

ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS DE MUESTRAS ACUÁTICAS CONTAMINADAS CON HIDROCARBUROS

(Métodos ecotoxicológicos utilizados na análise de amostras aquáticas contaminadas com hidrocarbonetos)

Shaun Patrick MCGAHAN SILVA^{1*}; Diego Carvalho VIANA²

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Biotecnología Ambiental. Campus Universitario, San Lorenzo, CEP: 2169; ²Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). *E-mail: patrick.slv2@gmail.com

RESUMEN

Los ensayos ecotoxicológicos brindan información sobre los posibles efectos nocivos que podrían tener ciertas sustancias sobre los seres vivos. El presente artículo de revisión es un análisis de los ensayos ecotoxicológicos desarrollados en los últimos años para determinar la toxicidad de hidrocarburos en muestras acuáticas, especialmente de combustibles o biocombustibles candidatos, empleando distintos organismos que pueden brindar información valiosa y necesaria sobre las consecuencias que dichos compuestos podrían tener en la cadena trófica. En el proceso de desarrollo de nuevos compuestos o productos derivados de hidrocarburos es importante conocer la relación causa-efecto que podría tener sobre el medioambiente, ahí radica la importancia de emplear dichos ensayos para seleccionar aquel producto que sea más adecuado y menos nocivo, así descartar la producción de aquellos que podrían tener efectos deletéreos y causar catástrofes medioambientales. Los organismos que usualmente se emplean para análisis de muestras acuáticas o disueltas son: pez cebra (*Danio rerio*), microcrustáceos (*Daphnia* sp.); microalgas (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. entre otros), y bacterias marinas (*Aliivibrio fischeri*), donde parte de los mismos, o los organismos como tal son objeto de estudio, y con ello se busca comprender el efecto que el compuesto podría tener sobre ellos, dando información importante en distintos niveles tróficos.

Palabras-Claves: Hidrocarburos, ecotoxicológico, pez cebra, microcrustáceos, microalgas.

RESUMO

Os testes ecotoxicológicos fornecem informações sobre os possíveis efeitos nocivos que certas substâncias podem causar nos seres vivos. Assim, este artigo de revisão é uma análise dos testes ecotoxicológicos desenvolvidos nos últimos anos para determinar a toxicidade de hidrocarbonetos em amostras aquáticas, especialmente combustíveis candidatos ou biocombustíveis, que se utiliza de diferentes organismos que podem fornecer informações valiosas e necessárias sobre as consequências que esses compostos podem ter na cadeia trófica. No processo de desenvolvimento de novos compostos ou produtos derivados de hidrocarbonetos, é importante conhecer a relação causa-efeito que pode ter o desenvolvimento do produto sobre o meio ambiente, daí a importância de usar esses testes para selecionar o produto mais adequado e menos prejudicial, descartando assim a produção daqueles que poderiam ter efeitos deletérios e causar catástrofes ambientais. Os organismos normalmente utilizados para análise de amostras aquáticas ou dissolvidas são: zebrafish (*Danio rerio*); microcrustáceos (*Daphnia* sp.); microalgas (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., entre outras); e bactérias marinhas (*Aliivibrio fischeri*); sendo parte deles, ou os organismos como tal, objeto de estudo. Com isso, busca-se entender o efeito que o composto pode ter sobre eles, dando informações importantes em diferentes níveis tróficos.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos, ecotoxicológico, peixe-zebra, microcrustáceos, microalga.

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados por carbono e hidrógeno. La conformación de los mismos se da por la unión de los átomos de carbono y la unión de los átomos

Recibido: jan./2023.

Publicado: mar./2023.

de hidrógeno al esqueleto de carbono formando distintas configuraciones. Los hidrocarburos son componentes principales del petróleo y gas natural, así también son materia prima para la producción de distintos productos como plásticos, fibras, hules, disolventes, explosivos (CAREY, 2018). Entonces, lo hace susceptible de encontrarse en cualquier ecosistema tanto terrestre como acuático, ya que los subproductos hacen parte de nuestras actividades diarias.

Los hidrocarburos generalmente son constituyentes principales petróleo crudo que también incluye una gran variedad de compuestos individuales (COZARELLI y BAEHR, 2003). Ellos se dividen en dos clases principales conforme a su estructura química: los alifáticos y los aromáticos (MORRISON y BOYD, 1998; OLAH *et al.*, 2018). De acuerdo con su capacidad química para mezclarse con otros compuestos pueden separarse en polares (asfaltenos y resinas que sí se mezclan) o no polares (alifáticos y aromáticos que no se mezclan) (BORGES, 2013).

Existe una diversidad de hidrocarburos, los aromáticos principalmente traen problemas ambientales, siendo complejos de resolverlos. Esto se debe a su estructura química que pueden poseer dos o más anillos de benceno fusionados, lo que les confiere propiedades no polares, hidrofóbicas, alta toxicidad, alta estabilidad en el medio ambiente, gran resistencia a la degradación microbiana, alta adsorción al sedimento y una gran bioacumulación en los organismos expuestos (ABDEL-SHAFY y MANSOUR, 2016).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son los que al estar en ecosistemas acuáticos podrían generar contaminaciones en las comunidades, causando un desbalance de condiciones ideales para el desarrollo de los organismos que la habitan. A fin de conocer cuánto daño podrían causar los productos que se obtienen a partir de los HAP como los combustibles, existen ensayos o bioensayos que emplean organismos de distintos niveles tróficos, así se pueden determinar el tipo de daño que podría causar la presencia de estos contaminantes en distintas concentraciones. El tipo de información que pueden brindar estos ensayos está relacionado al tipo de daño que puede causar a corto, mediano y largo plazo la presencia de estos contaminantes.

DESARROLLO

Contaminación de ecosistemas acuáticos por hidrocarburos.

Las contaminaciones que pueden darse por presencia de hidrocarburos pueden darse en sistemas de almacenamiento, así como también en fuentes de abastecimiento subterráneas y superficiales, así como en otros cuerpos de agua. Son casos desafortunados que ocurren con cierta frecuencia, ya sea por el transporte o un mal manejo de sistemas de abastecimiento. Las contaminaciones pueden presentarse de dos formas generales: puntuales y sistemáticas, acarreando problemas en la población acuática, así como en las propiedades organolépticas al ser aguas de recreación o de consumo. Las contaminaciones puntuales son aquellas que ocurren de manera fortuita en cuerpos de agua donde generalmente no hay presencia de hidrocarburos y sistemáticas son habituales, representa a aquellas aguas que son contaminadas por la actividad antrópica que en ellas se realiza, así también las fuentes de contaminación pueden ser simples o múltiples, que se

debe al tipo de compuesto que es vertido, pudiendo ser uno o una aleación de hidrocarburos (PRIETO *et al.*, 1999).

Ensayos Ecotoxicológicos

Los ensayos ecotoxicológicos surgen como una herramienta para investigar el efecto adverso provocado por la presencia de contaminantes que son resultados de actividades antropogénicas, industriales y domésticas, cuyos efectos dependerán de las concentraciones que estén biodisponibles que pueden causar distintos efectos en la población que componen los ecosistemas acuáticos. Las investigaciones y estudios para determinar causa-efecto entre agentes químicos y biota acuática surgieron a mediados de la primera mitad del siglo pasado a partir de la revolución industrial (RAMÍREZ y MENDOZA, 2008; CASTEÑO *et al.*, 2019). Así como cualquier instrumento analítico, los ensayos requieren ser calibrados que se realiza con un patrón o tóxico de referencia, esto ayuda a garantizar los resultados y la calidad de los organismos utilizados. Esto se logra realizando un ensayo de prueba con un compuesto que sea soluble y de alta pureza (99%) y el organismo que será empleado, los resultados nos darán un panorama sobre la respuesta de los organismos a distintas concentraciones y como los mismos se ven afectados ante la presencia de los mismos, normalmente trabaja con concentraciones que van del 100% al 6,25%, realizando una dilución seriada 1:1, entre los compuestos utilizados se encuentran: cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de cadmio (CdCl_2), sulfato de cobre (CuSO_4), dodecil sulfato de sodio (SDS) y dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (CASTILLO, 2004)

Actualmente los ensayos ecotoxicológicos son desarrollados como parte de los controles para la liberación de productos que puedan llegar a tener algún tipo de efecto en el ambiente, los ensayos permiten realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos o físicos en ecosistemas biológicos, estableciendo relaciones a escala laboratorio o en terreno (SILVA *et al.*, 2003).

Organismos utilizados en ensayos de Ecotoxicidad de agua

Los bioensayos ecotoxicológicos basados en efectos causados por hidrocarburos podrían ser herramientas adecuadas evaluar la toxicidad de dichos compuestos y sus derivados (BLUHM *et al.*, 2012; HEGER *et al.*, 2012).

Son varios los organismos que pueden emplearse como indicadores de cambios ambientales y ecológicos, dependiendo del nivel trófico que se desea estudiar. Los estudios y publicaciones demuestran que los peses son buenos indicadores de cambios ambientales acuáticos y salud de ecosistemas (MOISEENKO *et al.*, 2008). Existen evidencias, investigaciones y autores que demuestran que pueden emplearse también microalgas, entre las especies más utilizadas se encuentran las del género *Scenedesmus* y *Chlorella* (CASTILLO, 2004; HEGER *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2022), también micrustáceos, siendo la *D. magna* una de las más utilizadas (CASTILLO, 2004; MÜLLER *et al.*, 2019). Otros autores reportan la implementación de células V79 del Hamster chino (*Cricetulus griseus*) y bacteria marina *Aliivibrio fischeri* (HEGER *et al.*, 2018; MÜLLER *et al.*, 2019).

Cada organismo que sea empleado debe haber pasado por un ensayo de viabilidad, así como también de calibración a distintas concentraciones de un compuesto de referencia de elevada pureza, posterior a eso, podrá ser empleado por completo en los ensayos y cada organismo dará respuesta de como la presencia de dichos contaminantes afecta a la población y como eso repercute en el nivel trófico (SILVA *et al.*, 2003; AMARINGO *et al.*, 2019).

Son varias las investigaciones donde comparan organismos de distintos niveles tróficos con hidrocarburos a fin de conocer el efecto toxicológico sobre los mismos. Los biocombustibles nacen como una alternativa a los combustibles fósiles convencionales en varios países, su uso incrementó exponencialmente en los últimos años, ya que varios países lo van introduciendo como producto “eco-friendly” debido a que el mismo disminuye el porcentaje de gases nocivos para la atmósfera. Pero la introducción de nuevos biocombustibles debe ser analizada y estudiada en distintos ecosistemas a fin de garantizar que el mismo no es nocivo para los mismos (SILVA, *et al.*, 2003; FOCKS, *et al.*, 2018).

Empleando *Daphnia magna* para identificar candidatos a biocombustibles peligrosos

Una investigación abordó sobre la implementación de *D. magna* a fin de identificar candidatos a biocombustibles peligrosos. Analizaron 2-metiltetrahidrofurano (2-MTHF) y 2-metilfurano (2-MF) en ensayos de inmovilización aguda prolongada (96 h) y el test de reproducción. Los resultados fueron interesantes, pudiendo demostrar que 2-MF presentó efecto agudo y reproductivo de hasta 63 veces mayor que 2-MTHF. El potencial tóxico agudo y reproductivo del 2-MF sobre *D. magna* es hasta 63 veces mayor que el del 2-MTHF (dánidos adultos, 24 h). Otra información importante con respecto al ensayo es que el 2-MF induce efectos en un modo de acción rápido, mientras que el 2-MTHF afectó a los dánidos de manera dependiente del tiempo. Es importante comprender la importancia de implementar sistemas basados en organismos acuáticos para conocer el nivel de toxicidad de candidatos a biocombustibles, ya que el mismo puede brindar información útil en el proceso de diseño de nuevos combustibles. Si bien la "toxicología verde" se aplica cada vez más en el desarrollo de productos químicos o farmacéuticos (CRAWFORD *et al.*, 2017).

La toxicidad de los biocombustibles no es considerada en el diseño del combustible, pero estos resultados demuestran la importancia de implementar estas herramientas ecotoxicológicas, ya que las mismas podrían implementarse en una evaluación de toxicidad que cubra varios puntos finales como parte integral del proceso de diseño del combustible, considerando que la potencia tóxica relativa es un parámetro muy importante para el desarrollo de biocombustibles (HEGER *et al.*, 2018a).

La Agencia Internacional de Energía tiene como objetivo que los biocombustibles proporcionen el 27 % del total de combustibles para el transporte en 2050 (TANAKA, 2011). Aparte de estudios que impliquen solamente organismos de un nivel trófico, comparar organismos de distintos niveles tróficos brinda más información sobre el comportamiento de nuevos productos de combustión (HEGER *et al.*, 2018b).

Ecotoxicidad de candidatos a biocombustibles empleando distintos organismos modelo

Otro estudio evaluó mediante una estrategia de prueba integradora la ecotoxicidad de dos candidatos a biocombustibles, implementando tres organismos a fin de conocer el efecto de los mismos en ensayos. La prueba de inmovilización aguda con pulga de agua (*D. magna*), la prueba de toxicidad aguda de embriones de peces con pez cebra (*Danio rerio*) y el ensayo de micronúcleos *in vitro* con células V79 de hámster chino (*Cricetulus griseus*) fueron los bioensayos implementados en dicho estudio. En la prueba de *D. magna* los valores de concentración efectiva media (CE50) fueron $14,9 \pm 0,66 \text{ mg L}^{-1}$ para 1 octanol y $2152,1 \pm 44,6 \text{ mg L}^{-1}$ para 2 butanona, en la Fig. 01 puede observarse los defectos morfológicos en embriones y larvas de pez cebra después de la exposición a 1 octanol y 2 butanona. (A): Control negativo a 48 hpf; (B): 10 mg L^{-1} 1 octanol a 48 hpf; (C): 3000 mg L^{-1} 2 butanona a 48 hpf; (D): control negativo a 96 hpf; (E): 10 mg L^{-1} 1 octanol a 96 hpf; (F): 2000 mg L^{-1} 2 butaona a 96 hpf.



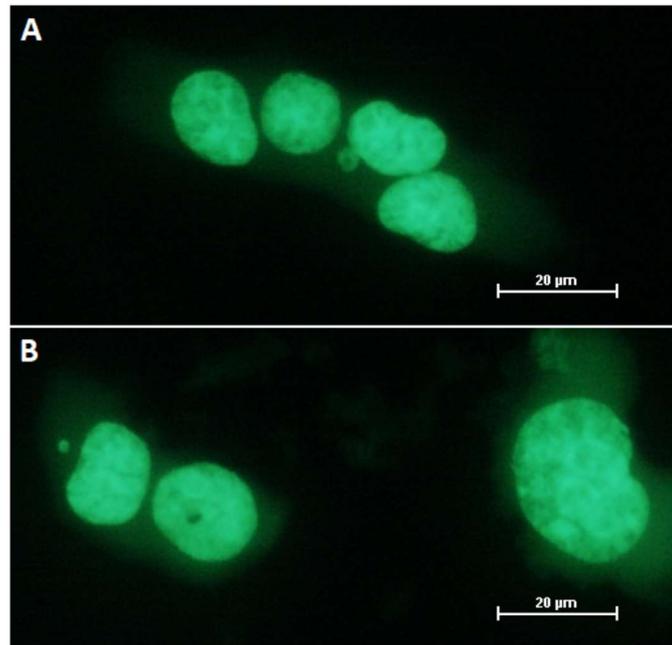
(Fuente: HEGER *et al.*, 2018b)

Figura 01: Defectos morfológicos de embriones y larvas de pez cebra después de la exposición a distintas concentraciones de octanol y butanona.

En la prueba del pez cebra ambos candidatos causaron efectos teratogénicos y letales en los embriones, mientras que la exposición al 1 octanol indujo significativamente estos efectos en concentraciones $\geq 2,0 \text{ mg L}^{-1}$. Por otra parte en el ensayo con células V79 tanto el 1 octanol como la 2 butanona no causaron efectos genotóxicos significativos, mientras que sus metabolitos indujeron significativamente micronúcleos en las células (Fig. 02).

Los resultados demostraron que el candidato 1 octanol ejerce una ecotoxicidad mucho mayor que 2 butanona para los embriones de *D. magna* y pez cebra, pudiendo recomendar continuar nuevamente la producción de 2 butanona viendo los bajos efectos sobre los organismos empleados. Se demuestra una vez más la efectividad de implementar bioensayos simples, rápidos y

económicos, la información que pueden brindar a los productores de alto valor (HEGER *et al.*, 2018b).



(Fuente: Heger *et al.*, 2018b).

Figura 02: Fotomicrografías de micronúcleos en células V79 después del tratamiento.

Obs.: Tratamientos = (A) octanol; (B) butanona. (Aumento de 1000x)

Estudio de fracción soluble en agua de diesel y biodiesel y su efecto ecotoxicológico

Otros investigadores evaluaron efectos agudos y crónicos de la fracción soluble en agua (WSF) de diesel y biodiesel sobre los organismos *Daphnia magna* y *Aliivibrio fischeri*, exponiéndolos a distintas concentraciones de los combustibles mencionados, pese a la baja solubilidad de ambos contaminantes en agua, los investigadores buscaron dilucidar si la WSF podría generar daño agudo inmediato en ambos organismos acuáticos. Los resultados obtenidos por los investigadores revelaron que la WFS del biodiesel demostró ser menos tóxica en comparación de la WFS del diesel, en el ensayo de toxicidad aguda la WSF del diesel presentó un valor elevado siendo 2,5-4 veces más tóxica que la WSF del biodiesel (MÜLLER *et al.*, 2019).

Con respecto a la ecotoxicidad aguda, se pudo determinar que la misma fue alta para ambos organismos acuáticos expuestos a WSF del diesel, mientras que la WFS del biodiesel otorgó una ecotoxicidad baja a *D. magna* y significativa a *A. fischeri*. En el estudio pudo ser evaluado también el efecto sobre la reproducción, longevidad y crecimiento de *D. magna*, en las concentraciones 25, 12.5, y 6.25%, no fueron observadas efecto alguno, mientras mientras que la WSF de biodiesel no presentó resultados significativamente diferentes en comparación con el control para ninguno de los parámetros evaluados en cualquiera de las diluciones ensayadas (NOEC>25%) (MÜLLER *et al.*, 2019).

Pese a la baja ecotoxicidad de la WSF del biodiesel en comparación a la WSF del diesel, es de atender la presencia del mismo en ecosistemas acuáticos ya que su WSF presentó una ecotoxicidad aguda significativa para las bacterias marinas que puede repercutir de manera negativa en niveles tróficos superiores, así mismo resaltaron la importancia de estudiar los efectos crónicos de la WSF de los combustibles en diluciones superiores al 25% (MÜLLER *et al.*, 2019).

Efectos comparativos de distintas fuentes de diesel sobre población de microalgas

En los últimos años se implementaron bastos organismos más económicos, pero con resultados reproducibles, las microalgas se establecen como organismos modelos en ensayos ecotoxicológicos. Una investigación abordó el uso de sistemas de microalgas en un estudio para comparar la toxicidad de Biodiesel puro (B100) obtenido por transesterificación de metanol de aceite de cocina usado (grasa amarilla), B0 (combustible diesel de petróleo) y B20 (diesel-biodiesel mezclado de 20% de biodiesel y 80% de diesel de petróleo por volumen). Implementando dos diatomeas marinas *Attheya ussuriensis* y *Chaetoceros muelleri*, las algas rojas *Porphyridium purpureum* y *Raphidophyte Heterosigma akashiwo* estudiando la inhibición que pudiese ocurrir como consecuencia a la exposición a dichos compuestos. Los resultados obtenidos demostraron que los niveles más altos de toxicidad se dieron en presencia de B100 para las tres microalgas, *A. ussuriensis*, *C. muelleri* y *H. akashiwo*, en comparación con B0 y B20 (PIKULA *et al.*, 2019)

La concentración efectiva (EC50) aguda en la prueba de inhibición del crecimiento (exposición de 96 h) de B100 para las cuatro especies estuvo en el rango de 3,75 a 23,95g/L, mientras que la EC50 de toxicidad crónica (exposición de 7 días) estuvo en el rango de 0,42 a 16,09g/L, solo B20 resultó ser el más tóxico para el alga roja *P. purpureum*. Los combustibles alternativos como el biodiésel que es considerado como candidato no tóxico y respetuoso con el medio ambiente también puede diferir según la materia prima empleada en el proceso de producción, el método de producción y la composición química del producto final (PIKULA *et al.*, 2019)

Aguas residuales tóxicas y efectos en la función celular de *Chlorella regularis*

En los últimos tiempos, se vio el potencial que poseen los organismos que crecen en simbiosis, pudiendo implementar organismos de distintas reinos u órdenes tróficos, así como especies similares. Es por eso que se ve como una tecnología prometedora el uso de cultivos combinados de microalgas con la finalidad de tratar aguas residuales. El estudio de compuestos específicos a nivel laboratorio es otra forma de estudiar posibles efectos que ciertos contaminantes podrían tener sobre la biota acuática. Se simuló el tratamiento aguas residuales tóxicas y se exploraron las funciones de dos ácidos fenólicos típicos, como el ácido p-hidroxibenzoico (p-HBA) y el ácido cafeico (CA) sobre el cultivo de *Chlorella regularis*, a fin de conocer los efectos sobre la tasa de crecimiento y función celular (LIU *et al.*, 2022).

Se podría decir que la presencia de ambos ácidos fue beneficiosa para el crecimiento de la especie empleada, tal y como se muestra en la Fig. 03, donde expone la (A) tasa de crecimiento específica; (B) parámetros fotosintéticos a las 48h; (C) la expresión del ADN y enzimas de replicación en respuesta a p-HBA y CA en comparación con el tratamiento con 4-CP. Vj, bloqueo

de transferencia de electrones de QA a QB en el receptor PS II; DIO/RC, energía disipada del centro de reacción unitario; ABS/RC, energía luminosa absorbida por el centro de reacción unitario; Phi_Eo, rendimiento cuántico por transferencia de electrones; Pi_Abs, rendimiento índice; Fv/Fm, eficiencia fotoquímica PS II. PRA, proteína de replicación A; RFC, factor de replicación C; PCNA, antígeno nuclear de células en proliferación. Barras de error mostrar las desviaciones estándar de los resultados por triplicado (*p<0,05) (LIU *et al*, 2022).

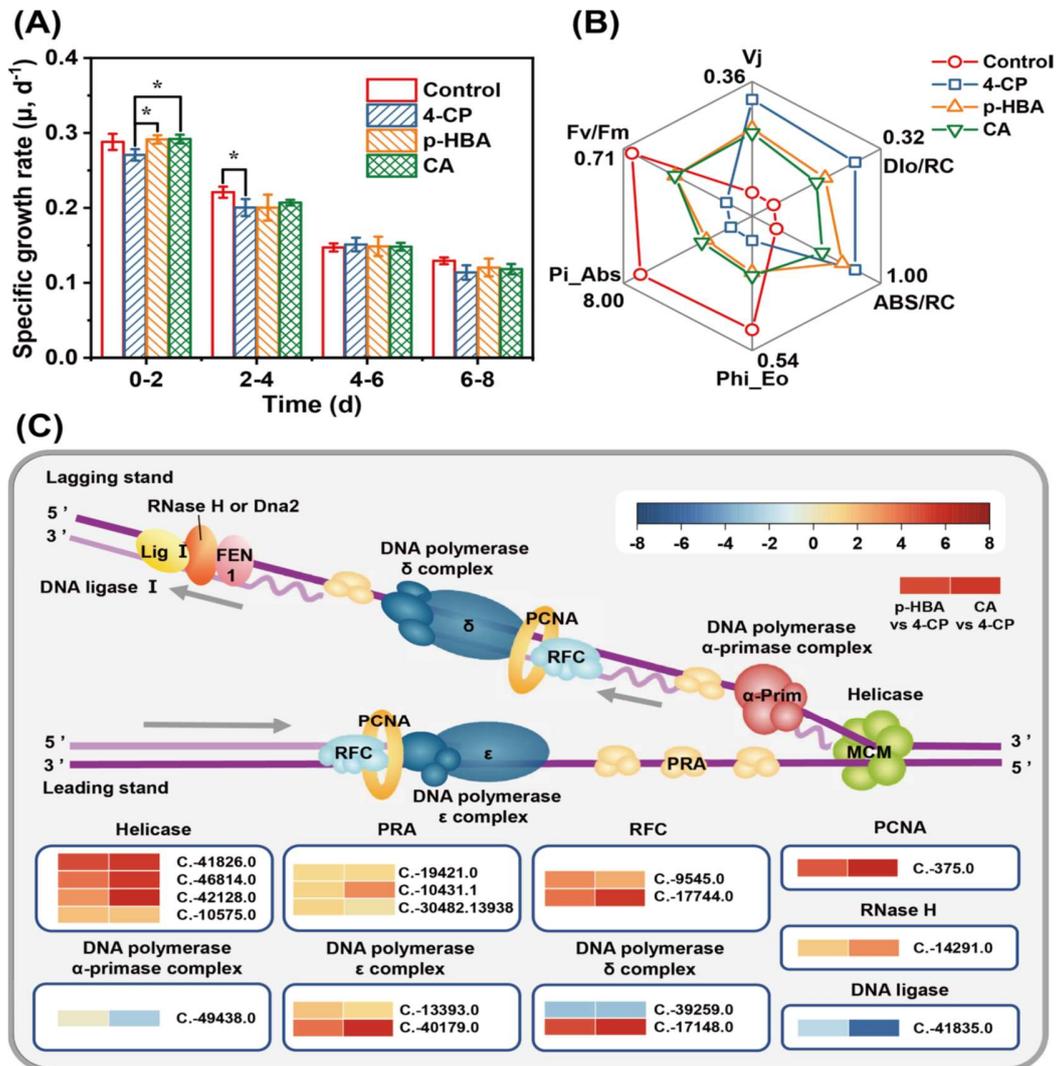


Figura 03: Crecimiento, fotosíntesis y replicación del ADN de *C. regularis*.

Obs.: A = tasa de crecimiento específica; B = parámetros fotosintéticos a las 48h; C = la expresión del ADN y enzimas de replicación en respuesta a p-HBA y CA.

La tasa de crecimiento específico mejoró en un 7,6% al mejorar la fotosíntesis y la replicación del ADN. Otro aspecto positivo fue la reducción entre un 30,3% y un 49,7% el daño oxidativo causado por el 4-CP mediante la síntesis de más enzimas antioxidantes y la eliminación directa de radicales libres por parte de los ácidos fenólicos, así también la tasa de eliminación de 4-CP aumentó en un 27,0% y el 4-CP tóxico se degradó en compuestos no tóxicos. Los ácidos

fenólicos no cambiaron la ruta de degradación de 4-CP, pero aceleraron su eliminación y desintoxicación al mejorar la expresión de las enzimas de degradación de 4-CP (LIU *et al.*, 2022).

Estos resultados se proyectan como prometedores, debido a que al poder implementarse estos sistemas se podría lograr una incorporación o simbiosis de técnicas, donde se empleen organismos fotosintéticos para el monitoreamiento de plantas de tratamiento pero a la vez la producción de biomasa que podría ser valorizada, esto debido a los resultados que se obtuvieron de lípidos que aumentó entre un 20,5% y un 23,1% debido a la regulación positiva de las enzimas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos y triacilglicerol. Los ácidos fenólicos traza estimularon la cascada de señalización de la proteína quinasa activada por mitógeno y la vía de señalización del calcio para regular la fisiología de las microalgas y proteger las células del estrés tóxico (LIU *et al.*, 2022).

CONSIDERACIONES FINALES

En la búsqueda de nuevas fuentes de combustibles, muchas veces se deja de lado los estudios sobre posibles efectos que podría tener sobre los distintos niveles tróficos de ecosistemas acuáticos. Los estudios ambientales realizados en los últimos años demuestran la importancia de desarrollar ensayos ecotoxicológicos. La importancia de estos a nivel medioambiental, y más aún en ecosistemas acuáticos, ayuda a conocer el posible comportamiento de la comunidad de organismos frente a contaminantes de distintas fuentes, sean orgánicos o inorgánicos. El aporte que brinda puede repercutir económicamente durante la producción de nuevos biocombustibles candidatos, a fin de seleccionar y continuar la línea de producción con aquel que genere daños mínimos o nulos al medioambiente, específicamente a ecosistemas acuáticos. Los ensayos ecotoxicológicos tienen un gran potencial en distintos rubros económicos, pudiendo llegar a sofisticarse mucho más, integrando análisis genómicos, que brindará información completa de como los compuestos llegan a dañar el genoma de organismos que se encuentran en esos ecosistemas en estudio y como el mismo puede repercutir de manera negativa al aumentar los niveles tróficos, pudiendo dañar la fauna acuática.

REFERENCIAS

ABDEL-SHAFY, H.; MANSOUR, M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v.25, n.1, p.107-123.

AMARINGO, F.; NARVÁEZ, J.F.; GÓMEZ-ARGUELLO, M.A.; MOLINA, F. Contaminación en agua y sedimentos por hidrocarburos aromáticos policíclicos: Revisión de la dinámica y los métodos analíticos. *Gestión y Ambiente*, v.22, n.1, p.129–140, 2019.

BORGES, O. **Los Asfaltenos y sus efectos en la producción de petróleo**. Portal del Petróleo, 2013. Disponible en: <https://www.portaldelpetroleo.com/2013/04/los-asfaltenos-y-sus-efectos-en-la.html>. Accedido en: 15 jul. 2022.

BLUHM K.; HEGER S.; ANGENENT LT.; AGLER MT.; MALETZ S.; SEILER T-B. The assessment of the ecotoxicological & environmental effects of biorefinery. In: GATHERGOOG, N.; XIE, H. **The role of green chemistry in biomass processing and conversion**. Hoboken: Wiley, cap.15, 2012. p. 435-467.

CAREY, F.A. **Hydrocarbon**. **Encyclopedia Britannica**. Encyclopedia Britannica Inc. Recuperado de <https://www.britannica.com/science/hydrocarbon>, 2018.

CASTAÑEDO, Z.A.; JIMÉNEZ, E.A.; CHANG, O.M.; MARCEL, A.M.; SIFONTES, S.; SEIJO, M.; SANTANA, A. Bioensayo de toxicidad aguda en tres biomodelos utilizando compuestos de referencia, **Revista de Toxicología**, v.36, n.2, p.128-133, 2019.

CASTILLO MORALES, G. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas**. 1. ed. México (ed.), IMTA, 2004.

COZZARELLI, I.; BAEHR, A. Volatile Fuel Hydrocarbons and MTBE in the Environment. En: LOLLAR, B.S. **Treatise on Geochemistry**. 1. ed. Nueva York: Elsevier Science, v.9, 2003. p.433-474.

CRAWFORD, S.E.; HARTUNG, T.; HOLLERT, H.; MATHES, B.; VAN RAVENZWAAY, B.; STEGER- HARTMANN, T.; STUDER, C.; KRUF, H.F. Green toxicology: a strategy for sustainable chemical and material development. **Environmental Sciences Europe**, v.29, n.16, p.1-10, 2017.

FOCKS, A., BELGERS, D., BOERWINKEL, MC. Calibration and validation of toxicokinetic-toxicodynamic models for three neonicotinoids and some aquatic macroinvertebrates. **Ecotoxicology**, v.27, p.992–1007, 2018.

HEGER, S.; BLUHM, K.; DU, M.; LEHMANN, G.B.; ANDERS, N.; DECHAMBRE, D.; BARDOW, A.; SCHÄFFER, A.; HOLLERT, H. Aquatic toxicity of biofuel candidates on *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.164, n.1, p.125-130, 2018a.

HEGER, S.; DU, M.; BAUER, K.; SCHÄFFER, A.; HOLLERT, H. Comparative ecotoxicity of potential biofuels to water flea (*Daphnia magna*), zebrafish (*Danio rerio*) and Chinese hamster (*Cricetulus griseus*) V79 cells. **The Science of the total environment**, v.631/632, n.1, p.216-222, 2018b.

HEGER, S.; BLUHM, K.; AGLER, M.T.; MALETZ, S.; SCHAFFER, A.; SEILER, T.B.; ANGENENT LT.; HOLLERT H. Biotests for hazard assessment of biofuel fermentation. **Energy & Environmental Science**, v.5, n.1, p.778-9788, 2012.

LIU, Y.; ZHAO, Z.; YANG, H.; FU, L.; ZHOU, D. Trace phenolic acids simultaneously enhance degradation of chlorophenol and biofuel production by *Chlorella regularis*. **Water Research**, v.218, n.1, p.118524, 2022.

MOISEENKO, TI.; GASHKINA, N.A.; SHAROVA, Y.N.; KUDRYAVTSEVA, L.P. Ecotoxicological assessment of water quality and ecosystem health: a case study of the Volga River. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.71, n.3, p.837-850, 2008.

MORRISON, R.T.; Y BOYD, R.N. **Química Orgánica**. 5. ed. México: Pearson Educación, 1998.

MÜLLER, J.B., MELEGARI, S.P., PERREAULT, F., MATIAS, W.G. Comparative assessment of acute and chronic ecotoxicity of water soluble fractions of diesel and biodiesel on *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. **Chemosphere**, v.221, n.1, p.640-646, 2019.

OLAH, G.A.; MOLNÁR, A.; PRAKASH, G.K.S. **Hydrocarbon Chemistry**. 3. ed. Hoboken, EUA: John Wiley e Sons, 2018.

PIKULA, K.S.; ZAKHARENKO, A.M.; CHAIKA, V.V.; STRATIDAKIS, A.K.; KOKKINAKIS, M.; WAISSI, G.; RAKITSKII, V.N.; SARIGIANNIS, D.A.; HAYES, A.W.; COLEMAN, M.D.; TSATSAKIS, A.; GOLOKHAVAST, K.S. Toxicity bioassay of waste cooking oil-based biodiesel on marine microalgae. **Toxicology Reports**, v.6, n.1, p.111-117, 2018.

PRIETO, D.; VICENTE, I.; AGUSTÍN, M.V.P. La contaminación de las aguas por hidrocarburos: un enfoque para abordar su estudio. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**, v.37, n.1, p.13-20, 1999.

RAMÍREZ P.; MENDOZA A. **Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo**. México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat), 2008. p.18-36.

SILVA, J.; TORREJÓN, G.; BAY-SCHMITH, E.; LARRAIN, A. Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera) usando un tóxico de referencia. **Gayana. Concepción**, v.67, n.1, p.87-96, 2003.

SPEIGHT, J.G. Chemical and Physical Properties of Hydrocarbons. In: SPEIGHT, J.G. **Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes**. Gulf Professional Publishing. Cap.9, 2012. p.325-353.

YANG, L.; ZHENHAO, Z.; HUIWEN, Y.; LIANG, F.; DANDAN, Z. Trace phenolic acids simultaneously enhance degradation of chlorophenol and biofuel production by *Chlorella regularis*. **Water Research**, v.218, n.1, p.118-524, 2022.