



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Evaluación de la toxicidad inducida por el filtro solar 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona mediante un ensayo FETAX en *Xenopus laevis*.**

**T E S I S**

Para obtener el Título de:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

Presenta:

**CAROLINA FIGUEROA PRADO**

Dirigida por:

**Dra. en C.Q. Hariz Islas Flores**

**Dr. en C. y T.F. Jesús Daniel Cardoso Vera**



Toluca, Estado de México, Mayo, 2024

## Índice

Contenido	Pág.
Índice de tablas .....	v
Índice de figuras .....	vi
<b>1 RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>3 MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1 Contaminación del agua.....</b>	<b>6</b>
<b>3.2 Contaminantes emergentes .....</b>	<b>7</b>
<b>3.3 Filtros solares .....</b>	<b>10</b>
<b>3.3.1 Filtros solares físicos .....</b>	<b>12</b>
<b>3.3.2 Filtros solares químicos .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3.3 Benzofenona-3 .....</b>	<b>14</b>
<b>3.4 Biomarcadores .....</b>	<b>18</b>
<b>3.5 Teratogénesis.....</b>	<b>20</b>
<b>3.6 FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus).....</b>	<b>21</b>
<b>3.6.1 Bioindicadores.....</b>	<b>23</b>
<b>3.6.2 <i>Xenopus laevis</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>4 ANTECEDENTES .....</b>	<b>27</b>
<b>5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>36</b>
<b>6 JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>37</b>
<b>7 HIPÓTESIS .....</b>	<b>39</b>
<b>8 OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICO.....</b>	<b>39</b>
<b>8.1 Objetivo general.....</b>	<b>39</b>
<b>8.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>39</b>

<b>9</b>	<b>DISEÑO DEL EXPERIMENTO</b> .....	<b>40</b>
<b>10</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>41</b>
<b>10.1</b>	<b>Mantenimiento y alimentación de <i>Xenopus laevis</i></b> .....	<b>41</b>
<b>10.2</b>	<b>Ensayo FETAX</b> .....	<b>41</b>
<b>10.2.1</b>	<b>Evaluación del desarrollo embrionario</b> .....	<b>43</b>
<b>10.2.2</b>	<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>43</b>
<b>11</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
<b>12</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
<b>13</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>57</b>
<b>14</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>59</b>
<b>15</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>72</b>

## Índice de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Nombres e identificadores de la benzofenona-3.....	14
<b>Tabla 2.</b> Propiedades físicas y químicas de la benzofenona-3 .....	16
<b>Tabla 3.</b> Ocurrencia de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona en el ambiente .....	28
<b>Tabla 4.</b> Efectos tóxicos reportados de la benzofenona-3 en diversas especies acuáticas .....	32
<b>Tabla 5.</b> Datos de supervivencia, mortalidad y malformaciones en larvas de <i>Xenopus laevis</i> expuesta benzofenona-3 .....	44
<b>Tabla 6.</b> Malformaciones más representativas en larvas de <i>Xenopus laevis</i> expuestos a concentraciones ambientales relevantes de BP-3.....	49

## Índice de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Representación gráfica de las principales vías de entrada de CE hacia el ambiente, creación propia. ....	9
<b>Figura 2.</b> Espectro electromagnético. Tomado y modificado de Garnacho, 2020. ....	10
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-3), tomado y modificado de FisherSci.es. ....	15
<b>Figura 4.</b> Distribución espacial de BP-3 detectada en distintas matrices acuáticas de todo el mundo, creación propia. ....	27
<b>Figura 5.</b> Tasas de mortalidad y malformaciones en larvas de <i>Xenopus laevis</i> expuestas a BP-3. ....	45
<b>Figura 6.</b> Curva tiempo-% de respuesta de la eclosión de embriones de <i>Xenopus laevis</i> expuestos a BP-3. ....	46
<b>Figura 7.</b> Frecuencia de las principales malformaciones inducidas por la exposición de embriones de <i>Xenopus laevis</i> a diferentes concentraciones de BP-3. ....	47
<b>Figura 8.</b> Medida de la cabeza a la cola de larvas de <i>Xenopus laevis</i> expuestas al control y a BP-3. ....	48

## 1 RESUMEN

La 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-3) es un filtro solar ampliamente utilizado como ingrediente activo en productos de protección solar, así como en la formulación de productos cosméticos, detergentes de ropa y envases que requieran evitar la decoloración o degradación por exposición solar. Debido al incremento en la demanda de estos artículos, su presencia en distintas matrices acuáticas ha ido en aumento. Algunos estudios han informado la presencia de BP-3 en afluentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, así como en aguas superficiales, aguas subterráneas y sedimentos. Sin embargo, son escasos los estudios publicados acerca de los efectos tóxicos de la BP-3 a concentraciones ambientales relevantes en organismos acuáticos; esta es una de las razones por las que, en el presente estudio, se trabajó con *Xenopus laevis* como especie bioindicadora. Por lo cual, se hizo uso del ensayo FETAX. Se evaluó la toxicidad de BP-3 a las 96 horas después de la fecundación en embriones de *Xenopus laevis* a concentraciones ambientales relevantes (0.063 a 3.0 mg/L). En el grupo control (únicamente con medio FETAX) no se observaron malformaciones y todos los embriones se desarrollaron correctamente alcanzadas las 96 horas. En comparación, los grupos expuestos a diferentes concentraciones de BP-3 presentaron distintas malformaciones, observándose que tanto la gravedad como la frecuencia de estas fueron directamente proporcionales a la concentración. Las malformaciones más frecuentes incluyeron el retraso en el desarrollo, rotura de la copa óptica, hipopigmentación ocular, hemorragia intestinal, edemas cardiaco y abdominal, modificación en la estructura de la notocorda, malformaciones severas, así como fracaso total de desarrollo facial y ocular. La Concentración Mínima para Inhibir el Crecimiento (CMIC) fue de 0.09 mg/L, obtenida mediante la prueba de comparaciones múltiples de Fisher con un límite de confianza ( $P > 0.095$ ). En la determinación de la concentración letal media y la concentración efectiva 50 de malformaciones obtuvimos los resultados:  $CL_{50} = 2.42046$  mg/L y  $CE_{50} = 0.01684$  mg/L, respectivamente, mediante un análisis PROBIT, mientras que al hacer la relación se obtuvo un índice teratogénico (IT) de 143.733. Con los resultados obtenidos en este estudio concluimos que la exposición a bajas concentraciones de

BP-3 produce alteraciones morfológicas durante el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*, y se sugiere seguir estudiando este compuesto debido a la falta de información existente sobre su toxicidad en organismos acuáticos.

## 2 INTRODUCCIÓN

El cáncer o neoplasia es una enfermedad en la cual las células corporales se multiplican de forma anormal y sin control en una zona del cuerpo, dichas células pueden propagarse y llegar a órganos distintos mediante un proceso conocido como *metástasis*. De acuerdo con la OMS, Organización mundial de la salud (2021), en 2020 se registraron alrededor de 10 millones de defunciones por esta enfermedad. Actualmente el cáncer es la segunda causa de muertes a nivel mundial, sin embargo, las cifras en Latinoamérica lo colocan como la segunda causa de muerte, por otro lado, en México se diagnostican anualmente alrededor de 191,000 casos de cáncer, de los cuales 84,000 son descendos, posicionando así a esta enfermedad como la tercera causa de mortalidad en el país (INEGI, 2024).

El melanoma es un tipo de neoplasia maligna que produce un crecimiento descontrolado de los melanocitos (células que pigmentan la piel), y a pesar de representar tan solo alrededor del 1% de neoplasias en la piel, es responsable de más del 80% de las muertes ocasionadas por cáncer cutáneo (Saginala *et al.*, 2021). Uno de los principales factores de riesgo es la radiación ultravioleta (RUV) a la que se está expuesto cuando se encuentran al aire libre sin un fotoprotector, aunque también puede producirse por exponerse a camas de bronceado, inmunosupresión y por una predisposición genética. En la RUV, la luz UVB (280-320 nm) es hasta 1000 veces más genotóxica por fotón que la UVA (320-400 nm); sin embargo, la exposición a los rayos UVA depende de la hora, la estación, la altitud y latitud. Por lo que esta, puede llegar a ser de 20-40 veces mayor que la exposición a los rayos UVB. Por otro lado, los rayos UVA tienen una menor tasa de reparación del ADN que los rayos UVB, y como consecuencia tienen una mayor tasa de mutaciones. Una de las desventajas es que la mayoría de los protectores solares no filtran los rayos UVA tan bien como los rayos UVB. Por lo que, en los últimos años la demanda de filtros solares que cumplan con características de absorción tanto de rayos UVA como de rayos UVB ha ido en aumento. Un dato destacado es que el melanoma tiene una mayor probabilidad de desarrollarse en los individuos con piel clara y aumenta su incidencia cada año en los países desarrollados, por lo que, en algunas zonas como Australia se han implementado iniciativas, como la

enseñanza del uso de protectores solares para disminuir la incidencia del melanoma en la población (Saginala *et al.*, 2021).

Debido al incremento en la demanda de productos químicos, durante los últimos años se han realizado estudios enfocados en la identificación y clasificación de estos como contaminantes, dichos estudios han permitido alertar la existencia de "contaminantes emergentes" (CE), compuestos que representan un peligro potencial en el ecosistema, por lo que Organismos dedicados a la protección de la Salud Pública y del Ambiente los han colocado en sus líneas de investigación prioritarias. Algunas de las características de los CE son que no necesitan ser persistentes para provocar efectos dañinos, además de que muchos pueden bioacumularse en especies acuáticas, aguas superficiales y sedimentos, lo cual trae consigo distintos efectos tóxicos (Usma *et al.*, 2013). Además, muchos de los CE actúan como disruptores endocrinos (DE) provocando la alteración del crecimiento, desarrollo, reproducción y del comportamiento de diversos organismos acuáticos (Teodosiu *et al.*, 2018).

Actualmente existen más de 1000 compuestos químicos considerados como CE los cuales han sido clasificados en 16 clases, entre los CE que requieren una urgente y mayor atención se encuentran los productos de cuidado personal. Dentro de la clasificación de productos de cuidado personal encontramos a los filtros solares, cuya demanda ha aumentado ante la preocupación de los efectos provocados por la exposición a la radiación solar. El aumento en la producción de protectores solares también ha causado que su presencia en el ambiente incremente y sus efectos tóxicos sean variables. Muchos de los filtros UV orgánicos tienen un coeficiente de partición octanol/agua ( $K_{ow}$ ) elevados por lo que tienden a acumularse en medios marinos, así como en diversas especies acuáticas como los corales, algas, artrópodos, moluscos y vertebrados marinos. Además de que al no ser compuestos estables en el agua se degradan y sus productos no son deseados (Chatzigianni *et al.*, 2022; Duro *et al.*, 2003).

La 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-3) es un filtro solar orgánico ampliamente utilizado por su capacidad de absorción de la luz UVA-I. En productos de protección solar se usa en concentraciones del 6-10%. Este filtro no solo previene las quemaduras solares, sino que también protege de los efectos fotodinámicos,

fotosensibilizadores y fototóxico de distintos fármacos (Nakagawa y Suzuki, 2002). Se han detectado concentraciones desde 0.2 ng/L hasta 8.472 mg/L de BP-3 en diferentes matrices acuáticas (Kasprzyk-Hordern et al., 2009; Cadena et al., 2022), lo que ha causado que diversas especies acuáticas presenten efectos tóxicos como producto de la exposición involuntaria a este filtro solar. A pesar de estos antecedentes, hay muy pocos estudios toxicológicos que demuestren los efectos de la BP-3 sobre distintos organismos acuáticos.

El uso de *Xenopus laevis* como bioindicador para la evaluación toxicológica de diferentes contaminantes ambientales, presenta varias ventajas entre las que se incluyen su proximidad evolutiva a los vertebrados superiores en cuanto a fisiología, expresión génica y desarrollo de órganos, ojos, hígado, pulmones, corazón, riñón, etc., lo cual permite transferir los resultados directamente a la especie humana (Nenni et al., 2019). Por esta razón es una de las principales especies utilizadas en estudios de teratogénesis *in vitro*, por lo que actualmente los investigadores se basan en el "Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX)" para realizar dichos estudios ya que en esta prueba requieren de tiempos de exposición cortos (96 horas), tiene costos accesibles y una buena reproducibilidad, además de proporcionar una validez científica y puede ser utilizada para la evaluación de riesgos en el ecosistema y en la salud humana (Hoke y Ankley, 2005; Fort y Mathis, 2018).

Debido a lo anterior, en este trabajo se utilizó el ensayo FETAX con la finalidad de determinar la toxicidad inducida por la exposición al filtro solar BP-3 en embriones de *Xenopus laevis*, para lo cual se planteó la hipótesis de que la exposición a concentraciones ambientales relevantes del filtro solar 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (0.063 a 3.0 mg/L) induciría embriotoxicidad y teratogénesis en los embriones de *Xenopus laevis*.

### **3 MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Contaminación del agua**

La acumulación de diversos residuos en el agua cada día va en aumento, cada uno de estos residuos procede de distintas fuentes y pueden infiltrarse en el agua directamente debido a los vertidos legales e ilegales de fábricas o plantas de tratamiento de aguas residuales (Barceló y López, n.d.). Fenómenos como el viento y las tormentas también pueden provocar que la basura, especialmente los residuos plásticos, sean trasladados a las vías fluviales (Bassem, 2020). La contaminación también puede deberse a que diferentes contaminantes son arrastrados en el suelo por la lluvia o la nieve derretida, lo que a su vez provoca que en el agua se mezclen con pesticidas, fertilizantes, herbicidas o residuos de animales domésticos que proceden de los hogares o zonas agrícolas, al igual que el petróleo, aceites y otras sustancias que provienen de las carreteras (Chowdhary et al., 2020; Dwivedi and Shikha, 2016). El problema con estos residuos es que la composición química de las aguas residuales industriales provoca que la temperatura del agua incremente, lo que es causa de muerte de animales acuáticos (Nunez, 2023).

La contaminación hídrica es un tema controversial debido a que el agua es considerada como un recurso fundamental para la vida en el planeta Tierra, sin embargo, la presencia del hombre en zonas como lagos, ríos y mares ha traído como consecuencias la pérdida de ecosistemas acuáticos causado por los desechos químicos que se transfieren al agua a través de cremas, lociones, fármacos y filtros UV. Los contaminantes en el agua pueden producir distintos efectos sobre los organismos, estos dependen de las emisiones del contaminante y del organismo. Muchos de los compuestos que ingresan en un organismo pueden producir genotoxicidad, es decir, pueden causar daños en el DNA provocando errores reproductivos, mutaciones o defectos que comprometan la salud y el desarrollo de este (Bassem, 2020). También existen contaminantes cancerosos y neurotóxicos, estos últimos provocan una mala coordinación muscular, temblores, convulsiones, nervios y mareos, algunas veces el nivel de neurotoxicidad puede causar la muerte por una parálisis pulmonar o insuficiencia respiratoria. Los efectos de la

contaminación también pueden ser observados en organismos acuáticos mediante el descenso de la fertilidad producida por agentes que actúan como disruptores endocrinos, tal puede ser el daño en los órganos reproductivos que el problema puede resultar en la infertilidad del organismo. Otros desechos también han provocado problemas de salud en la vida humana, como la disentería, hepatitis y cólera (Guadarrama et al, 2016).

### **3.2 Contaminantes emergentes**

Debido al impacto ambiental que tienen los contaminantes químicos, a lo largo de los años se han realizado estudios científicos para identificarlos y clasificarlos. Los nuevos avances tecnológicos han permitido alertar la existencia de contaminantes potencialmente peligrosos, a los cuales se les ha denominado "contaminantes emergentes" (CE), estos se han convertido en un en una preocupación real debido a los peligros que ocasionan al ambiente y a la humanidad, además de que en su mayoría son tóxicos y bioacumulables ( Barceló y López, n.d.; Dulio et al., 2018;Arman et al., 2021), es por ello que organismos dedicados a la protección de salud pública y ambiental como la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han colocado a estos contaminantes como prioridad en sus líneas de investigación. Petrović et al. (2003) señalan que los CE son compuestos de los que se cuenta con poca información acerca de su presencia o su impacto en el ambiente, por lo cual no han sido regulados y sus métodos de análisis son limitados. Uno de los problemas de estos compuestos es que debido a su alta demanda se ha elevado su producción y a su vez ha incrementado su presencia en el medio ambiente, además de que una característica de los CE es que no necesitan ser persistentes para provocar efectos dañinos, debido a su constante ingreso al medio ambiente (Usma et al., 2013).

En la actualidad se consideran como CE a más de 1000 compuestos que han sido clasificados en 16 clases: toxinas de algas, anticorrosivos, agentes antiespumantes y complejantes, antioxidantes, blanqueadores, subproductos de desinfección, retardantes de llama, perfumes, aditivos de gasolina, nanopartículas, sustancias perfluoroalquiladas, productos de cuidado personal, pesticidas, plastificantes y productos farmacéuticos (Arman et al., 2021). Entre estos contaminantes existe

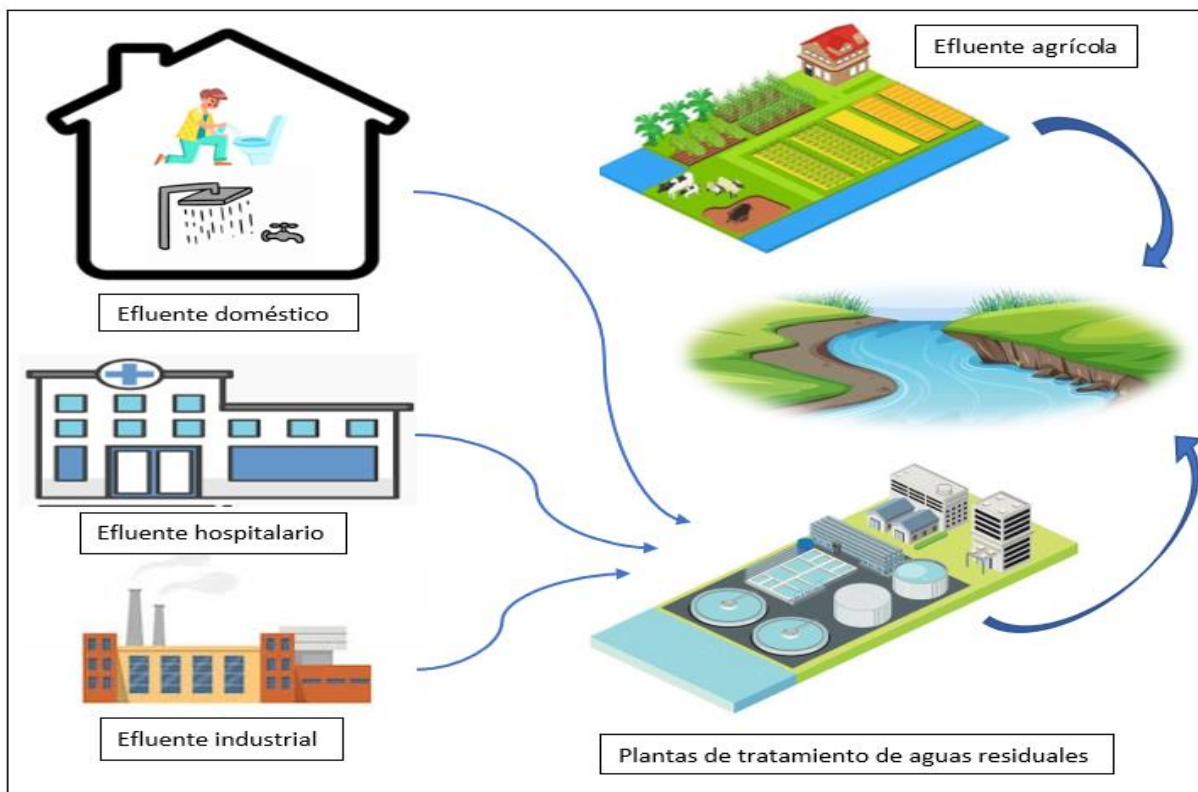
una extensa variedad de productos de uso cotidiano, como los detergentes de tipo alquilfenol etoxilado, pesticidas, detergentes perfluorados, productos de cuidado personal y fármacos, muchos de estos actúan como disruptores endocrinos (DE) alterando el crecimiento, desarrollo, reproducción y el comportamiento de organismos acuáticos (Teodosiu *et al.*, 2018). Aquellos CE que requieren una mayor y urgente atención son:

- Retardantes de llama bromados: empleados en productos comerciales como muebles, plásticos, pinturas, etc.
- Compuestos perfluorados: usados como refrigerantes, detergentes, cosméticos, adhesivos y polímeros.
- Fármacos: antibióticos que desarrollan cepas bacterianas resistentes, fármacos citostáticos que tienen propiedades cancerígenas.
- Drogas de abuso.
- Productos de degradación de fármacos y sustancias de abuso.
- Productos de cuidado personal (filtros solares).

El destino de los CE suele ser variado, ya que se desconocen sus rutas de exposición ambiental de forma concreta, además de que estas se ven afectadas por los entornos en los que se encuentran (Wilkinson *et al.*, 2017). En algunos países se han realizado listas de CE con la finalidad de disminuir la liberación de estos al ambiente, por lo que países como Suiza y Canadá llevan a cabo proyectos con el propósito de tener mejoras en las estrategias empleadas en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Gibson, 2020). La problemática de estos contaminantes engloba el hecho de que estos aún no son incluidos en el monitoreo actual en los programas de tratamiento de aguas. La existencia de contaminantes acuáticos hace indispensable realizar estudios ambientales de biodisponibilidad, degradación y toxicidad, para así identificarlos, evaluar el impacto ecológico y tener una mejor visión de la problemática relacionada con estos compuestos (Barceló y López, 2016). Aunado a esto, los nuevos estudios realizados se han centrado en la aparición de CE en aguas superficiales, en aguas de ríos y lagos, aguas residuales con tratamiento biológico, entre otras, debido a que estas son más susceptibles de contener concentraciones mayores de CE que las aguas subterráneas. A pesar de

esto, la información que hay disponible sobre los efectos que pueden causar en la salud humana y en la ecología es muy limitada (Usma *et al.*, 2013).

En la figura 1 se representan las principales vías de entrada de los CE al ambiente, los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales son considerados como la principal fuente de liberación de CE a las aguas superficiales donde posteriormente llegan a sedimentos, aguas subterráneas y océanos.



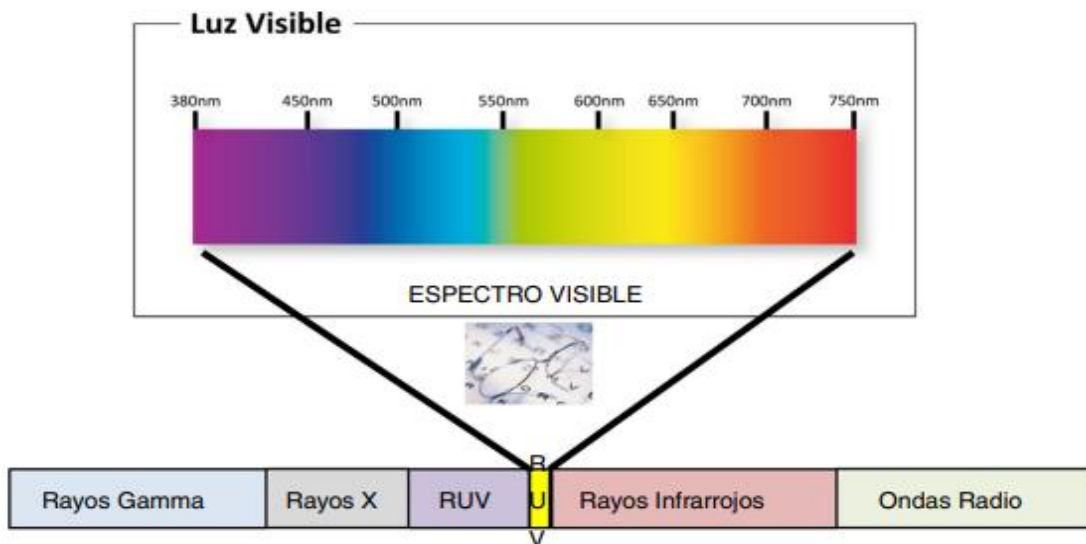
**Figura 1.** Representación gráfica de las principales vías de entrada de CE hacia el ambiente, creación propia.

Entre los CE que son liberados en aguas superficiales se encuentran los productos de cuidado personal, los cuales, son producidos para ser utilizados directamente sobre la piel, muchos de estos también se utilizan como ingredientes activos o protecciones en cosméticos, fragancias o productos de baño, no obstante, en algunas ocasiones estas sustancias se usan en cantidades más elevadas a las sugeridas (Arman *et al.*, 2021). Uno de los productos de cuidado personal que está dentro de la clasificación de contaminantes emergentes son los filtros de protección solar, los cuales están compuestos principalmente por conjugados aromáticos

lipofílicos, en particular los filtros orgánicos incluyen benzofenonas y octinoxato (Usma *et al.*, 2013).

### 3.3 Filtros solares

El sol es considerado como una fuente de energía muy importante ya que sin este la vida en el planeta sería imposible, sin embargo, emite radiaciones electromagnéticas caracterizadas por la frecuencia y longitud de onda de estas. Solo algunas de las radiaciones electromagnéticas procedentes del sol pueden llegar a la tierra, tal es el caso de las radiaciones ultravioletas UVA y UVB, radiación infrarroja y la luz visible. En la figura 2 se observa el espectro electromagnético iniciando con la radiación de menor longitud de onda, como son los rayos gamma y los rayos X, pasando por la radiación ultravioleta, la luz visible y la radiación infrarroja, hasta llegar a las ondas electromagnéticas que tienen una mayor longitud de onda, es decir, las ondas de radio (Garnacho *et al.*, 2020).



**Figura 2.** Espectro electromagnético. Tomado y modificado de Garnacho, 2020.

Los efectos causados por la radiación solar en el ser humano son distintos e influyen en su salud (Gallo, 2016). La radiación ultravioleta (RUV) de la luz solar provoca daños que dependen de la longitud de onda, no obstante, la RUV es la responsable de causar las dermatosis lumínicas, la energía de esta radiación es inversamente proporcional a su longitud de onda, debido a esto, es clasificada en 3 bandas energéticas, que son la UVC (200-290 nm), UVB (290-320 nm) y UVA (320-400

nm). Las bandas UVC son las más nocivas, sin embargo, estas son absorbidas por la capa de ozono, por otro lado, de la radiación UV que atraviesa la capa de ozono y logra llegar a la superficie terrestre solo un 1-10% es UVB, mientras que del 80-90% es UVA (Raffa *et al.*, 2019), de las cuales alrededor del 50% de la radiación UVA penetra la epidermis mientras que el porcentaje de UVB que penetra la epidermis es del 90% (Cañarte, 2015). En el caso de la radiación UVA, los efectos que provoca son a largo plazo, algunos de estos pueden ser foto envejecimiento, fotosensibilidad y melanoma (Young *et al.*, 2017; Raffa *et al.*, 2019) En comparación a estos, la UVB provoca eritema inmediato, fotoinmunosupresión, pigmentación de la piel y cáncer cutáneo no melanoma. Así entonces, los efectos por absorción de la radiación UV suelen ser diversos y son dependientes de la longitud de onda, el tiempo de exposición a esta y la penetración en la piel, el daño puede presentarse poco tiempo después de dicha exposición solar o incluso puede aparecer años más tarde (Mota *et al.*, 2003).

En la actualidad, existen filtros solares que tienen la finalidad de disminuir los efectos provocados por la exposición a la radiación solar en la piel, estos actúan desviando, reflejando o absorbiendo la radiación (Cañarte, 2015; Yamada *et al.*, 2020). A la cantidad de veces que el protector solar aumenta su protección sobre la piel contra el eritema o a la irritación previa a la quemadura se le llama *factor de protección solar* (FPS), lo que permite el FPS es medir cuál es la capacidad de protección que tiene filtro solar contra la radiación UVB, por lo que se debe considerar que este solo indica qué cantidad de protección hay frente al eritema y no ante los demás efectos causados por la radiación (Young *et al.*, 2017; Raffa *et al.*, 2019). Existen por lo menos cuatro sistemas para la medición del FPS; el americano (FDA), australiano (SSA), europeo (COLIPA) y alemán (DIN), sin embargo, podrían existir variaciones dependiendo del método utilizado debido a que la misma metodología de cada sistema es variable (Batlle, 2005).

Aún con las diferentes sistemas de medición se destaca que los filtros solares cumplan con características tales como:

1. Amplio espectro de protección: protección tanto contra la radiación UVA y UVB.

2. Estabilidad: es importante que los filtros no cambien su estructura química frente a la exposición a altas temperaturas, ya que eso los haría perder su efectividad.
3. Adherencia y resistencia al agua: los filtros que tienen resistencia al agua son logran conservar su protección hasta 40 minutos de estar inmerso en el agua, sin embargo, los filtros que son a prueba de agua tienen la capacidad de preservar su protección incluso después de 80 minutos estar inmerso en el agua.
4. No produzca irritación ni sensibilidad.

Los filtros solares tienen entonces la función de reflejar, dispersar y absorber parte de la radiación solar a la que somos expuestos diariamente, pero sin bloquear los efectos beneficiosos como la síntesis de vitamina D, la foto adaptación, inmunosupresión de la inmunidad adquirida y el estímulo de la inmunidad innata (Young *et al.*, 2017). Ante la importancia del uso de filtros solares adecuados, estos se clasifican en dos grupos de acuerdo con su composición: filtros *físicos* y filtros *químicos* (Batlle, 2005).

### **3.3.1 Filtros solares físicos**

Los filtros *físicos* reflejan o desvían la radiación solar, tienen un espectro de acción más amplio por lo que sirven como protección de rayos UVA, UVB, luz visible e infrarrojos, es decir, actúan como sustancias pantalla. Se requieren mayores cantidades en la aplicación al tratarse de partículas minerales como son el dióxido de titanio, óxido de zinc y la mica, además tienden a manchar la ropa, pero suelen no provocar irritación, las sustancias más comúnmente empujadas son el dióxido de titanio y el óxido de zinc, las menos frecuentemente utilizadas son el carbonato de calcio y magnesio, óxido de magnesio y cloruro de hierro. Tanto sus características como su mecanismo de acción hacen que este tipo de protectores sea recomendado en niños desde año y medio de edad, pieles alérgicas y reactivas, lastimadas, con cicatrices, eritema o después de tratamientos agresivos como los peelings químicos (Marín y Pozo, 2005).

A pesar de tener una gran eficacia en cuanto a su protección, los filtros físicos en formulaciones cosméticas se combinan con otros para conseguir preparaciones con un FPS mayor y mejores características organolépticas (Garrote y Bonet, 2008).

### **3.3.2 Filtros solares químicos**

Cuando se habla de filtros *químicos* se refiere a moléculas que tiene la capacidad de absorber los fotones de la radiación solar provocando la alteración de su estructura molecular, esto puede provocar a su vez cambios en su estructura química, son altamente utilizados en el mercado porque son incoloros, se ocupa poca cantidad y no manchan, las sustancias más utilizadas como filtros UVB son el PABA (ácido para-aminobenzoico), salicilatos, ácido cinámico, alcanfor y benzimidazoles, en cambio, las sustancias que se emplean como filtros UVA son las benzofenonas, antranilatos y dibenzoilmetanos (Duro *et al.*, 2003).

A diferencia de los filtros físicos, estos deben ser aplicados por lo menos 30 minutos previos la exposición solar, además de que al ser absorbidos por la piel existe mayor riesgo de causar intolerancia, esta es una de las razones por las que no se recomienda usar filtros químicos en pieles sensibles o lesionadas (Marín y Pozo, 2005).

En los últimos años, mediante estudios científicos, se ha demostrado una considerable acumulación de filtros UV en distintos ecosistemas con un efecto tóxico observable variado en cada uno de ellos, además estos pueden permanecer durante periodos de tiempo prolongados en sedimentos y en el agua, por lo que las corrientes marinas pueden trasladarlos y distribuirlos por largas distancias (Chatzigianni *et al.*, 2022). Muchos filtros UV orgánicos se acumulan en medios marinos debido a sus elevados valores del coeficiente de partición octanol/agua (Kow), además, los agentes UV no son estables en el agua y se transforman en subproductos no deseados. Algunos estudios experimentales han demostrado que los filtros UV orgánicos tienden a bioacumularse en diversas especies acuáticas como corales, algas, artrópodos, moluscos, equinodermos y vertebrados marinos (Chatzigianni *et al.*, 2022; Duro *et al.*, 2003)

Filtros UV como la 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-3) y el salicilato de etilhexilo han sido detectados en cantidades importantes en ríos, playas, mares, etc. Y en organismos vivos como peces, corales, algas y mamíferos (Kasprzyk-Hordern et al., 2009; Cadena et al., 2022), por lo que el estudio exhaustivo del impacto medioambiental causado por la exposición a filtros solares es transcendental (Duro et al., 2003).

### 3.3.3 Benzofenona-3

Las benzofenonas son compuestos orgánicos con dos anillos de benceno unidos por una cetona, es decir, se trata de cetonas aromáticas que absorben la luz UV. Lo que convierte a la benzofenona-3 (International Nomenclature Cosmetic Ingredient), abreviada como BP-3 (tabla 1), en un ingrediente activo que se encuentra en muchos productos de protección solar es su capacidad de absorción de la luz UV-AI, además, sus características químicas y organolépticas permiten que este compuesto sea utilizado en la formulación de productos cosméticos, protectores solares, detergentes de ropa y envases que requieran evitar la decoloración o degradación por exposición solar, sin embargo, es considerado como un xenobiótico con importancia ambiental (Mutlu *et al.*, 2017).

La BP-3 es utilizada en concentraciones de hasta el 10% en protectores solares, ya sea solo o en combinación con otros filtros UV. Además, no solo previene las quemaduras solares, sino también protege de los efectos fotodinámicos, fotosensibilizadores y fototóxico de distintos fármacos (Nakagawa y Suzuki, 2002).

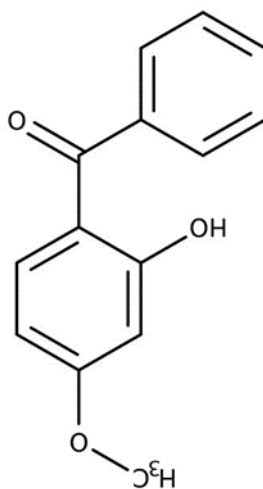
**Tabla 1.** Nombres e identificadores de la benzofenona-3

Sinónimos	2-hidroxi-4-metoxibenzofenona 2-hidroxi-4-metoxibenzona Benzofenona-3 (BP-3) Eusolex-4360 Oxibenzona Uvinul 3040 Metanona HMBP cpd Solbar
-----------	---

Nombre IUPAC	(2-hidroxi-4-metoxifenil)-fenilmetanona
Fórmula molecular	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
CAS (Chemical Abstracts Service)	131-57-7
EINECS (European Inventory of Existing Chemical Substances)	205-031-5

### 3.3.3.1 Propiedades fisicoquímicas

La estructura química de la BP-3 tiene como fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>, es un sólido cristalino incoloro (Tabla 2), se identifica por tener una molécula conjugada con un grupo hidroxilo que está unido por hidrógeno a la cetona (Figura 3) y se sospecha que esta interacción de enlaces de hidrógeno puede contribuir a las propiedades de absorción de luz de este compuesto, su capacidad para absorber la luz a niveles de energía más bajos en comparación con muchos otros compuestos aromáticos la convierte en un ingrediente adecuado en productos de protección solar (Liebich y Parthé, 1974).



**Figura 3.** Estructura química de la 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-3), tomado y modificado de FisherSci.es.

**Tabla 2.** Propiedades físicas y químicas de la benzofenona-3

<b>Propiedad</b>	<b>Valor</b>
Forma	Cristales
Color	Incoloros
Peso molecular	228.24 g/mol
Aspecto físico	Sólido
Punto de ebullición	302-305 °F a 5 mmHg
Punto de fusión	65.5 °C
punto de inflamación	100 °C
Solubilidad	3.7 mg/L en agua a 25°C Fácilmente soluble en la mayoría de disolventes orgánicos, completamente en alcohol y tolueno.
Densidad	1.32 a 25°C
Presión de vapor	0.00000142 [mmHg]
Vida útil	2 años
Estabilidad en agua destilada	96 horas
Estabilidad en DMSO	4 horas
Estabilidad en acetona	3 semanas

El coeficiente de partición Kow de la BP-3 es de 3.79, lo que ocasiona que este sea un compuesto lipofílico, y al poseer un valor de Kow alto tiene una mayor probabilidad de ser bioacumulable en los organismos, concentrarse en suelos y sedimentos (He et al., 2019; Astel et al., 2020)

### **3.3.3.2 Toxicidad**

Al ser un compuesto lipofílico, fotoestable, pero altamente bioacumulativo, la concentración máxima permitida en filtros solares es del 6% (Nakagawa y Suzuki, 2002). El principal problema de este filtro solar es que cuando se encuentra en un medio acuoso se adhiere a partículas que se encuentran suspendidas, a absorberse el ecosistema acuático y se acumula en la interfase agua-aire. Algunas pruebas *in*

*vivo e in vitro* demuestran que la benzofenona-3 es una sustancia que produce alteraciones a nivel endocrino en mamíferos y organismos acuáticos, principalmente a nivel estrogénico, por otro lado, otros estudios demuestran que la BP-3 provoca reacciones alérgicas y se sospecha de su interacción en el fenómeno de decoloración de arrecifes de coral (Blüthgen et al., 2012; Raffa et al., 2019; Lee et al., 2020; Kinnberg et al., 2015).

Tras exposiciones prolongadas o repetitivas a este puede haber daños en órganos como el hígado, actuando como una hepatotoxina por ingestión o experimentación con animales, y riñón. Solo en caso de ser ingeridos, es nocivo para los organismos acuáticos y puede provocar efectos duraderos (Fent et al., 2008; Coronado et al., 2008; Oliveira et al., 2022)

### **3.3.3.3 Vías de entrada al ambiente**

Las benzofenonas son producidas de forma natural por un número reducido de frutas y plantas, sin embargo, son compuestos que también se pueden fabricar de manera sintética atribuyéndosele diferentes usos, el Food Chemical Codex (FCC) indica que BP-3 puede usarse como un agente aromatizante, por otro lado, en los productos cosméticos, este está regulado actualmente como filtro UV en productos de protección solar a una concentración de hasta el 6% en preparados listos para el uso y en una concentración de hasta el 0,5% para proteger la formulación de otros productos cosméticos, en instituciones europeas permiten su uso como potenciador de sabor con una ingesta diaria tolerable de 0.03 mg/kg pc/día, mientras que en estados unidos está permitido para la fabricación de artículos de caucho o polímeros para uso de materiales de envasado.

La oxibenzona, al estar presente en productos de cuidado personal como esmaltes de uñas, fragancias, jabones y bloqueadores solares, puede ser liberada al ambiente como agua de uso doméstico o mediante el uso de protector solar en zonas como lagos, ríos, playas o mares, además de que al tratarse de un producto que tiene la capacidad de acumularse en el ambiente, este es de interés científico (Kim y Choi, 2014; Mao et al., 2019; Tsui et al., 2019; Mengual, 2020).

### **3.4 Biomarcadores**

En la actualidad, el estilo de vida determina la exposición a distintos agentes ambientales los cuales son un elemento para el desarrollo de alteraciones en la salud como son la carcinogénesis, genotoxicidad, neurotoxicidad, teratogénesis, etc. El constante avance en la tecnología ha permitido la determinación de biomarcadores, los cuales son indicadores biológicos que brindan información acerca del estado de salud un individuo, es decir, permiten evaluar la respuesta funcional o fisiológica, a nivel celular o molecular, entre un sistema biológico y un agente ya sea químico, físico o biológico, lo cual nos brinda información de la probabilidad del desarrollo de una enfermedad. Para poder evaluar dichas interacciones debe tenerse en cuenta la duración de la exposición, dosis, etapa durante la cual se produjo, la vía de contacto y la frecuencia de exposición con el agente (Arango, 2012;HBM4EU, 2020).

Antes de considerar utilizar un biomarcador es necesaria su validación, por lo cual debe pasar por un proceso de selección y aprobación, en estas se considera la especificidad, fiabilidad y sensibilidad de este, por lo que se debe establecer su exactitud y precisión. Para la validación de un biomarcador se debe identificar el riesgo, evaluar la dosis respuesta (relación cuantitativa dosis-efecto) y evaluación de exposición (Arango, 2012).

Los biomarcadores son clasificados en tres tipos:

- i. Biomarcadores de exposición: estos se utilizan para evaluar la presencia de una sustancia externa, metabolito o al resultado de la interacción entre un agente xenobiótico y una molécula o célula diana en un organismo.
- ii. Biomarcadores de efecto: evalúan la modificación química, bioquímica, fisiológica o de conducta producida en un organismo.
- iii. Biomarcadores de susceptibilidad: revelan la capacidad de respuesta, ya sea, heredada o adquirida, que tiene un organismo producida por la exposición de una sustancia xenobiótica.

Los biomarcadores suelen dividirse en diferentes tipos, como los biomarcadores diagnósticos, pronósticos y terapéuticos. Un biomarcador debe tener una buena

especificidad, sensibilidad, debe ser económico, estable *in vivo*, no invasivo, con alta relevancia preclínica y clínica con el objetivo de impactar positivamente las decisiones relacionadas al estudios en cuestión (Giménez y Peel, 2014; Torres y Pérez, 2016).

En la toxicología humana y ambiental, el uso de biomarcadores tiene como objetivo medir la exposición a agentes considerados como xenobióticos con la finalidad de predecir la respuesta toxica. El uso de estos ha permitido la existencia de requerimientos para regular el desarrollo de medicamentos, pesticidas u otros compuestos que produzcan efectos no deseados durante y después de su uso. En la actualidad, los estudios toxicológicos a corto y largo plazo son realizados en sistemas *in vitro* y en animales de experimentación para demostrar el desarrollo de procesos mutagénicos, carcinogénicos y de teratogénesis y así promover acciones que mejoren la protección de la salud (Torres y Pérez, 2016).

Mediante el uso de biomarcadores se mide el daño potencial producido por la exposición, para así medir el riesgo, el daño va a depender de la cuantificación del efecto toxico y de la toxicidad formulada que se obtienen a partir de la dosis letal para el 50% de los individuos ( $DL_{50}$ ), de la concentración letal para el 50% de los individuos ( $CL_{50}$ ), la dosis de efecto sobre el 50% de los individuos ( $DE_{50}$ ), concentración de efecto sobre el 50% de los individuos ( $CE_{50}$ ), el máximo aceptable de concentración del toxico (MATC), el nivel más bajo de efecto observable (LOEL), nivel más bajo de concentración con efecto observable (LOEC), el nivel con efecto no observable (NOEL) y la concentración de efecto no observable (NOEC). En el caso de la toxicología ambiental, la estimación del riesgo está basada en la comparación de los datos de toxicidad que se obtienen en el laboratorio mediante la exposición del organismo al agente de estudio. Los biomarcadores son medidos en especies como aves, peces, invertebrados etc., siguiendo los protocolos éticos de investigación. Existe una amplia variedad de técnicas que permiten calcular la exposición de los individuos a sustancias dañinas, mediante metabolitos, proteínas o enzimas (Arango, 2012).

### 3.5 Teratogénesis

Cuando hablamos de teratogénesis nos referimos a los cambios o anomalías estructurales o funcionales durante el desarrollo embrionario, estos cambios son producidos por la exposición a agentes ambientales, enfermedades, consumo de fármacos contraindicados durante la gestación, uso de sustancias de abuso o por mutaciones de *novo* (Castañón y Mayet, 2013).

Es importante mencionar que a pesar de creer que la mayoría de las malformaciones son consecuencia del uso de fármacos durante la gestación, no todas las anomalías son causadas por el uso de fármacos. En realidad, el origen de aproximadamente el 40% de las malformaciones no se conoce, por otro lado, el 12-25% de las malformaciones congénitas se debe a alteraciones genéticas, el más frecuente es el síndrome de Down en este grupo, el siguiente 20% se debe a las interacciones existentes entre factores heredados y ambientales, y solo del 5-9% de las malformaciones son consecuencia de factores ambientales como agente único (enfermedades o infecciones maternas durante la gestación, productos químicos o fármacos) (Pérez *et al.*, 2002).

Debido al riesgo de exposición a medicamentos, se han desarrollado clasificaciones con la finalidad de agrupar a los medicamentos de acuerdo con el riesgo teratogénico que producen, sin embargo, la clasificación más utilizada en algunos países es la de la FDA, a pesar de eso también se tiene en cuenta la información que brindan otros tipos de clasificación. En 1979 se describió por primera vez la clasificación de la FDA y se renueva periódicamente, para esta clasificación se distinguen cinco categorías descritas a continuación (Pérez *et al.*, 2002)

- A. Ensayos controlados realizados con el fármaco que no demuestran riesgos para el feto en el primer trimestre de gestación y sin evidencia de riesgo durante los siguientes trimestres.
- B. Esta categoría a su vez se divide en dos subcategorías:
  - Ensayos en animales que no han demostrado riesgo teratogénico y sin estudios controlados en mujeres embarazadas.

- Ensayos en animales en los que se ha demostrado efectos teratogénicos no confirmados por estudios en mujeres en el primer trimestre de gestación y sin evidencia posterior.

C. Para fármacos de los que se espera que el beneficio justifique el riesgo potencial, puede ser porque existan estudios en animales que revelen ser teratogénicos sobre fetos, pero no se han realizado en mujeres embarazadas o aún sin antecedentes de estudios en mujeres ni en animales.

D. Fármacos con evidencia certera de riesgo teratogénico, pero que los beneficios puedan hacerlos aceptables, aunque haya un riesgo alto.

X. Medicamentos que no están contraindicados en mujeres embarazadas, que además ya se han realizado estudios en animales y humanos con evidencia de riesgo teratogénico y que el riesgo supera el beneficio.

En 1959 James Wilson propuso seis principios de teratología, los cuales son enlistados a continuación:

- i. La susceptibilidad a la teratogénesis va a depender del genotipo del embrión que interactúa con factores ambientales adversos.
- ii. La etapa de desarrollo de la exposición va a determinar el resultado.
- iii. Todos los agentes teratogénicos tienen mecanismos específicos a través de los cuales ejercen sus efectos patógenos.
- iv. La naturaleza del compuesto determina su acceso al tejido en desarrollo.
- v. Categorías principales de manifestaciones del desarrollo alterado: muerte malformación, retraso del crecimiento y déficit funcional.
- vi. Las manifestaciones del desarrollo alterado aumentan con el incremento de la dosis.

Además, podemos considerar también tres características básicas de los teratogénicos: pueden ser específicos para un órgano, para una especie o de una dosis (Hodgson, 2004).

### **3.6 FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus)**

El FETAX que utiliza embriones de *Xenopus laevis* fue introducido por el Dr. James Dumont en 1983, posterior a su introducción se estuvieron realizando estudios

interlaboratorios para validar su utilidad, fue hasta 1991 que la American Society for Testing and Materials elaboró algunas directrices para este ensayo, volviéndose a publicar en 1998. FETAX es un ensayo desarrollado para determinar el potencial teratogénico mediante el uso de embriones de rana *Xenopus*, es decir, dicho ensayo tiene como finalidad evaluar los efectos de sustancias químicas, ya sean puras, mezclas o complejas y sedimentos, durante las primeras etapas del desarrollo en ranas *Xenopus* (Bantle y Sabourin, 1991; NICEATM FETAX, 2000). Al tratarse de una prueba potente, que requiere de tiempos de exposición cortos (96 horas), además de tener costos accesibles y una buena reproducibilidad, es uno de los ensayos más utilizados para realizar estudios de toxicidad ya que proporciona una validez científica y puede ser utilizado para la evaluación de riesgos en el ecosistema y en la salud humana (Hoke y Ankley, 2005; Fort y Mathis, 2018).

Para este método se utilizan embriones de rana africana *Xenopus*, una vez que los embriones son seleccionados, son expuestos al compuesto del cual se desea evaluar su toxicidad (Bantle y Sabourin, 1991), los criterios primarios de valoración son la mortalidad, las malformaciones y la inhibición del crecimiento. A partir de los primeros dos datos se calcula la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>, concentración que induce letalidad al 50% de embriones expuestos), concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>, concentración que induce malformaciones en el 50% de los embriones expuestos) y con dichas estimaciones se calcula el índice teratogénico (IT), que se obtiene al dividir la CL<sub>50</sub> sobre la CE<sub>50</sub>. La concentración mínima para la inhibición del crecimiento (CMIC) se determina mediante una comparación estadística de la longitud media de la cabeza a la cola a las 96 h de los embriones expuestos en cada concentración contra la longitud media de la cabeza a la cola a las 96 h de los embriones del grupo control. Dicha comparación se basa en el uso de la prueba t de Student para observaciones agrupadas al nivel  $P= 0.05$ , en donde los valores del IT mayores a 1.5 significan un mayor potencial de malformaciones en los embriones con ausencia de mortalidad embrionaria significativa, así, la inhibición de crecimiento está relacionada con la teratogenicidad en FETAX, considerándose un peligro teratogénico cuando se inhibe significativamente el crecimiento a

concentraciones inferiores al 30% de la CL<sub>50</sub> de 96 h (CMI/CL<sub>50</sub>) (Bantley Sabourin, 1991; Fort y Mathis, 2018; Gómez et al., 2021).

Durante las primeras 96 horas del desarrollo embrionario, *Xenopus laevis* tiene procesos de organogénesis semejantes a muchos de los procesos principales de la organogénesis humana (NICEATM FETAX, 2000). Sin embargo, otros autores sugieren que no solo *Xenopus laevis* puede utilizarse en estudios de teratogénesis, también algunas otras especies de *Xenopus* como *X. tropicalis* pueden ser utilizadas de manera efectiva (Fort y Mathis, 2018).

### **3.6.1 Bioindicadores**

Los constantes cambios en el ambiente producidos por las interacciones humanas han provocado que los científicos recurran a la utilización de elementos que se encuentren biológicamente disponibles, con la finalidad de usarlos para conocer y difundir las causas que la interacción humana tiene en el ecosistema (Parmar et al., 2016). Al hablar de bioindicadores se refiere a organismos o comunidades de estos que responden a la contaminación ambiental, e indican el nivel o estado de preservación de un hábitat. Así, un bioindicador sería considerado como ideal cuando muestra tolerancias ambientales estrechas, es decir, tienen una buena sensibilidad a los cambios de factores físicos y químicos del medio en el que viven. Estos miden los efectos de la contaminación en el ambiente, por lo que ofrecen información del riesgo que implica para otros organismos, ecosistemas y para el ser humano (Saulovic et al., 2015).

Los bioindicadores son un medio indirecto de lo que se desea evaluar, su uso está basado en la hipótesis de que la presencia, abundancia o ausencia de una especie o especies, se correlaciona con el cambio de alguna variable en el ambiente que usualmente son favorables para su supervivencia, como resultado de esto se establece que existe una relación estadística entre el bioindicador y las variables que se requieren indicar (Parmar et al., 2016).

Para que un bioindicador sea biológicamente relevante, este debe mostrar cambios en respuesta a un estresor, es decir, mostrar sensibilidad, tener una variabilidad natural baja, presentar cambios mensurables, mostrar cambios persistentes que

sean muy probablemente atribuibles al estresor (especificidad), abarcar variaciones de escala y complejidad y encarnar cambios biológicamente importantes. La utilización de sistemas de bioindicación permite que la información taxonómica se traduzca en índices y así se facilita la interpretación de información y datos resultados de los monitoreos biológicos (Burger y Gochfeld, 2001).

Las razones por las que recurre al uso de bioindicadores suelen ser variadas, entre ellas se encuentran las siguientes:

- La información que se requiere no es de fácil acceso o de acceso directo.
- El acceso a la información que se requiere es difícil y costosa que el uso del bioindicador.

Un buen bioindicador debe ser fácil de utilizar por científicos, gestores y reguladores para responder a sus necesidades de gestión, deben poder utilizar fácilmente un buen bioindicador para responder a sus preguntas y para comprobar hipótesis (Burger y Gochfeld, 2001).

Segnini (2003), menciona la existencia de factores controversiales en especies bioindicadoras, es decir, se debe considerar que el área de distribución geográfica de muchas de estas especies es limitada, esta característica limita su utilidad, además, tanto el punto de vista del investigador y el tipo de alteración influye sobre la utilidad de una especie como indicadora, además de que las especies indicadoras no se pueden ser utilizadas si el origen de la contaminación es diferente al enriquecimiento orgánico.

Las especies consideradas bioindicadoras pueden ser clasificadas como bioindicadores de la salud ecológica y bioindicadores de los cambios poblacionales (Piedras *et al.*, 2006).

### **3.6.2 *Xenopus laevis***

La especie de *Xenopus laevis* (Daudin, 1802), conocida comúnmente como rana de garras africana, es un anfibio experimental que se utiliza en los laboratorios a nivel mundial desde la década de 1950 (Gurdon y Hopwood, 2000; Beck y Slack, 2001; Tadjuidje, 2022). Esta es una especie acuática, con un sistema sensorial denominado "línea lateral", tiene ausencia de lengua, su cuerpo es aplanado y su

cabeza es de un tamaño menor al cuerpo, sus extremidades delanteras son pequeñas y no cuentan con membranas, en cambio, sus extremidades traseras son más largas y con membranas (Tadjuidje, 2022).

Este anfibio se ha utilizado ampliamente para comprender mecanismos relacionados con la embriogénesis y la organogénesis, la toxicología y también algunos mecanismos de enfermedades humanas debido a que este produce un gran número de huevos que se fecundan fácilmente tanto *in vitro* como *in vivo*, así pueden producir un número incontable de embriones en pocos días, durante todas las estaciones del año (Bantle y Sabourin, 1991). Los estadios embrionarios se han empleado con frecuencia por tener ventajas como el tiempo, costo y facilidad de manejo. Éticamente, el uso del embrión de *X. laevis* no es problemático porque, como en el caso de larvas de pez cebra, el desarrollo temprano de *Xenopus* queda fuera de la directiva 240/2010 de la UE, por lo que no es necesaria la aprobación de las autoridades sanitarias para los experimentos *in vivo* siempre y cuando esos se realicen en las primeras etapas de esta especie (Tadjuidje, 2022; Zahn et al., 2022).

Una de las principales ventajas de trabajar con *Xenopus* es que proximidad evolutiva a los vertebrados superiores en cuanto a fisiología, expresión génica y desarrollo de órganos, ojos, hígado, pulmones, corazón, riñón, etc., permite transferir los resultados directamente a la especie humana (Nenni et al., 2019). Debido a la importancia de esta especie como organismo modelo para estudios sobre biología del desarrollo, *X. laevis* se considera una de las principales especies para estudios de teratogénesis *in vitro* por lo que actualmente los estudios científicos se basan en el "Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX)", el cual es un ensayo específico que utiliza embriones en fase inicial de esta especie con la finalidad de medir la actividad de los contaminantes durante su desarrollo (Hoke and Ankley, 2005; Fort and Mathis, 2018).

A pesar de ser una especie para estudios experimentales, al ser un anfibio, su uso podría tener desventajas, como el hecho de que estos son reproductores estacionales lo cual reduciría la posibilidad de realizar experimentos durante todo el año. Sin embargo, en el caso de *X. laevis* se puede inducir el desove con una

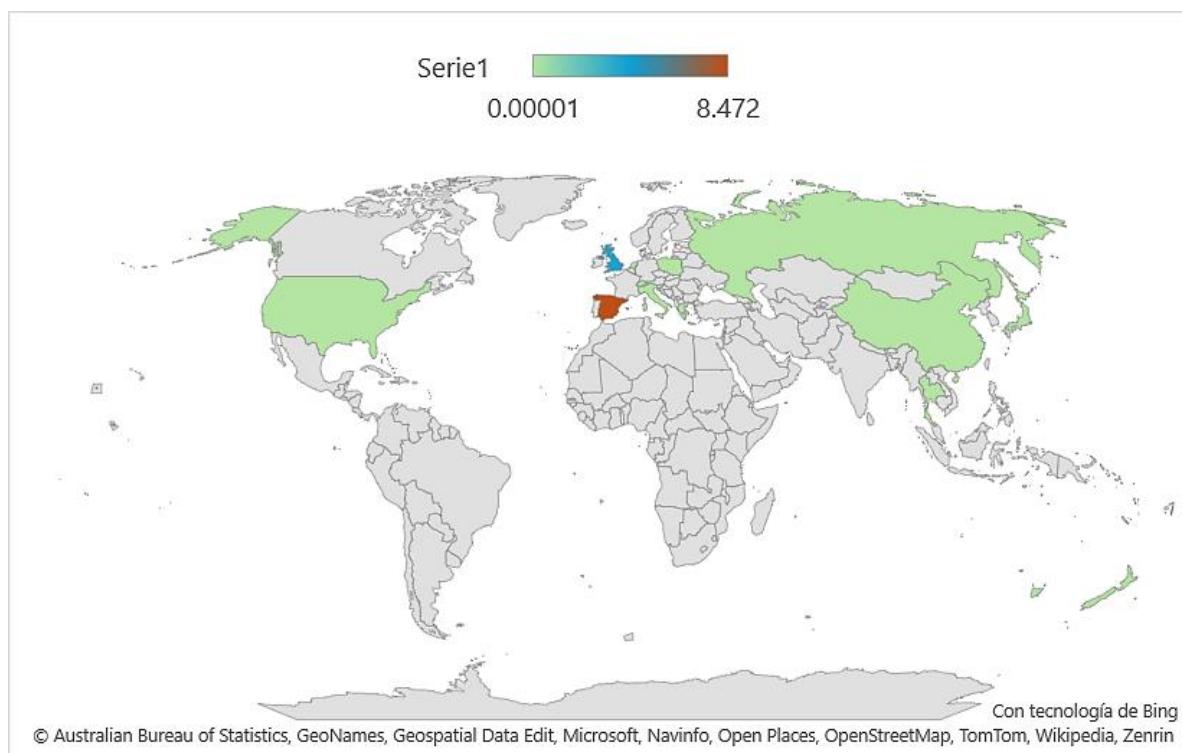
inyección de gonadotropina coriónica humana por lo que las limitaciones por el periodo de reproducción natural pueden superarse fácilmente. Además, es posible manipular fácilmente los ovocitos antes del proceso de fecundación debido a su tamaño y a que la fecundación y el desarrollo embrionario tienen lugar fuera del cuerpo de la madre, así se puede observar y manipular el proceso en todas sus fases, por otro lado, tiene un desarrollo temprano muy rápido, lo que permite estudiar el progreso del desarrollo, hasta la fase de renacuajo (Carotenuto et al., 2023).

Algunos estudios realizados han demostrado que los embriones de *Xenopus* son sensibles a los compuestos ambientales por lo que el ensayo FETAX se emplea en laboratorios de ecotoxicología y toxicología reproductiva, con la finalidad investigar la mortalidad, las malformaciones y las modificaciones de los mecanismos moleculares en respuesta a distintos factores ambientales (Hoke and Ankley, 2005; Pérez et al., 2021).

El uso de este ensayo ha permitido descubrir que varios contaminantes ambientales químicos causan toxicidad en desarrollo de los embriones de *Xenopus*, por esta razón su uso en la investigación básica y aplicada dedicada a la evaluación de la seguridad del ecosistema y la salud sigue siendo muy extensa (Hoke y Ankley, 2005; Qin y Xu, 2006).

#### 4 ANTECEDENTES

Hasta ahora la mayoría de los estudios que se han centrado en la identificación de contaminantes emergentes en efluentes acuáticos han reportado la ocurrencia de productos de cuidado personal, como los filtros solares, en aguas superficiales en distintas zonas del mundo, teniendo como vinculo la cercanía de estas con las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), sin embargo, la concentración de filtros solares como la BP-3 ha sido considerablemente mayor en las aguas superficiales debido a que reciben derrames de aguas residuales urbanas (Negreira et al., 2009 Tarazona et al., 2010; Kameda et al., 2011; Tsui et al., 2014; Ramos et al., 2016; Cadena et al., 2022). La distribución espacial de BP-3 se presenta en la figura 4.



**Figura 4.** Distribución espacial de BP-3 detectada en distintas matrices acuáticas de todo el mundo, creación propia.

Como se puede observar los estudios que se han realizado han permitido identificar la presencia de este filtro en cuatro de los seis continentes del planeta, con una mayor concentración en Europa (Tarazona et al., 2010; Cadena et al., 2022). Los

datos sobre la ocurrencia de BP-3 en diferentes matrices acuáticas se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Ocurrencia de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona en el ambiente

<b>Referencias</b>	<b>País</b>	<b>Tipo de efluente</b>	<b>[ ] Reportada</b>
Giokas et al. (2004)	<b>Grecia</b>	Aguas residuales no tratadas	1.8- 10 ng/L
			Jörisse <2 ng/L
		Lagos	Zurich: 10-20 ng/L
Balmer et al. (2005)	<b>Suiza</b>		Greifensee: 20-30 ng/L
			Hüttnersee: 23-35 ng/L
		Aguas residuales no tratadas	0.7-7.8 µ/L
Giokas et al. (2005)	<b>Grecia</b>	Aguas residuales no tratadas	6.5-8.2 ng/L
		Río kolpa	114 ng/L
		Lago Rakidna	85 ng/L
Cuderman y Heath (2007)	<b>Eslovenia</b>	Lago Bohinj	32 ng/L
		Lago Sobec	58 ng/L
		Lago Bled	66 ng/L
		Alberca Portoroz	400 ng/L
Li et al. (2007)	<b>China</b>	Planta de tratamiento de aguas residuales	97-722 ng/L
Kasprzyk et al. (2008)	<b>Reino unido</b>	Río Taff	15-44 ng/L

		Río Ely	<15 ng/L
Rodil et al. (2008)	<b>España</b>	Río Mero	27 ng/L
		Aguas residuales tratadas	16 ng/L
		Aguas residuales no tratadas	31-168 ng/L
Kasprzyk et al. (2009)	<b>Reino unido</b>	Río Taff	15-44 µg/L
		Río Ely	<15 µg/L
		Aguas residuales no tratadas	Cilfynydd: <46-400 µg/L Coslech: <104-3945 µg/L
		Aguas residuales tratadas	Cilfynydd: 2-18 µg/L Coslech: <80-223µg/L
Negreira et al. (2009)	<b>España</b>	Aguas residuales tratadas	13-44 ng/L
		Aguas residuales no tratadas	216- 462 ng/L
		Agua de río	52 ng/L
Tarazona et al. (2010)	<b>España</b>	Agua superficial	1340-3300 ng/L
Leal et al. (2010)	<b>Leeuwarden, The Netherlands</b>	Aguas residuales no tratadas	2.9 µ/L
		Aguas residuales tratadas	0.2 µ/L
		Aguas grises	0.3- 4.9 µ/L
Kameda et al. (2011)	<b>Japón</b>	Lagos	16-41 ng/L
		Ríos	4-12 ng/L

		Aguas residuales no tratadas	29-164 ng/L
Liu et al. (2012)	<b>Australia</b>	Aguas residuales no tratadas	1027-2086 ng/L
		Aguas residuales tratadas	121-153 ng/L
Magi et al. (2013)	<b>Italia</b>	Aguas residuales no tratadas	6-163 ng/L
		Aguas residuales tratadas	5-28 ng/L
Paredes et al. (2014)	<b>España</b>	Playa Coira	68.6 ng/L
		Playa de Toralla	21.7 ng/L
Tsui et al. (2014)	<b>China</b>	Aguas superficiales	Hong Kong: 39-5429 ng/L Tokyo: 24- 86 ng/L New York: 23-178 ng/L Los Angeles: 227-601 ng/L Shantou: 55-188 ng/L Chaozhou: 37-49 ng/L Bangkok: 86-116 ng/L Ártico y Chukchi: 17-33 ng/L
Wu et al. (2017)	<b>China</b>	Aguas superficiales	10.3- 30 ng/L
Kapelewska et al. (2018)	<b>Polonia</b>	Lixiviado de vertedero	<13 µg/L
		Agua subterránea en pozo	0.4-1.2 µg/L

		Aguas residuales no tratadas	0.001-1.16 µg/L
		Aguas residuales tratadas	0.01-0.033 µg/L
Tsui et al. (2019)	<b>China</b>	Agua superficial de zona costera del mar de china	2.2-36.65 ng/L
Emnet et al. (2020)	<b>Nueva Zelanda</b>	Plantas de tratamiento de aguas residuales	Lyttelton: 11-164.8 ng/L Governors: 22.8-89.3 ng/L Diamond: 22.8-207.3 ng/L
Cadena et al. (2022)	<b>España</b>	Aguas residuales tratadas	187-890 µg/L*1000 habitantes
		Aguas residuales no tratadas	2189-8472 µg/L*1000 habitantes

Los efectos tóxicos reportados por exposición a BP-3 en diversas especies acuáticas son mostrados en la tabla 4, en la cual se observa que algunas de las consecuencias por exposición a BP-3 en organismos acuáticos son las alteraciones endocrinas, bioacumulación, disminución en la expresión de genes y blanqueamiento de arrecifes de coral (Coronado et al., 2008; Fent et al., 2008; Paredes et al., 2014; Lee et al., 2020).

La mayoría de los estudios de evaluación de toxicidad por contaminantes emergentes (CE), como los productos de cuidado personal, se han centrado en organismos acuáticos como peces, algas, moluscos, crustáceos y equinodermos (Sieratowicz et al., 2011; Blüthgen et al., 2012; Kim et al., 2014; He, Tsui, et al., 2019), por lo que en la presente investigación se hace uso del ensayo FETAX con la finalidad de evaluar la toxicidad de BP-3 a concentraciones ambientales en embriones de *Xenopus laevis* (Hoke y Ankley, 2005; Qin y Xu, 2006).

**Tabla 4.** Efectos tóxicos reportados de la benzofenona-3 en diversas especies acuáticas

Referencias	Especie	[ ] usada	Observación
Coronado et al. (2008)	<i>Oryzias latipes</i>	10-1000 µg/L	620 µg/L:  La expresión de vitelogenina hepática en los machos fue inducida significativamente después de 21 días.
			Reducción significativa del número de huevos/hembra/día después de 1 semana, la fecundidad volvió a los valores de control a las 3 semanas.
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	10-1000 µg/L	Reducción significativa de huevos fecundados erosionados a los 21 días.  749 µg/L: Inducción significativa en plasma de vitelogenina a los 14 días de exposición.
Fent et al. (2010)	<i>Daphnia magna</i>	625-10,000 µg/L	CL <sub>50</sub> : 1.9 mg/L inmovilización aguda.
Sieratowicz et al. (2011)	<i>Daphnia magna</i>	0.005-10 mg/L	CL <sub>50</sub> : 1.67 mg/L Inmovilización aguda  La prueba de reproducción se realizó de 0.005-0.5 mg/L y no se observaron efectos.
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	0.06-1.0 mg/L	IC <sub>50</sub> : 0.96 mg/L En el intervalo de mediciones no se observó una inhibición completa del crecimiento
Blüthgen et al. (2012)	<i>Danio rerio</i>		84 µg/L: Bioacumulación tras 14 días de exposición.

		10-600 µg/L	<p>En el cerebro hubo regulación a la baja de los genes <i>esr1</i>, <i>ar</i> y <i>cyp19b</i>.</p> <p>312 µg/L: Los transcritos de <i>cyp1a1</i> fueron inducidos en el cerebro.</p> <p>2.4 µg/L: En los testículos hubo inducción transitoria de <i>cyp19a</i>.</p> <p>En los testículos hubo una regulación a la baja general de los transcritos <i>hsd3b</i>, <i>hsd17b3</i>, <i>hsd11b2</i> y <i>cyp11b2</i>, lo que sugiere una actividad anti androgénica, significativa a 84 µg/L sólo para el transcrito <i>hsd17b3</i>.</p>
Li (2012)	<i>Dugesia japonica</i>	0.1-10 mg/L	CL <sub>50</sub> : 0.9 mg/L a las 48 h.
Paredes et al. (2014)	<i>Isochrysis galbana</i>		CE <sub>50</sub> : 13.87 µg/L Inmovilización aguda LOEC: 300 µg/L
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	3.5-30000 µ/L	CE <sub>50</sub> : 3472.59 µg/L LOEC: 300 µg/L
	<i>Paracentrotus lividus</i>		CE <sub>50</sub> : 3280 µg/L LOEC 3840 µg/L
	<i>Siriella armata</i>		CE <sub>50</sub> 710.76 µg/L LOEC: 500 µg/L

Kim et al. (2014)	<i>Oryzias latipes</i>	15-500 µg/L	<p>90 µg/L: Incremento de transcripción de genes <i>vtg1</i> y <i>vtg2</i> en el hígado en los peces macho. Se observó una regulación a la baja significativa de los genes <i>star</i> y <i>cyp19a</i> en el ovario. La transcripción del gen <i>hsd17b3</i> fue significativamente regulada a la baja a <math>\geq 26</math> g/L en las hembras. Disminución significativa de <i>cyp11a</i>, <i>cyp17</i> y <i>hsd3b</i> en los testículos</p> <p>26 µg/L: El número de huevos producidos por hembra durante los días 22-28 fue menor.</p>
Kinnberg et al. (2015)	<i>Danio rerio</i>	100-500 µg/L	<p>-LOEC Hembras: 388 µg/L</p> <p>-LOEC Machos: 470 µg/L</p> <p>Afección en la maduración de las gónadas</p> <p>268 µg/L: aumento de la concentración de vitelogenina en machos adultos.</p>
He, Tsui, et al. (2019)	<i>Seriatopora caliendrum</i>	0.1-1000 µg/L	<p>1000 µg/L: muerte (5%) de <i>S. caliendrum</i> el día 6 y blanqueamiento producido el 4 día de exposición</p>
Lee et al. (2020)	<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.1-3.0 mg/L	<p>3 mg/L: inhibición del crecimiento (23%), disminución del total de clorofila (10.4%). Inhibición en la expresión</p>

			<p>del gen <i>Lhcb1</i> (42%), este gen se correlaciona con las mediciones de clorofila total. Inhibición del gen <i>HydA</i> (74 %), se relaciona con una alteración de la actividad fotosintética.</p> <p>La expresión del gen <i>ATPFOC</i> aumentó un 21 % a 0.1 mg/L y disminuyó un 38 % a 3 mg/L.</p> <p>CE<sub>50</sub>: 3.64 mg/L (calculada)</p>
Cahova et al. (2021)	<i>Danio rerio</i>	0.1-2000 µg/L	<p>2000 µg/L: retraso significativo (p&lt;0.01) en la eclosión.</p> <p>Sin observaciones significativas de mortalidad y malformaciones.</p>
Sun et al. (2023)	<i>Danio rerio</i>	10 µg/L	<p>A las 24 horas aumento el movimiento espontaneo de embriones ya las 30 horas reduce la respuesta al tacto</p> <p>Efectos neurotóxicos en embriones: disminución de la longitud relativa de los axones sólo en las larvas Hb9 (transgénicas) a las 30 horas.</p>

## 5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años se ha observado un mayor interés de las personas por su cuidado personal, por lo que la industria ha tenido que lograr grandes avances y buscar alternativas que cumplan las expectativas del consumidor, sin embargo, esto ha traído graves consecuencias ambientales, una de ellas es la contaminación del agua ya que esta puede proceder del sector social (descargas domésticas y públicas), agropecuario e industrial. El incremento en la producción de artículos de cuidado personal eleva su presencia en el agua residual, algunos de estos suelen ser desechos químicos que no pueden ser eliminados fácilmente, como es el caso de los filtros solares que se acumulan en cuerpos de agua o sedimentos entrando en contacto así con organismos acuáticos, poniendo en riesgo el equilibrio ecológico. Para determinar el daño potencial inducido por la exposición a diversos productos se recurre al uso de biomarcadores, dicho daño va a depender de la cuantificación de los efectos toxicológicos inducidos por el compuesto en organismos. Por ello, en el presente trabajo tuvo por objetivo determinar la teratogénesis y embriotoxicidad inducida por un filtro solar altamente consumido, 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, en el bioindicador *Xenopus laevis*, utilizando la metodología establecida en el ensayo FETAX (por sus siglas en inglés: Frog Embryo Teratogenesis Assay- *Xenopus*). Se expusieron durante 96 horas a diferentes concentraciones traza del filtro solar 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona a embriones de *Xenopus laevis*, posteriormente se determinó la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), concentración efectiva 50 de malformaciones (CE<sub>50</sub>), índice teratogénico (IT), concentración mínima para inhibir el crecimiento (CMIC) y la principales malformaciones inducidas por el filtro solar, dichos parámetros nos ayudaron a evaluar la toxicidad en el desarrollo producida por exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de este el filtro solar.

## **6 JUSTIFICACIÓN**

La calidad del agua es primordial para la vida humana, por lo que se requiere garantizar su disponibilidad y que sea apta para su consumo, aunado a esto se debe considerar cubrir las necesidades actuales sin comprometer las necesidades futuras, sin embargo, la protección medio ambiental se ve cada vez más afectada por lo que cada día se convierte en un reto para población actual.

Debido a los crecientes niveles de contaminación ambiental se han identificado potenciales contaminantes emergentes que requieren la atención científica ya que de su mayoría se desconoce el impacto que su presencia tiene en el ecosistema.

Al tratarse de compuestos poco regulados con métodos de análisis limitados y considerando que en México no ha habido un gran enfoque en el daño ambiental que los contaminantes emergentes producen, es importante evaluar el impacto ecológico de estos desechos. Algunos de los contaminantes emergentes que requieren una mayor atención son los productos de cuidado personal debido a que se presentan como contaminantes bioacumulables, un ejemplo de estos son los productos de protección solar los cuales tienen como finalidad la protección de la piel ante los efectos nocivos del sol para lo que requieren ingredientes como los filtros solares que cuentan con propiedades de reflejar, absorber o dispersar los rayos solares, así se tiene un menor riesgo ante la exposición a los rayos del sol, siendo así, su demanda en los últimos años ha incrementado en el mercado por su capacidad de protección ante la radiación solar, sin embargo, algunos de ellos no son biodegradables o las plantas de tratamiento de aguas residuales no son capaces de filtrarlos correctamente, lo que provoca que estos se diseminen en el ambiente y se acumulen en el suelo, aguas continentales, océanos, lagos y en múltiples organismos como algas, corales, peces, mamíferos y aves terrestres.

La benzofenona-3 es un compuesto orgánico utilizado en productos de protección solar debido a su capacidad de absorción de la luz UV-AI, además de los productos cosméticos y de cuidado personal, también se utiliza en productos de revestimiento, masillas, emplastos, plastilina y pinturas. Sin embargo, su liberación en el ambiente puede suceder a partir de su uso en interiores (detergentes de

lavado, productos para el cuidado del automóvil, pinturas y ambientadores) y de su uso en exteriores como coadyuvante tecnológico.

La 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona se ha detectado en el ambiente en diferentes matrices acuáticas en concentraciones desde 0.2 ng/L hasta 8.472 mg/L lo que ha provocado que distintas especies acuáticas presenten efectos tóxicos por exposición involuntaria al filtro solar BP-3, a pesar de los resultados que estudios anteriores han obtenido, hay pocos estudios toxicológicos de este compuesto, y estos se enfocan en peces, dejando de lado el grupo de los anfibios que es un grupo de gran relevancia ecológica. Es por lo que este trabajo tuvo por objetivo evaluar la toxicidad inducida por el filtro solar 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-3) en embriones de *Xenopus laevis* para ampliar el conocimiento sobre los efectos biológicos producidos por contaminantes en matrices acuáticas.

## **7 HIPÓTESIS**

La exposición a concentraciones traza del filtro solar 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona inducirá embriotoxicidad y teratogénesis en los embriones de *Xenopus laevis*.

## **8 OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICO**

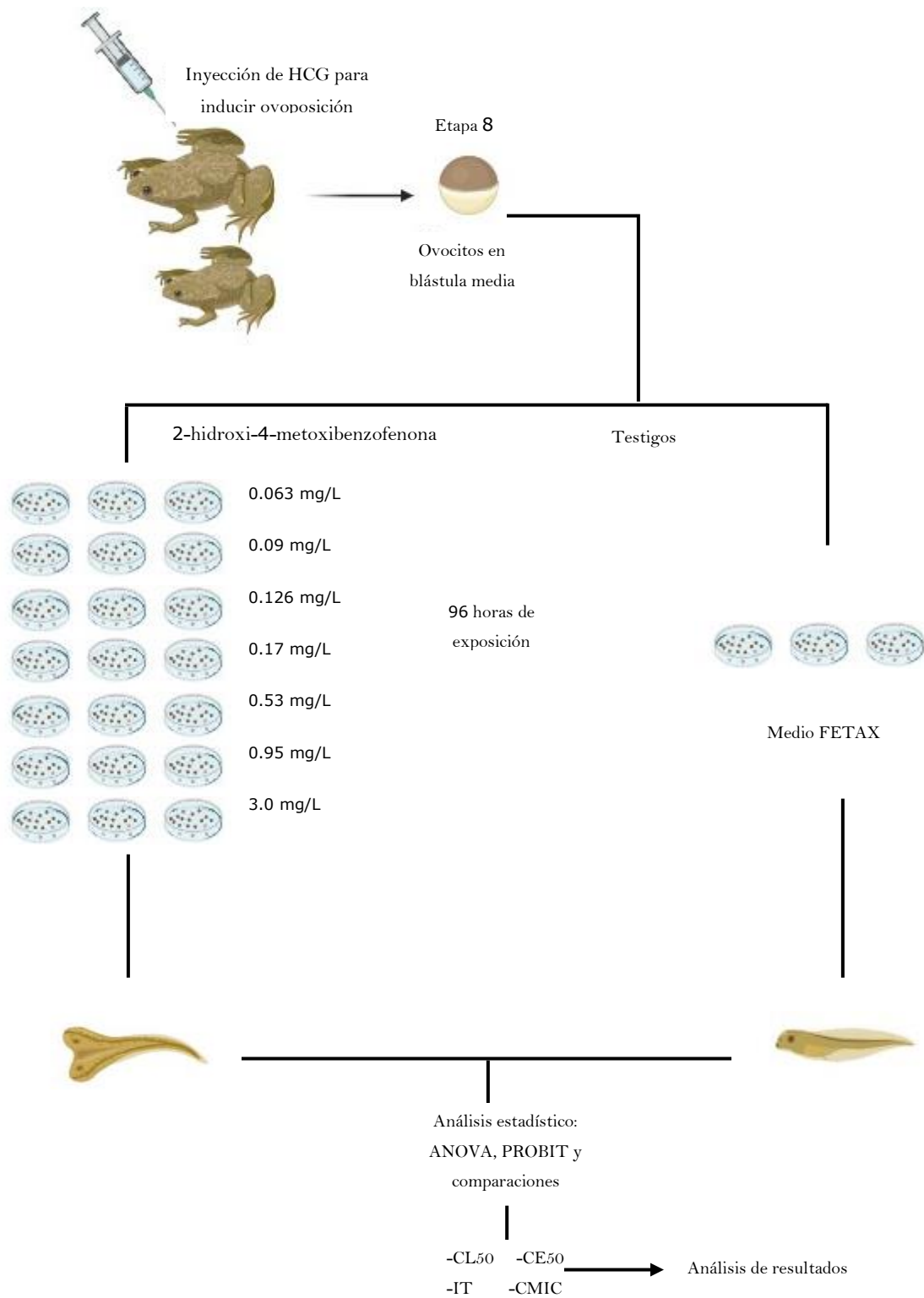
### **8.1 Objetivo general**

Evaluar la toxicidad inducida por el filtro solar 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona en embriones de *Xenopus laevis* utilizando el ensayo FETAX.

### **8.2 Objetivos específicos**

- Determinar la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), concentración efectiva 50 de malformaciones (CE<sub>50</sub>) y el índice teratogénico (IT) en larvas de *Xenopus laevis* expuestas a 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona.
- Identificar las malformaciones generales inducidas por el filtro solar 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona en larvas *Xenopus laevis*.
- Determinar la concentración mínima de 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona para inhibir el crecimiento (CMIC) de las larvas de *Xenopus laevis*.

## 9 DISEÑO DEL EXPERIMENTO



## **10 METODOLOGÍA**

### **10.1 Mantenimiento y alimentación de *Xenopus laevis***

Los organismos de ensayo utilizados fueron adultos de *Xenopus laevis*, el macho cuenta con 2 años de edad, mientras que la hembra tiene 3 años, ambos se mantuvieron en peceras con paredes opacas de 60 L a un 80% de su capacidad, a una temperatura de  $21 \pm 3$  °C, cada acuario se mantuvo con bombas y filtros de fibra de vidrio con la finalidad de oxigenar el agua suministrados con agua natural. El agua de los acuarios se renovaba cada dos días. En todos los acuarios se midió mensualmente el pH (7.5), carbón orgánico total (4 mg/L), cadmio (4 µg/L), alcalinidad y dureza mediante la determinación de CaCO<sub>3</sub> (entre los 16 y 400 mg/L) plomo (2 µg/L), mercurio (0.83 µg/L), níquel (12 µg/L), selenio (97 µg/L) y zinc (29 µg/L). Los organismos se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h, hembras y machos fueron separados y se alimentaron 3 veces por semana con un alimento comercial a base de espirulina y con *Chirostoma sp.* de  $0.05 \pm 0.03$  cm de longitud.

### **10.2 Ensayo FETAX**

El estudio se realizó de acuerdo con los procedimientos para la evaluación de la teratogénesis de la guía estándar de la American Society for Testing Materials (2019) (ASTM E 149-12).

Para realizar las pruebas de embriotoxicidad y teratogénesis, los embriones se obtuvieron a partir del apareamiento inducido, al macho y a la hembra se les administró una dosis de 350 UI y 700 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, disuelta en solución 0.9% de NaCl estéril), respectivamente, mediante una inyección en el saco linfático dorsal, utilizando jeringas de 1 mL equipadas con agujas largas de calibre 26.

Para la recogida de ovocitos, las ranas fueron transferidas a acuarios más pequeños con paredes opacas un día antes de iniciar el experimento en una relación de 1 hembra: 1 macho, se dejó a la pareja aparearse, los ovocitos se recogieron a la mañana siguiente con ayuda de pipetas Pasteur estériles, colocándolas en cajas Petri. Los ovocitos viables fueron seleccionados con la ayuda de un estereoscopio

Stemi 305 Zeiss, para inspeccionar la fertilidad y calidad de estos, seleccionando a los que se encontraban en etapa de blástula media (etapa 8).

Se realizó la preparación del medio FETAX disolviendo 625 mg de NaCl, 96 mg de NaHCO<sub>3</sub>, 30 mg de KCl, 15 mg de CaCl<sub>2</sub>, 60 mg CaSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O y 75 mg de MgSO<sub>4</sub> por litro de agua destilada o ionizada.

Para las soluciones de prueba de BP-3 se preparó una solución madre de 1.5 mg de BP-3 en 1.0 mL de DMSO y se aforó a 1 L con agua desionizada. La concentración final de DMSO en las soluciones de exposición fue del 0.001% (v/v). Todos los reactivos utilizados eran de grado analítico.

Para los grupos expuestos consistieron siete concentraciones de BP-3 (0.063, 0.09, 0.126, 0.17, 0.53, 0.95 y 3.0 mg/L), y un grupo testigo expuesto únicamente al medio FETAX. Para las pruebas se colocaron 8 mL de cada concentración a evaluar de BP-3 o medio, en cajas Petri de 50 mm previamente identificadas. Con ayuda de pipetas Pasteur estériles se recogieron los ovocitos que tenían una forma esférica regular y una división celular homogénea mediante la observación de cada uno en el estereoscopio Zeiss Stemi 305. Posteriormente se colocaron 25 ovocitos en etapa de blástula media en cada caja Petri con las diferentes concentraciones para los grupos expuestos y testigo, cada concentración se realizó por triplicado. Las placas se colocaron en una incubadora a  $22 \pm 1$  °C durante 4 días, con ciclos de luz/oscuridad natural. Para detectar alteraciones en el desarrollo embrionario y/o la muerte de los embriones debido a la exposición a BP-3, las observaciones se realizaron a las 12, 24, 48, 72 y 96 h para cada placa y se reportaron los valores en una hoja de parámetros de desarrollo, una vez cumplidas las 96 horas se realizó la eutanasia a las larvas y se examinó cada una en el microscopio estereoscópico con Zen Blue Zeiss software para identificar malformaciones en el desarrollo, apoyándose del Atlas de anomalías (Bantle y Sabourin, 1991). Después de haber realizado todas las observaciones se eliminaron las larvas de acuerdo con las normas internas relativas a las muestras, y con los datos obtenidos se realizó una regresión lineal de máxima verosimilitud para calcular la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y la concentración efectiva de malformación (CE<sub>50</sub>) con sus intervalos de

confianza del 95% ( $P > 0.05$ ), con estos datos se calculó el índice teratogénico (IT) utilizando la relación CL50/CE50.

### **10.2.1 Evaluación del desarrollo embrionario**

De acuerdo con la morfología visible de los embriones expuestos, se llevó a cabo la evaluación de las anomalías estructurales y el retraso en el desarrollo de los embriones expuestos a BP-3 mediante la comparación con un embrión de referencia, según Zahn et al., 2022. Los factores evaluados fueron: el desarrollo del intestino, desarrollo cardiaco, desarrollo abdominal, desarrollo cefálico, desarrollo de la cola, desarrollo de la notocorda, desarrollo facial, desarrollo ocular, desarrollo del cerebro, pigmentación ocular y desarrollo del ano. Cada anomalía fue clasificada y registrada en una hoja de cálculo de acuerdo con la concentración en la que fue observada.

### **10.2.2 Análisis estadístico**

Cada larva se midió de la cabeza a la cola para determinar las diferencias de crecimiento, y los valores medios se compararon mediante análisis unidireccional (ANOVA) y comparaciones múltiples de Fisher ( $P > 0.05$ ).

En el ensayo FETAX, la toxicidad aguda se evaluó determinando la CL<sub>50</sub> y la CE<sub>50</sub> a las 96 horas y su respectivo límite de confianza (C.L.) al 95% mediante análisis PROBIT (STATPLUS V. 8.0). Para determinar las diferencias en el número de embriones muertos/malformados y en el crecimiento, se midió cada larva de la cabeza a la cola, y se compararon los valores medios mediante un análisis unidireccional (ANOVA) seguida de una prueba post-hoc mediante comparaciones múltiples de Fisher ( $P > 0.05$ ).

## 11 RESULTADOS

En el ensayo FETAX, durante la exposición a las diferentes concentraciones de BP-3 (0.063, 0.09, 0.126, 0.17, 0.53, 0.95 y 3.0 mg/L) la mortalidad en la concentración de 3.0 mg/L fue del 52%, la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) fue de 2.42046 mg/L (IC 95%:1.428-5.723 mg/L), después se calculó que la concentración efectiva media de malformaciones (CE<sub>50</sub>) la cual fue de 0.01684 mg/L (IC 95%: 8.12x<sup>-09</sup>-0.00518 mg/L).

**Tabla 5.** Datos de supervivencia, mortalidad y malformaciones en larvas de *Xenopus laevis* expuesta benzofenona-3

Concentración de BP-3 (mg/L)	% de supervivencia	% mortalidad	% malformados
0 (control)	100	0	0
0.063	84	16	83.33
0.09	92	8	65.21
0.126	78	22	89.74
0.17	81.33	18.66	93.44
0.53	68	32	96.07
0.95	61.33	38.66	97.82
3	48	52	100
CL <sub>50</sub> : 2.42046		CE <sub>50</sub> : 0.01684	
IC (1.428-5.723)		IC (8.12x <sup>-09</sup> -0.00518)	
IT: 143.733			

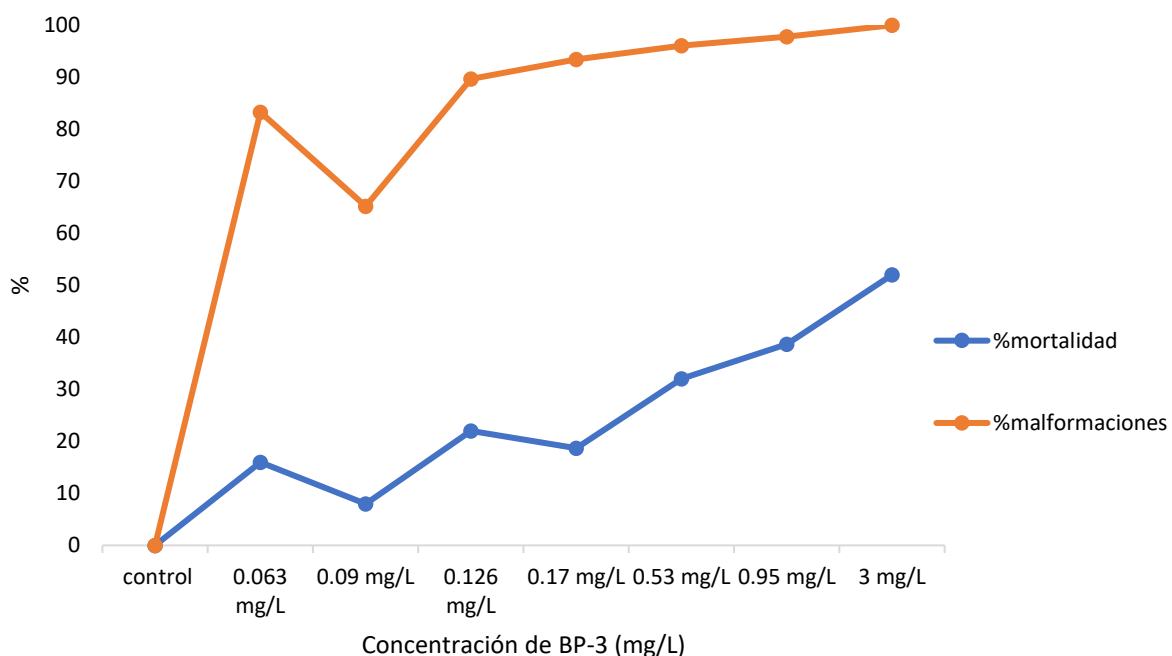
IC: intervalo de confianza IT: Índice teratogénico

En la tabla 5 se resume la teratogenicidad debida a la exposición de concentraciones ambientales relevantes de BP-3. El índice teratogénico se determinó haciendo uso de la relación entre la concentración letal media CL<sub>50</sub> y la concentración efectiva media para malformaciones CE<sub>50</sub>.

$$IT = \frac{CL50}{CE50}$$

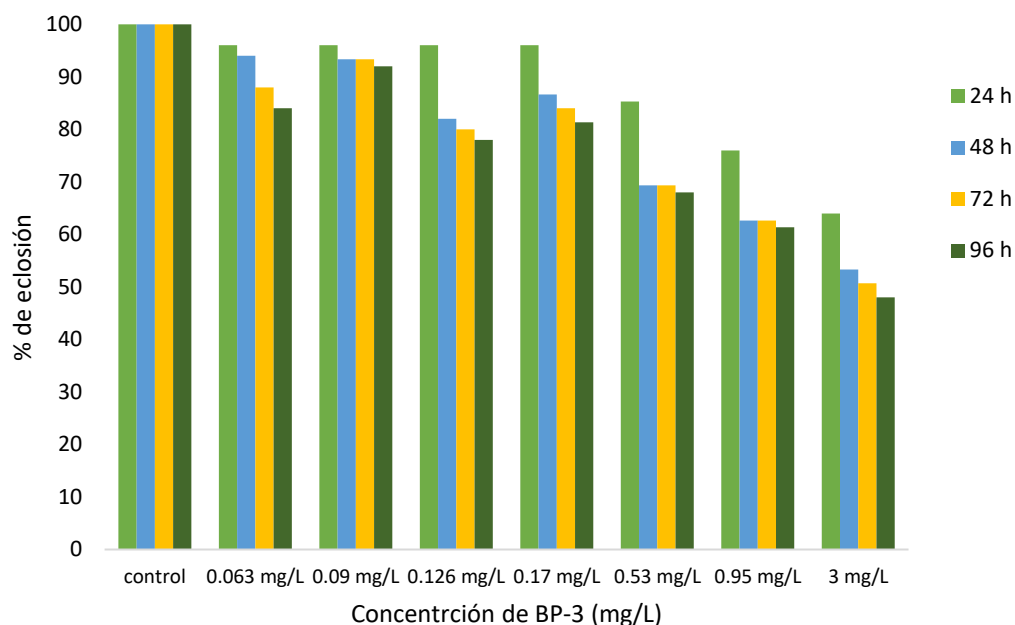
Para la toxicidad producida durante el desarrollo y la evaluación embrionaria se evaluó la toxicidad de la BP-3 a las 96 horas después de la fecundación de las larvas de *Xenopus laevis* a diferentes concentraciones ambientales relevantes. En el grupo control no se observaron malformaciones, todos los embriones se desarrollaron de forma normal al final de las 96 horas, sin embargo, en el caso de las larvas expuestas a las diferentes concentraciones de BP-3 probadas se observó

que la frecuencia y la gravedad de las malformaciones fueron en aumento con el incremento de la concentración de BP-3 en comparación con las larvas del grupo control (Figura 5).



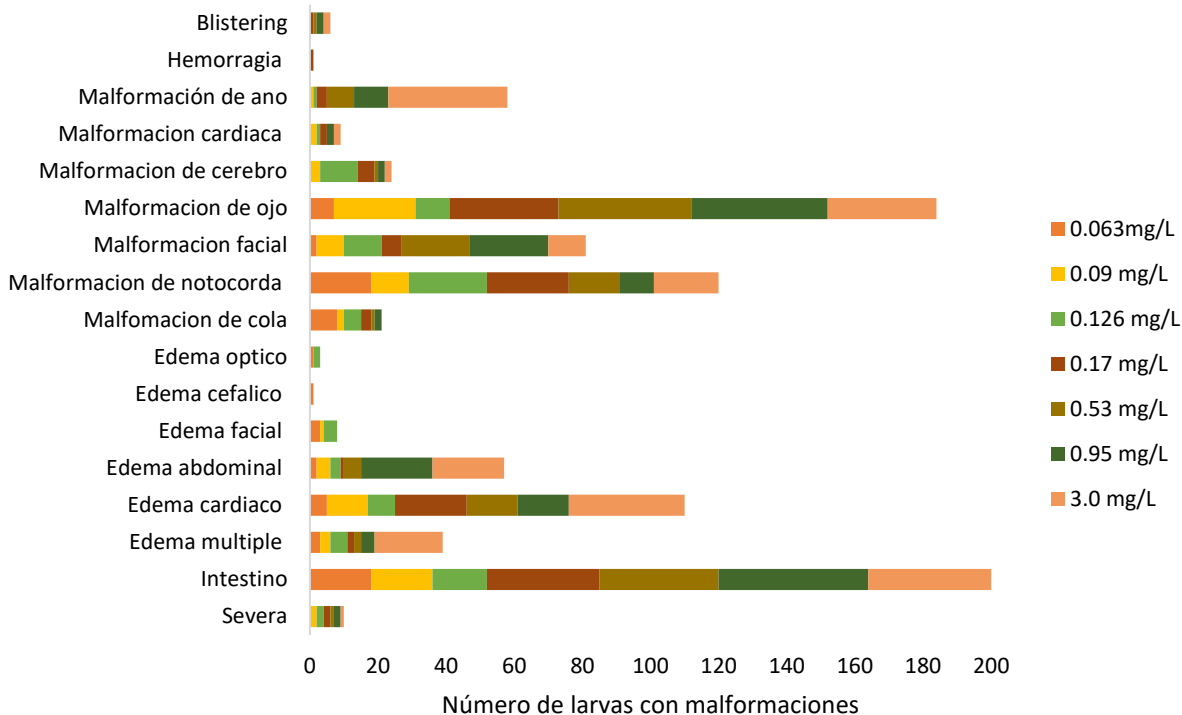
**Figura 5.** Tasas de mortalidad y malformaciones en larvas de *Xenopus laevis* expuestas a BP-3.

La tasa de eclosión de los embriones redujo significativamente en un patrón dependiente a la concentración en comparación del grupo control. La tasa de mortalidad de las larvas de *Xenopus laevis* aumentó significativamente cuando se expusieron a 0.53, 0.95 y 3.0 mg/L de BP-3 a las 96 horas de exposición. Además, el BP-3 indujo anomalías morfológicas durante el desarrollo embrionario, incluyendo retraso en el desarrollo, rotura de la copa óptica, hipopigmentación ocular, hemorragia intestinal, modificación en la estructura de la notocorda, malformación severa, fracaso total de desarrollo facial y ocular. Las tasas de malformación se observaron con un aumento dependiente de la concentración, teniendo la concentración más alta el valor máximo a las 96 h de exposición (Figura 5, 6 y 7).



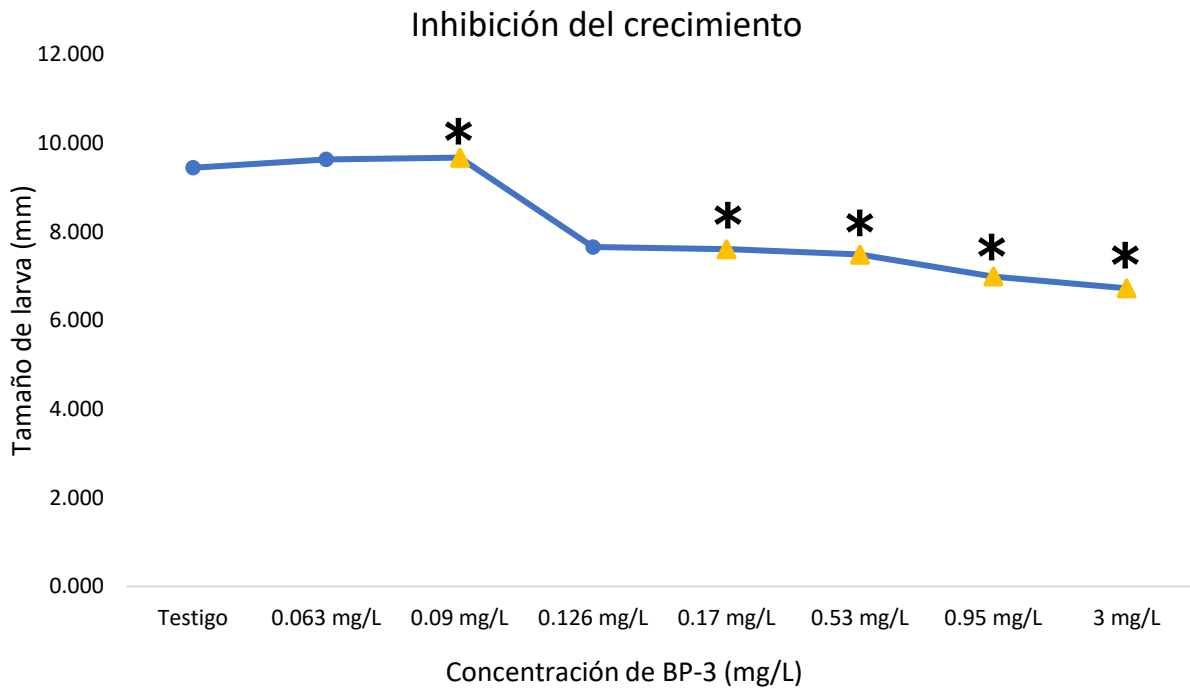
**Figura 6.** Curva tiempo-% de respuesta de la eclosión de embriones de *Xenopus laevis* expuestos a BP-3.

Las principales malformaciones observadas (Figura 7) fueron: intestino mal enrollado, malformación en el ojo, malformaciones axiales (cola doblada y notocorda), edema cardiaco, malformación facial, malformación del ano, edema abdominal, edema múltiple, malformación del cerebro, malformación cardiaca, edema facial, blistering, edema óptico, hemorragia y edema cefálico.



**Figura 7.** Frecuencia de las principales malformaciones inducidas por la exposición de embriones de *Xenopus laevis* a diferentes concentraciones de BP-3.



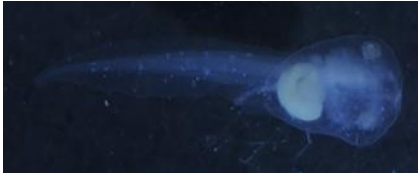









Las medidas de la cabeza a la cola de las larvas se muestran en la Figura 8. Las larvas expuestas a 0.17, 0.53, 0.95 y 3.0 mg/L de BP-3 mostraron una diferencia de tamaño significativa con respecto al grupo de control. La Concentración Mínima de BP-3 para Inhibir el Crecimiento (CMIC) de las larvas de *Xenopus laevis* fue de 0.09 mg/L, obtenida mediante la prueba de comparaciones múltiples de Fisher con un límite de confianza ( $P > 0.05$ )

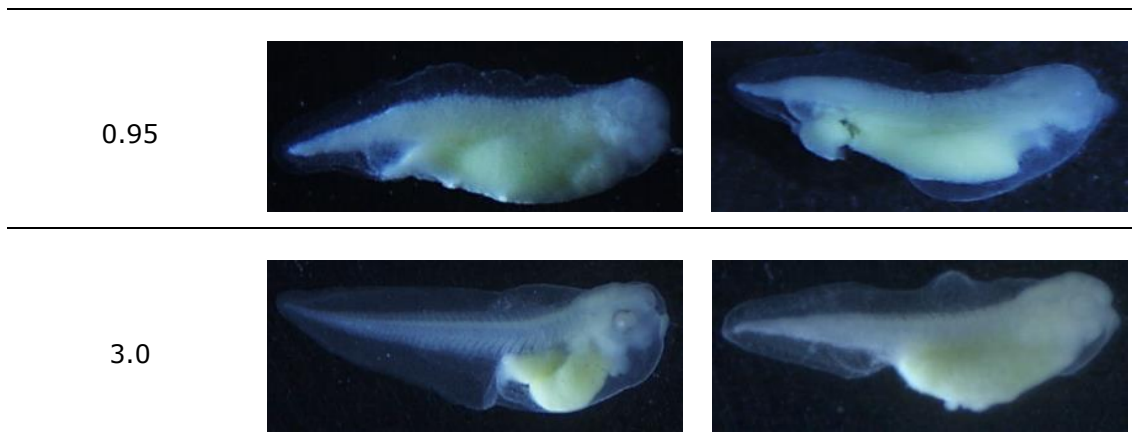


**Figura 8.** Medida de la cabeza a la cola de larvas de *Xenopus laevis* expuestas al control y a BP-3. \* significa diferencia significativa con respecto al grupo testigo ( $P > 0.05$ ).

En la tabla 6 se observan las malformaciones severas producidas en larvas de *Xenopus laevis* tras 96 horas de exposición de BP-3. El grupo control mostró un desarrollo normal hasta las 96 de exposición. Se presentan imágenes microscópicas de malformaciones más representativas en embriones expuestos a 7 diferentes concentraciones ambientalmente relevantes de BP-3, incluyendo malformación de la notocorda, malformación facial, falta de enrollamiento del intestino, blistering, rotura de la copa óptica, malformación del ano, hipopigmentación ocular, edemas cardiaco y abdominal.

**Tabla 6.** Malformaciones más representativas en larvas de *Xenopus laevis* expuestos a concentraciones ambientales relevantes de BP-3 a las 96 horas de exposición.

Concentración de BP-3 (mg/L)	96 horas	
0 (control)		
0.063		
0.09		
0.126		
0.17		
0.53		



La malformación en el intestino fue mayor en el grupo expuesto a 3.0 mg/L (100% de malformaciones) de BP-3, seguido del grupo expuesto a 0.95 mg/L (95.65% de malformaciones).

El retraso en el desarrollo que se observó principalmente en la estructura de la notocorda, cola corta y en el enrollamiento del intestino, fue más frecuente en el grupo expuesto a 3.0 mg/L y en menor medida en el grupo expuesto a 0.063 mg/L.

## 12 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Continuamente los sistemas biológicos están involuntariamente expuestos a diversos contaminantes emergentes (CE), cuyos efectos pueden ser nocivos en el ecosistema, por lo que la mayor parte de la investigación en ecotoxicología y la regulación química se centran en la evaluación del peligro y riesgo por exposición de muchas sustancias que se encuentran en el ambiente debido a que estas en su mayoría son tóxicas y bioacumulables (Usma *et al.*, 2013). Entre los CE que se encuentran en los medios acuáticos están los productos de cuidado personal, en esta clasificación encontramos a los filtros solares y entre ellos a la benzofenona-3 (BP-3) un ingrediente activo que se encuentra en muchos productos de protección solar debido a su capacidad de absorción de la luz UV-AI. Debido a sus propiedades fisicoquímicas se ha comprobado que es difícil su eliminación en plantas de tratamiento de aguas residuales, por lo que tienden a bioacumularse en sedimentos o superficies acuáticas, asimismo también se ha mencionado en diversos estudios que la BP-3 puede actuar como un disruptor endocrino en diferentes especies acuáticas, lo que sugiere que posee un impacto ecológico relevante (Liu *et al.*, 2012; Chatzigianni *et al.*, 2022). Por esta razón, para este estudio se realizó una revisión de las concentraciones ambientales reportadas, y a partir de ellas, se seleccionaron las concentraciones utilizadas para evaluar la toxicidad inducida por exposición a BP-3 en embriones de *Xenopus laevis* utilizando el ensayo FETAX.

Los efectos tóxicos evaluados en este estudio fueron la mortalidad, presencia de malformaciones, inhibición del crecimiento y cálculo de índice teratogénico. En los resultados observamos que la exposición a BP-3 disminuye la tasa de eclosión, mientras que aumentaban las tasas de mortalidad y malformaciones durante el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*, es decir, durante 96 horas de exposición (Figura 6). Además, se observó que tanto la disminución de la tasa de eclosión como el incremento de la mortalidad y malformaciones durante el desarrollo embrionario son dependientes de la concentración y el tiempo de exposición (Figura 5 y 6). Se ha demostrado que para evaluar la toxicidad inducida por la exposición a tóxicos ambientales pueden utilizarse como indicadores los cambios en la

eclosión, las malformaciones y la mortalidad durante el desarrollo embrionario (Hoke y Ankley, 2005; Qin y Xu, 2006; Coronado et al., 2008; Fent et al., 2010; Fort and Mathis, 2018; Pérez et al., 2021). En este trabajo obtuvimos un valor de  $CL_{50}$  a las 96 horas de exposición a BP-3 de 2.42046 mg/L y  $CE_{50}$  de malformaciones de 0.01684 mg/L (Tabla 5). Otros estudios realizados en distintas especies acuáticas en los que se evaluó la toxicidad aguda por exposición a BP-3 mostraron una  $CL_{50}$  de 1.67 mg/L (Sieratowicz et al., 2011) y 1.9 mg/L (Fent et al., 2010) para neonatos de *Daphnia magna*. Por otra parte, Li (2012) reporta una  $CL_{50}$  de 0.9 mg en *Dugesia japonica*, y, He, Tsui, et al. (2019) reportan una muerte del 5% de *Seriatorpora caliendrum* expuestos a una concentración de 1000  $\mu\text{g/L}$ ; mientras que Cahova et al. (2021) reportan que no observaron diferencias significativas en la mortalidad y malformaciones a una concentración de 0.1 a 2000  $\mu\text{g/L}$  en *Danio rerio*. Aunado a lo anterior, Paredes et al. (2014), reportaron que al exponer a larvas de *Paracentrotus lividus* a BP-3 obtuvieron una  $CE_{50}$  de 3280  $\mu\text{g/L}$ , una  $CE_{50}$  de 13.87  $\mu\text{g/L}$  en *Isochrysis galbana*,  $CE_{50}$  de 3472.59  $\mu\text{g/L}$  en *Mytilus galloprovincialis*, y una  $CE_{50}$  de 710.76  $\mu\text{g/L}$  en *Siriella armata*; mientras que Lee et al. (2020) obtuvo una  $CE_{50}$  calculada de 3.64 mg/L en *Scenedesmus obliquus*. Como puede observarse, los valores reportados de  $CL_{50}$  y  $CE_{50}$  en diferentes especies son variados, sin embargo, concuerdan en que la mayoría se encuentra en el intervalo de los mg/L, lo cual podría parecer concentraciones altas para el ambiente, pero, las concentraciones de BP-3 que fueron necesarias para inducir el 50% de muertes (2.42046 mg/L) y el 50% de malformaciones (0.01684 mg/L) en las larvas de *X. laevis* en este estudio, y algunos de los referenciados, son menores a las concentraciones ambientales encontradas en estudios realizados en afluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales de Coslech, en Gales en donde reportan una concentración de 3.945 mg/L; y, en aguas residuales no tratadas en España donde encontraron una concentración de 8472 mg/L (Kasprzyk et al., 2009; Cadena et al., 2022).

En los resultados observados en este estudio también se encontró un retraso en el desarrollo y distintas anomalías en las larvas dependiendo la concentración de exposición (Figura 7 y Tabla 6). Esto indica que las concentraciones de BP-3

encontradas en el ambiente pueden causar toxicidad en el desarrollo de embriones de *X. laevis*, lo que supone un riesgo tóxico ecológico potencial para los ecosistemas acuáticos.

En el presente estudio se realizó el cálculo del índice teratogénico (IT= 143.733) mediante la relación entre la CL<sub>50</sub> y CE<sub>50</sub> obtenidas, dicho cálculo muestra que la exposición a BP-3 es mayormente teratogénica para las larvas de *X. laevis* expuestas, ya que de acuerdo con lo establecido en la guía ASTM (2019) los valores de IT > 1.5 son sustancias con potencial teratogénico. Lo anterior fue confirmado mediante la identificación de las diferentes malformaciones observadas (intestino mal enrollado, malformación en el ojo, hipopigmentación ocular, malformaciones axiales incluyendo la cola doblada y notocorda, edema cardiaco, malformación facial, malformación del ano, edema abdominal, edema múltiple, malformación del cerebro, malformación cardiaca, edema facial, blistering, edema óptico, hemorragia y edema cefálico) durante las 96 horas de exposición, dichas malformaciones tuvieron un comportamiento dependiente de la concentración, es decir, mientras se incrementaba la concentración de BP-3 incrementaba la severidad de las malformaciones al igual que el grado de inhibición del crecimiento (Figuras 5, 7 y 8). Cahova *et al.* (2021) realizaron un estudio de embriotoxicidad en *Danio rerio* por exposición a BP-3 mediante un método modificado del Test de Toxicidad Aguda en Embriones de Peces (FET)-Directriz 236 de la OCDE, el cual determina la toxicidad de las sustancias químicas en las fases embrionarias de los peces, en dicho estudio se observó un retraso significativo ( $p < 0.01$ ) en la eclosión a una concentración de 2000 µg/L de BP-3, pero no se observó una mortalidad significativa ni malformaciones en el rango de exposición del filtro solar (0.1-2000 µg/L). Sin embargo, no se cuenta con más antecedentes de evaluación de la toxicidad inducida por exposición a BP-3 en los que se evalúe la CL<sub>50</sub>, CE<sub>50</sub> y se obtenga el IT en un mismo organismo acuático, por lo que no se puede realizar un contraste de los resultados obtenidos en este trabajo sobre otras especies.

Según Argemi *et al.* (2005), las benzofenonas se encuentran en la categoría 3 (sin datos), grupo III (nivel bajo de exposición o ausencia de datos) dentro de los compuestos industriales enlistados en el censo europeo de DE, por lo que la

toxicidad inducida por BP-3 puede deberse a su potencial como disruptor endocrino (DE). Por otra parte, se ha demostrado que el metabolismo de BP-3 en organismos acuáticos produce dos metabolitos principales, la Benzofenona-1 (BP-1) y la Benzofenona-8 (BP-8), ambos metabolitos han sido estudiados para evaluar su efecto tóxico en comparación con BP-3. En uno de sus estudios realizados, Blüthgen *et al.* (2012) expuso a adultos y embriones de pez cebra a 10-600 µg/L de BP-3 observando que la biotransformación a BP-1 está ausente en los embriones de eleuthero, pero sí se lleva a cabo en los adultos de pez cebra, sin embargo, no obtuvo diferencias significativas en el efecto estrogénico. Así mismo, Wang *et al.* (2023) realizaron un estudio de comparación de la toxicidad para el desarrollo de BP-3 y BP-8 en embriones de pez cebra, sus resultados demostraron que BP-8 tiene una mayor bioacumulación, además de producir una menor tasa de eclosión, anomalías en el comportamiento y alteraciones en la vía de señalización, en el metabolismo de cofactores y vitaminas mediante el cambio metabólico a riboflavinas y biosíntesis de folato, en cambio la BP-3 alteró la vía de interacción ligando-receptor neuroactivo al igual que la vía metabólica por vía pantotenato y biosíntesis de Co-A el cual es el precedente para la síntesis de ácidos grasos y esteroides, estos resultados pueden relacionarse con los obtenidos en estudios que demuestran la alteración en el desarrollo sexual de distintas especies acuáticas. Por su parte, He, Tsui, et al. (2019) expusieron a dos especies de corales a 0.1-1000 µg/L de BP-3 y a sus dos metabolitos principales, BP-1 y BP-8, observando que los metabolitos de BP-3 produjeron un fracaso significativo del asentamiento, el blanqueamiento y la mortalidad de las larvas de *S. caliendrum* y *P. damicornis*, sugiriendo que dichos efectos pueden deberse al potencial relativo de bioacumulación de la BPs (BP-8 > BP-1 ≈ BP-3).

Cabe recordar que el FETAX se enfoca en estudiar los efectos tóxicos inducidos en el periodo de organogénesis en el cual los organismos se encuentran más sensibles y los contaminantes poseen un mayor potencial para inducir anomalías, así, si el contaminante produce algún efecto dañino, este repercute en el desarrollo de órganos y tejidos (Aranzazu Taborda *et al.*, 2012). Algunos estudios experimentales han permitido la evaluación del impacto que tiene la exposición a

tóxicos en peces, así como los efectos en su desarrollo, observando efectos como el retraso en el desarrollo y maduración de ovocitos, incremento de atresia folicular, alta mortalidad, depósito anormal y formación de vitelo en los ovocitos (Mills y Chichester, 2005),

En la mayoría de los estudios que han sido realizados para la evaluación de la toxicidad inducida por BP-3 en organismos acuáticos se han utilizado como bioindicadores a peces, algas, corales, moluscos, crustáceos y equinodermos, además se han enfocado en realizar ensayos de inmovilización, inhibición de crecimiento, ensayos de reproducción y de expresión de genes (Coronado *et al.*, 2008; Blüthgen *et al.*, 2012; Li, 2012; Kinnberg *et al.*, 2015), en los cuales se ha observado un decremento en la expresión de genes en el cerebro, testículos, hígado, ovarios, afección en la maduración de las gónadas, bioacumulación, reducción significativa en el número de ovocitos puestos, fecundados y erosionados en diferentes especies acuáticas (Coronado *et al.*, 2008; Blüthgen *et al.*, 2012; Li, 2012; Kim y Choi, 2014), demostrando así el efecto estrogénico que la BP-3 produce sobre especies acuáticas. Sin embargo, los organismos acuáticos difieren en algunos aspectos de la fisiología reproductiva, los cuales pueden causar una respuesta distinta a los disruptores endocrinos (Mills y Chichester, 2005).

La principal función de los estrógenos en el organismo es regular el desarrollo, mantenimiento y la función del sistema reproductor en hembras y machos (Ramírez *et al.*, 2015), los disruptores endocrinos (DE) interrumpen el desarrollo normal por interferencias en la síntesis, producción, transporte, unión o eliminación de las hormonas que están presentes en el organismo, las cuales controlan en desarrollo cerebral y otros sistemas en órganos, las consecuencias se manifiestan de manera predominante en los embriones porque interfieren durante el desarrollo embrionario (Falero Morejón *et al.*, 2005; Márquez y Álvarez, 2012 Arias *et al.*, 2020). Por medio de estudios de laboratorio se ha demostrado que los DE en el medio ambiente acuático pueden interferir de forma negativa en la reproducción y desarrollo de varias especies acuáticas (Mills y Chichester, 2005).

Las consecuencias por exposición a un DE en peces suele ser la modificación de la función tiroidea, el decremento en la fertilidad, el descenso en el éxito en la

incubación, anomalías morfológicas, alteraciones metabólicas y feminización, demostradas tanto en estudios en afluentes, estuarios y en trabajos experimentales dentro de un laboratorio (Mills y Chichester, 2005), por lo que los resultados obtenidos en nuestro estudio, como son la disminución en la tasa de eclosión, el aumento de mortalidad embrionaria, la malformación de los embriones y la inhibición de crecimiento pueden deberse al efecto estrogénico que la BP-3 ha demostrado tener en otros estudios sobre organismos acuáticos (Coronado *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2014; Kinnberg *et al.*, 2015).

### **13 CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la exposición a bajas concentraciones BP-3 produce alteraciones morfológicas durante el desarrollo embrionario tales como las malformaciones axiales, faciales, cerebrales, cardíacas y ópticas, además, también produce embriotoxicidad reflejada en la disminución de eclosión de los oocitos en embriones de *Xenopus laevis*. Los efectos teratogénicos y embriotóxicos aumentaron en frecuencia y gravedad de forma dependiente al tiempo y concentración de exposición, además los efectos teratogénicos no son temporales sino permanentes. Cabe destacar que la BP-3 trae consigo de forma involuntaria la exposición a sus metabolitos (BP-1 y BP-8), de los cuales algunos estudios han sugerido que presentan un riesgo mayor o igual al de la BP-3 en el ecosistema.

Estudios anteriores a este trabajaron con concentraciones de BP-3 de acuerdo con los registros ambientales de ese momento, sin embargo, dichas concentraciones han aumentado significativamente en los últimos años debido su demanda actual, por lo que se sugiere realizar nuevos estudios que evalúen la disposición y los efectos de las concentraciones ambientales actuales de BP-3, así como de sus metabolitos, con la finalidad de verificar estas conclusiones debido a que estos resultados pueden mostrar un breve panorama del impacto ecológico que puede producir la presencia de este filtro solar en el ambiente.

En el ecosistema, debido a su uso en productos de cuidado personal, la BP-3 y sus metabolitos derivados de la biotransformación son de importancia ecotóxica, de modo que es importante realizar estudios en lo que se evalúan los efectos tóxicos que inducen estos compuestos en diferentes organismos acuáticos con el fin de demostrar el riesgo que estas sustancias pueden producir en el deterioro reproductivo debido a que son disruptores endocrinos, por lo que su presencia puede ocasionar un impacto ecológico relevante sobre la sostenibilidad del ecosistema acuático. Debido a la falta de información sobre la toxicidad del BP-3 y las concentraciones presentes en diversos efluentes, se sugiere continuar con la evaluación del riesgo ambiental producido por este contaminante emergente y sus

metabolitos activos, lo que puede llegar a presentarse como un desafío de investigación ante la sociedad científica.

## 14 REFERENCIAS

- Arango, S. (2012), "Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana", *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, Vol. 30.
- Aranzazu Taborda, D.A., Rodríguez, B. de J. and Duque Agudelo, B.A. (2012), "Disrupción edocrina en peces", *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias (Colombian Journal of Animal Science and Veterinary Medicine)*.
- Argemi, F., Cianni, N. and Porta, A. (2005), "Disrupción endocrina: Perspectivas ambientales y salud pública", *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*.
- Arias, M.P., Castro-Feijóo, L., Conde, J.B. and Cabanas Rodríguez, P. (2020), "Una revisión sobre los disruptores endocrinos y su posible impacto sobre la salud de los humanos", *Rev Esp Endocrinol Pediatr*, Vol. 11 No. 2.
- Arman, N.Z., Salmiati, S., Aris, A., Salim, M.R., Nazifa, T.H., Muhamad, M.S. and Marpongahtun, M. (2021), "A review on emerging pollutants in the water environment: Existences, health effects and treatment processes", *Water (Switzerland)*, doi: 10.3390/w13223258.
- Astel, A., Stec, M. and Rykowska, I. (2020), "Occurrence and distribution of uv filters in beach sediments of the southern baltic seacoast", *Water (Switzerland)*, Vol. 12 No. 11, doi: 10.3390/w12113024.
- Balmer, M.E., Buser, H.R., Müller, M.D. and Poiger, T. (2005), "Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes", *Environmental Science and Technology*, Vol. 39 No. 4, pp. 953–962, doi: 10.1021/es040055r.
- Bantle, J. and Sabourin, T. (1991), "Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX)", *American Society for Testing and Materials E1439*, Vol. 98 No. Reapproved 2004.
- Barceló, D. and López de Alda, M. (n.d.). *Contaminación y Calidad Química Del Agua: El Problema de Los Contaminantes Emergentes*.
- Bassem, S.M. (2020), "Water pollution and aquatic biodiversity", *Biodiversity International Journal Review*, Vol. 4 No. 1.

- Batlle, C. (2005), "Factor de protección solar", *OFFARM*, Vol. 24 No. 6, pp. 65–72.
- Beck, C.W. and Slack, J.M.W. (2001), "An amphibian with ambition: A new role for *Xenopus* in the 21st century", *Genome Biology*.
- Blüthgen, N., Zucchi, S. and Fent, K. (2012), "Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*)", *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 263 No. 2, pp. 184–194, doi: 10.1016/j.taap.2012.06.008.
- Burger, J. and Gochfeld, M. (2001), "On developing bioindicators for human and ecological health", *Environmental Monitoring and Assessment*, Vol. 66 No. 1, doi: 10.1023/A:1026476030728.
- Cadena, M.I., Montesdeoca, S., Sosa, Z. and Santana, J.J. (2022), "Occurrence and environmental hazard of organic UV filters in seawater and wastewater from Gran Canaria Island (Canary Islands, Spain)", *Environmental Pollution*, Vol. 300, doi: 10.1016/j.envpol.2022.118843.
- Cahova, J., Blahova, J., Plhalova, L., Svobodova, Z. and Faggio, C. (2021), "Do single-component and mixtures selected organic UV filters induce embryotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*)?", *Water (Switzerland)*, Vol. 13 No. 16, doi: 10.3390/w13162203.
- Cañarte, K. (2015), "Radiación Ultravioleta Y su efecto en la salud", *CIENCIA UNEMI*, Vol. 3 No. 4, doi: 10.29076/issn.2528-7737vol3iss4.2010pp26-33p.
- Carotenuto, R., Pallotta, M.M., Tussellino, M. and Fogliano, C. (2023), "Xenopus laevis (Daudin, 1802) as a Model Organism for Bioscience: A Historic Review and Perspective", *Biology*, MDPI, 1 June, doi: 10.3390/biology12060890.
- Castañón, Y.A. and Mayet, M. de L. (2013), "Teratogénesis por retinoides. El caso de México", *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, Vol. 44 No. 1.
- Chatzigianni, M., Pavlou, P., Siamidi, A., Vlachou, M., Varvaresou, A. and Papageorgiou, S. (2022), "Environmental impacts due to the use of sunscreen products: a mini-review", *Ecotoxicology*, doi: 10.1007/s10646-022-02592-w.

- Chowdhary, P., Bharagava, R.N., Mishra, S. and Khan, N. (2020), "Role of Industries in Water Scarcity and Its Adverse Effects on Environment and Human Health", *Environmental Concerns and Sustainable Development*, doi: 10.1007/978-981-13-5889-0\_12.
- Coronado, M., De Haro, H., Deng, X., Rempel, M.A., Lavado, R. and Schlenk, D. (2008), "Estrogenic activity and reproductive effects of the UV-filter oxybenzone (2-hydroxy-4-methoxyphenyl-methanone) in fish", *Aquatic Toxicology*, Elsevier BV, Vol. 90 No. 3, pp. 182–187, doi: 10.1016/j.aquatox.2008.08.018.
- Cuderman, P. and Heath, E. (2007), "Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 387, pp. 1343–1350, doi: 10.1007/s00216-006-0927-y.
- Dulio, V., Van, B., Brorström, E., Harmsen, J., Hollender, J., Schlabach, M., Slobodnik, J., *et al.* (2018), "Emerging pollutants in the EU: 10 years of NORMAN in support of environmental policies and regulations", *Environmental Sciences Europe*, doi: 10.1186/s12302-018-0135-3.
- Duro, E., Campillos, M. and Causín, S. (2003), "El sol y los filtros solares", *MEDIFARM*, Vol. 13 No. 3, pp. 159–165, doi: 10.4321/s1131-57682003000300005.
- Dwivedi, S. and Shikha, D. (2016), "Water pollution: Causes, effects and control", *Biochemical and Cellular Archives*, Vol. 16.
- Emnet, P., Mahaliyana, A.S., Northcott, G. and Gaw, S. (2020), "Organic Micropollutants in Wastewater Effluents and the Receiving Coastal Waters, Sediments, and Biota of Lyttelton Harbour (Te Whakaraupō), New Zealand", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 79 No. 4, doi: 10.1007/s00244-020-00760-9.
- Falero Morejón, A., Pérez, C., Luna, B. and Fonseca, M. (2005), "Impacto de los disruptores endocrinos en la salud y el medio ambiente. (Spanish)", *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 36.

- Fent, K., Kunz, P.Y. and Gomez, E. (2008), "UV filters in the aquatic environment induce hormonal effects and affect fertility and reproduction in fish", *Chimia*, Swiss Chemical Society, doi: 10.2533/chimia.2008.368.
- Fent, K., Kunz, P.Y., Zenker, A. and Rapp, M. (2010), "A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethylhexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor", *Marine Environmental Research*, Vol. 69 No. SUPPL. 1, doi: 10.1016/j.marenvres.2009.10.010.
- Fort, D.J. and Mathis, M. (2018), "Frog embryo teratogenesis assay—Xenopus (FETAX): Use in alternative preclinical safety assessment", *Cold Spring Harbor Protocols*, Vol. 2018 No. 8, doi: 10.1101/pdb.prot098319.
- Gallo, R. (2016), "El sol: Beneficios y efectos nocivos", *LA RADICACION SOLAR Y LA SALUD*.
- Garnacho, G.M., Salido, R. and Moreno, J.C. (2020), "Efectos de la radiación solar y actualización en fotoprotección", *Anales de Pediatría*, Vol. 92 No. 6, doi: 10.1016/j.anpedi.2020.04.014.
- Garrote, A. and Bonet, R. (2008), *Fotoprotección. Factores de Protección y Filtros Solares, Offarm*, Vol. 27.
- Gibson, J.C. (2020), "Emerging persistent chemicals in human biomonitoring for populations in the Arctic: A Canadian perspective", *Science of the Total Environment*, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134538.
- Giménez, P. and Peel, C. (2014), "Biomarcadores en la práctica clínica. Validación y verificación.", *Dianas*, Vol. 3 No. 1.
- Giokas, D.L., Sakkas, V.A. and Albanis, T.A. (2004), "Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-photodiode array detection and gas chromatography-mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1026 No. 1–2, doi: 10.1016/j.chroma.2003.10.114.

- Giokas, D.L., Sakkas, V.A., Albanis, T.A. and Lampropoulou, D.A. (2005), "Determination of UV-filter residues in bathing waters by liquid chromatography UV-diode array and gas chromatography-mass spectrometry after micelle mediated extraction-solvent back extraction", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1077 No. 1, doi: 10.1016/j.chroma.2005.04.074.
- Gómez, L.M., Islas, H., Ramírez, P., Galar, M., Sánchez, J.C., Guzmán, X., Barrera, G., et al. (2021), *Contribuciones Selectas En Ecotoxicología y Química Ambiental*, México.
- Guadarrama, R., Kido, J., Roldan, G. and Salas, M. (2016), "Contaminación del agua", *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, Vol. 2 No. 5, pp. 1-10.
- Gurdon, J.B. and Hopwood, N. (2000), "The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: Of empire, pregnancy testing and ribosomal genes", *International Journal of Developmental Biology*, Vol. 44 No. 1 SPEC. ISS. 1.
- HBM4EU. (2020), "Biomarcadores de Efecto: Lo que necesitas saber.", *European Human Biomonitoring Initiative*, No. 733032.
- He, K., Hain, E., Timm, A., Tarnowski, M. and Blaney, L. (2019), "Occurrence of antibiotics, estrogenic hormones, and UV-filters in water, sediment, and oyster tissue from the Chesapeake Bay", *Science of the Total Environment*, Vol. 650, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.021.
- He, T., Tsui, M.M.P., Tan, C.J., Ng, K.Y., Guo, F.W., Wang, L.H., Chen, T.H., et al. (2019), "Comparative toxicities of four benzophenone ultraviolet filters to two life stages of two coral species", *Science of the Total Environment*, Vol. 651, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.148.
- Hodgson, E. (2004), *A Textbook of Modern Toxicology*, Third Edition., Wiley-Interscience.
- Hoke, R.A. and Ankley, G.T. (2005), "Application of frog embryo teratogenesis assay-Xenopus to ecological risk assessment", *Environmental Toxicology and Chemistry*, October, doi: 10.1897/04-506R.1.

- Kameda, Y., Kimura, K. and Miyazaki, M. (2011), "Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes", *Environmental Pollution*, Vol. 159 No. 6, doi: 10.1016/j.envpol.2011.02.055.
- Kapelewska, J., Kotowska, U., Karpińska, J., Kowalczyk, D., Arciszewska, A. and Świryrdo, A. (2018), "Occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of emerging organic contaminants in leachates, groundwaters and wastewaters", *Microchemical Journal*, Vol. 137, doi: 10.1016/j.microc.2017.11.008.
- Kasprzyk, B., Dinsdale, R.M. and Guwy, A.J. (2008), "The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK", *Water Research*, Elsevier Ltd, Vol. 42 No. 13, pp. 3498–3518, doi: 10.1016/j.watres.2008.04.026.
- Kasprzyk, B., Dinsdale, R.M. and Guwy, A.J. (2009), "The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters", *Water Research*, Vol. 43 No. 2, doi: 10.1016/j.watres.2008.10.047.
- Kim, S. and Choi, K. (2014), "Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: A mini-review", *Environment International*, Elsevier Ltd, doi: 10.1016/j.envint.2014.05.015.
- Kim, S., Jung, D., Kho, Y. and Choi, K. (2014), "Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of japanese medaka (*Oryzias latipes*)-A two generation exposure study", *Aquatic Toxicology*, Elsevier, Vol. 155, pp. 244–252, doi: 10.1016/j.aquatox.2014.07.004.
- Kinnberg, K.L., Petersen, G.I., Albrektsen, M., Minghlani, M., Awad, S.M., Holbech, B.F., Green, J.W., *et al.* (2015), "Endocrine-disrupting effect of the ultraviolet filter benzophenone-3 in zebrafish, *Danio rerio*", *Environmental Toxicology and Chemistry*, Wiley Blackwell, Vol. 34 No. 12, pp. 2833–2840, doi: 10.1002/etc.3129.

- Leal, L., Vieno, N., Temmink, H., Zeeman, G. and Buisman, C.J.N. (2010), "Occurrence of xenobiotics in gray water and removal in three biological treatment systems", *Environmental Science and Technology*, Vol. 44 No. 17, pp. 6835–6842, doi: 10.1021/es101509e.
- Lee, S.H., Xiong, J.Q., Ru, S., Patil, S.M., Kurade, M.B., Govindwar, S.P., Oh, S.E., *et al.* (2020), "Toxicity of benzophenone-3 and its biodegradation in a freshwater microalga *Scenedesmus obliquus*", *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 389, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122149.
- Li, M.H. (2012), "Acute toxicity of benzophenone-type UV filters and paraben preservatives to freshwater planarian, *Dugesia japonica*", *Toxicological and Environmental Chemistry*, Vol. 94 No. 3, pp. 566–573, doi: 10.1080/02772248.2012.655695.
- Li, W., Ma, Y., Guo, C., Hu, W., Liu, K., Wang, Y. and Zhu, T. (2007), "Occurrence and behavior of four of the most used sunscreen UV filters in a wastewater reclamation plant", *Water Research*, Vol. 41 No. 15, doi: 10.1016/j.watres.2007.05.039.
- Liebich, B.W. and Parthé, E. (1974), "2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone", *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, Vol. 30 No. 10, doi: 10.1107/s0567740874007503.
- Liu, Y.S., Ying, G.G., Shareef, A. and Kookana, R.S. (2012), "Occurrence and removal of benzotriazoles and ultraviolet filters in a municipal wastewater treatment plant", *Environmental Pollution*, Vol. 165, doi: 10.1016/j.envpol.2011.10.009.
- Magi, E., Scapolla, C., Di Carro, M., Rivaro, P. and Ngoc Nguyen, K.T. (2013), "Emerging pollutants in aquatic environments: Monitoring of UV filters in urban wastewater treatment plants", *Analytical Methods*, Vol. 5 No. 2, doi: 10.1039/c2ay26163d.

- Mao, F., He, Y. and Gin, K.Y.H. (2019), "Occurrence and fate of benzophenone-type UV filters in aquatic environments: A review", *Environmental Science: Water Research and Technology*, doi: 10.1039/c8ew00539g.
- Marín, D. and Del Pozo, A. (2005), "Filtros solares. Características, tipos y requerimientos", *OFFARM*, Vol. 24 No. 9, pp. 175–178.
- Márquez, E. and Álvarez, A. (2012), "Disruptores endocrinos, un posible riesgo tóxico en productos de consumo habitual", *Unirevista. Es*.
- Mengual, J. (2020), *TOXICIDAD DE LA BENZOFENONA*, Revisión bibliográfica, Universitas Miguel Ángel, España, June.
- Mills, L.J. and Chichester, C. (2005), "Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations?", *Science of the Total Environment*, doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.12.070.
- Mota, E.D., Campillos Páez, M.T. and Causín Serrano, S. (2003), "El sol y los filtros solares", *MEDIFAM - Revista de Medicina Familiar y Comunitaria*, doi: 10.4321/s1131-57682003000300005.
- Mutlu, E., Pierfelice, J., McIntyre, B.S., Cunny, H.C., Kissling, G.E., Burbach, B. and Waidyanatha, S. (2017), "Simultaneous quantitation of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone, a sunscreen ingredient, and its metabolites in Harlan Sprague Dawley rat plasma following perinatal dietary exposure", *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 41 No. 9, doi: 10.1093/jat/bkx070.
- Nakagawa, Y. and Suzuki, T. (2002), "Metabolism of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in isolated rat hepatocytes and xenoestrogenic effects of its metabolites on MCF-7 human breast cancer cells", *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 139 No. 2, doi: 10.1016/S0009-2797(01)00293-9.
- Negreira, N., Rodríguez, I., Ramil, M., Rubí, E. and Cela, R. (2009), "Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, Vol. 638 No. 1, doi: 10.1016/j.aca.2009.02.015.

- Nenni, M.J., Fisher, M.E., James-Zorn, C., Pells, T.J., Ponferrada, V., Chu, S., Fortriede, J.D., *et al.* (2019), "XenBase: Facilitating the use of *Xenopus* to model human disease", *Frontiers in Physiology*, doi: 10.3389/fphys.2019.00154.
- NICEATM FETAX. (2000), *Background Review Document Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX)*.
- Oliveira, J., Dias, R.L. and Brito, L. (2022), "Effect of benzophenone-3 on the blood cells of zebrafish (*Danio rerio*)", *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, Vol. 57 No. 2, doi: 10.1080/03601234.2021.2022946.
- Paredes, E., Perez, S., Rodil, R., Quintana, J.B. and Beiras, R. (2014), "Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Siriella armata*", *Chemosphere*, Elsevier Ltd, Vol. 104, pp. 44–50, doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.10.053.
- Parmar, T.K., Rawtani, D. and Agrawal, Y.K. (2016), "Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution", *Frontiers in Life Science*, Vol. 9 No. 2, doi: 10.1080/21553769.2016.1162753.
- Pérez, A., Allende, M.A., Agustín, M.J. and Palomo, P. (2002), "Teratogénesis: Clasificaciones", *Farmacia Hospitalaria*.
- Pérez, I., Islas, H., Gómez, L.M., Sánchez, L.M. and Chamorro, G. (2021), "Protective effects of *Spirulina* (*Arthrospira maxima*) against toxicity induced by cadmium in *Xenopus laevis*", *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, Vol. 248, doi: 10.1016/j.cbpc.2021.109099.
- Petrović, M., Gonzalez, S. and Barceló, D. (2003), "Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water", *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22 No. 10, doi: 10.1016/S0165-9936(03)01105-1.

- Piedras, S.R.N., Bager, A., Moraes, P.R.R., Isoldi, L.A., Ferreira, O.G.L. and Heemann, C. (2006), "Macroinvertebrados bentônicos como indicadores de qualidade de água na Barragem Santa Bárbara, Pelotas, RS, Brasil", *Ciência Rural*, Vol. 36 No. 2, doi: 10.1590/s0103-84782006000200020.
- Qin, Z. and Xu, X. (2006), "Application of *Xenopus laevis* in ecotoxicology (I) - Introduction and quality control of laboratory animal", *Chinese Science Bulletin*, doi: 10.1007/s11434-006-1273-3.
- Raffa, R.B., Pergolizzi, J. V., Taylor, R. and Kitzen, J.M. (2019), "Sunscreen bans: Coral reefs and skin cancer", *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, doi: 10.1111/jcpt.12778.
- Ramírez, I.M., Martínez, P., Quiroz, M.A. and Bandala, E.R. (2015), "Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente", *Tecnología y Ciencias Del Agua*, Vol. 6 No. 5.
- Ramos, S., Homem, V., Alves, A. and Santos, L. (2016), "A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants", *Environment International*, doi: 10.1016/j.envint.2015.10.004.
- Rodil, R., Quintana, J.B., López-Manía, P., Muniategui-Lorenzo, S. and Prada-Rodríguez, D. (2008), "Multiclass determination of sunscreen chemicals in water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Analytical Chemistry*, Vol. 80 No. 4, doi: 10.1021/ac702240u.
- Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J.S., Rawla, P. and Barsouk, A. (2021), "Epidemiology of Melanoma", *Medical Sciences (Basel, Switzerland)*, doi: 10.3390/medsci9040063.
- Saulovic, D., Biocanin, R. and Rodriguez, B. (2015), "Bioindicators in human environment", *University of Belgrade*.
- Segnini, S. (2003), "El uso de macroinvertebrados béntonicos como indicadores de la condición ecológica de los cuerpos de agua corriente", *Ecotropicos*, Vol. 16 No. 2.

- Sieratowicz, A., Kaiser, D., Behr, M., Oetken, M. and Oehlmann, J. (2011), "Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for *Desmodesmus subspicatus* and *Daphnia magna*", *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, Vol. 46 No. 12, pp. 1311–1319, doi: 10.1080/10934529.2011.602936.
- Sun, X., Yang, Q., Jing, M., Jia, X., Tian, L. and Tao, J. (2023), "Environmentally relevant concentrations of organic (benzophenone-3) and inorganic (titanium dioxide nanoparticles) UV filters co-exposure induced neurodevelopmental toxicity in zebrafish", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 249, doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114343.
- Tadjuidje, E. (2022), "*Xenopus* as an Experimental Organism", *Encyclopedia of Life Sciences*, doi: 10.1002/9780470015902.a0029517.
- Tarazona, I., Chisvert, A., León, Z. and Salvador, A. (2010), "Determination of hydroxylated benzophenone UV filters in sea water samples by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1217 No. 29, pp. 4771–4778, doi: 10.1016/j.chroma.2010.05.047.
- Teodosiu, C., Gilca, A.F., Barjoveanu, G. and Fiore, S. (2018), "Emerging pollutants removal through advanced drinking water treatment: A review on processes and environmental performances assessment", *Journal of Cleaner Production*, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.06.247.
- Torres, I. and Pérez, J.I. (2016), "Biomarcadores y práctica clínica", *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, doi: 10.4321/S1137-6627/2016000100001.
- Tsui, M.M.P., Chen, L., He, T., Wang, Q., Hu, C., Lam, J.C.W. and Lam, P.K.S. (2019), "Organic ultraviolet (UV) filters in the South China sea coastal region: Environmental occurrence, toxicological effects and risk assessment", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 181, doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.05.075.

- Tsui, M.M.P., Leung, H.W., Wai, T.C., Yamashita, N., Taniyasu, S., Liu, W., Lam, P.K.S., *et al.* (2014), "Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries", *Water Research*, Vol. 67, doi: 10.1016/j.watres.2014.09.013.
- Usma, J.I., Gutiérrez, O.D., Gil, M.J. and Soto, A.M. (2013), "Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos", *Producción Más Limpia*, Vol. 7 No. 2.
- Wang, Y., Jiang, S., Chen, X., Liu, X., Li, N., Nie, Y. and Lu, G. (2023), "Comparison of developmental toxicity of benzophenone-3 and its metabolite benzophenone-8 in zebrafish", *Aquatic Toxicology*, Vol. 258, doi: 10.1016/j.aquatox.2023.106515.
- Wilkinson, J., Hooda, P.S., Barker, J., Barton, S. and Swinden, J. (2017), "Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field", *Environmental Pollution*, doi: 10.1016/j.envpol.2017.08.032.
- World Health Organization. (2021), "Cancer WHO", *Cancer*.
- Wu, M. hong, Xie, D. guo, Xu, G., Sun, R., Xia, X. yu, Liu, W. long and Tang, L. (2017), "Benzophenone-type UV filters in surface waters: An assessment of profiles and ecological risks in Shanghai, China", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 141, doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.03.013.
- Yamada, M., Mohammed, Y. and Prow, T.W. (2020), "Advances and controversies in studying sunscreen delivery and toxicity", *Advanced Drug Delivery Reviews*, doi: 10.1016/j.addr.2020.02.001.
- Young, A.R., Claveau, J. and Rossi, A.B. (2017), "Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection", *Journal of the American Academy of Dermatology*, Vol. 76 No. 3, doi: 10.1016/j.jaad.2016.09.038.
- Zahn, N., James-Zorn, C., Ponferrada, V.G., Adams, D.S., Grzymkowski, J., Buchholz, D.R., Nascone-Yoder, N.M., *et al.* (2022), "Normal Table of Xenopus

development: a new graphical resource", *Development (Cambridge)*, Vol. 149  
No. 14, doi: 10.1242/dev.200356.

## 15 ANEXOS

### Malformaciones de las larvas expuestas a 0.063 mg/L de BP-3 durante 96 horas.



**Figura 1.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.951 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 2.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.394 mm, con el intestino mal enrollado, malformación en notocorda y edema múltiple (abdominal, cardiaco, cefálico y facial).



**Figura 3.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.833 mm, con el intestino mal enrollado.



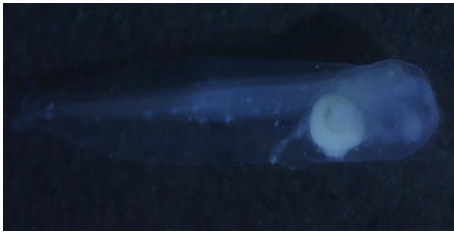
**Figura 4.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.719 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



**Figura 5.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.664 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación en la notocorda.



**Figura 6.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.183 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 7.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.811 mm, con el intestino mal enrollado, malformación facial e hipopigmentación ocular.



**Figura 8.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.088 mm, con malformación en la notocorda.



**Figura 9.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.488 mm, con el intestino mal enrollado, edema craneoencefálico y malformación facial.



**Figura 10.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.363 mm, con el intestino mal enrollado, malformación en cola y notocorda.



**Figura 11.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.840 mm, con flexión lateral y dorsal de la cola como producto de una malformación en la notocorda y el intestino mal enrollado.



**Figura 12.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.108 mm, con edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



**Figura 13.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.907 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación en la notocorda.



**Figura 14.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.119 mm, con flexión ventral de la cola como producto de una malformación en la notocorda.



**Figura 15.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.669 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 16.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.138 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación en la notocorda.



**Figura 17.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.552 mm, con el intestino mal enrollado y flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



**Figura 18.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.066 mm, con anormalidad en la punta de la cola, flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y el intestino mal enrollado.



**Figura 19.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.813 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 20.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.433 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación en la notocorda.



**Figura 21.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.757 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 22.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.272 mm, con el intestino mal enrollado.



**Figura 23.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.060 mm, con malformación en la punta de la cola.



**Figura 24.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.108 mm, con el intestino mal enrollado.



**Figura 25.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.624 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación en notocorda.



**Figura 26.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.974 mm, con el intestino mal enrollado e hipopigmentación ocular.



**Figura 27.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.853 mm, con malformación en la punta de la cola e hipopigmentación ocular.



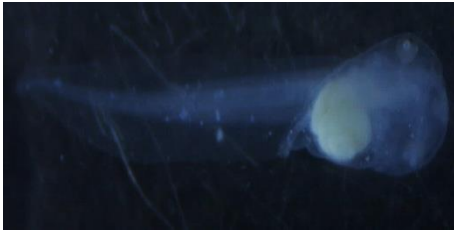
**Figura 28.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.722 mm, con malformación en la punta de la cola e hipopigmentación ocular.



**Figura 29.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.173 mm, con malformación en la punta de la cola y flexión lateral de la cola como producto de una malformación en notocorda.



**Figura 30.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.366 mm, con hipopigmentación ocular.



**Figura 31.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.645 mm, con el intestino mal enrollado y malformación en la cola.



**Figura 32.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.928 mm, con edema múltiple (abdominal, facial, cardíaco y ocular) y el intestino mal enrollado.



**Figura 33.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.458 mm, con malformación en la punta de la cola.



**Figura 34.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.115 mm, con el intestino mal enrollado, flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda e hipopigmentación ocular.



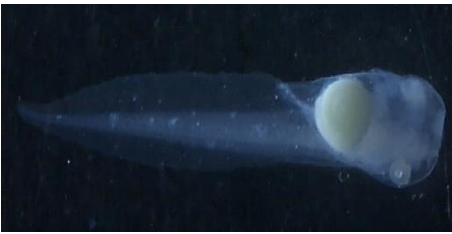
**Figura 35.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.419 mm, con el intestino mal enrollado e hipopigmentación ocular.



**Figura 36.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.095 mm, con flexión ventral de la cola como producto de una malformación en la notocorda.



**Figura 37.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.847 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación en la notocorda y el intestino mal enrollado.



**Figura 38.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.756 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 39.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.594 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 40.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.989 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación en la notocorda e intestino mal enrollado.



**Figura 41.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.892 mm, con edema severo (cardiaco y facial).



**Figura 42.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.944 mm, con edema cardiaco.

**Malformaciones de las larvas expuestas a 0.09 mg/L de BP-3 durante 96 horas.**



**Figura 1.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.074 mm, con el intestino mal enrollado.



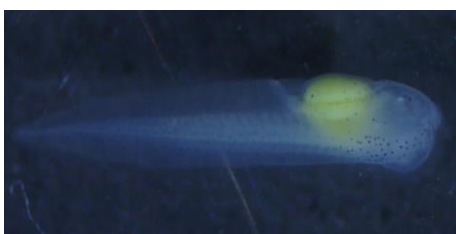
**Figura 2.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.762 mm, con el intestino mal enrollado.



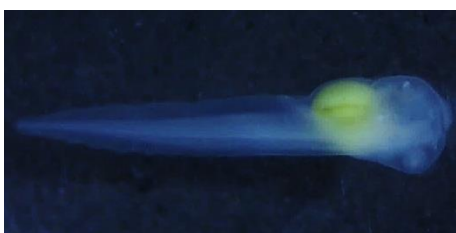
**Figura 3.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.362 mm, sin malformaciones aparentes.



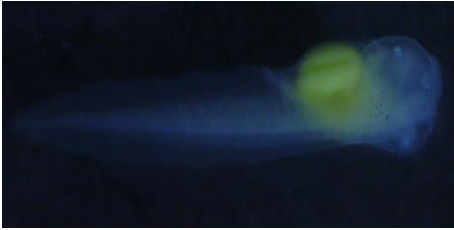
**Figura 4.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.587 mm, sin malformaciones aparentes.



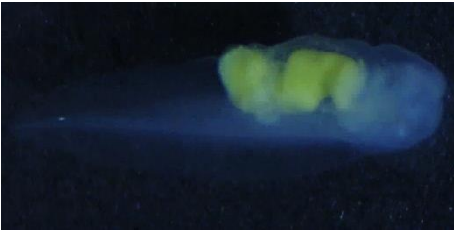
**Figura 5.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.731 mm, sin malformaciones aparentes.



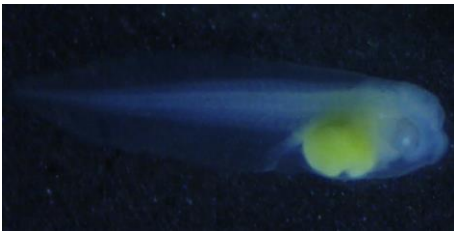
**Figura 6.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.639 mm, sin malformaciones aparentes.



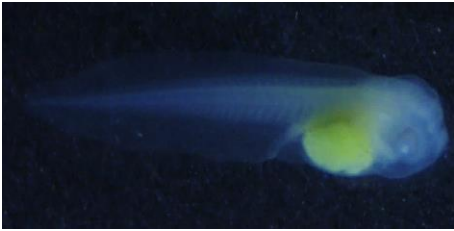
**Figura 7.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.421 mm, con malformación facial e hipopigmentación ocular.



**Figura 8.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.289 mm, con falta de enrollamiento del intestino y edema múltiple (cardiaco y abdominal) e hipopigmentación ocular.



**Figura 9.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.628 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho.



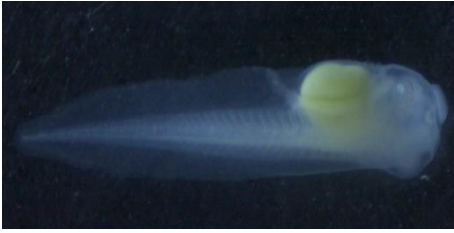
**Figura 10.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.760 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo derecho.



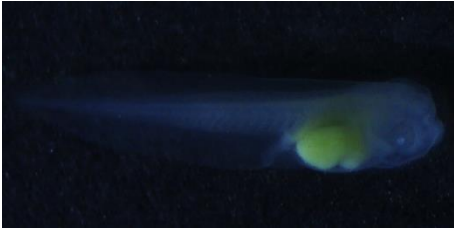
**Figura 11.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.986 mm, edema cardiaco.



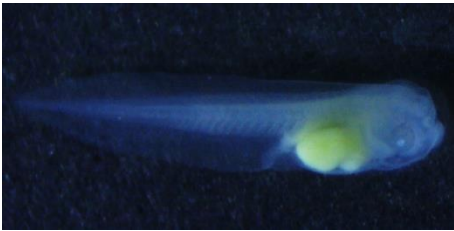
**Figura 12.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.589 mm, con falta de enrollamiento del intestino, malformación facial, rotura de la copa óptica en el ojo derecho y edema abdominal.



**Figura 13.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.104 mm, sin malformaciones aparentes.



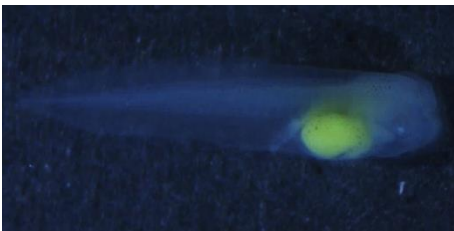
**Figura 14.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.918 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 15.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.740 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo derecho.



**Figura 16.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.516 mm, con el intestino mal enrollado, edema cardiaco, rotura de la copa óptica en el ojo derecho, malformación facial y de la notocorda.

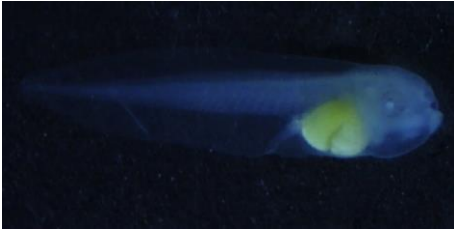


**Figura 17.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.853 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo derecho.

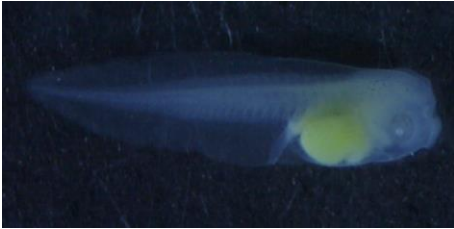


**Figura 18.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 5.061 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardiaco y abdominal), malformación de notocorda y cola, malformación severa con fracaso total del desarrollo del cerebro

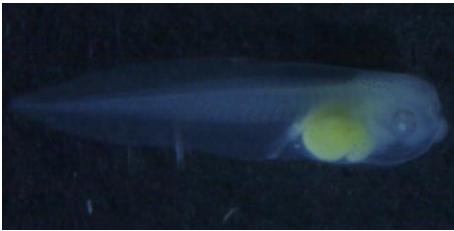
y cara.



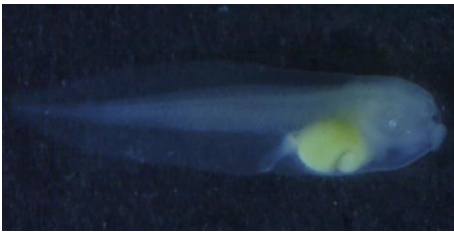
**Figura 19.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.066 mm, con edema cardiaco.



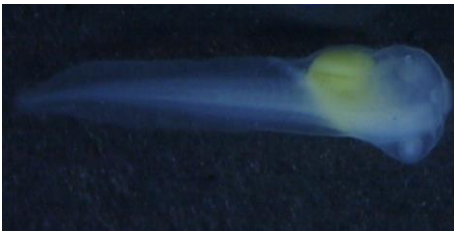
**Figura 20.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.854 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 21.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.102 mm, con edema cardiaco.



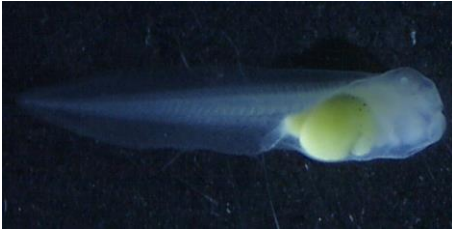
**Figura 22.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.955 mm, sin malformaciones aparentes.



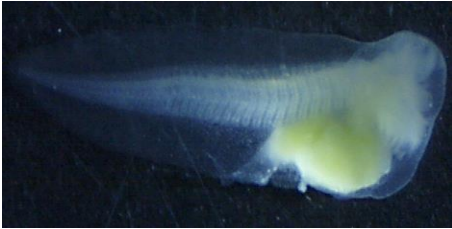
**Figura 23.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.087 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 24.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.113 mm, sin malformaciones aparentes.

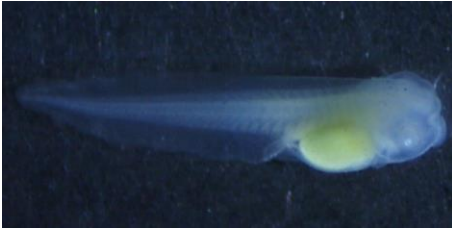


**Figura 25.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.484 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo derecho y el intestino mal enrollado.

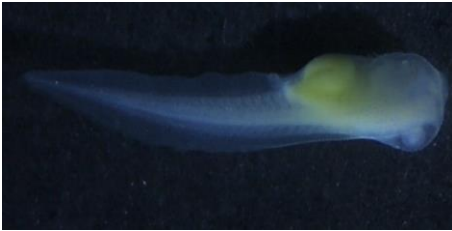


y cara.

**Figura 26.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.693 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardiaco y abdominal), malformación de notocorda y cola, malformación severa con fracaso total del desarrollo del cerebro



**Figura 27.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.780 mm, con hipopigmentación ocular.



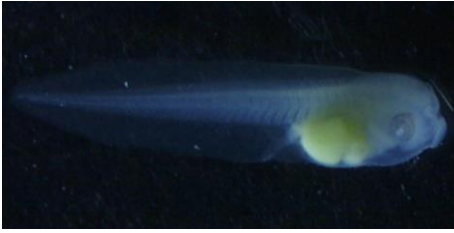
**Figura 28.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.331 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación en notocorda.



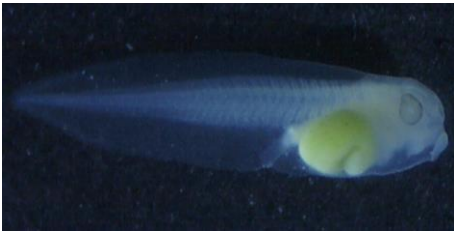
**Figura 29.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.638 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 30.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.383 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



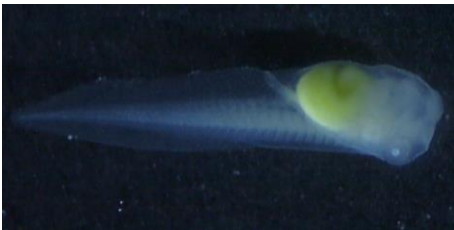
**Figura 31.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.050 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo derecho.



**Figura 32.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.541 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho.



**Figura 33.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.602 mm, con el intestino mal enrollado.



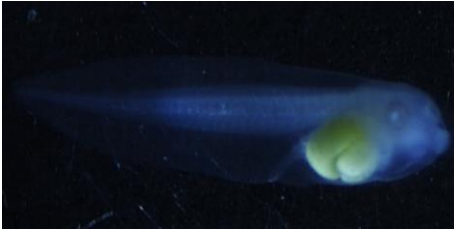
**Figura 34.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.962 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo izquierdo.



**Figura 35.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.854 mm, sin malformaciones aparentes.



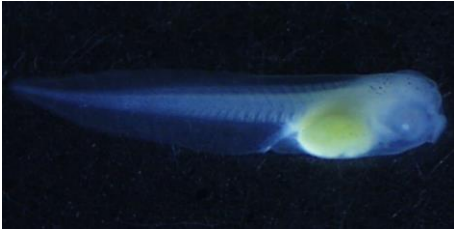
**Figura 36.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.747 mm, con falta de enrollamiento del intestino, malformación del ano y rotura de la copa óptica en el ojo derecho.



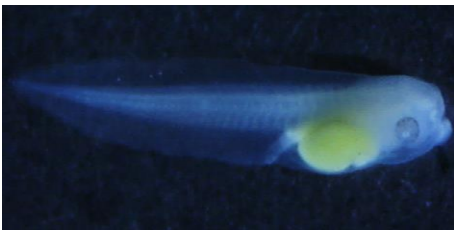
**Figura 37.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.893 mm, con edema cardiaco.



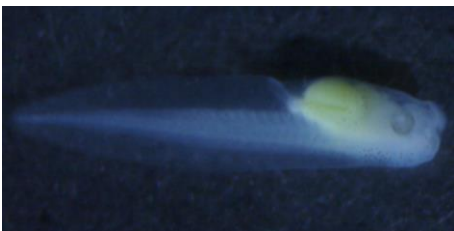
**Figura 38.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.500 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda e hipopigmentación ocular.



**Figura 39.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.973 mm, sin malformaciones aparentes.



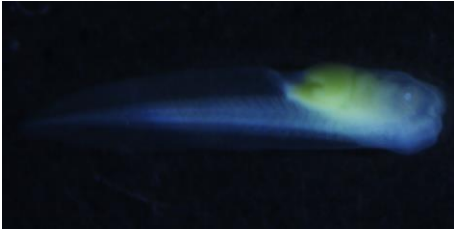
**Figura 40.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.468 mm, sin malformaciones aparentes.



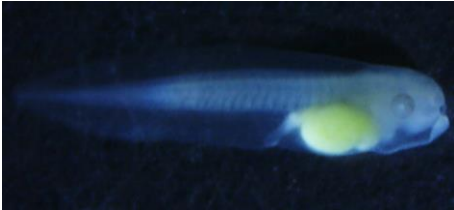
**Figura 41.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.526 mm, sin malformaciones aparentes.



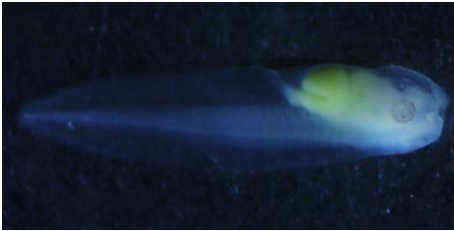
**Figura 42.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.782 mm, sin malformaciones aparentes.



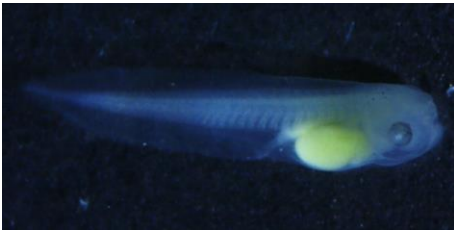
**Figura 43.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.349 mm, con el intestino mal enrollado e hipopigmentación ocular.



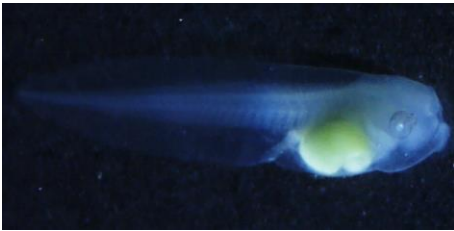
**Figura 44.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.473 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 45.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.499 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 46.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.446 mm, sin malformaciones aparentes.



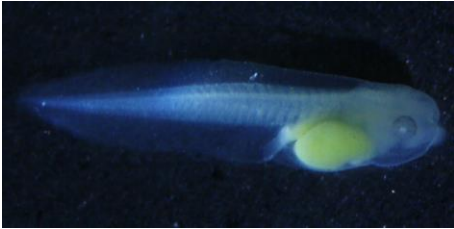
**Figura 47.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.825 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho.



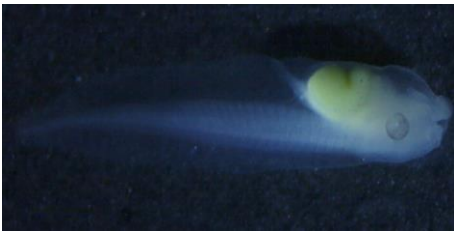
**Figura 48.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.830 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 49.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.561 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, malformación facial y en la notocorda.



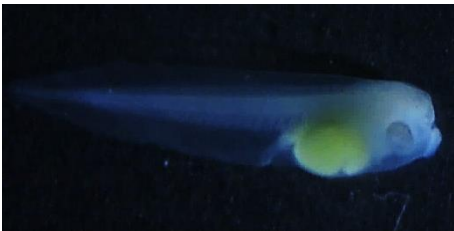
**Figura 50.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.385 mm, con malformación de la notocorda.



**Figura 51.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.950 mm, sin malformaciones aparentes.



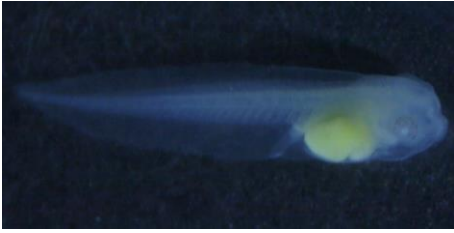
**Figura 52.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.440 mm, con hipopigmentación ocular.



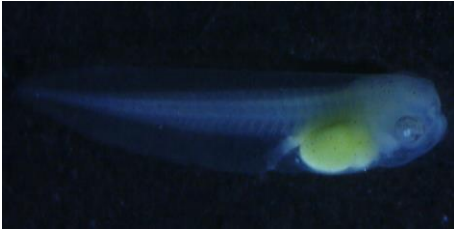
**Figura 53.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.588 mm, con el intestino mal enrollado y rotura de la copa óptica en el ojo derecho.



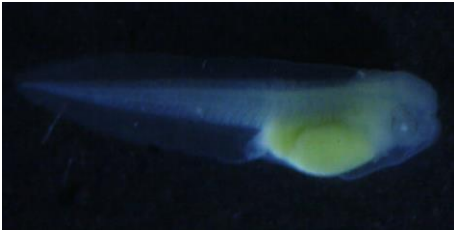
**Figura 54.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.963 mm, con edema cardiaco.



**Figura 55.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.904 mm, sin malformaciones aparentes.



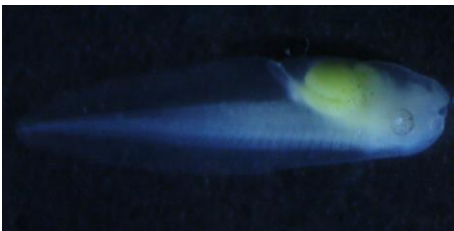
**Figura 56.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.346 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho.



**Figura 57.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.800 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho y malformación facial.



**Figura 58.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.648 mm, sin malformaciones aparentes.



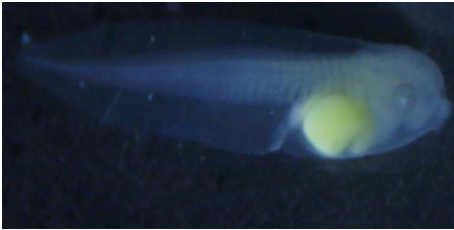
**Figura 59.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.582 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 60.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.065 mm, con edema cardiaco.



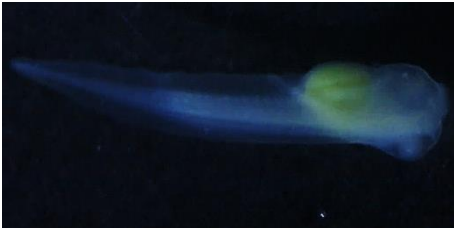
**Figura 61.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.928 mm, con el intestino mal enrollado, flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y malformación craneofacial.



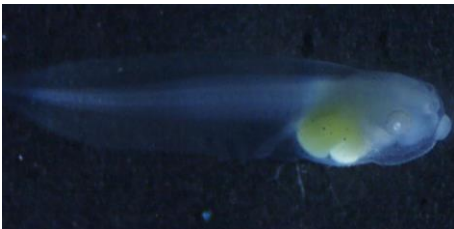
**Figura 62.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.722 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 63.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.622 mm, con el intestino mal enrollado y flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



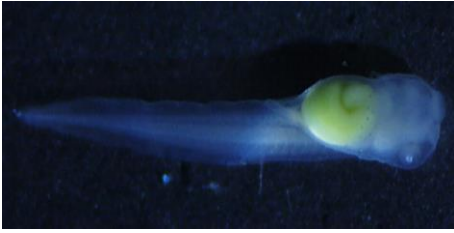
**Figura 64.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.062 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



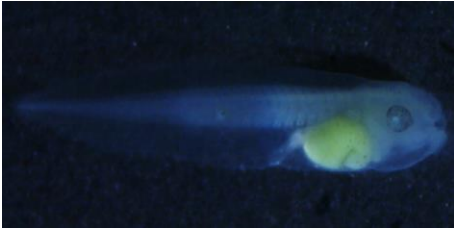
**Figura 65.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.176 mm, con edema cardiaco.



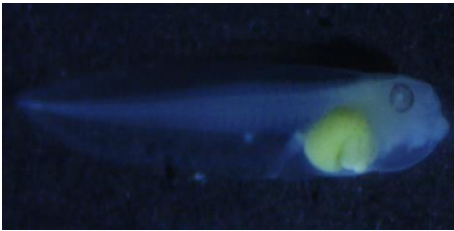
**Figura 66.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.455 mm, con rotura severa de la copa óptica en ambos ojos.



**Figura 67.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.922 mm, con el intestino mal enrollado.

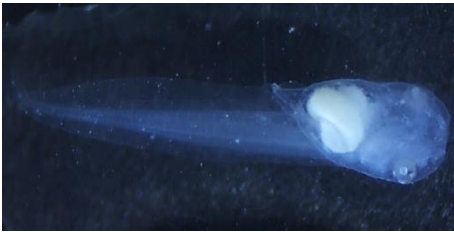


**Figura 68.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.744 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo derecho.



**Figura 69.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.852 mm, con edema cardiaco.

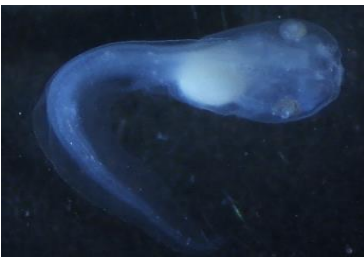
**Malformaciones de las larvas expuestas a 0.126 mg/L de BP-3 durante 96 horas.**



**Figura 1.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.978 mm, con el intestino mal enrollado e hipopigmentación ocular.



**Figura 2.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.798 mm, con flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



**Figura 3.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.926 mm, con flexión lateral severa de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



**Figura 4.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.653 mm, con flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda y el intestino mal enrollado.



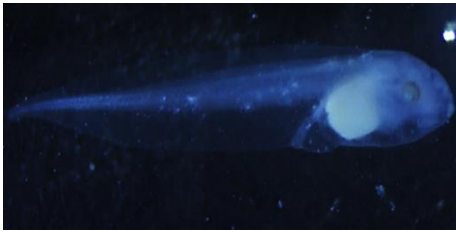
**Figura 5.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.795 mm, con edema múltiple (cardiaco, ocular y facial) y malformación de la notocorda.



**Figura 6.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.067 mm, con malformación craneofacial.



**Figura 7.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.617 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 8.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.266 mm, con malformación craneofacial.



**Figura 9.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.742 mm, con edema cardiaco y flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



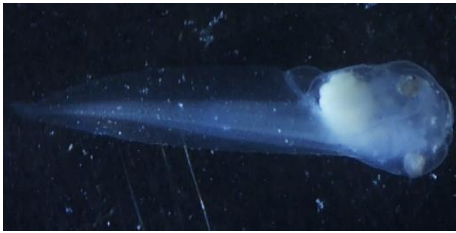
**Figura 10.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.541 mm, con el intestino mal enrollado y malformación craneofacial.



**Figura 11.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.819 mm, con hipopigmentación ocular, flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda y el intestino mal enrollado.



**Figura 12.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.965 mm, con hipopigmentación ocular, malformación craneofacial, ligera flexión dorsal de la cola flexión producto de una malformación de la notocorda y edema cardiaco.



**Figura 13.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.778 mm, malformación craneofacial.



**Figura 14.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.957 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardiaco, abdominal y facial), malformación cardíaca, severa flexión ventral de la cola como producto de una malformación de la notocorda, malformación severa con fracaso total del desarrollo del cerebro y cara con fallo completo en el desarrollo ocular.



**Figura 15.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.611 mm, con el intestino mal enrollado e hipopigmentación ocular.



**Figura 16.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.866 mm, sin malformaciones aparentes.



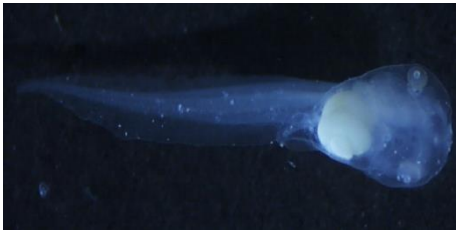
**Figura 17.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.832 mm, con malformación craneofacial y de la notocorda.



**Figura 18.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.636 mm, con flexión lateral de la cola producida por un mal desarrollo de la notocorda, hipopigmentación ocular y malformación craneofacial.



**Figura 19.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.339 mm, con edema múltiple (cardiaco y abdominal), flexión dorsal de la cola debido a una malformación de la notocorda, malformación en la punta de la cola, malformación severa con fracaso en el desarrollo del cerebro y cara, fallo del desarrollo ocular y malformación craneofacial.



**Figura 20.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.725 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y malformación craneofacial.



**Figura 21.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.257 mm, con malformación del ano.



**Figura 22.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.010 mm, con flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda y edema cardiaco.



**Figura 23.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.021 mm, con hipopigmentación ocular, flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y el intestino mal enrollado.



**Figura 24.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.708 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



**Figura 25.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.272 mm, con el intestino mal enrollado y edema múltiple (facial, ocular y abdominal).



**Figura 26.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.772 mm, con malformación en la punta de la cola.



**Figura 27.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.549 mm, sin malformaciones aparentes.



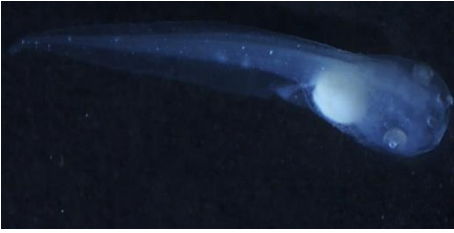
**Figura 28.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.886 mm, con malformación de la notocorda y punta de la cola.



**Figura 29.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.462 mm, con el intestino mal enrollado, hipopigmentación ocular, edema cardiaco y ligera malformación de la notocorda.



**Figura 30.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.325 mm, sin malformación aparente.



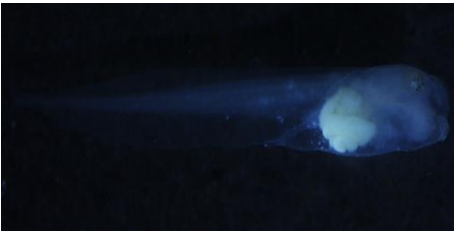
**Figura 31.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.925 mm, con el intestino mal enrollado, flexión ventral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y malformación en la punta de la cola.



**Figura 32.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.985 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 33.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.124 mm, con el intestino mal enrollado y flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



**Figura 34.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.913 mm, malformación craneofacial.



**Figura 35.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.060 mm, con el intestino mal enrollado y flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



**Figura 36.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.696 mm, con el intestino mal enrollado.



**Figura 37.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.895 mm, con el intestino mal enrollado, malformación craneofacial, edema múltiple (facial, abdominal y cardiaco) y malformación de notocorda.



**Figura 38.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 10.159 mm, con el intestino mal enrollado y ligera flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.

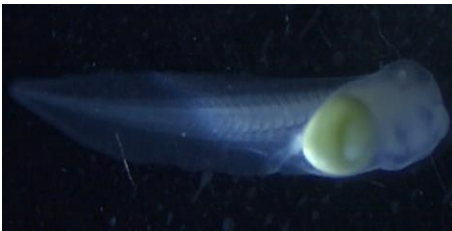


**Figura 39.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 9.759 mm, con hipopigmentación ocular y flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.

**Malformaciones de las larvas expuestas a 0.17 mg/L de BP-3 durante 96 horas.**



**Figura 1.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.166 mm, con hipopigmentación ocular.



**Figura 2.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.912 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo derecho, intestino mal enrollado, flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y malformación del ano.



**Figura 3.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.671 mm, con el intestino mal enrollado y malformación de la notocorda.



**Figura 4.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.397 mm, con hipopigmentación ocular, flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda, edema cardíaco y con el intestino mal enrollado.



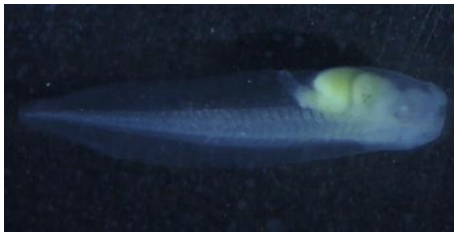
**Figura 5.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.945 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y el intestino mal enrollado.



**Figura 6.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.633 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo y flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



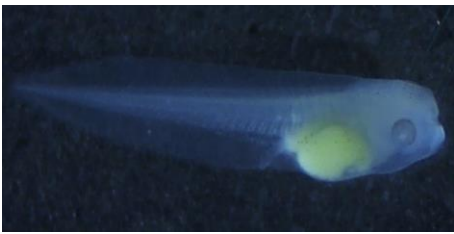
**Figura 7.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.041 mm, con edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



**Figura 8.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.822 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo izquierdo, el intestino mal enrollado y flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



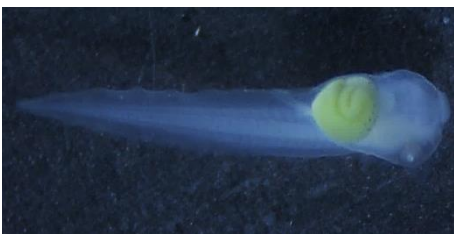
**Figura 9.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.924 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y el intestino mal enrollado.



**Figura 10.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.170 mm, con el intestino mal enrollado.



**Figura 11.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.537 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo derecho, edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



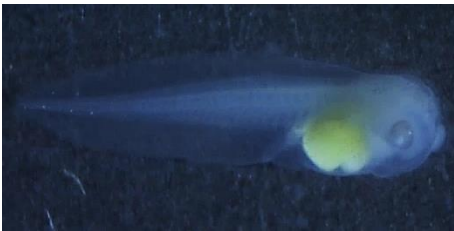
**Figura 12.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.547 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 13.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.212 mm, con el intestino mal enrollado e hipopigmentación ocular.



**Figura 14.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.722 mm, sin malformaciones aparentes.



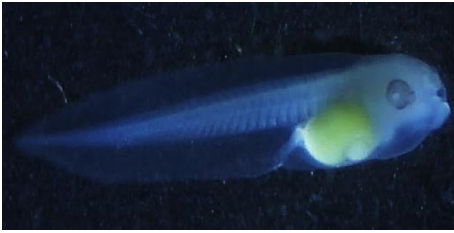
**Figura 15.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.105 mm, con edema cardiaco y malformación de ojo.



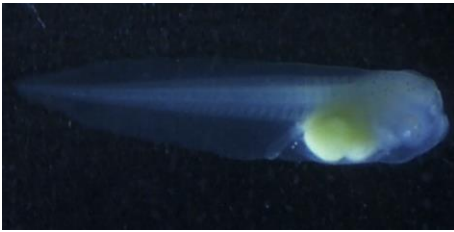
**Figura 16.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 5.951 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardiaco y abdominal), malformación cardiaca, flexión ventral y dorsal debido a una malformación de la notocorda, malformación severa con fracaso total del desarrollo del cerebro y cara, fallo en el desarrollo ocular con rotura severa de la copa óptica, malformación del ano y blistering en la línea dorsal media y en la zona ventral cerca del ano.



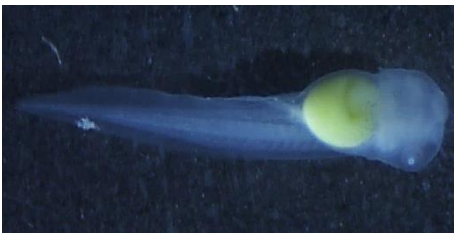
**Figura 17.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.038 mm, con edema cardiaco, malformación facial y el intestino mal enrollado.



**Figura 18.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.843 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, malformación de la notocorda, edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



**Figura 19.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.964 mm, con hipopigmentación ocular y malformación de la notocorda.



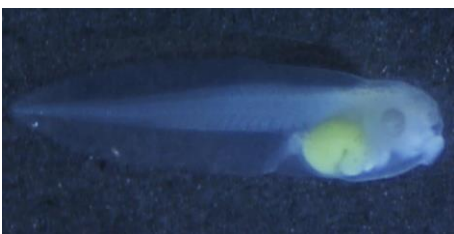
**Figura 20.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.727 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y el intestino mal enrollado.



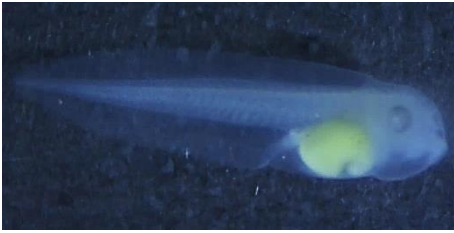
**Figura 21.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.368 mm, con el intestino mal enrollado.



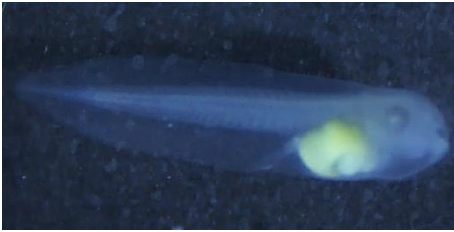
**Figura 22.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.726 mm, con edema múltiple (craneofacial y cardiaco).



**Figura 23.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.024 mm, con el intestino mal enrollado, malformación craneofacial y del ojo.



**Figura 24.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.635 mm, con edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



**Figura 25.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.654 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda, edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



**Figura 26.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.291 mm, con edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



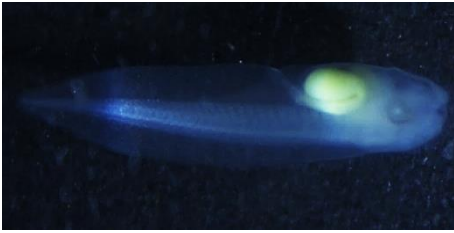
**Figura 27.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.407 mm, con hipopigmentación ocular.



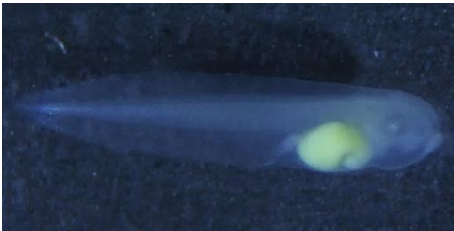
**Figura 28.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.509 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho.



**Figura 29.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.209 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y rotura de la copa óptica en ambos ojos.



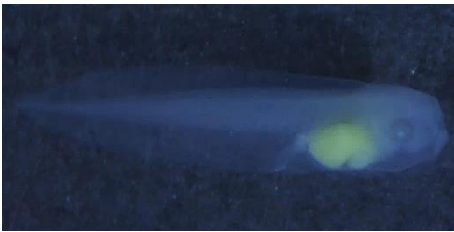
**Figura 30.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.753 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo.



**Figura 31.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.637 mm, con hipopigmentación ocular, edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



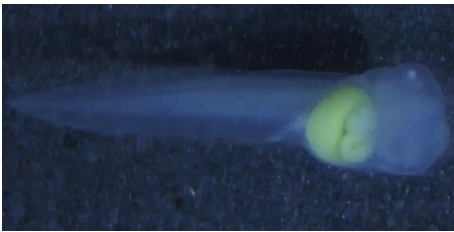
**Figura 32.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.791 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo derecho.



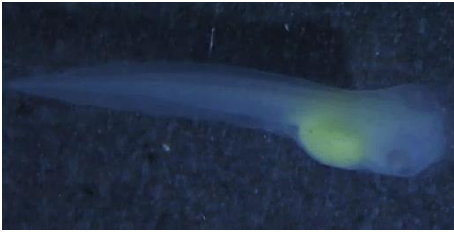
**Figura 33.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.874 mm, con hipopigmentación ocular, edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



**Figura 34.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.225 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo izquierdo y edema cardiaco.



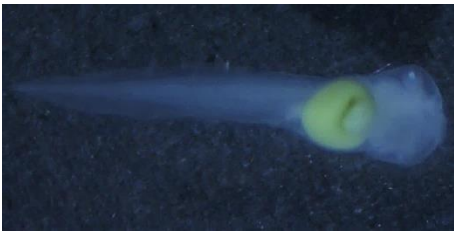
**Figura 35.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.165 mm, con el intestino mal enrollado.



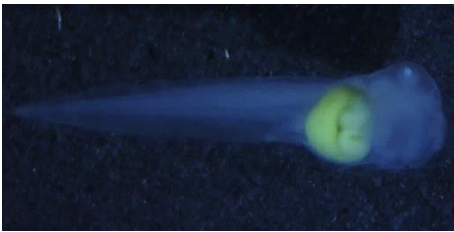
**Figura 36.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.239 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



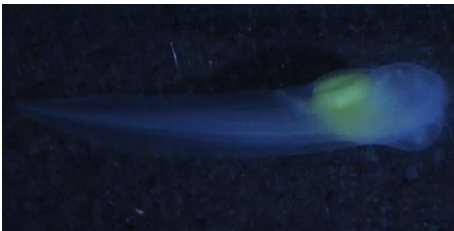
**Figura 37.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.838 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo derecho y el intestino mal enrollado.



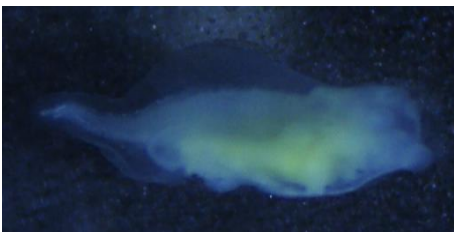
**Figura 38.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.812 mm, con el intestino mal enrollado.



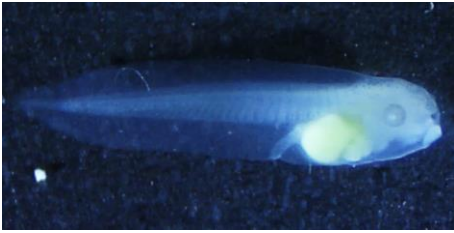
**Figura 39.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.248 mm, con el intestino mal enrollado.



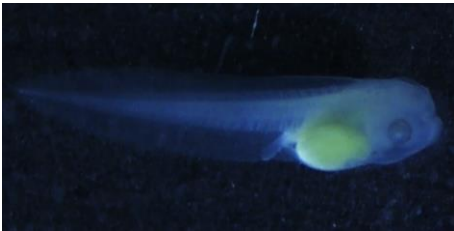
**Figura 40.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.489 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



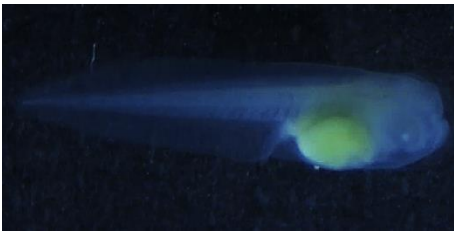
**Figura 41.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 4.589 mm, con falta de enrollamiento del intestino, malformación cardíaca, con la parte distal de la cola flexionada ventral y dorsalmente como producto de un mal desarrollo de la notocorda, malformación severa con fracaso total del desarrollo del cerebro y cara, fallo completo en el desarrollo ocular y hemorragia intestinal.



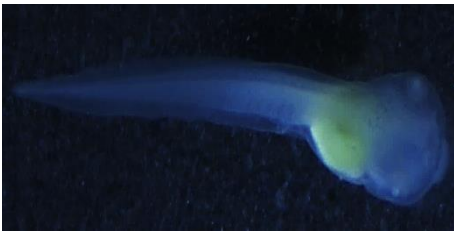
**Figura 42.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.892 mm, con hipopigmentación ocular.



**Figura 43.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.275 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 44.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.351 mm, con hipopigmentación ocular.



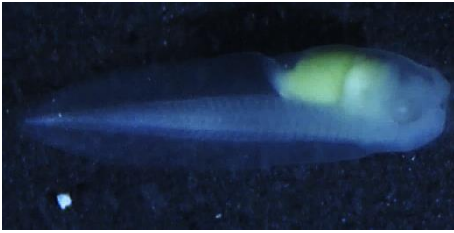
**Figura 45.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.352 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y el intestino mal enrollado.



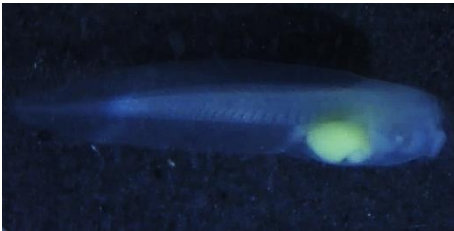
**Figura 46.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.702 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y mal enrollamiento del intestino.



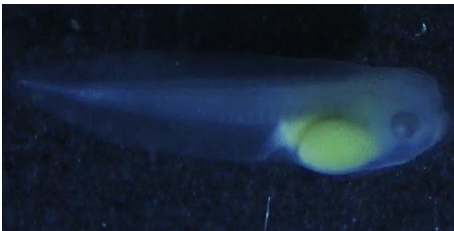
**Figura 47.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.095 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 48.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.863 mm, con rotura severa de la copa óptica en ambos ojos y el intestino mal enrollado.



**Figura 49.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.995 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo izquierdo e hipopigmentación ocular.



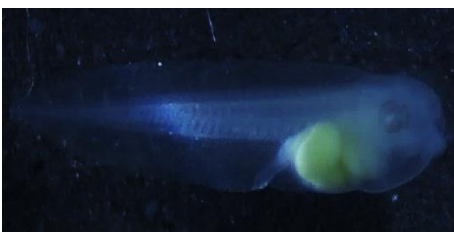
**Figura 50.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.024 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho y edema cardiaco.



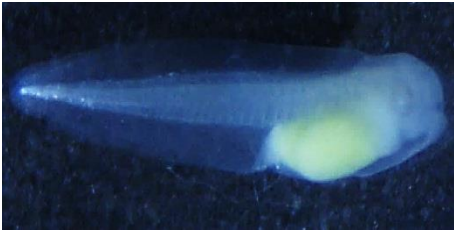
**Figura 51.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.432 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y edema cardiaco.



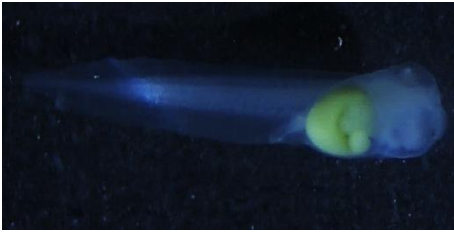
**Figura 52.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.688 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



**Figura 53.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.253 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo, flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y edema cardiaco.



**Figura 54.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.586 mm, con el intestino mal enrollado, hipopigmentación ocular, rotura severa de la copa óptica de ambos ojos, edema cardiaco, malformación craneofacial y del ano.



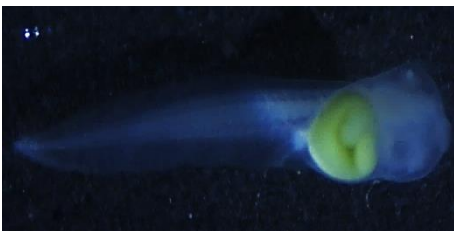
**Figura 55.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.089 mm, con el intestino mal enrollado.



**Figura 56.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.438 mm, con rotura severa de la copa óptica del ojo derecho e hipopigmentación ocular.



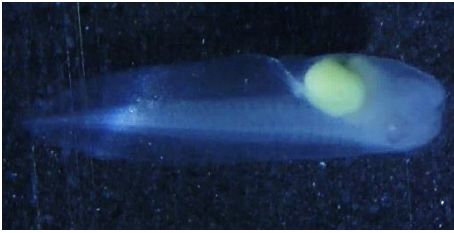
**Figura 57.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.916 mm, con flexión ventral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y edema cardiaco.



**Figura 58.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.267 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y el intestino mal enrollado.



**Figura 59.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.854 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y edema cardiaco.



**Figura 60.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7. 470 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda, rotura severa de la copa óptica del ojo izquierdo e hipopigmentación ocular.



**Figura 61.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.462 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, edema cardiaco y malformación craneofacial.

**Malformaciones de las larvas expuestas a 0.53 mg/L de BP-3 durante 96 horas.**



**Figura 1.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.310 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardiaco y abdominal), flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda, hipopigmentación ocular, blistering en la línea dorsal media, malformación facial y del ano.



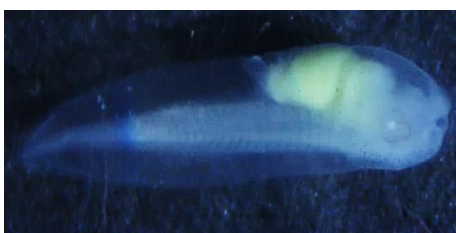
**Figura 2.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.563 mm, con el intestino mal enrollado y edema cardiaco.



**Figura 3.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.181 mm, con el intestino mal enrollado y edema cardiaco.

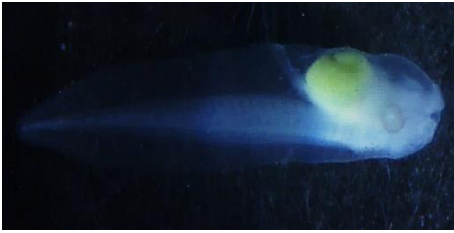


**Figura 4.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.593 mm, con hipopigmentación ocular y edema cardiaco.

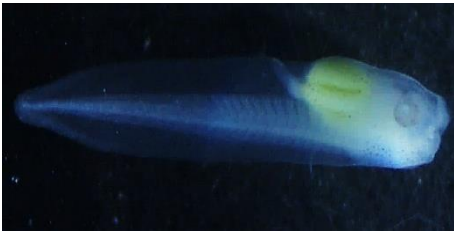


**Figura 5.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.802 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo, hipopigmentación ocular, edema múltiple (cardiaco y abdominal) y malformación en la punta

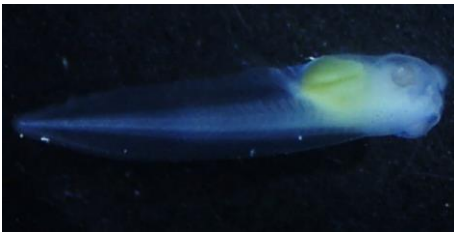
de cola.



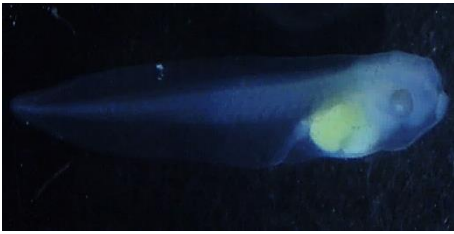
**Figura 6.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.923 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo izquierdo, hipopigmentación ocular y edema cardiaco.



**Figura 7.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.580 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda, rotura de la copa óptica en el ojo izquierdo e hipopigmentación ocular.



**Figura 8.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.967 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo izquierdo y malformación de la notocorda.



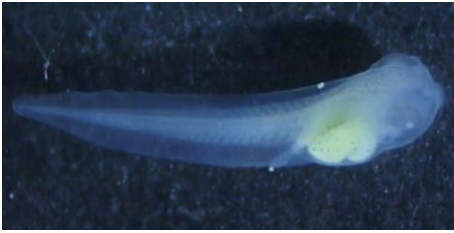
**Figura 9.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.103 mm, con el intestino mal enrollado y edema cardiaco.



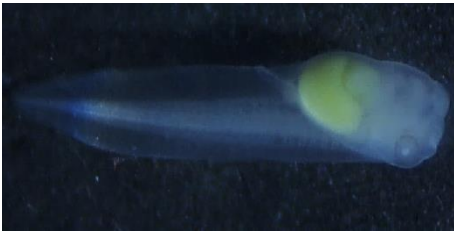
**Figura 10.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.015 mm, sin malformaciones aparentes.



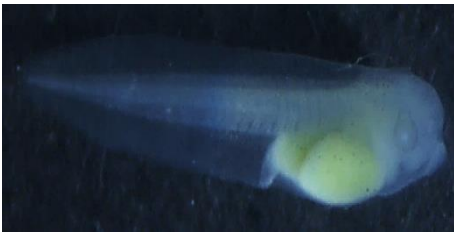
**Figura 11.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.547 mm, con falta de enrollamiento del intestino, hipopigmentación ocular, malformación facial y del ano.



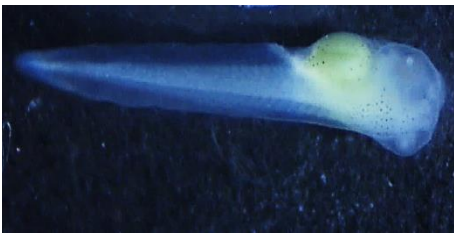
**Figura 12.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.943 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda, hipopigmentación ocular, edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



**Figura 13.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.849 mm, malformación de notocorda y el intestino mal enrollado.



**Figura 14.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.969 mm, con el intestino mal enrollado, hipopigmentación ocular, malformación facial y rotura severa de la copa óptica en ambos ojos.



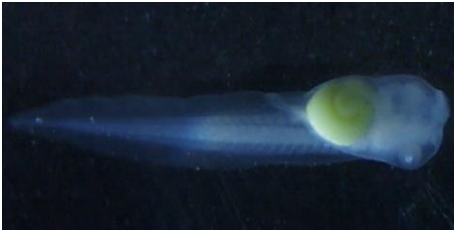
**Figura 15.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.944 mm, con hipopigmentación ocular y malformación facial.



**Figura 16.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.664 mm, con falta de enrollamiento del intestino, flexión dorsal debido a una malformación de la notocorda, malformación facial e hipopigmentación ocular.



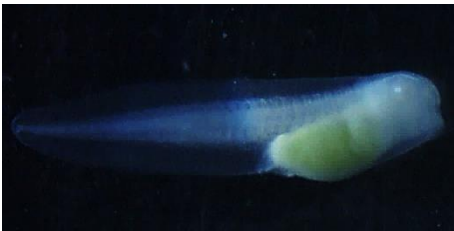
**Figura 17.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.173 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 18.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.361 mm, con el intestino mal enrollado.



**Figura 19.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.746 mm, con hipopigmentación ocular, el intestino mal enrollado y edema cardiaco.



**Figura 20.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.812 mm, falta de enrollamiento del intestino, hipopigmentación ocular, malformación facial, de la notocorda y del ano.



**Figura 21.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.657 mm, hipopigmentación ocular y malformación de la notocorda y ano.



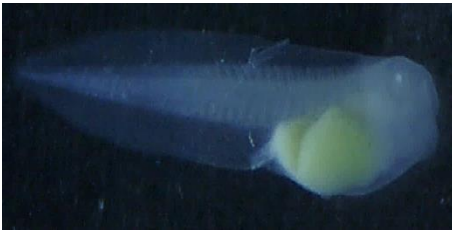
**Figura 22.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.855 mm, con el intestino mal enrollado.



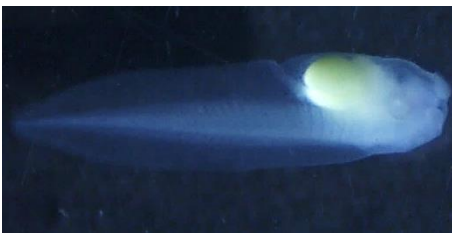
**Figura 23.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.406 mm, con el intestino mal enrollado, malformación facial, hipopigmentación ocular y rotura de la copa óptica en el ojo derecho.



**Figura 24.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.094 mm, con hipopigmentación ocular.



**Figura 25.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.069 mm, con el intestino mal enrollado, hipopigmentación ocular y malformación craneofacial.

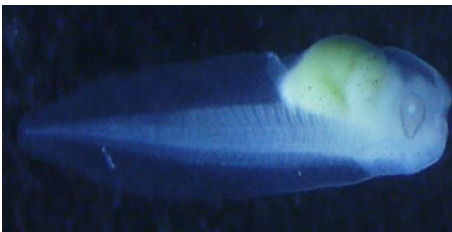


**Figura 26.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.563 mm, con malformación facial, hipopigmentación ocular, flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda, falta de cierre de la fisura coroidea del ojo izquierdo y el intestino

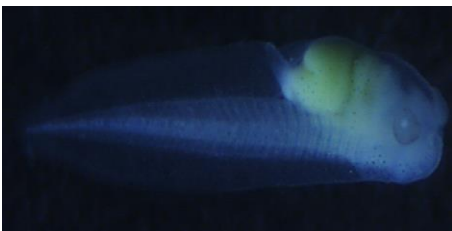
mal enrollado.



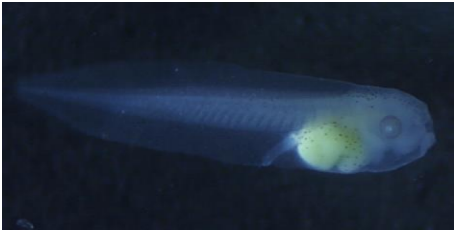
**Figura 27.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.200 mm, con malformación facial, rotura de la copa óptica en el ojo derecho e hipopigmentación ocular, edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



**Figura 28.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.144 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, malformación facial y de la notocorda.



**Figura 29.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.037 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo izquierdo, el intestino mal enrollado y malformación facial.



**Figura 30.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.925 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 31.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.687 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda e hipopigmentación ocular.



**Figura 32.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.315 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho y edema cardiaco.



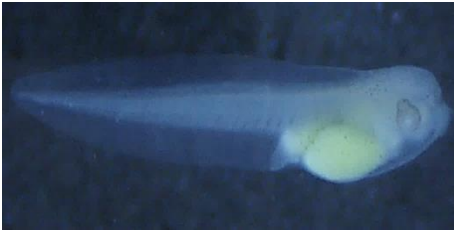
**Figura 33.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.401 mm, con el intestino mal enrollado.



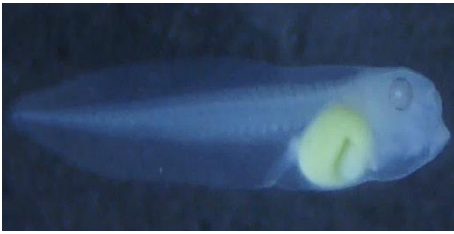
**Figura 34.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.873 mm, con falta de enrollamiento del intestino, hipopigmentación ocular, malformación facial, rotura severa de la capa óptica en el ojo izquierdo y edema abdominal.



**Figura 35.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.546 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, edema cardiaco, malformación facial y del ano.



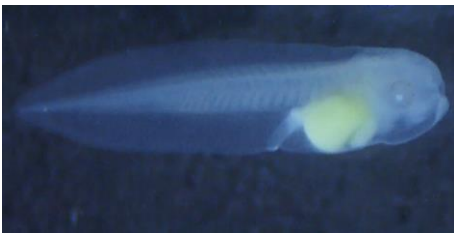
**Figura 36.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.855 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, malformación facial, del ano y de la notocorda.



**Figura 37.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.860 mm, con malformación de cara, edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



**Figura 38.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.995 mm, con flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda.



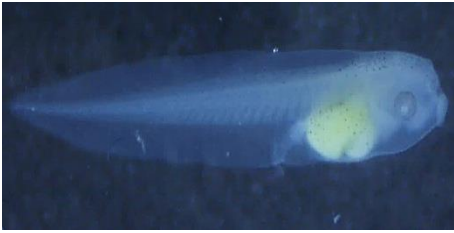
**Figura 39.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.648 mm, con hipopigmentación ocular, malformación de la notocorda y edema cardiaco.



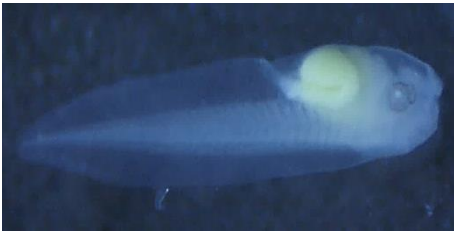
**Figura 40.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.455 mm, con hipopigmentación ocular, malformación facial, edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



**Figura 41.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.185 mm, con hipopigmentación ocular, el intestino mal enrollado, malformación facial y del ano.



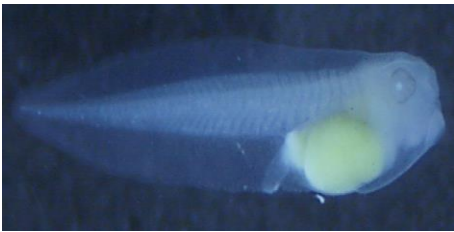
**Figura 42.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.238 mm, con hipopigmentación ocular, edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



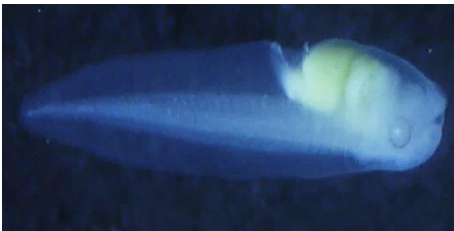
**Figura 43.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.382 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo y el intestino mal enrollado.



**Figura 44.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.927 mm, con hipopigmentación ocular y el intestino mal enrollado.



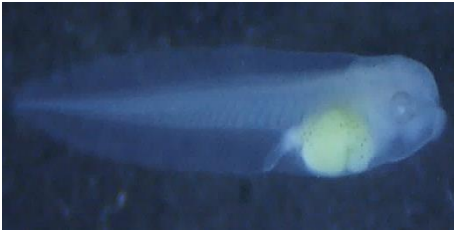
**Figura 45.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.478 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, edema abdominal, malformación facial y del ano.



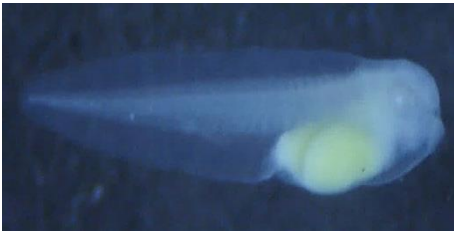
**Figura 46.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.168 mm, con el intestino mal enrollado, flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda y rotura de la copa óptica en el ojo izquierdo.



**Figura 48.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.444 mm, con el intestino mal enrollado.



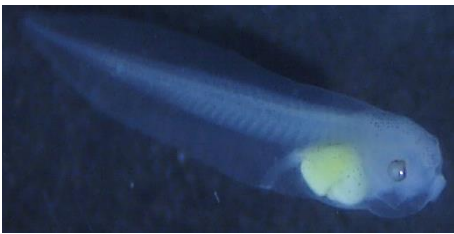
**Figura 48.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.391 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, hipopigmentación ocular y el intestino mal enrollado.



**Figura 49.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.932 mm, con falta de enrollamiento del intestino, malformación facial, hipopigmentación ocular, rotura severa de la copa óptica de ambos ojos y edema abdominal.



**Figura 50.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.281 mm, con falta de enrollamiento del intestino e hipopigmentación ocular.

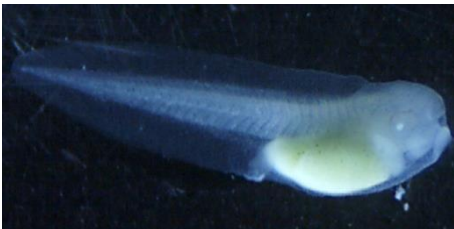


**Figura 51.** Larva de *Xenopus laevis*, 8.068 mm, con rotura de la copa óptica y reducción en el tamaño del ojo derecho.

**Malformaciones de las larvas expuestas a 0.95 mg/L de BP-3 durante 96 horas.**



**Figura 1.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.622 mm, con el intestino mal enrollado y rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho.



**Figura 2.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.748 mm, con falta de enrollamiento del intestino, flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda, malformación facial, hipopigmentación ocular y rotura de la copa óptica en el ojo derecho.



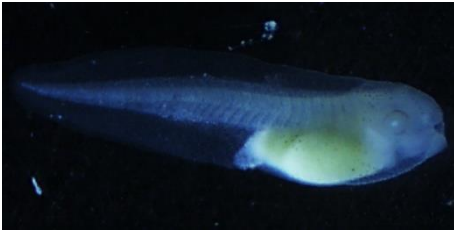
**Figura 3.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.387 mm, con el intestino mal enrollado, hipopigmentación ocular, rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho y edema cardíaco.



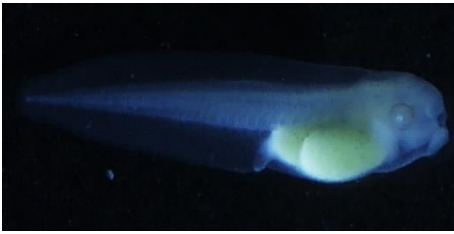
**Figura 4.-** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.579 mm, con hipopigmentación ocular y el intestino mal enrollado.



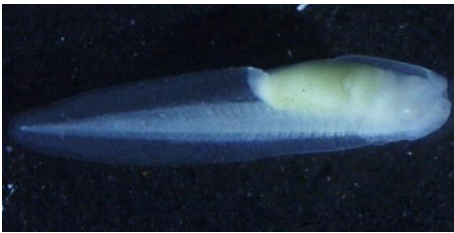
**Figura 5.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.253 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho y edema cardíaco.



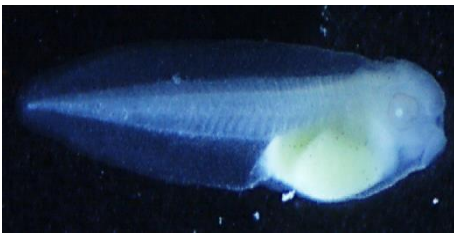
**Figura 6.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.413 mm, con falta de enrollamiento del intestino, flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda, malformación facial y edema abdominal.



**Figura 7.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.166 mm, con falta de enrollamiento del intestino, malformación facial y de la notocorda.



**Figura 8.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.492 mm, con falta de enrollamiento del intestino, hipopigmentación ocular, rotura de la copa óptica del ojo derecho y edema abdominal.



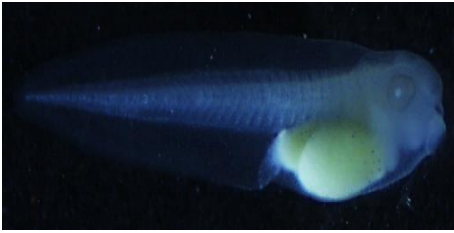
**Figura 9.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.626 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, hipopigmentación ocular y malformación facial.



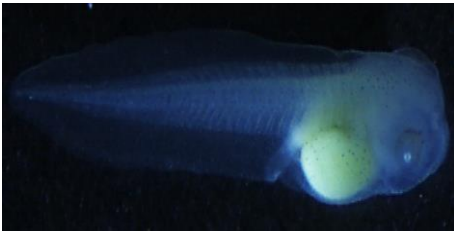
**Figura 10.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.611 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo derecho, malformación facial y el intestino mal enrollado.



**Figura 11.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.206 mm, con falta de enrollamiento del intestino, malformación facial, rotura de la copa óptica en ambos ojos e hipopigmentación ocular.



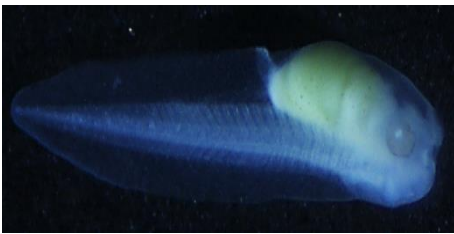
**Figura 12.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.078 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, hipopigmentación ocular, malformación facial y edema abdominal.



**Figura 13.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.709 mm, con rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, el intestino mal enrollado, edema cardiaco y malformación facial.



**Figura 14.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.964 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, malformación facial y edema abdominal.



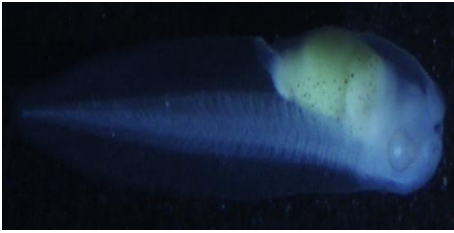
**Figura 15.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.073 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo, edema abdominal, malformación facial y de la notocorda.



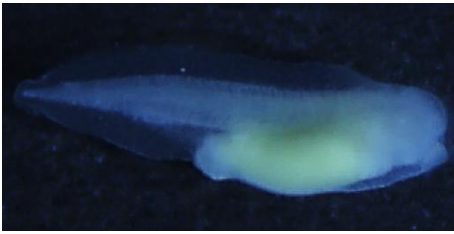
**Figura 16.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.029 mm, con el intestino mal enrollado, malformación facial, rotura de la copa óptica en ambos ojos y edema abdominal.



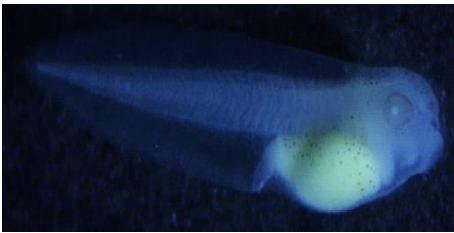
**Figura 17.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.184 mm, con falta de enrollamiento del intestino, hipopigmentación ocular y malformación facial.



**Figura 18.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.267 mm, con el intestino mal enrollado, flexión lateral de la cola como producto de una malformación de la notocorda, malformación facial y rotura severa de la copa óptica en ambos ojos.



**Figura 19.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 5.454 mm, con falta de enrollamiento del intestino, malformación facial, hipopigmentación ocular, flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda y edema abdominal.



**Figura 20.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.867 mm, con el intestino mal enrollado, rotura de la copa óptica en el ojo derecho, malformación de la notocorda y facial.



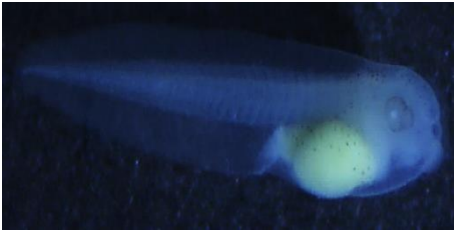
**Figura 21.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.959 mm, con el intestino mal enrollado, edema abdominal, malformación facial y del ano.



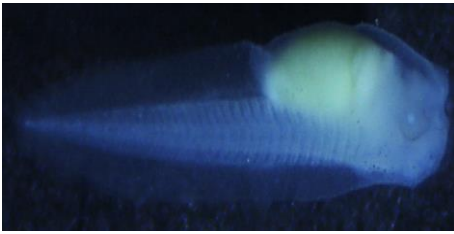
**Figura 22.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.338 mm, con edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



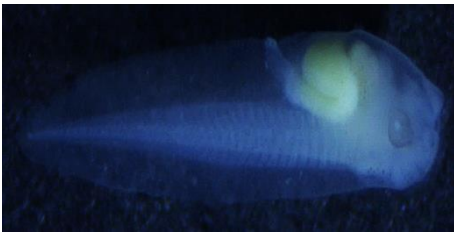
**Figura 23.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.790 mm, con edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



**Figura 24.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.098 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, edema abdominal y malformación facial.



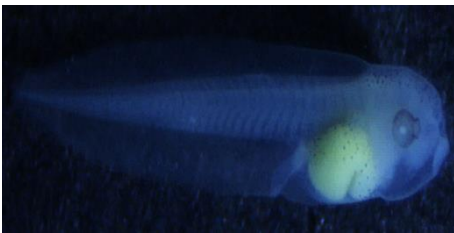
**Figura 25.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.586 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo, hipopigmentación ocular, malformación facial y edema abdominal.



**Figura 26.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.422 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo izquierdo, edema abdominal y el intestino mal enrollado.



**Figura 27.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.055 mm, con rotura de la copa óptica en el ojo derecho y edema cardiaco.



**Figura 28.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.969 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, edema cardiaco y el intestino mal enrollado.

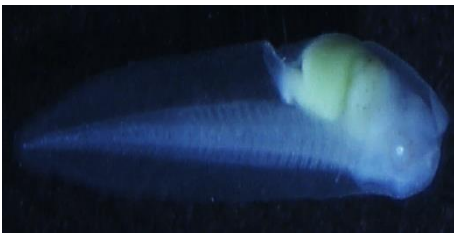


**Figura 29.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.797 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, malformación craneofacial e hipopigmentación ocular.

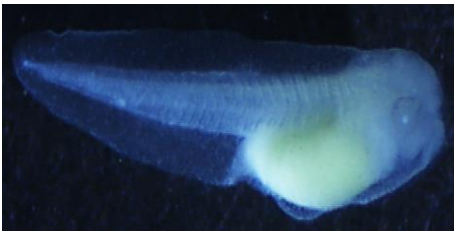


**Figura 30.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 4.147 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardiaco y abdominal), malformación cardiaca, flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la

notocorda, malformación severa con fracaso del desarrollo del cerebro y cara, hipopigmentación ocular, blistering en la zona ventral cerca del ano y malformación del ano.



**Figura 31.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.175 mm, con el intestino mal enrollado, hipopigmentación ocular, rotura de la copa óptica en ambos ojos, edema múltiple (abdominal y cardiaco) y malformación del ano.

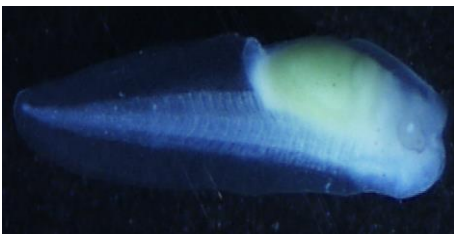


**Figura 32.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.354 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura de la copa óptica en el ojo derecho, malformación facial, edema abdominal y blistering abdominal.

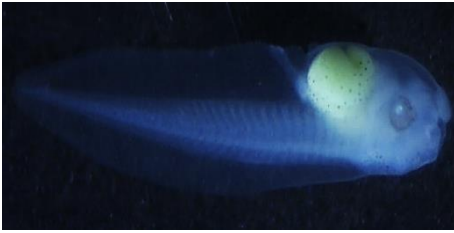


**Figura 33.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 4.710 mm, con falta de enrollamiento del intestino, malformación cardiaca y del ano, flexión ventral de la cola como producto de una malformación de la notocorda, malformación severa con fracaso total

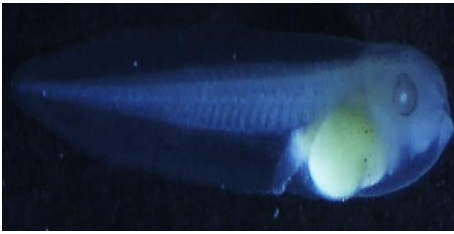
del desarrollo de cara y fallo en el desarrollo ocular con hipopigmentación ocular.



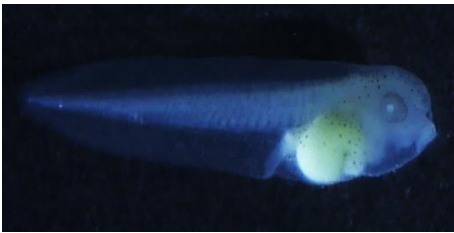
**Figura 34.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.318 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo, hipopigmentación ocular, edema abdominal, malformación facial y del ano,



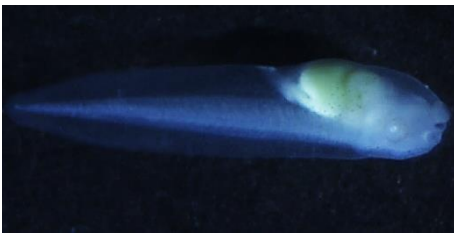
**Figura 35.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.225 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo, edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



**Figura 36.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.409 mm, con rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, el intestino mal enrollado, edema múltiple (cardiaco y abdominal) y malformación facial.



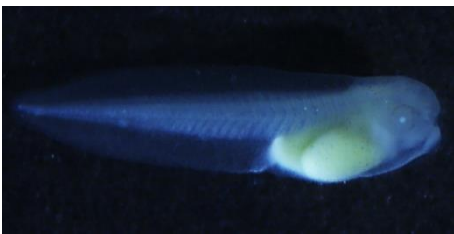
**Figura 37.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.334 mm, con rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, edema cardiaco y el intestino mal enrollado.



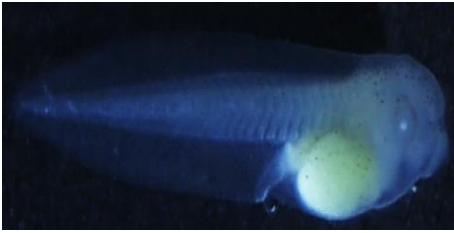
**Figura 38.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.394 mm, con hipopigmentación ocular, el intestino mal enrollado y edema abdominal.



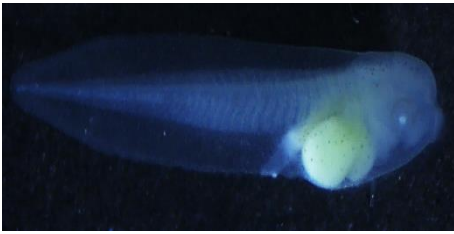
**Figura 39.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.989 mm, con el intestino mal enrollado, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos y edema cardiaco.



**Figura 40.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.891 mm, con el intestino mal enrollado, rotura de la copa óptica en el ojo derecho, hipopigmentación ocular, malformación facial y edema abdominal.



**Figura 41.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.198 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, hipopigmentación ocular, malformación del ano, el intestino mal enrollado y edema abdominal.



**Figura 42.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.670 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, hipopigmentación ocular, edema cardiaco, intestino mal enrollado y malformación del ano.



**Figura 43.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 5.910 mm, con falta de enrollamiento del intestino, malformación facial, del ano y de la notocorda, rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo e hipopigmentación ocular.



**Figura 44.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 8.262 mm, sin malformaciones aparentes.



**Figura 45.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.610 mm, con rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, el intestino mal enrollado, edema múltiple (abdominal y cardiaco), malformación facial y del ano.



**Figura 46.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.701 mm, con el intestino mal enrollado y rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, edema abdominal, malformación facial y de ano.

### Malformaciones de las larvas expuestas a 3.0 mg/L de BP-3 durante 96 horas.



**Figura 1.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.897 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardíaco y abdominal), malformación cardíaca, flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda, malformación facial y del cerebro, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos con hipopigmentación ocular y blistering observada en la línea dorsal media.



**Figura 2.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.603 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardíaco y abdominal), malformación cardíaca, flexión lateral y dorsal de la cola debido a una malformación de la notocorda, malformación facial y del ano, rotura de la copa óptica en ambos ojos con hipopigmentación ocular.



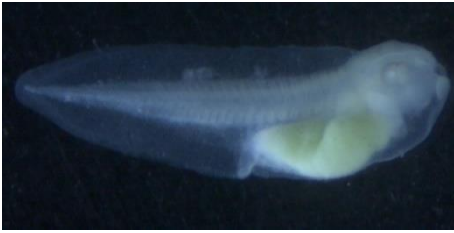
**Figura 3.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.809 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardíaco y abdominal), rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo, hipopigmentación ocular y malformación del ano.



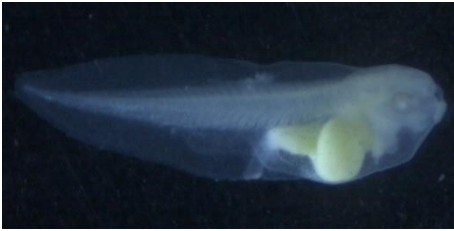
**Figura 4.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.702 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardíaco y abdominal), rotura severa de la copa óptica en ambos ojos y malformación del ano.



**Figura 5.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.934 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardíaco y abdominal), flexión dorsal como producto de una malformación de la notocorda y malformación del ano.



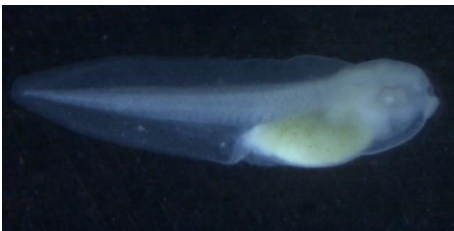
**Figura 6.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.943 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardiaco y abdominal), rotura severa de la copa óptica en ambos ojos con hipopigmentación ocular, flexión dorsal como producto de una malformación de la notocorda y malformación del ano.



**Figura 7.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.210 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, edema múltiple (cardiaco y abdominal) y malformación del ano.



**Figura 8.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.706 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, edema cardiaco y malformación del ano.

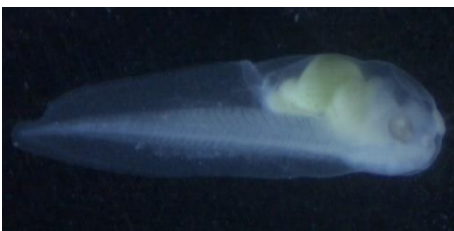


**Figura 9.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.265 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, edema cardiaco, malformación del ano y flexión dorsal como producto de una malformación de la

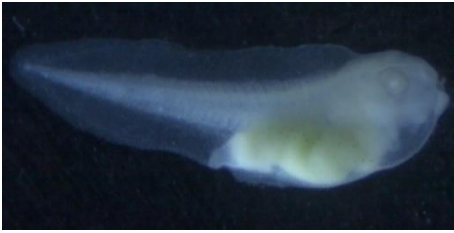
notocorda.



**Figura 10.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.027 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardiaco y abdominal), rotura severa de la copa óptica en ambos ojos y malformación del ano.



**Figura 11.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.387 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo, edema múltiple (cardiaco y abdominal) y malformación del ano.



**Figura 12.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.128 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, edema cardíaco, flexión dorsal como producto de una malformación de la notocorda, malformación

facial y del ano.



**Figura 13.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 5.165 mm, con falta de enrollamiento del intestino, flexión dorsal como producto de una malformación de la notocorda, malformación severa con fracaso en el desarrollo del cerebro, cara y ano, edema

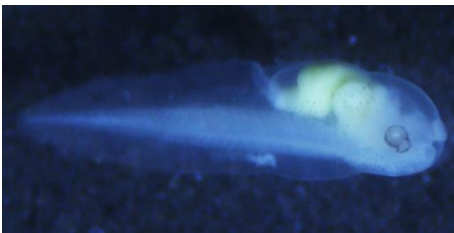
cardíaco, hipopigmentación ocular, blistering observado en la línea dorsal media y en la zona ventral cerca del ano.



**Figura 14.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.150 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema cardíaco y malformación del ano.

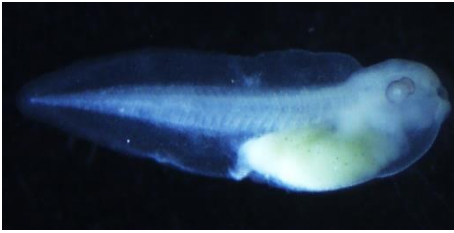


**Figura 15.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.675 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, edema múltiple (cardíaco y abdominal), malformación facial y del ano.



**Figura 16.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.059 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardíaco y abdominal), malformación del ano, rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo y flexión dorsal de la cola

como producto de una malformación de la notocorda.



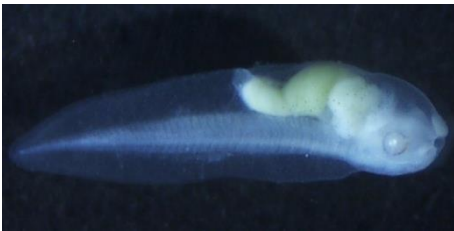
**Figura 17.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.067 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema cardiaco, flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos,

malformación facial y del ano.

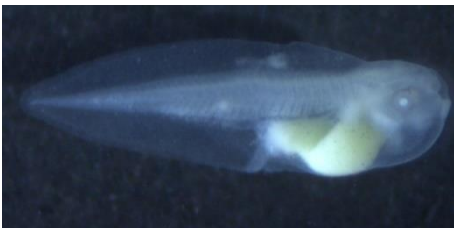


**Figura 18.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.857 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardiaco y abdominal), rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, flexión dorsal de la cola como producto de una

malformación de la notocorda y malformación del ano.



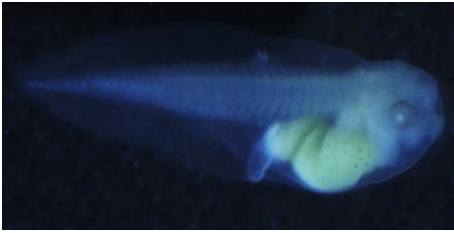
**Figura 19.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.097 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema cardiaco y rotura de la copa óptica en el ojo izquierdo y malformación del ano.



**Figura 20.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.693 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardiaco y abdominal), rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, malformación de la notocorda, facial y del ano.



**Figura 21.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.590 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema cardiaco, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, malformación de la notocorda y del ano.



**Figura 22.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.814 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho y malformación del ano.

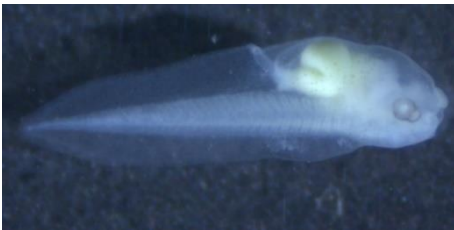


**Figura 23.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.995 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardíaco y abdominal), rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, malformación facial y del ano.



**Figura 24.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.467 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema cardíaco, rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, malformación del ano y flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de

la notocorda.



**Figura 25.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.902 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo, edema cardíaco y malformación del ano.



**Figura 26.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.437 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardíaco y abdominal), rotura severa de la copa óptica en el ojo izquierdo y malformación del ano.



**Figura 27.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.568 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardíaco y abdominal), flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda, rotura severa de la

copa óptica en el ojo derecho y malformación del ano.



**Figura 28.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.303 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, edema cardíaco, flexión de notocorda y malformación del ano.



**Figura 29.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 5.898 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardíaco y abdominal), rotura de la copa óptica en ambos ojos y malformación del ano.



**Figura 30.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.669 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardíaco y abdominal), malformación del ano y flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la

notocorda.



**Figura 31.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 5.856 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura de la copa óptica en ambos ojos, edema múltiple (cardíaco y abdominal), malformación facial y del ano.



**Figura 32.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.038 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema cardíaco, rotura de la copa óptica en el ojo derecho, flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda y

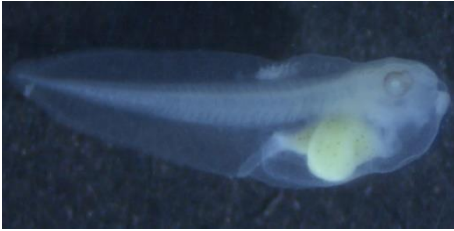
malformación del ano.



**Figura 33.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 6.964 mm, con falta de enrollamiento del intestino, rotura severa de la copa óptica en el ojo derecho, edema cardíaco y malformación del ano.



**Figura 34.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.127 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardiaco y abdominal), rotura severa de la copa óptica en ambos ojos, malformación facial y del ano.



**Figura 35.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.241 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema múltiple (cardiaco y abdominal), flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda, rotura severa de la copa ocular en el ojo derecho, malformación facial y del ano.



**Figura 36.** Larva de rana *Xenopus laevis*, 7.408 mm, con falta de enrollamiento del intestino, edema cardiaco, malformación del ano y flexión dorsal de la cola como producto de una malformación de la notocorda.