

2021

Efectos de la concentración de fenol en la mortalidad, comportamiento y características morfológicas de renacuajos de *Rhinella humboldti*

Carlos Andres Parreño Calvache
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>



Part of the [Biology Commons](#)

Citación recomendada

Parreño Calvache, C. A. (2021). Efectos de la concentración de fenol en la mortalidad, comportamiento y características morfológicas de renacuajos de *Rhinella humboldti*. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/99>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Departamento de Ciencias Básicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

**Efectos de la concentración de fenol en la mortalidad, comportamiento y
características morfológicas de renacuajos de *Rhinella humboldti***

Carlos Andres Parreño Calvache

Universidad de La Salle

Departamento de Ciencias Básicas

Programa de Biología

Bogotá D.C, Colombia

2021

**Efectos de la concentración de fenol en la mortalidad, comportamiento y
características morfológicas de renacuajos de *Rhinella humboldti***

Carlos Andres Parreño Calvache

Trabajo de grado como requisito para optar al título de biólogo

Tutor

Lucia Cristina Lozano Ardila, PhD.

Cotutor

Diana Alexandra Delgadillo Mendez, MSc.

Universidad de La Salle

Departamento de Ciencias Básicas

Programa de Bióloga

Bogotá D.C, Colombia

2021

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco de manera especial primeramente a Dios, a la doctora Lucia Cristiana Lozano Ardila y a la estudiante doctoral Diana Alexandra Delgadillo Méndez, ya que fueron tutoras y realizaron un acompañamiento a lo largo del desarrollo y escritura de este estudio y tesis de pregrado. De igual manera quiero expresar mi agradecimiento a COLCIENCIAS por patrocinar económicamente a este estudio catalogado como proyecto semilla anclado a uno más grade denominado, “Construcción de una herramienta para evaluar la vulnerabilidad ecológica frente al cambio climático y la alteración del hábitat en la Orinoquia colombiana”, por medio de la convocatoria 808 de 2018” así mismo quiero agradecer al Grupo de Ecofisiología, Comportamiento y Herpetología (GECOH) de la Universidad de Los Andes por prestarme los laboratorios y haberme ayudado en la fase experimental del estudio. Así mismo me gustaría agradecer a Comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Universidad de los Andes y al comité de ética de la Universidad de La Salle por brindarme acompañamiento y capacitaciones para el cuidado de los organismos utilizados en este experimento. Igualmente, agradezco a mis padres, que fueron mis patrocinadores a lo largo de la carrera, igual que al Icetex, el programa ser pilo paga 2.0 y a la Universidad los Andes y la Universidad de La Salle ya que contribuyeron a mi formación profesional. Por último, agradezco a mis compañeros de carrera por contribuir a mi proceso formativo, en especial a Jesús Gómez y Laura Pérez por contribuir de manera directa en este estudio.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	7
PALABRAS CLAVE	8
Abstract	8
KEYWORDS	9
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS.	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos.	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Obtención de renacuajos de <i>Rhinella humboldti</i>	14
Bioensayos	14
Toma de datos	16
Análisis de datos.	17
RESULTADOS	19
Porcentaje de mortalidad de los individuos	19
Porcentaje de individuos alimentados (comportamiento)	21

Características morfológicas de los organismos	23
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	25
Efectos del fenol en el porcentaje de mortalidad de renacuajos de <i>R. humboldti</i>	25
Efectos de la postura.....	27
Efectos del fenol sobre el porcentaje de alimentación de renacuajos de <i>R. humboldti</i>	28
Efectos del fenol sobre las características morfológicas de los renacuajos de <i>R. humboldti</i>	29
CONCLUSIONES	30
RECOMENDACIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXOS	38

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Tratamientos control de una de las posturas colectadas.....	15
Figura 2. Vista lateral (A) y la vista dorsal (B) de un renacuajo de <i>Rhinella humboldti</i> demarcado con las siete medidas lineales que se utilizaron en el análisis de las características morfológicas (1: alto del cuerpo, 2: longitud del cuerpo, 3: ancho del cuerpo, 4: alto de la cola, 5: longitud de la cola, 6: profundidad muscular y 7: ancho del músculo de la cola	17

Figura 3. Efecto de la concentración de fenol en la mortalidad de los renacuajos de *R. humboldti* que nacieron de diferentes posturas. 20

Figura 4. Evaluación de comportamiento del hábito alimenticio de los organismos de las posturas 5 y 6 a través del tiempo en concentraciones subletales de fenol..... 22

Figura 5. Efecto de fenol sobre las características morfológicas de renacuajos de *R. humboldti*. A) efecto sobre el promedio del volumen corporal. B) efecto sobre el promedio del tamaño de la cola..... 24

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Valores de p del modelo lineal generalizado anidado utilizando la familia de Poisson en el porcentaje de mortalidad..... 19

Tabla 2. Valores de p del modelo lineal generalizado anidado utilizando la familia de Poisson en el porcentaje de individuos alimentados. 21

Tabla 3. Valores de p del modelo lineal anidado sobre los promedios del volumen corporal.. 23

Tabla 4 Valores de p del modelo lineal anidado sobre los promedios del tamaño de la cola ... 23

Tabla 5 Valores de p de la prueba de Tukey para las diferentes concentraciones de fenol afectando el tamaño de la cola 24

RESUMEN

El fenol, uno de los diversos compuestos que constituyen el petróleo, es usado en diferentes industrias como la de producción de papel y de madera, aunque tiene un alto potencial de contaminación ambiental. Entre sus efectos nocivos, está la afectación sobre los ecosistemas acuáticos, en donde puede causar alteraciones morfológicas en organismos como los anuros. Los efectos varían dependiendo la especie, la fase del desarrollo, y la forma o tiempo de exposición al contaminante. *Rhinella humboldti* es un buen modelo de estudio para evaluar los efectos de este compuesto ya que es un organismo fácil de observar y de manipular, se ha encontrado en 16 departamentos de Colombia teniendo una distribución altitudinal que va desde los 400 m.s.n.m. hasta los 1000 m.s.n.m. Generalmente, se puede encontrar a esta especie en áreas abiertas y perturbadas, en una variedad de hábitats como llanuras bajas, sabanas y bosque secos, además tiene la capacidad de poner entre 4000 y 5000 huevos a manera de cadena dentro del agua; adicionalmente, en Colombia esta especie se encuentra catalogada en la IUCN como “preocupación menor”. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la concentración de fenol en la mortalidad, comportamiento y características morfológicas de los renacuajos de *Rhinella humboldti*. Para ello, se recolectaron un total de 5 posturas, cada una se dividió en diferentes concentraciones de fenol (30, 60, 120, 240, 265 mg/L más un grupo control). La mortalidad se determinó contando el número de individuos muertos en cada uno de los tratamientos, mientras que el comportamiento se determinó por el número de individuos que se alimentaban en un periodo de tiempo de 5 minutos en cada uno de los tratamientos. Las características morfológicas se obtuvieron por medio de fotografías después de la muerte, con las cuales se tomaron 7 medidas del cuerpo del individuo. Se encontró que el fenol tiene un efecto biocida sobre esta

especie, siendo concentraciones de 120, 240 y 265 mg/L altamente tóxicas; además, se observó que a medida que aumenta la concentración de fenol, la mortalidad ocurría más rápido. De igual manera se evidenció un cambio en el comportamiento, encontrando una diferencia entre el grupo control el cual tenía porcentajes de tiempo de alimentación más altos en comparación con los observados en de 60 mg/L del hidrocarburo; por último, al momento de la muerte se observó una disminución en las características morfológicas como lo es el tamaño de la cola por parte de los organismos expuestos a concentraciones de fenol más altas (120, 240 y 265mg/L). Se concluye que el fenol afecta el patrón de alimentación, algunas características morfológicas y ocasiona un aumento en los porcentajes de mortalidad de los renacuajos de *R. humboldti*, afectando de esta manera aspectos importantes en la historia de vida de esta especie.

PALABRAS CLAVE

Hidrocarburo, toxicidad, *Rhinella humboldti*, porcentaje de mortalidad, porcentaje de alimentación, Tamaño de los organismo.

Abstract

Phenol, one of the various compounds that make up oil, is used in different industries such as the production of paper and wood, although it has a high potential for environmental pollution. Among its harmful effects, is the effect on aquatic ecosystems, where it can cause morphological alterations in organisms such as anurans. The effects vary depending on the species, the stage of development, and the form or time of exposure to the contaminant. *Rhinella humboldti* is a good study model to evaluate the effects of this compound since it is an organism easy to observe and manipulate, it has been found in 16 departments of Colombia, having an altitudinal distribution that goes from 400 m.a.s.l. up to 1000 m.a.s.l.

Generally, this species can be found in open and disturbed areas, in a variety of habitats such as low plains, savannas and dry forests, it also has the capacity to lay between 4000 and 5000 eggs in a chain way in the water; additionally, in Colombia this species is listed in the IUCN as "least concern". The objective of this research was to determine the effect of phenol concentration on mortality, behavior and morphological characteristics of *Rhinella humboldti* tadpoles. For this, a total of 5 postures were collected, each one was divided into different concentrations of phenol (30, 60, 120, 240, 265 mg / L plus a control group). Mortality was determined by counting the number of dead individuals in each of the treatments, while the behavior was determined by the number of individuals that fed in a period of time of 5 minutes in each of the treatments. The morphological characteristics were obtained by means of photographs after death, at which 7 measurements of the individual's body were taken. It was found that phenol has a biocidal effect on this species, being concentrations of 120, 240 and 265 mg / L highly toxic; Furthermore, it was observed that as the phenol concentration increased, mortality occurred faster. A change in behavior was evidenced, in comparison to control group, which had higher percentages of feeding time compared to those observed in 60 mg / L of hydrocarbon; finally, at the time of death, a decrease in morphological characteristics such as tail size was observed by organisms exposed to higher phenol concentrations (120, 240 and 265mg / L). It is concluded that phenol affects the feeding pattern, some morphological characteristics and causes an increase in the mortality rates of *R. humboldti* tadpoles, thus affecting important aspects in the life history of this species.

KEYWORDS

Hydrocarbon, toxicity, *Rhinella humboldti*, percentage of mortality, percentage of feeding, Size of organisms

INTRODUCCIÓN

En Colombia la explotación del petróleo se ha intensificado desde el año 1986 convirtiéndose en una actividad de importancia para la economía del país (Perry & Olivera, 2009). Ligado a esta actividad se han presentado grandes derrames de petróleo de forma accidental, debido a errores humanos, errores instrumentales, o incluso debido al conflicto armado interno, lo cual ha afectado algunos de los ecosistemas acuáticos colombianos (Cusaria & Alfonso, 2004). Los efectos negativos de este tipo de derrames se deben a que los hidrocarburos presentan una difícil degradación debido a su compleja estructura química. Además, muchos de los componentes del petróleo crudo como el benceno, tolueno, xileno, fenoles y ácidos carboxílicos, son de difícil eliminación por los organismos, generándose un proceso de bioacumulación como se demostró en el pez *Pseudopleuronectes americanus* (Hellou, Payne, Upshall, Fancey, & Hamilton, 1994).

Muchas especies de vertebrados como peces, reptiles y anfibios pueden ser altamente vulnerables a la presencia de algunos tipos de contaminantes en sus primeras etapas del desarrollo, presentando alteraciones morfológicas, las cuales varían dependiendo de la especie, la forma de exposición o el estado del desarrollo en el que se encuentre el organismo (Hall, 1980). Estos efectos pueden ser negativos; por ejemplo, en los derrames de petróleo, se ha determinado una relación directamente proporcional entre la alteración morfológica y la concentración del hidrocarburo, como se evidenció en individuos neonatos de la tortuga *Chelydra serpentina* expuestos a altas concentraciones de este contaminante. En ese caso en particular, los organismos sufrieron deformidades en el caparazón e incluso una fusión incorrecta de los huesos del cráneo dejando expuesto el cerebro y posteriormente a la muerte (Van Meter, Spotila, & Avery, 2006). Otros estudios, como el llevado a cabo en la serpiente

marina *Enhydrina schistose* han evidenciado la presencia de hidrocarburos en órganos como el riñón, intestino e hígado de animales que han estado expuestos a estas sustancias, lo que supone un gran problema ya que estos contaminantes pueden entrar a la cadena trófica generando un proceso de biomagnificación (Mote, Kumar, Naik, & Ingole, 2015).

El fenol es un derivado del petróleo ampliamente utilizado en la industria en la coquización de carbón, refinerías de petróleo, en la industria química, la obtención de pesticidas, la preservación de la madera, la fabricación de tintes y la producción de pulpa y papel; de igual manera los fenoles también se encuentran en desinfectantes y antisépticos, convirtiéndose en uno de los contaminantes más comunes del agua (World Health Organization, 1994). En Colombia existe este compuesto se encuentra descrito como un residuo peligroso en el anexo A de la resolución 4741 del 2005 en donde se plantea que la concentración de fenol en aguas residuales no debe superar las 0.2 ppm. Sin embargo se ha reportado concentraciones de este hidrocarburo en aguas residuales que supera los 20 mg/L (Domínguez, 2014).

El fenol causa efectos teratógenos y además puede ser letal dependiendo de la concentración a la que se vea expuesto el organismo. Esto fue comprobado en un estudio realizado en embriones de la especie *Bufo arenarum*, en donde la exposición a este hidrocarburo causó mutaciones expresadas en flexión axial, el tapón de vitelo y diferentes anomalías que llevaron a la muerte de las blástulas de estos organismos (Paisio, Agostini, González, & Bertuzzi, 2009). En un estudio similar se determinó que el nitrofenol (un compuesto fenólico) a una concentración de 8,51 mol/L causó un porcentaje de mortalidad del 50% en la especie *Rana japonica* corroborando la actividad biocida de este compuesto (Wang et al., 2019).

De igual manera se ha observado que el fenol puede generar cambios en el comportamiento de los peces, donde se determinó que individuos expuestos a este tipo de contaminantes

tienden a flotar de manera vertical o mostrar un aumento en la frecuencia respiratoria acompañado de sangrado. Además, se presentan alteraciones en la coloración corporal de estos individuos (McKim, Bradbury, & Niemi, 1987). También se observó el efecto biocida de este compuesto en *Poecila reticulata*, determinando que la concentración letal 50 (CL₅₀) es de 31,96 mg/L de fenol (Hermens & Leeuwangh, 1982). Estudios como los mencionados anteriormente demuestran la necesidad de realizar bioensayos con diferentes organismos, ya que de esta manera se pueden observar los diferentes efectos que pueden tener las sustancias químicas cuando son liberadas a los ecosistemas. Además, se puede saber con mayor certeza la concentración en la que dicha sustancia causa un efecto (Ghosh, Thakur, & Kaushik, 2017),

Se ha documentado que el 32,5% de las especies de anfibios se encuentran en estado de vulnerables, en peligro o en peligro crítico, el 7,4% de las especies estaban en peligro crítico y que el 43% de las especies estaban experimentando una disminución de su población (IUCN, Conservation International, & NatureServe. 2008). Esto se debe a que los anfibios son organismos muy sensibles a cambios ambientales, como los que se generan por contaminación. Por lo tanto, se han desarrollado estudios en anuros, en los cuales se evalúa el efecto de compuestos como el glifosato, el cromo o el arsénico que son usados en diferentes prácticas industriales o agrícolas. Se ha comprobado que estos compuestos químicos pueden generar diferentes efectos histológicos en órganos como el hígado (Bach, Marino, Natale, & Somoza, 2018; Samanta, Pal, Mukherjee, & Ghosh, 2020).

Rhinella humboldti es una especie de anuro abundante, fácil de observar y de manipular, la cual se ha encontrado en 16 departamentos de Colombia teniendo una distribución altitudinal que va desde los 400 m.s.n.m. hasta los 1000 m.s.n.m. Generalmente se puede encontrar a

esta especie en áreas abiertas y perturbadas, en una variedad de hábitats como son llanuras bajas, sabanas y bosque secos, además tiene la capacidad de poner entre 4000 y 5000 huevos a manera de cadena dentro del agua. En Colombia esta especie se encuentra catalogada como “preocupación menor” (Montealegre-Delgado, Avendaño-Casadiegos, & Bernal, 2013; Torres-Suárez & Vargas-Salinas, 2014). Además, al igual que los diferentes anuros que presentan dos formas de vida, es de vital importancia realizar estudios de toxicidad ya que puede dar información de los efectos de compuestos contaminantes en ecosistemas acuáticos y terrestres. Por otro lado, diferentes características morfológicas, como lo es una piel altamente permeable, hace que los anfibios se vuelvan más sensibles a dichos compuestos (Costa, Ronco, Trudeau, Marino, & Natale, 2018). Debido a estas características, esta especie es un modelo perfecto de estudio para investigaciones sobre toxicidad en Colombia y por lo tanto es importante evaluar cuáles son los posibles efectos a diferentes concentraciones de fenol sobre variables como la mortalidad, el comportamiento y características morfológicas, las cuales van a incidir en el futuro del organismo o de las poblaciones de la especie *Rhinella humboldti*.

OBJETIVOS.

Objetivo general: Determinar el efecto de la concentración de fenol en la mortalidad, comportamiento y características morfológicas de renacuajos de *Rhinella humboldti*.

Objetivos específicos.

- Determinar el efecto de la concentración de fenol en la mortalidad de renacuajos de *Rhinella humboldti*.
- Estimar el efecto de la concentración de fenol en el comportamiento de renacuajos de *Rhinella humboldti*.

- Determinar cómo la exposición al fenol afecta el las características morfológicas de renacuajos de *Rhinella humboldti*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de renacuajos de *Rhinella humboldti*

Con el fin de evaluar cuáles son los efectos causados por diferentes concentraciones de fenol se colectaron 5 posturas diferentes de *Rhinella humboldti*, en el municipio de Orocué en el departamento del Meta en el mes de octubre del año 2019. Esta actividad fue llevada a cabo por integrantes del grupo de “Ecofisiología, Comportamiento y Herpetología (GECOH)” perteneciente a la Universidad de los Andes. Los individuos fueron llevados desde el lugar de la colecta hasta los laboratorios de la Universidad de los Andes. Estos organismos fueron transportados en frascos plásticos pequeños con tapa y volúmenes de agua bajos, en los cuales permanecieron menos de 3 días.

Bioensayos

Los procedimientos descritos a continuación fueron evaluados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de los Andes (CICUAL). Para medir los efectos del fenol en el porcentaje de mortalidad, comportamiento y características morfológicas, los renacuajos de cada postura de *R. humboldti* fueron divididos en 5 tratamientos y durante 1 mes fueron expuestos a concentraciones de 30, 60, 120, 240 y 265 mg/L del hidrocarburo, Adicionalmente de cada postura se obtuvo un grupo de renacuajos para el control negativo, el cual solo contenía agua destilada reposada. En la primera postura, debido al número de individuos no se pudo obtener replicas, en la segunda postura solo se logró obtener una réplica en el control, en la postura 3 se logró obtener 3 réplicas de todos los tratamientos, en la postura 5 se logró obtener 3

réplicas de todos los tratamientos más 4 réplicas del tratamiento del control, 30, 60 y 120 mg/L de fenol, por último en la postura 6 se lograron obtener 6 réplicas de cada uno de los tratamientos.

En cada uno de los tratamientos se colocaron un total de 3 renacuajos, con menos de 3 días de eclosión, en un vaso de plástico con un volumen total de 50 mililitros de agua destilada reposada y fenol en las concentraciones mencionadas anteriormente. Cada tratamiento también contenía pequeños trozos de Elodea en cada recipiente con el fin de mejorar el microambiente de los tratamientos (Figura 1). El agua de cada réplica se cambió cada 7 días volviendo a agregar la misma concentración final de fenol en cada tratamiento. Los individuos que morían eran retirados de cada tratamiento para evitar contaminación debido al proceso de descomposición. Los organismos se alimentaron a diario con comida comercial para peces de acuario, la comida era granulada y debió ser triturada previamente en un mortero para que los renacuajos la ingirieran.



Figura 1. Tratamientos control de una de las posturas colectadas.

Toma de datos

El efecto del fenol en los renacuajos se determinó en los siguientes aspectos: mortalidad, comportamiento y características morfológicas. La mortalidad se determinó en la totalidad de los organismos (274), cada 24 horas durante todo el experimento, contando el número de individuos muertos en cada tratamiento, sin embargo esta variable fue analizada hasta el 6^{to} día en donde el porcentaje de mortalidad en el control estaba por debajo del 40% como lo indica la EPA (agencia de protección ambiental de Estados Unidos) (Chapman, Denton, & Lazorchak, 1995). Se estimó el porcentaje de mortalidad calculando el número de individuos muertos en cada uno de los tratamientos en cada postura (Araujo et al., 2006).

El comportamiento se evaluó por medio de la actividad de alimentación de los individuos. Para esto, fue necesario que el investigador se acercara lentamente a los recipientes de plástico donde se encontraban los individuos. Los organismos activos se definieron como aquellos que se alimentaban (Relyea, 2001). Las visualizaciones se realizaron durante los primeros 5 minutos después de agregar la comida. Los residuos de comida eran retirados al día siguiente, después de este proceso de extracción se esperaba un periodo de 30 minutos para agregar comida nuevamente. Las observaciones del comportamiento se hicieron sobre los organismos que tuvieron una exposición previa al fenol y que sobrevivieron; por lo tanto, se seleccionaron los expuestos a una concentración de 30 mg/L, 60 mg/L de fenol y el grupo control, concentraciones en las cuales el número total de individuos era 28, además solo se logró realizar estas estimaciones en la postura 5 y postura 6, las cuales contaban con un número de individuos de 68 y 111 respectivamente al inicio del experimento. Las mediciones de esta variable se realizaron 15 días después de haber iniciado el estudio y se observó únicamente en concentraciones subletales (control, 30 y 60 mg/L de fenol).

Las características morfológicas de cada individuo se calculó al momento de su muerte, mediante fotos analizadas en el software ImageJ (Rueden et al., 2017). Se realizaron 7 mediciones de cada renacuajo. Fue necesario realizar tomas de la vista dorsal y lateral de cada individuo para poder realizar las diferentes mediciones que se observan en la Figura 2 (Relyea, 2001), esto mismo se realizó para el total de orgasmos al inicio del experimento (274 individuos) Cada foto de los renacuajos tenía una cuadrícula la cual servía para calibrar la escala de la foto.

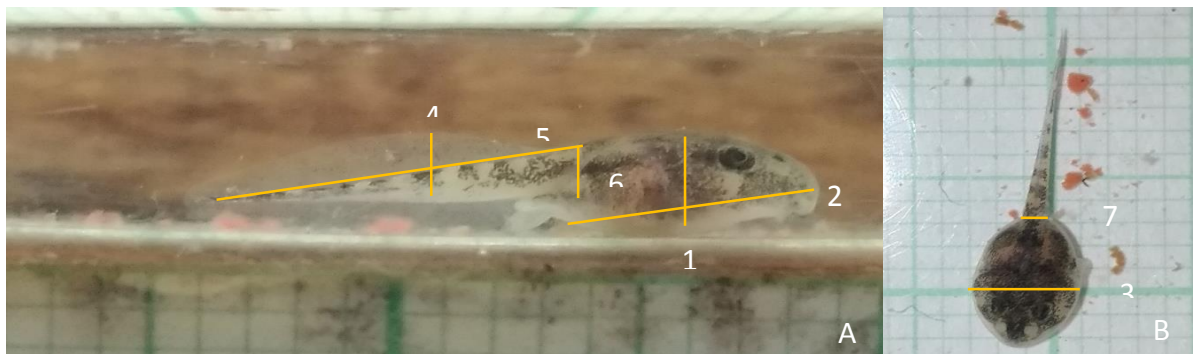


Figura 2. Vista lateral (A) y la vista dorsal (B) de un renacuajo de *Rhinella humboldti* demarcado con las siete medidas lineales que se utilizaron en el análisis de las características morfológicas (1: alto del cuerpo, 2: longitud del cuerpo, 3: ancho del cuerpo, 4: alto de la cola, 5: longitud de la cola, 6: profundidad muscular y 7: ancho del músculo de la cola)

Análisis de datos.

El efecto de la concentración de fenol sobre el porcentaje de mortalidad y el porcentaje de individuos alimentados (comportamiento) se evaluó por medio de modelos lineales generalizados mixtos (López-González & Ruiz-Soler, 2011), usando la familia de Poisson. Estos modelos tenían como variables dependientes el porcentaje de mortalidad y el porcentaje de individuos alimentados, por otro lado se tuvo en cuenta como variables independientes el tiempo de exposición, la concentración de fenol (30, 60, 120, 240, 265 mg/L y el control) y la postura a la cual pertenecía cada individuo, estas variables se encontraban anidadas siendo el tiempo de exposición el nivel mayor, seguido de la postura y por último la concentración de fenol.

La concentración letal 50 se estimó por medio del programa TRAP, con los datos de la mortalidad de los renacuajos de la postura 6 y a los 3 días, debido a que en esta postura habían valor intermedios de mortalidad necesarios para que el programa puede realizar una evaluación estadísticamente relevante; este valor se calculó con el fin de conocer cuáles son las concentraciones subletales del fenol.

Para evaluar la correlación entre las variables morfológicas medidas se realizó un test de Bartlett el cual dio un valor de p de <0.001 , lo que significa que era necesario un análisis de componentes principales (PCA) para reducir las variables. Mediante este PCA se generaron 2 nuevas variables (Tabla A1 de los anexos), el volumen corporal (PCA 1) y el tamaño de la cola (PCA 2), las cuales explicaban el 89.665% de la varianza.

El efecto del fenol sobre las características morfológicas de los renacuajos se evaluó por medio de 2 análisis de regresión lineales, en ambos casos las variables de entrada eran el tiempo de exposición, la concentración (30, 60, 120, 240, 265 mg/L de fenol y el control) y la postura a la cual pertenecía cada individuo y al igual que en los casos anteriores estas variables se encuentran anidadas. Por otro lado, en uno de los casos se evaluó el volumen corporal y en el otro en el tamaño de la cola como variables de salida. Las comparaciones entre las medias de las concentraciones en las variables del tamaño promedio de la cola al momento de la muerte de los organismos se realizaron a través del método de 'Diferencia significativa honesta' de Tukey.

Todos los análisis estadísticos y gráficos prestados se realizaron con el software R (Team, 2016).

RESULTADOS

Porcentaje de mortalidad de los individuos

Se determinó que las concentraciones por debajo de 60 mg/L son subletales debido a que a 3 días de exposición la CL₅₀ del fenol para renacuajos de esta especie es de 98,96 mg/L. De igual manera por medio del análisis lineal generalizado mixto anidado, se logró determinar que tanto el fenol como el tiempo de exposición tuvieron un efecto en la mortalidad de renacuajos de *R. humboldti* (Tabla 1). Se encontró un aumento a través del tiempo en el porcentaje de mortalidad en los grupos de concentraciones letales de 120, 240 y 265 mg/L en donde el 100% de mortalidad se obtuvo en el 2 día (Figura 3).

Tabla 1. Valores de p del modelo lineal generalizado anidado utilizando la familia de Poisson en el porcentaje de mortalidad

Variable	valor de p	Valor de p para la interacción de la postura y concentración de fenol	Valor de p para la interacción de la tiempo y concentración de fenol
Tiempo	<0,001		
Postura	<0,001	<0,001	<0,001
Concentración de fenol	<0,001		

Adicionalmente, se encontró que la postura también tuvo un efecto sobre el porcentaje de mortalidad (Tabla 1, Figura 3). En la Figura 3 se puede observar que hay una diferencia en el patrón de mortalidad en los renacuajos pertenecientes a los grupos de control de las diferentes posturas; las posturas 1, 2 y 3 poseen un mayor porcentaje de mortalidad que las posturas 5 y 6; pero cabe resaltar que la postura 1 contaba con el 10% de los organismos totales empleados en este estudio. Las postura 2 con el 10,8% y las postura 3 con el 19,2%; por lo tanto, el número de individuos obtenidos fue menor a los que nacieron de las posturas 5 y 6.

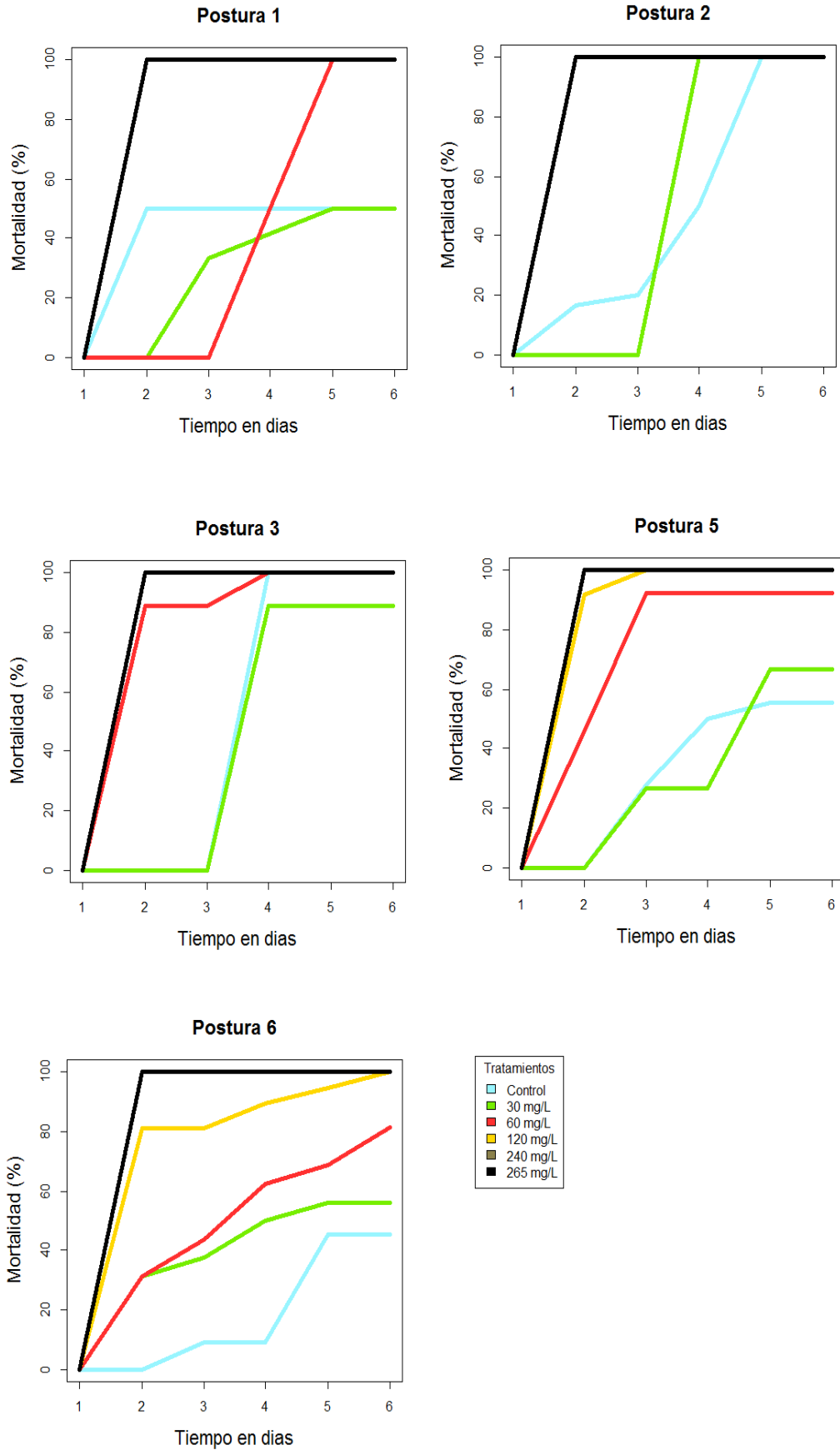


Figura 3. Efecto de la concentración de fenol en la mortalidad de los renacuajos de *R. humboldti* que nacieron de diferentes posturas.

Porcentaje de individuos alimentados (comportamiento)

De igual manera que en la mortalidad, el comportamiento se evaluó por medio de un análisis lineal generalizado mixto anidado en donde se encontró que la concentración del fenol puede causar un efecto negativo sobre los porcentajes de alimentación de los renacuajos de *R. humboldti*, soportando sobre una valor de $p < 0,001$ (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de p del modelo lineal generalizado anidado utilizando la familia de Poisson en el porcentaje de individuos alimentados.

Variable	valor de p	Valor de p para la interacción de la postura y concentración	Valor de p para la interacción de la tiempo y concentración
Tiempo	<0,001		
Postura	<0,001	<0,001	<0,001
Concentración de fenol	<0,001		

En la Figura 4, se puede observar que los renacuajos del control negativo tuvieron un mayor porcentaje de individuos alimentados que los organismos del resto de tratamientos, mientras que los renacuajos de la concentración de 60 mg/L fueron los que en general, presentaron menores porcentajes de alimentación.

Así mismo en la Tabla 2, se puede observar que la posturas tienen un efecto sobre los diferentes patrones de comportamiento en los renacuajos de *R. humboldti* soportado en el valor de $p < 0,001$. De igual manera se puede observar en la Figura 4, que los organismos expuestos a la concentración de 30 mg/L de fenol, pertenecientes a la postura 5 difieren y en general tienen porcentajes de alimentación más bajos, en comparación con los organismos que se encontraban expuestos a la misma concentración del hidrocarburo, pero que pertenecía a la postura 6.

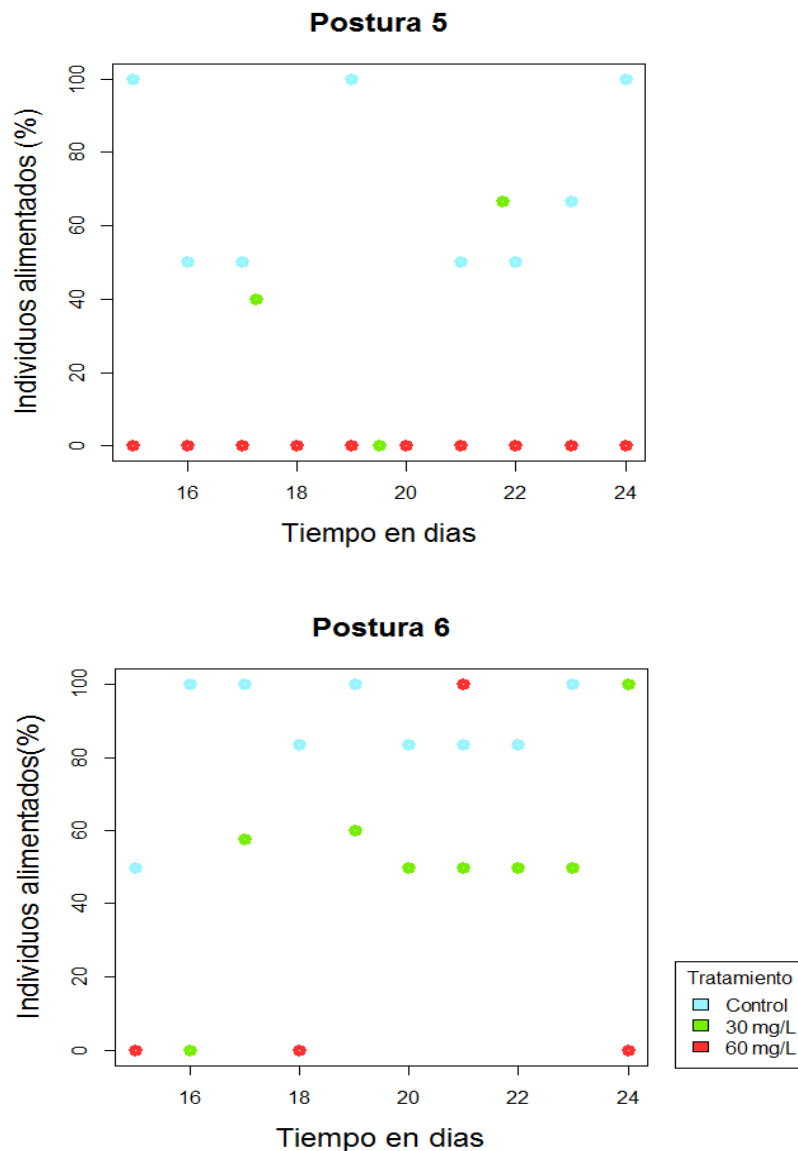


Figura 4. Evaluación de comportamiento del hábito alimenticio de los organismos de las posturas 5 y 6 a través del tiempo en concentraciones subletales de fenol.

También se logró identificar dos interacciones como se muestra en la Tabla 2, la primera de ellas nos da a entender que a medida que el tiempo de exposición y la concentración de fenol son mayor, los organismos son más sensibles al hidrocarburo y por lo tanto los porcentajes de alimentación tienden a disminuir. La segunda interacción explica que la variabilidad genética propia de los organismos (postura) puede influir en el efecto negativo que el fenol

pueda tener en los porcentajes de alimentación. Las dos interacciones cuentan con valores de p estadísticamente relevantes mostrados en las Tabla 2

Características morfológicas de los organismos

El volumen corporal y el tamaño de la cola de los individuos de *R. humboldti* cambian cuando estos se ven expuestos al fenol ($p = 0,018$ y $p = 0,029$ respectivamente) (Tablas 3 y 4). En la Figura 5 se puede observar que aquellos organismos expuestos a concentraciones de fenol iguales o superiores a 60 mg/L, poseían menores tamaños de la cola (PCA 2) en comparación con los organismos que se encontraban en el control negativo. Esto mismo ocurre con el tiempo de exposición, se observa que aquellos organismos que se encontraban en concentraciones entre 30 y 120 mg/L de fenol, a través de tiempo poseían menores tamaños de la cola.

Tabla 3. Valores de p del modelo lineal anidado sobre los promedios del volumen corporal

Volumen corporal		
Variables independientes	Valores de P	R² ajustado
Concentración de fenol	0,018	
Tiempo	0,004	0,315

Tabla 4 Valores de p del modelo lineal anidado sobre los promedios del tamaño de la cola

Tamaño de la cola		
Variables independientes	Valores de P	R² ajustado
Concentración de fenol	0,029	0,405
Tiempo	0,002	

Al realizar la prueba de Tukey para comparar el efecto entre las diferentes concentraciones de fenol en el PCA 2, se determinó que hay una diferencia significativa en el tamaño de la

cola de los renacuajos expuestos a las concentraciones de 60 mg/L, 120 mg/L, 240 mg/L y 265 mg/L con el control negativo (Tabla 5).

Tabla 5 Valores de p de la prueba de Tukey para las diferentes concentraciones de fenol afectando el tamaño de la cola

Promedio del tamaño de la cola al momento de la muerte	
Comparaciones	Valor de p
control-60mg/L	<0,001
control-120mg/L	<0,001
control-240mg/L	<0,001
control-265mg/L	0,001

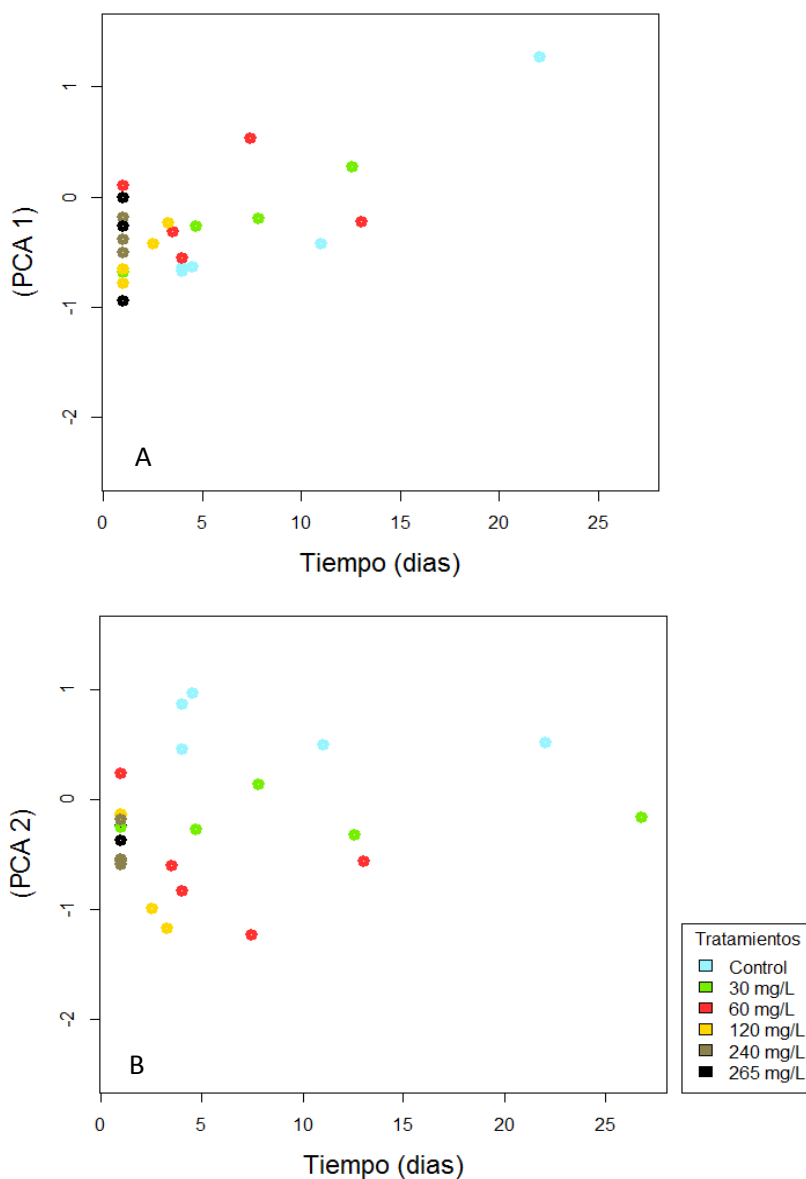


Figura 5. Efecto de fenol sobre las características morfológicas de renacuajos de *R. humboldti*. A) efecto sobre el promedio del volumen corporal. B) efecto sobre el promedio del tamaño de la cola.

Como se observa en la Figura 5B, la cola de los organismos del grupo control fueron de mayor tamaño que las de los individuos expuestos a 60 mg/L de fenol. Es importante resaltar que el PCA 2 (tamaño de la cola) explica el 40% de la varianza del modelo. Por otro lado, sí se observa la Figura 5A no hay un patrón que explique si la concentración de fenol tiene un efecto sobre el volumen corporal de los renacuajos, aunque en la TABLA 3 el valor de p para dicha variable es de 0,018.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Efectos del fenol en el porcentaje de mortalidad de renacuajos de *R. humboldti*.

En este estudio se comprobó el efecto biocida que puede tener el fenol. Este se debe a que generalmente este compuesto es metabolizado dentro de la célula por acción del citocromo P450, una familia de hemoproteínas, responsables de la oxidación de xenobioticos (Donato, 2004). Estas transformaciones, a veces ocasionan que el compuesto se vuelva aún más toxico generado metabolitos electrofílicos que pueden unirse y causar daños en el ADN o las proteínas (Hansch, McKarns, Smith, & Doolittle, 2000). Sin embargo, esta vía de acción depende la hidrofobicidad del fenol, ya que este puede estar acompañando de átomos de cloro, grupos metilo o alquilo, cambiando así la solubilidad del compuesto, obteniendo una actividad peroxidativa, volviéndose hematotóxico y hepatotóxico (Michałowicz & Duda, 2007).

Se logró demostrar que la exposición a diferentes concentraciones de fenol incide en el porcentaje de mortalidad en renacuajos de *R. humboldti*, ya que se puede observar que la mortalidad aumenta, llegando al 100% al cabo de 2 días cuando estos se encuentran en concentraciones de fenol letales como lo son 120, 240 y 265 mg/L. La relación encontrada en este estudio entre la concentración y la mortalidad fue similar a lo encontrado en

embriones de *Xenopus* y de *B. arenarum*, donde se ratifica que la concentración de fenol tiene un efecto proporcional al porcentaje de mortalidad (Bernardini et al., 1996; Paisio et al., 2009). Sin embargo, sí se muestra una diferencia en la CL₅₀ puesto que para *R. humboldti* es de 98,96 mg/L y para *Xenopus* y de *B. arenarum* es de 183,70 mg/L, lo que indica que la especie utilizada en este estudio es mucho más sensible al fenol. Estas diferencias en la CL₅₀ se debe a que la sensibilidad al fenol puede variar dependiendo de la especie que se encuentre en contacto con el compuesto (Hall, 1980).

En este estudio, también se observó que el tiempo de exposición tenía un efecto sobre la mortalidad de los renacuajos *R. humboldti*. Este mismo efecto se observó en un estudio realizado por Wang et al (2019) en renacuajos de *R. chensinensis* que fueron expuestos a diferentes concentraciones de compuestos fenólicos como el nitrofenol. En ese estudio, por medio de un análisis QSAR, se reportó un aumento en la toxicidad de manera proporcional al aumento del tiempo de exposición debido a que la absorción no logra llegar a un estado estacionario en los primeros momentos de exposición (Wang et al., 2019).

En otro estudio, se demostró que la exposición a diferentes concentraciones de pirimetanil y tebuconazol tenían un efecto inversamente proporcional con el porcentaje de supervivencia de los renacuajos de *H. intermedia*, resultados similares a los encontrados en este estudio, en los renacuajos de *R. humboldti* que fueron expuestos diferentes concentraciones de fenol. Sin embargo, en la investigación realizada con los funguicidas, se observó que a partir del día 6^{to} de exposición, la mortalidad aumentaba más rápido en concentraciones más bajas, esto se debe a que estos dos químicos pueden actuar como descriptores endocrinos, generando diferentes desequilibrios hormonales (Bernabò et al., 2016), lo cual no sucedió con los renacuajos de *R. humboldti* expuestos a fenol.

Efectos de la postura

Nuestros resultados también sugieren que la postura tiene un efecto en el porcentaje de mortalidad de los renacuajos de *R. humboldti*, ocasionando posiblemente que algunos renacuajos sean más tolerantes al fenol en concentraciones subletales como la concentraciones de 60 mg/L, resultados que se pueden observar en la Figura 3. Los efectos del fenol pueden ir de la mano con la variabilidad genética de los organismos. Estos resultados son similares a los encontrados en renacuajos de *H. versicolor*, donde se evaluó el efecto de la presencia de la variación genética en la tolerancia al insecticida carbarilo. Los resultados de este estudio sugieren que la tolerancia al contaminante depende de la variabilidad genética de los organismos, sin embargo hay otra variables como la edad o las características morfológicas que pueden dar respuesta a los efectos aquí presentados sin embargo dichas variables no fueron tenidos en cuenta (Semlitsch, Bridges, & Welch, 2000).

Como se ha mostrado que el fenol genera alteraciones a nivel molecular tanto en el ADN como en las proteínas, causando una serie de mutaciones que dan como consecuencia fenotipos distintos a los que se ven en condiciones normales (Hansch et al., 2000). En la literatura se afirma que los diferentes compuestos fenólicos pueden actuar de diferentes formas, por ejemplo pueden afectar el ADN de los organismos causando de esta manera, los aumentos en los porcentajes de mortalidad; por otro lado también se ha documentado que los fenoles pueden afectar diferentes rutas metabólicas como lo son el almacenamiento de lípidos (Smolders, De Coen, & Blust, 2005) o diferentes funciones hormonales (Xie et al., 2019), generando patrones extraños en el comportamiento y causando disminuciones o efectos tanto en el crecimiento, como en las características morfológicas de individuos expuesto a este tipo de agente orgánico.

Efectos del fenol sobre el porcentaje de alimentación de renacuajos de *R. humboldti*

Al momento de evaluar el comportamiento de los renacuajos expuestos a concentraciones subletales de fenol, se determinó que este compuesto afecta la actividad de alimentación (Tabla 2), encontrando que el porcentaje de los renacuajos de *R. humboldti* que se alimentaron disminuye cuando la concentración es mayor, como se puede observar en la Figura 4.

Resultados similares se obtuvieron en estudios anteriores como el realizado con renacuajos de *Lithobates castebianus* expuestos a diferentes concentraciones de un herbicida llamado DMA 806. Freitas et al (2019) demostraron que había cambios significativos del comportamiento cuando los renacuajos eran expuestos a concentraciones altas del compuesto, y también que mayores concentraciones de DMA 806 causaron una disminución en la velocidad máxima de natación y en la tasa de respiración de los renacuajos debido a un cambio en el porcentaje de lípidos en los organismos expuestos al herbicida (Freitas et al., 2019). Estos resultados se deben a que los contaminantes como el fenol o los herbicidas causan alteraciones no solo a nivel celular, sino también a nivel metabólico o en la movilización de sus componentes bioquímicos, lo cual depende del estado de salud en los organismos (Sheridan, 1994). Además, se sabe que las exposiciones constantes a algunas sustancias pueden ocasionar que la energía reservada se destine al mantenimiento de procesos generales como la desintoxicación, alterando de esta manera la homeostasis energética y el comportamiento de los organismos (Smolders et al., 2005).

Efectos del fenol sobre las características morfológicas de los renacuajos de *R. humboldti*.

Como se mostró en los resultados (Figura 5), las características morfológicas de los renacuajos de *R. humboldti* fueron analizadas a partir de dos variables, el tamaño de la cola y el volumen corporal. En este trabajo se observó que el efecto del fenol sobre estas dos variables es diferente, ya que, se pudo observar que el tamaño de la cola de los organismos en el grupo control eran más grandes en comparación con los que fueron expuestos a una concentración de 60 mg/L y con concentraciones letales como 120, 240 y 265 mg/L (Tabla 4, Figura 5).

En un estudio realizado por Paisio et al., en el 2009 se encontró que el fenol puede causar diferentes mutaciones en embriones del anuro *B. arenarum*. Dentro de estas malformaciones se encuentra la reducción axial, es decir que cuando estos organismo se encontraban en concentraciones altas de fenol, la probabilidad de generar cambios en su morfología aumentaba. Estos mismo resultados se observaron en renacuajos de genero *Xenopus*; se demostró que la exposición a altas concentraciones de fenol causaba malformaciones en estos organismos (Bernardini et al., 1996).

Resultados similares se observaron con el octilfenol, un compuesto usado en la producción de plásticos, textiles, algunos productos agrícolas, emulsificación, entre otros usos, además de ser una derivado del fenol (Priac et al., 2017). Esta sustancia causó un efecto negativo en el crecimiento corporal de renacuajos de la especie *R. chensinensis* que fueron expuestos a concentraciones de 10^{-7} y 10^{-6} mol/L de octilfenol; esto se debe a que este compuesto disminuye la expresión de la hormona tiroidea (Xie et al., 2019). Esto puede ser una explicación para los resultados obtenidos en el tamaño de la cola, como se puede observar en la Figura 5B don se evidencia que hay una disminución del tamaño de la cola en

concentraciones de fenol iguales y superiores a 60 mg/L. Sin embargo, es importante resaltar que los organismos pueden responder de diversas maneras a diferentes compuestos químicos e incluso a diferentes concentraciones. Un ejemplo claro de esto son los efectos sobre el tiempo de metamorfosis y la longitud corporal que se presentan en renacuajos de *R. arenarum* expuestos a atrazina. En ese caso se encontró que la exposición a ese compuesto aumentó la longitud corporal y los tiempos de metamorfosis en comparación a los grupos control (Brodeur, Sassone, Hermida, & Codugnello, 2013).

Los diferentes cambios morfológicos y comportamentales en los renacuajos de *R. humboldti*, pueden darse como una respuesta inducida, la cual surge gracias a las perturbaciones ambientales, mediante la cual todos los organismos tienen la capacidad de expresar fenotipos alternativos, esto depende de la intensidad del cambio ambiental al que se exponen, como lo es estar en presencia de un compuesto químico (Levis & Pfennig, 2019).

CONCLUSIONES

El fenol tuvo un efecto negativo tanto en la sobrevivencia como en el patrón de alimentación de renacuajos de *R. humboldti*. Ese efecto fue dependiente de la dosis de exposición. A medida que la concentración de fenol aumentaba, también lo hacía el porcentaje de mortalidad; todo lo contrario, al comportamiento, puesto que cuando la concentración aumentaba los porcentajes de individuos alimentados disminuía, lo que sugiere que *R. humboldti* es altamente sensible a concentraciones que se encuentren por encima de 60 mg/L de fenol.

Además, es importante resaltar el papel que cumplen las posturas en los resultados obtenidos en este estudio, ya que se puede observar diferencias en los patrones de comportamiento en las variables mortalidad, porcentajes de alimentación y las características morfológicas

dependiendo de las posturas que se estén analizando. Lo que sigue es una interacción entre la postura o la variabilidad genética y la concentración de fenol a la que los organismos se ven expuestos.

Por otro lado, en este estudio no se encontró evidencia estadística para afirmar que el fenol no afecta el volumen corporal en los renacuajos de *R. humboldti*; sin embargo, cuando se trata del tamaño de la cola, existe evidencia para afirmar que el fenol causa una disminución en esta característica y esta relación es inversamente proporcional con la concentración, afirmando de esta manera que, a una mayor concentración de fenol habrá organismos con colas pequeñas en comparación a otros individuos que no estuvieron en contacto con este hidrocarburo.

De manera general se puede observar que el fenol en concentraciones iguales y superiores a 60 mg/L puede afectar el porcentaje de mortalidad, de alimentación y las características morfológicas en la especie de anuro *Rhinella humboldti*, Esto quiere decir que existe evidencia para afirmar que el fenol en concentraciones subletales, las cuales se encuentran en el ambiente, va a afectar variables como el comportamiento o el tamaño de la cola de este organismo los renacuajos de *Rhinella humboldti*

RECOMENDACIONES

Es importante realizar pruebas en las cuales se determinen alteraciones en el ADN o en hormonas causadas por el fenol y así determinar de manera más precisa el modo de acción de este hidrocarburo sobre los renacuajos de *R. humboldti*, así mismo es importante incluir variables como los tamaños de los organismos, edad y estadíos larvales con el fin de tener resultados más precisos. También es importante realizar estudios de este tipo incluyendo más variables ambientales e incluso en lo posible realizar estudios *in situ* y de esta manera tener

más información sobre cómo afectaría el fenol en los ecosistemas, ya que se sabe que la sensibilidad de una especie puede depender de diferentes variables como la temperatura o la presencia de depredadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Araujo, C. V. M., Cohin-de-Pinho, S. J., Santos, J. da S., Delgado, F., Santana, L. C. S., Chastinet, C. B. A., & da Silva, E. M. (2006). In situ and laboratory bioassays using *Poecilia reticulata* Peters, 1859 in the biomonitoring of an acidic lake at Camaçari, BA, Brazil. *Chemosphere*, 65(4), 599–603.
- Bach, N. C., Marino, D. J. G., Natale, G. S., & Somoza, G. M. (2018). Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 202, 289–297.
- Bernardini, G., Spinelli, O., Vismara, C., Presutti, C., Bolzacchini, E., Orlandi, M., & Settimi, R. (1996). Evaluation of the developmental toxicity of the pesticide MCPA and its contaminants phenol and chlorocresol. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 15(5), 754–760.
- Brodeur, J. C., Sassone, A., Hermida, G. N., & Codugnello, N. (2013). Environmentally-relevant concentrations of atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 10–17.
- Chapman, G. A., Denton, D. L., & Lazorchak, J. M. (1995). *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine*

and estuarine organisms. US EPA, Office of Research and Development, National Exposure Research

Costa, C. S., Ronco, A. E., Trudeau, V. L., Marino, D., & Natale, G. S. (2018). Tadpoles of the horned frog *Ceratophrys ornata* exhibit high sensitivity to chlorpyrifos for conventional ecotoxicological and novel bioacoustic variables. *Environmental Pollution*, 235, 938–947.

Cusaria, A., & Alfonso, J. (2004). Petróleo, ambiente y conflicto en Colombia. *Guerra, Sociedad y Medio Ambiente*, 464–501.

Domínguez, V. A. (2014). Degradación de fenol por medio de bacterias aisladas de agua de mar de Cartagena. Uniandes.

Donato, M. T. (2004). ¿ Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? *Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 29-69

Freitas, J. S., Giroto, L., Goulart, B. V., Alho, L. de O. G., Gebara, R. C., Montagner, C. C., ... Espíndola, E. L. G. (2019). Effects of 2, 4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109446.

Ghosh, P., Thakur, I. S., & Kaushik, A. (2017). Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141, 259–270.

Hall, R. J. (1980). *Effects of environmental contaminants on reptiles: a review*. US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service.

Hansch, C., McKarns, S. C., Smith, C. J., & Doolittle, D. J. (2000). Comparative QSAR

- evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 127(1), 61–72.
- Hellou, J., Payne, J. F., Upshall, C., Fancey, L. L., & Hamilton, C. (1994). Bioaccumulation of aromatic hydrocarbons from sediments: a dose-response study with flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27(4), 477–485.
- Hermens, J., & Leeuwangh, P. (1982). Joint toxicity of mixtures of 8 and 24 chemicals to the guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 6(3), 302–310.
- Levis, N. A., & Pfennig, D. W. (2019). Phenotypic plasticity, canalization, and the origins of novelty: evidence and mechanisms from amphibians. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 88, pp. 80–90). Elsevier.
- López-González, E., & Ruiz-Soler, M. (2011). Análisis de datos con el Modelo Lineal Generalizado. Una aplicación con R. *Revista Española de Pedagogía*, 59–80.
- McKim, J. M., Bradbury, S. P., & Niemi, G. J. (1987). Fish acute toxicity syndromes and their use in the QSAR approach to hazard assessment. *Environmental Health Perspectives*, 71, 171–186.
- Michałowicz, J., & Duda, W. (2007). Phenols--Sources and Toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(3).
- Montealegre-Delgado, X. K., Avendaño-Casadiegos, K., & Bernal, M. H. (2013). Efecto del tamaño del hábitat en la supervivencia, desarrollo y crecimiento en renacuajos de *Engystomops pustulosus* (Anura: Leiuperidae) y *Rhinella humboldti* (Anura: Bufonidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 53(23), 209–314.

- Mote, S., Kumar, R., Naik, B. G., & Ingole, B. S. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and n-alkanes in beaked sea snake *Enhydrina schistose* (Daudin, 1803) from the Mandovi Estuary, Goa. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94(2), 171–177.
- Organization, W. H. (1994). International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 161. Phenol. *World Health Organization, Geneva, Switzerland*.
- Paisio, C. E., Agostini, E., González, P. S., & Bertuzzi, M. L. (2009). Lethal and teratogenic effects of phenol on *Bufo arenarum* embryos. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1–3), 64–68.
- Perry, G., & Olivera, M. (2009). El impacto del petróleo y la minería en el desarrollo regional y local en Colombia.
- Priac, A., Morin-Crini, N., Druart, C., Gavaille, S., Bradu, C., Lagarrigue, C., ... Crini, G. (2017). Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater: A review of options for their elimination. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3749–S3773.
- Relyea, R. A. (2001). Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. *Ecology*, 82(2), 523–540.
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 529.
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A. K., & Ghosh, A. R. (2020). Acute toxicity assessment of arsenic, chromium and almix 20WP in *Euphlyctis cyanophlyctis* tadpoles.

Ecotoxicology and Environmental Safety, 191, 110209.

Semlitsch, R. D., Bridges, C. M., & Welch, A. M. (2000). Genetic variation and a fitness tradeoff in the tolerance of gray treefrog (*Hyla versicolor*) tadpoles to the insecticide carbaryl. *Oecologia*, 125(2), 179–185.

Sheridan, M. A. (1994). Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 107(4), 495–508.

Smolders, R., De Coen, W., & Blust, R. (2005). Integrative measures of toxicant exposure in zebra fish (*Danio rerio*) at different levels of biological organization. In *Techniques in Aquatic Toxicology, Volume 2* (pp. 23–38). CRC Press.

Team, R. C. (2016). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, version 3.3.0. URL Available: <https://www.R-project.org/> (Accessed October 2017).

Torres-Suárez, O. L., & Vargas-Salinas, F. (2014). *Rhinella humboldti*. *Anfibios y Reptiles*, 19.

Van Meter, R. J., Spotila, J. R., & Avery, H. W. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons affect survival and development of common snapping turtle (*Chelydra serpentina*) embryos and hatchlings. *Environmental Pollution*, 142(3), 466–475.

Wang, S., Yan, L. C., Zheng, S. S., Li, T. T., Fan, L. Y., Huang, T., ... Zhao, Y. H. (2019). Toxicity of some prevalent organic chemicals to tadpoles and comparison with toxicity to fish based on mode of toxic action. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 138–145.

Xie, L., Li, X., Liang, K., Wu, C., Wang, H., & Zhang, Y. (2019). Octylphenol influence growth and development of *Rana chensinensis* tadpoles via disrupting thyroid function. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 747–755.

ANEXOS

TABLA A1. Valores de correlación de los dos componentes principales, volumen corporal y tamaño de la cola

Concentración de fenol	Postura	Tiempo de exposición en días	Volumen corporal	Tamaño de la cola
30mg/L	ps1	6	-0.57276554	0.35593781
30mg/L	ps1	4	-0.5213281	0.12711634
30mg/L	ps1	4	0.29960463	-0.20181748
60mg/L	ps1	2	-0.14871451	-1.61628792
60mg/L	ps1	4	-0.59789666	-0.22671581
60mg/L	ps1	4	0.02161687	-0.2972172
60mg/L	ps1	4	-0.5130853	-0.24679029
240mg/L	ps1	1	-0.25895031	-0.53211595
265mg/L	ps1	2	-0.25895031	-0.53211595
Control	ps1	2	-0.57739888	1.08274951
Control	ps1	4	-0.76552944	1.10126524
Control	ps1	5	-0.57848852	0.22739787
Control	ps1	5	-0.77467074	1.05023542
30mg/L	ps2	1	-0.67635239	-0.24666541
60mg/L	ps2	1	0.11095924	0.24124828
120mg/L	ps2	1	-0.65278924	-0.15157393
240mg/L	ps2	1	-0.18306545	-0.17849377
265mg/L	ps2	1	-0.11241592	-0.14913094
265mg/L	ps2	1	0.10470324	-0.33224248
Control	ps2	2	-0.57739888	1.08274951
Control	ps2	4	-0.76552944	1.10126524
Control	ps2	5	-0.57848852	0.22739787
Control	ps2	5	-0.77467074	1.05023542
Control	ps2	5	-0.93171364	0.5600283
Control	ps2	5	-0.30436577	-0.71851958
Control	ps2	5	-0.279478	1.78167557
Control	ps2	5	-0.80387142	2.61738357
30mg/L	ps3	26	-0.10338365	2.10088775
30mg/L	ps3	4	-0.22715262	0.67063487
30mg/L	ps3	4	0.17249806	-0.20673136
30mg/L	ps3	4	-0.39618705	-0.61465803
30mg/L	ps3	1	-0.40663954	-1.2533567
60mg/L	ps3	4	-0.55162322	-0.83752017
120mg/L	ps3	1	-0.72672131	-0.19765436
120mg/L	ps3	1	-1.26596227	0.50563498

120mg/L	ps3	1	-0.36128787	-0.69890188
240mg/L	ps3	1	-0.50460383	-0.58439308
265mg/L	ps3	1	-1.24901204	0.1150112
265mg/L	ps3	1	-0.79654679	-0.59437831
265mg/L	ps3	1	-0.77095887	-0.63400846
Control	ps3	4	-0.9241341	0.41099469
Control	ps3	4	-0.61647223	-0.2386972
Control	ps3	4	-0.80567644	0.49833242
Control	ps3	4	-0.3958811	0.82443191
Control	ps3	4	-0.03276684	0.09094672
Control	ps3	2	-0.57389208	-1.1236138
Control	ps3	5	-1.01208515	0.6253382
Control	ps3	5	-0.59978986	0.95850659
Control	ps3	2	-0.57739888	1.08274951
Control	ps3	4	-0.76552944	1.10126524
Control	ps3	5	-0.57848852	0.22739787
Control	ps3	5	-0.77467074	1.05023542
30mg/L	ps5	7	0.21216178	-1.37522543
30mg/L	ps5	7	0.42410417	-2.13548062
30mg/L	ps5	7	0.28816767	-1.17707197
30mg/L	ps5	7	0.05342759	-1.14470792
30mg/L	ps5	7	-0.45649726	-0.38736797
30mg/L	ps5	22	1.06459559	2.22409442
30mg/L	ps5	22	0.52140314	2.10483543
30mg/L	ps5	26	-0.17151609	0.36037335
30mg/L	ps5	8	0.56073882	-1.3266083
60mg/L	ps5	42	0.50472862	0.85820708
60mg/L	ps5	2	-0.62484259	-0.65067349
60mg/L	ps5	4	-0.56595402	-1.39953148
60mg/L	ps5	4	-0.19510805	-1.03257014
120mg/L	ps5	2	-0.26948881	-1.08533407
120mg/L	ps5	2	-0.25499821	-1.20758818
120mg/L	ps5	2	-0.58695231	-0.42847723
120mg/L	ps5	4	-0.5860497	-1.25415688
240mg/L	ps5	1	-0.50460383	-0.58439308
240mg/L	ps5	1	-0.25895031	-0.53211595
265mg/L	ps5	1	-1.24901204	0.1150112
265mg/L	ps5	1	-0.79654679	-0.59437831
265mg/L	ps5	1	-0.77095887	-0.63400846
Control	ps5	7	0.48152946	-1.29784672
Control	ps5	7	-0.10966292	-0.37007123

Control	ps5	19	0.68938559	0.90691089
Control	ps5	34	-0.46504849	2.23437185
Control	ps5	34	-0.12238586	1.96873274
Control	ps5	14	-1.1641577	1.6108888
Control	ps5	30	-0.34523101	1.06622397
Control	ps5	4	-0.9241341	0.41099469
Control	ps5	4	-0.61647223	-0.2386972
Control	ps5	4	-0.80567644	0.49833242
Control	ps5	4	-0.3958811	0.82443191
Control	ps5	4	-0.03276684	0.09094672
Control	ps5	2	-0.57389208	-1.1236138
Control	ps5	5	-1.01208515	0.6253382
Control	ps5	5	-0.59978986	0.95850659
Control	ps5	7	-0.75276647	0.60109491
Control	ps5	7	-0.72976904	0.89123906
Control	ps5	7	-0.17041397	-0.63864032
30mg/L	ps6	9	0.13588256	-0.56146625
30mg/L	ps6	35	2.93199217	-0.32620902
30mg/L	ps6	42	2.25534595	-0.51954754
30mg/L	ps6	42	2.87535905	-0.00639761
30mg/L	ps6	25	2.91601527	0.05517687
30mg/L	ps6	25	1.62145451	0.20950624
30mg/L	ps6	26	3.19758927	-0.48697168
30mg/L	ps6	32	1.8561451	1.82415424
30mg/L	ps6	5	0.93592164	-1.6524614
60mg/L	ps6	9	0.69800958	-1.84844859
60mg/L	ps6	21	2.68403229	-0.68525905
60mg/L	ps6	5	0.25850682	-2.29987586
60mg/L	ps6	5	0.63516565	-0.59359952
60mg/L	ps6	4	-0.46473977	-0.73044375
60mg/L	ps6	4	0.14395569	-1.51594587
60mg/L	ps6	4	-0.21762514	-0.93938222
120mg/L	ps6	7	0.19434189	-1.97806502
120mg/L	ps6	2	-0.26948881	-1.08533407
120mg/L	ps6	2	-0.25499821	-1.20758818
120mg/L	ps6	2	-0.58695231	-0.42847723
265mg/L	ps6	1	-1.24901204	0.1150112
265mg/L	ps6	1	-0.79654679	-0.59437831
265mg/L	ps6	1	-0.77095887	-0.63400846
Control	ps6	42	1.61938058	1.07316058
Control	ps6	42	3.14006114	-0.62097069

Control	ps6	42	1.35104758	0.94236152
Control	ps6	14	0.21988175	-0.2596947
Control	ps6	14	1.74343311	1.43564285
Control	ps6	22	2.14260573	1.21408763
Control	ps6	22	1.8304817	0.88185739
Control	ps6	22	1.532628	1.26183519
Control	ps6	30	1.39031446	0.84902425
Control	ps6	30	0.95675641	1.22833165
Control	ps6	30	2.03726713	0.79270042
Control	ps6	5	0.17467748	-0.05875118
Control	ps6	5	0.00052941	-0.33836788
Control	ps6	5	0.96015893	-0.36537708
Control	ps6	5	-0.00184904	-0.33325768