en dos ambientes lentos de zonas bajas de Colombia. Actual Biol, 31(90), 67-77.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Aplicaci%C3%B3n-de-la-prueba-de-micron%C3%BAcleos-a-especies-Palacio-Betancur-Palacio-Baena/a8ff78bea659774cd39bc391164681af2e5ae397>
- Palacios Anzules, T. D. C., & Moreno Castro, D. W. (2022). Contaminación ambiental. RECIMUNDO, 6(2), 93–103. [https://doi.org/10.26820/recimundo/6.\(2\).abr.2022.93-103](https://doi.org/10.26820/recimundo/6.(2).abr.2022.93-103)
- PEMEX. (2015). Hoja de datos de seguridad gasolina con contenido mínimo 91 octanos. México: Pemex.. Recuperado de URL https://kupdf.net/download/div-class2qs3tf-truncatedtext-modulewrapperfg1km9p-classtruncatedtext-modulelineclamped85ulhh-style-max-lines5hdss-105-gasolina-cont-min-91-octanos-p-div_6733702cb6d692685d8b48bd_pdf
- Quiñónez-Portocarrero, D. K., & Guano-Guano, J. W. (2022). Evaluación de los riesgos químicos para el control de hidrocarburos aromáticos en el área de combustibles del Consejo provincial de Esmeraldas-Ecuador. Sapienza: International Journal of Interdisciplinary Studies, 3(7), 300-321.
- Rajput, A. P., Kulkarni, M., Pingale, P. L., Tekade, M., Shakya, A. K., & Tekade, R. K. (2023). Understanding the bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care products. En Elsevier eBooks (pp. 393–434). <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-15840-7.00024-5>
- Reyes, Y. C., Vergara, I., Torres, O., Díaz, M., & González, E. (2016). Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. Ingeniería

- Rodríguez, D., Saravia, A. Y., Pacheco, O., & Piedra, G. (2014). Evaluación de los niveles de hidrocarburos en sedimentos marinos, su posible origen y efectos sobre la actividad de acuicultura entre Punta Morales y Costa de Pájaros en el Golfo de Nicoya. *Revista Geográfica de América Central*, 2(53), 113-134. <https://doi.org/10.15359/rgac.2-53.5>
- Rodríguez-Gonzales, A., Zárate-Villarreal, S. G., & Bastida-Codina, A. (2022). Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. *Revista de Ciencias Ambientales (Trop J Environ Sci)*, 56(1), 178–208. <https://doi.org/10.15359/rca.56-1.9>
- Salas Salazar, M. L., San Martín Del Ángel, P., Cuervo González, R., Jiménez Torres, A. C., & Hernández Herrera, R. I. (2017). Efecto de la temperatura sobre la bioacumulación de hidrocarburos en el Ostión americano *Crassostrea virginica*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 4(11), 299-308. <https://doi.org/10.19136/era.a4n11.1006>
- Saldaña-Serrano, M., Bastolla, C., & Zacchi, F. (2024). Respuestas biológicas en ostras contaminadas por hidrocarburos: foco en el sistema de biotransformación. *South Sustainability*, 5(2), e111. <https://doi.org/10.21142/SS-0502-2024-e111>
- Sánchez-Olivares, M. A., Gaytán-Oyarzun, J. C., Pérez-Cruz, M. E., & Prieto-García, F. (2021). Embryotoxic, teratogenic and genotoxic effect in zebrafish (*Danio rerio*) by exposure to arsenic. *Hidrobiológica*, 31(3), 221-230. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2021v31n3/sanchez>
- Sayed, A. E. H., Soliman, H. A. M., Idriss, S. K., Abdel-Ghaffar, S. K., & Hussein, A. A. A. (2023). Oxidative stress and immunopathological alterations of *Clarias gariepinus* exposed to monocyclic aromatic hydrocarbons (BTX). *Water Air & Soil Pollution*, 234(6). <https://doi.org/10.1007/s11270-023-06343-3>
- Scotto, C., Álvarez, J., Llanos, C. P., Leyva, O., Sotomayor, S., Chávez, K., ... & Sanga, W. (2013). Análisis genotóxico de muestras de agua del río Ramis (Departamento de Puno, Perú) utilizando eritrocitos de la sangre periférica del pez cebra (*Danio rerio*). *Cátedra Villarreal*, 1(1), 13-25. <https://doi.org/10.24039/cv2013116>
- Scotto, C., Arrilucea, M., Vargas, G. C., Salas, J., & Ybañez, J. (2016). Implementación de una metodología toxicológica para la rápida determinación del CL50 del sulfato de cobre en peces cebra (*Danio rerio*) a 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición. *Cátedra Villarreal*, 1(2), 185-190. <https://doi.org/10.24039/cv20164272>
- SEMARNAT. (2018). Informe del medio ambiente. Gobierno de México. Recuperado el 3 de octubre de 2024, de <https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe18/tema/cap5.html>
- Sommer, S., Buraczewska, I., & Kruszewski, M. (2020). Micronucleus assay: the state of art, and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
- Toledo, A. M., & Cuevas Diaz, M. (2010). Producción de BTX en México: usos, toxicología y análisis. Tlatemoani: *Revista Académica de Investigación*, 5, 1-12. <https://dialnet.unirioja.es/download/articulo/7313474.pdf>
- Unión de Científicos Conscientes. (2023, 17 de octubre). Carros, camiones, buses y la contaminación del aire. Recuperado de <https://es.ucs.org/recursos/carros-camiones-buses-contaminacion#:~:text=Transporte%20sucio%20=%20aire%20sucio,ayudar%20a%20transformar%20el%20transporte>
- Vargas-Vargas, R. A. (2017). Pez cebra (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. *Anestesia en México*, 29(1), 86-96.
- Velásquez Arias, J. A. (2017). Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(1), 151-167. <https://doi.org/10.22490/21456453.1846>

- Vera, A. I. F. (2021). Enfermedades por exposición ocupacional a plomo: revisión sistemática exploratoria de la evidencia cualitativa y cuantitativa. *Revista San Gregorio*, 1(47), 199-221. <https://doi.org/10.36097/rsan.v1i47.1817>
- Xu, J., Zheng, L., Yan, Z., Huang, Y., Feng, C., Li, L., & Ling, J. (2019). Effective extrapolation models for ecotoxicity of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX). *Chemosphere*, 240, 124906. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124906>
- Yu, B., Yuan, Z., Yu, Z., & Xue-Song, F. (2022). BTEX in the environment: An update on sources, fate, distribution, pretreatment, analysis, and removal techniques. *Chemical Engineering Journal*, 435, 134825. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.134825>
- Zambrano, M., Casanova, R., Prada, J. A., Arencibia, G., Vidal, A., & Capetillo, N. (2012). Bioacumulación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) (Arcoida: Arcidae). *Gayana*, 76(1), 1-9. <https://doi.org/10.4067/s0717-65382012000200001>
- Zarate, M. A. G., Evarista, M., García, A., Walter, L., Heuser, D., Villada-Canela, M., & Núñez, M. Q. (2015). Mapa cualitativo para el análisis de riesgo por BTEX por proximidad con gasolineras en la ciudad de Ensenada, Baja California, México. *Salud Ambiental*, 15(1), 4-12. <http://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/download/548/663>
- Zarzuela-Aguilar, N. (2021). Evaluación de la contaminación por pesticidas en aguas superficiales de España (Tesis). Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, España.
- Zepeda, M. Y. S., Herrera, M. L., Martínez, A. J. G., Oyarzun, J. C. G., García, F. P., & Aguilar, P. O. (2019). Micronúcleos, índice mitótico y aberraciones cromosómicas como biomarcadores de genotoxicidad en haba (*Vicia faba* L.) por efecto de cadmio. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 10(1), 27-40.
- Zhao, M., Wang, F., Wu, J., Cheng, Y., Cao, Y., Wu, X., Ma, M., Tang, F., Li, Z., Liu, H., & Ge, B. (2021). CGAS is a micronucleophagy receptor for the clearance of micronuclei. *Autophagy*, 17(12), 3976-3991. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1899>