



FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

“Evaluación de la toxicidad y riesgo ambiental por dos contaminantes emergentes, diclofenaco e ibuprofeno, en organismos bioindicadores del ecosistema dulceacuícola: *Daphnia Magna* (pulga de agua), *Lemna gibba* (lenteja de agua) y *Paracheirodon Innesi* (pez tetra neón), para la estimación de estándares de calidad ambiental”

Tesis para optar el título de:

INGENIERO AMBIENTAL

Presentado por:

Bach. Matvey Sánchez Gonzales

Asesor:

Dr. José Iannacone Oliver

Lima – Perú

2019

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Lima, 25 de junio de 2019.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Mg. Alexander Emanuel Díaz Sotil
Integrante: Ing. Juan Alberto Palomino Vega
Integrante: Ing. Karen Samantha Sánchez Antezana

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

**Evaluación de la toxicidad y riesgo ambiental, por dos contaminantes emergentes, Diclofenaco e Ibuprofeno en organismos bioindicadores del ecosistema dulceacuícola: Daphnia pulex (Pulga de agua), Lemna minor (Lenteja de agua) y Paracheirodon inessi (Pez tetra neón) para la estimación de estándares de calidad ambiental**

Presentada por el bachiller:

- **Matvey Sánchez Gonzales**

Para optar el Título Profesional de **Ingeniero Ambiental**

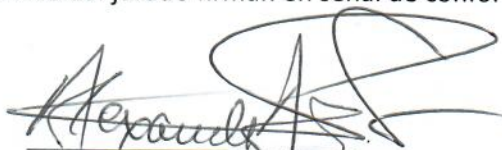
Asesorado por:

- **Dr. José Alberto Iannacone Oliver**


Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño del bachiller en la sustentación, concluyen de manera unánime (X) por mayoría simple ( ) calificar a:

Integrante 1: <b>Matvey Sánchez Gonzales</b>			Nota (escrito): <i>QUINCE</i>
Aprobado (X)	Aprobado - Muy buena ( )	Aprobado - Sobresaliente ( )	Desaprobado ( )

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.

  
**Presidente del Jurado**

  
**Miembro del Jurado**

  
**Miembro del Jurado**

  
**Asesor**

## ACTA DE SUSTENTACIÓN



### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 25 de junio de 2019.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Mg. Alexander Emanuel Diaz Sotil
Integrante: Ing. Juan Alberto Palomino Vega
Integrante: Ing. Karen Samantha Sánchez Antezana

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

**Evaluación de la toxicidad y riesgo ambiental, por dos contaminantes emergentes, Diclofenaco e Ibuprofeno en organismos bioindicadores del ecosistema dulceacuícola: Daphnia pulex (Pulga de agua), Lemna minor (Lenteja de agua) y Paracheirodon inessi (Pez tetra neón) para la estimación de estándares de calidad ambiental**

Presentada por el bachiller:

- **Matvey Sánchez Gonzales**

Para optar el Título Profesional de **Ingeniero Ambiental**

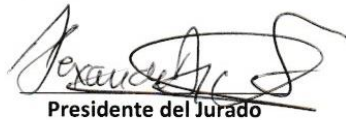
Asesorado por:

- Dr. José Alberto Iannacone Oliver

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño del bachiller en la sustentación, concluyen de manera unánime (  ) por mayoría simple (  ) calificar a:

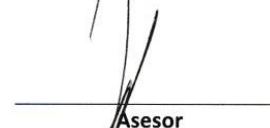
Integrante 1: <b>Matvey Sánchez Gonzales</b>			Nota (escrito): <i>Quince</i>
Aprobado ( <input checked="" type="checkbox"/> )	Aprobado - Muy buena ( <input type="checkbox"/> )	Aprobado - Sobresaliente ( <input type="checkbox"/> )	Desaprobado ( <input type="checkbox"/> )

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.

  
Presidente del Jurado

  
Miembro del Jurado

  
Miembro del Jurado

  
Asesor

T // (51) 610 6738  
informes@cientifica.edu.pe

Asesoría al postulante  
• Campus Villa 2 - Panamericana Sur km 19  
• Calle Cantuarias 398, Miraflores

## DEDICATORIA

*A Dios, por permitirme desarrollar el presente estudio; a mi madre, Sonia, por acompañarme durante todo mi trayecto profesional y de vida; a mi padre, Enrique, por los consejos y el apoyo; finalmente a mis familiares por el constante aliento.*

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. José Iannacone, por su orientación permanente, dedicación y asesoramiento continuo en la presente investigación. A mi compañero de carrera, Sebastián Lozano, por el apoyo y los conocimientos compartidos durante la ejecución de la tesis. Finalmente, a todos quienes compartieron parte de su tiempo para hacer posible esta investigación.*

## INDICE GENERAL

### CONTENIDO

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
INDICE GENERAL .....	4
INDICE DE FIGURAS .....	7
INDICE DE TABLAS .....	9
INDICE DE ANEXOS .....	12
RESUMEN .....	13
ABSTRACT .....	15
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
II. MARCO TEÓRICO .....	26
1. Bases Teóricas.....	26
1.1 Contaminantes emergentes.....	27
1.2 La Industria Farmacéutica.....	28
a. Fuentes y distribución de los fármacos en el ambiente .....	27
b. Comportamiento y dinámica de los fármacos en el ambiente...	30
c. Legislación y Valorización del Riesgo Ambiental de Fármacos	34
1.3 Antiinflamatorios no Esteroides (AINEs).....	37
a. Diclofenaco.....	38
b. Ibuprofeno.....	38
1.4 Evaluación de la Toxicidad.....	42
a. Parámetros para expresar y caracterizar la toxicidad .....	41
b. Toxicidad aguda.....	42
c. Efectos subletales.....	43
1.5 Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA).....	46

a. Parámetros para evaluar el Riesgo Ambiental.....	45
1.6 Especies Bioindicadoras.....	50
a. <i>Daphnia magna</i> (Straus,1820).....	49
b. <i>Lemna gibba</i> (Linneo,1753).....	53
c. <i>Paracheirodon innesi</i> (Myers, 1936).....	56
2. Antecedentes.....	59
III. OBJETIVOS/HIPÓTESIS.....	63
1. Hipótesis	
2. Objetivos	
a. Objetivo Principal.....	63
b. Objetivos Específicos.....	63
IV. METODOLOGÍA.....	65
1. Diseño Experimental.....	65
2. Metodología.....	66
2.1 Obtención y Aclimatación de los cultivos.....	68
2.2 Obtención de los Productos Farmacéuticos.....	71
2.3 Protocolo Experimental.....	72
2.4 Diseño Experimental y Lectura.....	75
2.5 Análisis Estadístico.....	78
2.6 Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA) y Formulación de Estándares de Protección del Ambiente Dulceacuícola.....	79
V. RESULTADOS.....	78
1. <i>Daphnia magna</i> .....	78
2. <i>Paracheirodon innesi</i> .....	84
3. <i>Lemna gibba</i> .....	96

4	<i>Evaluación del Riesgo Ambiental</i> .....	100
VI.	DISCUSIÓN.....	102
VII.	CONCLUSIONES.....	106
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	108
IX.	ABREVIATURAS.....	119
X.	ANEXOS.....	120



**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Entradas y destino de los fármacos en el medio ambiente.....	29
<b>Figura 2:</b> Clases terapéuticas detectadas en el ambiente, expresado en porcentaje. Datos colectados de 134 artículos publicados entre 1997 y 2009.....	31
<b>Figura 3:</b> Estructura química del Diclofenaco.....	38
<b>Figura 4:</b> Estructura química del Ibuprofeno.....	40
<b>Figura 5:</b> Principios para la evaluación del riesgo ambiental.....	46
<b>Figura 6:</b> Procedimientos para estimar efectos ecológicos en un contexto regulatorio.....	48
<b>Figura 7:</b> <i>Daphnia magna</i> .....	52
<b>Figura 8:</b> <i>Lemna gibba</i> .....	56
<b>Figura 9:</b> <i>Paracheirodon innesi</i> .....	59
<b>Figura 10:</b> Diseño Experimental.....	67
<b>Figura 11:</b> Gráfico de barras acerca del efecto del diclofenaco en <i>D. magna</i> sobre el porcentaje (%) de mortalidad a las 24 y 48 h de exposición.....	81
<b>Figura 12:</b> Gráfico de barras acerca del efecto del diclofenaco en <i>D. magna</i> sobre el porcentaje (%) de inmovilización a las 24 y 48 h de exposición.....	82
<b>Figura 13:</b> Gráfico de barras acerca del efecto del ibuprofeno en <i>D. magna</i> sobre el porcentaje (%) de mortalidad a las 24 y 48 h de exposición.....	84
<b>Figura 14:</b> Gráfico de barras acerca del efecto del ibuprofeno en <i>D. magna</i> sobre el porcentaje (%) de inmovilización a las 24 y 48 h de exposición.....	85
<b>Figura 15:</b> Gráfico de barras acerca del efecto del diclofenaco en <i>P. innesi</i> sobre el porcentaje (%) de mortalidad a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.....	87
<b>Figura 16:</b> Gráfico de barras acerca del efecto del diclofenaco sobre <i>P. innesi</i> sobre el porcentaje (%) de inmovilización a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.....	89

- Figura 17:** Gráfico de barras acerca del efecto del diclofenaco sobre *P. innesi* sobre el porcentaje (%) de nado hiperventilación a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición..... 91
- Figura 18:** Gráfico de barras acerca del efecto del ibuprofeno en *P. innesi* sobre el porcentaje (%) de mortalidad a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición..... 93
- Figura 19:** Gráfico de barras acerca del efecto del ibuprofeno sobre *P. innesi* sobre el porcentaje (%) de inmovilización a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición..... 95
- Figura 20:** Gráfico de barras acerca del efecto del ibuprofeno sobre *P. innesi* sobre el porcentaje (%) de nado hiperventilación a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición..... 97
- Figura 21:** Gráfico de barras acerca del efecto del diclofenaco sobre *L. gibba* sobre el n° total de frondas, el porcentaje (%) de ruptura de colonias y el porcentaje (%) de clorosis a las 168 h de exposición..... 99
- Figura 22:** Gráfico de barras acerca del efecto del ibuprofeno sobre *L. gibba* sobre el n° total de frondas, el porcentaje (%) de ruptura de colonias y el porcentaje (%) de clorosis a las 168 h de exposición..... 101

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Afinidad de los compuestos por tejidos grasos animales en función del coeficiente de partición octanol-agua (Kow).....	34
<b>Tabla 2:</b> Clasificación y propiedades fisicoquímicas del diclofenaco.....	39
<b>Tabla 3:</b> Clasificación y propiedades fisicoquímicas del ibuprofeno.....	41
<b>Tabla 4:</b> Ficha taxonómica de <i>Daphnia magna</i> .....	51
<b>Tabla 5:</b> Ficha taxonómica de <i>Lemna gibba</i> .....	55
<b>Tabla 6:</b> Ficha taxonómica de <i>Paracheirodon innesi</i> .....	58
<b>Tabla 7:</b> Protocolo experimental para los medios de cultivo de <i>L. gibba</i> .....	72
<b>Tabla 8:</b> Protocolo experimental para los medios de cultivo de <i>D. magna</i> .....	73
<b>Tabla 9:</b> Protocolo experimental para los medios de cultivo de <i>P. innesi</i> .....	74
<b>Tabla 10:</b> Concentraciones de Diclofenaco e Ibuprofeno para el diseño experimental con <i>L. gibba</i> .....	75
<b>Tabla 11:</b> Concentraciones de Diclofenaco e Ibuprofeno para el diseño experimental con <i>D. magna</i> .....	76
<b>Tabla 12:</b> Concentraciones de Diclofenaco e Ibuprofeno para el diseño experimental con <i>P. innesi</i> .....	77
<b>Tabla 13:</b> Efecto del diclofenaco sobre <i>D. magna</i> a las 24 y 48 h de exposición tomando como puntos de lectura el % de mortalidad y % de inmovilización.....	80
<b>Tabla 14:</b> Efecto del ibuprofeno sobre <i>D. magna</i> a las 24 y 48 h de exposición tomando como puntos de lectura el % de mortalidad y % de inmovilización.....	83

<b>Tabla 15:</b> Efecto del diclofenaco sobre <i>P. innesi</i> a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición tomando como punto final de lectura el porcentaje (%) de mortalidad.....	86
<b>Tabla 16:</b> Efecto del diclofenaco sobre <i>P. innesi</i> a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición tomando como punto de lectura el porcentaje (%) de inmovilización.....	88
<b>Tabla 17:</b> Efecto del diclofenaco sobre <i>P. innesi</i> a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición tomando como punto de lectura el porcentaje (%) de hiperventilación.....	90
<b>Tabla 18:</b> Efecto del ibuprofeno sobre <i>P. innesi</i> a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición tomando como punto de lectura el porcentaje (%) de mortalidad.....	92
<b>Tabla 19:</b> Efecto del ibuprofeno sobre <i>P. innesi</i> a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición tomando como punto de lectura el porcentaje (%) de inmovilización.....	94
<b>Tabla 20:</b> Efecto del diclofenaco sobre <i>P. innesi</i> a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición tomando como punto de lectura el porcentaje (%) de hiperventilación.....	96
<b>Tabla 21:</b> Efecto del diclofenaco sobre <i>L. gibba</i> a las 168 h de exposición tomando como puntos de lectura el n° total de frondas, el porcentaje (%) de ruptura de colonias y el porcentaje (%) de clorosis.....	98
<b>Tabla 22:</b> Efecto del ibuprofeno sobre <i>L. gibba</i> a las 168 h de exposición tomando como puntos de lectura el n° total de frondas, el porcentaje (%) de ruptura de colonias y el porcentaje (%) de clorosis.....	100
<b>Tabla 23:</b> Resumen de la evaluación del riesgo ambiental (ERA) del diclofenaco sobre 3 especies bioindicadoras del ecosistema dulceacuícola adaptado a escala nacional.....	102

**Tabla 24:** Resumen de la evaluación del riesgo ambiental (ERA) del ibuprofeno sobre 3 especies bioindicadoras del ecosistema dulceacuícola adaptado a escala nacional..... 103

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo A:</b> Galería Fotográfica del registro de resultados.....	123
<b>Figura 1A:</b> Vista al estereoscopio (100X) de <i>D. magna</i> al ser expuesta a Diclofenaco e Ibuprofeno tras 48 h de exposición	
<b>Figura 1B:</b> Registro fotográfico de <i>L. gibba</i> al ser expuesta a Diclofenaco e Ibuprofeno tras 7 días de exposición. Se observó pérdida de pigmentación, ruptura de colonias y un decaimiento en el número de frondas	
<b>Figura 1C:</b> Registro fotográfico de <i>P. innesi</i> al ser expuesto a Diclofenaco e Ibuprofeno tras 96 h de exposición	
<b>Anexo B:</b> Registro Fotográfico de la aclimatación de los organismos de ensayo.....	124
<b>Figura 1B:</b> Pecera para aclimatación de <i>P. innesi</i>	
<b>Figura 2B:</b> Aclimatación del cultivo de <i>D. magna</i>	
<b>Figura 3C:</b> Aclimatación del cultivo de <i>L. gibba</i> de acuerdo a protocolo	
<b>ANEXO C:</b> Resultados del laboratorio certificado respecto a la Calidad de agua de colecta de <i>L. gibba</i> .....	126

## RESUMEN

Se evaluó la ecotoxicidad y riesgo ambiental de dos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), Diclofenaco (DFC) e Ibuprofeno (IBU), ambos de masivo uso y de venta libre en el Perú, sobre una batería multitrófica compuesta por tres bioindicadores: pulga de agua (*Daphnia magna*), lenteja de agua (*Lemna gibba*) y pez tetra neón (*Paracheirodon innesi*), con la finalidad de proponer estándares de calidad ambiental en la categoría de conservación del ambiente acuático.

Los ensayos fueron llevados a cabo de acuerdo a lo estipulado en las guías internacionales OECD para cada especie empleada. Se empleó el software TRAP v.1.30 (EPA) considerando límites de confianza al 95% para el cálculo de CL(E)50. La eficacia de los tratamientos para cada punto de lectura de las tres especies evaluadas se evaluó a través de un Análisis de Varianza (ANOVA), previa transformación de los datos mediante el método de Box-Cox, con el fin de cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, en caso haya sido necesario. La evaluación ambiental se llevó a cabo de acuerdo con la guía de Medicina Europea (EMEA,2006), adaptada con datos locales y el cálculo de indicadores como el Coeficiente de Riesgo (CR) y Ratio Agudo Crónico (RAC).

El diclofenaco presentó mayor grado de toxicidad que el ibuprofeno en los tres modelos biológicos empleados. Sin embargo, de acuerdo al Coeficiente de Riesgo el diclofenaco solo generó riesgo ambiental para las plantas menores. En el caso del ibuprofeno, el riesgo fue mucho mayor al abarcar los tres niveles tróficos evaluados: zooplancton, plantas acuáticas y peces menores.

Se propone, en la categoría de conservación del ambiente acuático, un ECA de 0,007 mg/L para el diclofenaco, mientras que para el ibuprofeno un ECA de 0,021 mg/L. Concentraciones del fármaco por encima de estos valores, ya estarían generando un efecto negativo sobre las especies dulceacuícolas.

**Palabras Clave:**

Diclofenaco, Ibuprofeno, ECA, *Daphnia magna*, *Lemna gibba*, *Paracheirodon innesi*



## ABSTRACT

The ecotoxicity and environmental risk of two non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), Diclofenac (DFC) and Ibuprofen (IBU), both of massive use and over-the-counter in Peru, were evaluated on a multitrophic battery composed of three bioindicators: water flea (*Daphnia magna*), duckweed (*Lemna gibba*) and tetra neon fish (*Paracheirodon innesi*), with the purpose of proposing environmental quality standards in the category of conservation of the aquatic environment.

The tests were carried out according to the stipulations of the international OECD guidelines for each species used. The software TRAP v.1.30 (EPA) was used considering 95% confidence limits for the calculation of CL(E) 50. The effectiveness of the treatments for each reading point of the three species evaluated was evaluated through a Variance Analysis (ANOVA), after data transformation using the Box-Cox method, in order to comply with the assumptions of normality and homoscedasticity, if necessary. The environmental assessment was carried out in accordance with the European Medicine guide (EMA, 2006), adapted with local data and the calculation of indicators such as the Risk Coefficient (CR) and Chronic Acute Ratio (RAC).

Diclofenac showed a greater degree of toxicity than ibuprofen in the three biological models used. However, according to the Risk Coefficient, diclofenac only generated environmental risk for the smaller aquatic plants. In the case of ibuprofen, the risk was much greater when encompassing the three trophic levels

evaluated: zooplankton, aquatic plants and smaller fish. ECA of 0.007 mg / L for diclofenac is proposed in the aquatic environment conservation category, while for an ibuprofen, an ECA of 0.021 mg / L. Concentrations of the drug above these values would already be generating a negative effect on the freshwater species.

**Keywords:**

Diclofenac, Ibuprofen, ECA, *Daphnia magna*, *Lemna gibba*, *Paracheirodon innesi*

## I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El creciente deterioro de los ecosistemas acuáticos debido al incremento de los niveles de contaminantes como consecuencia de diversas actividades antrópicas es un problema crítico de nuestros tiempos. La mayoría de los estudios con relevancia en materia ambiental, priorizan sus esfuerzos en evaluar contaminantes con regulaciones ya establecidas, como lo son los metales pesados, plaguicidas, compuestos orgánicos volátiles (COVs), hidrocarburos; entre otros, pero sin embargo, son muy pocas las investigaciones direccionadas a generar nueva data acerca de la presencia del efecto de aquellos compuestos que no reúnen un marco normativo, pero que pueden estar degradando paulatinamente los ecosistemas y afectando a los organismos que en ellos habita.

El mercado farmacéutico reporta un crecimiento exponencial a lo largo de los años, al igual que el impacto ambiental de sus componentes activos sobre el medio ambiente (Castro *et al.*, 2015). A pesar de la existencia de investigaciones e informes que advierten sobre esta problemática emergente, esta realidad ha sido desestimada por parte de las autoridades y entes reguladores. En este sentido, los productos farmacéuticos se han convertido en un tema principal de debate para los científicos y los profesionales afines a garantizar la protección del medio ambiente. Su presencia en los distintos compartimentos medioambientales (agua, suelo y aire) suponen un grave problema ambiental por su excesivo consumo, provocando efectos adversos que varían en función del tipo de medicamento, la sensibilidad de las especies, las concentraciones a las que se exponen y el tiempo que dura la exposición (Cuñat & Ruiz, 2016).

Los AINEs, llamados también antiinflamatorios no esteroides, son uno de los grupos de fármacos con mayores índices de consumo a nivel mundial (Rang *et al.*,2004; Santos *et al.*,2010) incluyendo a más de 50 compuestos farmacéuticamente activos, dentro de ellos el diclofenaco e ibuprofeno. No obstante, su presencia ha sido reportada en cuerpos de agua alrededor de todo el mundo e incluso en la Antártida (Kallenborn *et al.*,2008), lo cual conlleva a la necesidad de evaluar el efecto que podría estar ocasionando sobre los ecosistemas de agua dulce con especial énfasis en los organismos bioindicadores que en ellos habita. Si bien las concentraciones ambientales a menudo son bajas, es importante señalar que estos compuestos farmacéuticos están generalmente diseñados para tener efectos biológicos a dosis bajas, actuando sobre sistemas fisiológicos que pueden inclusive conservarse evolutivamente a través de los taxones (Rang *et al.*, 2004). Al estar estos expuestos durante toda su vida en sitios contaminados, los organismos acuáticos son objetivos particularmente importantes, y la falta de conocimientos actuales sobre los efectos tanto crónicos como agudos dificulta la evaluación del riesgo ecotoxicológico.

En el Perú, muchos fármacos son usados de manera irracional, siendo uno de los grupos de mayor consumo los AINEs, tales como el diclofenaco e ibuprofeno. Dentro de las principales preocupaciones que generan a partir de la presencia de estos compuestos farmacéuticos en el ámbito medioambiental es el hecho de que, por su propia función, están diseñadas para que sean bioactivas, con un gran abanico de efectos, niveles de actividad, dosis y modos de acción. Se

desconoce en gran parte cómo pueden afectar a los organismos acuáticos que viven en exposición permanente a estos productos, y aún se conocen menos los efectos de sus metabolitos (Muniategui & Simal-Lozano, 2013). De hecho, existen estudios que sostienen la presencia de efectos negativos de sustancias metabolizadas sobre los organismos tanto acuáticos como terrestres, como toxicidad aguda y crónica, disrupción endocrina, bioacumulación y biomagnificación. Prueba de ello, fue la identificación de residuos de diclofenaco en poblaciones de buitres en India y Pakistán, causantes de la disminución de más del 95% de su población al comprobar que este compuesto generaba lesiones renales que conducían a la extinción de la especie. Definitivamente, este estudio es un precedente clave, que sienta un antes y un después concerniente a la importancia de evaluar los efectos que los AINEs estarían ocasionando en los distintos ecosistemas, con especial énfasis en el diclofenaco e ibuprofeno, debido a sus patrones de consumo, características y propiedades químicas de interés ambiental, así como también por su toxicidad reportada en organismos y presencia de los mismos en diversos cuerpos de agua dulce alrededor del mundo.

A pesar de que para su comercialización sean necesarios estudios de toxicidad clínica y de seguridad, en muchos casos no se incluyen evaluaciones para cuantificar su nivel impacto sobre los organismos no blancos y cuerpos receptores (Valdes,2009).

A la fecha no existen datos exactos acerca del uso total de fármacos, ya que el consumo y la aplicación de productos farmacéuticos puede variar

considerablemente de un país a otro (Verbrugh & Neeling 2003, Goossens *et al.*, 2007). No obstante, compuestos farmacéuticos, como analgésicos, antiinflamatorios, anticonvulsionantes, hormonas, entre otros han sido reportados en cuerpos hídricos superficiales. Su alta polaridad y baja volatilidad, en mayoría de los fármacos los hacen más propensos a ser transportados a la columna de agua. En 71 países, se ha detectado la presencia de fármacos sobre el medio ambiente, 16 sustancias farmacéuticas fueron encontradas en aguas superficiales, subterráneas, o agua potable en cada uno de los grupos regionales de las Naciones Unidas, dentro de los que se destaca la presencia del diclofenaco e ibuprofeno (IWW, 2014). Publicaciones recientes, reportan descargas de aproximadamente 500 ton/año donde el DFC logra alcanzar concentraciones de hasta 3,02µg/L (Heberer, 2002) en países como España, Alemania, Canadá, Brasil, Francia, entre otros. Incluso muchos de los compuestos farmacéuticos han sido detectados en el ambiente ártico (Kallenborn *et al.*, 2008). También se han informado hallazgos de diclofenaco e ibuprofeno en otros países, por ejemplo, en lagos y ríos suizos (Buser *et al.*, 1998, Tixier *et al.*, 2003, Tauxe-Wuersch *et al.*, 2005), así como del Reino Unido (Ashton *et al.*, 2004), Brasil (Stumpf *et al.*, 1999), España (Farre *et al.*, 2001), Grecia (Heberer *et al.*, 2001a, Koutsouba *et al.*, 2003) y Estados Unidos (Heberer *et al.*, 2001b), por nombrar sólo algunos. Se ha reportado que aproximadamente un tercio del volumen total de productos farmacéuticos vendidos en Alemania (Greiner & Rönnefahrt, 2003) y alrededor del 25% de los vendidos en Austria se desechan con los residuos domésticos o por el desagüe. En Europa, varios medicamentos de venta libre como el ibuprofeno y diclofenaco se consumen en cantidades superiores a 100 toneladas por año (Bound & Voulvoulis, 2005;

Zwiener & Frimmel, 2000). Estas son solamente algunas cifras alarmantes acerca de la magnitud del problema.

Los residuos de productos farmacéuticos suponen una amenaza ambiental debido a sus propiedades fisicoquímicas, persistencia y distribución en el agua, suelo, aire, cadenas tróficas y en los alimentos. Investigaciones ecotoxicológicas han demostrado que estos compuestos pueden interferir fuertemente con las actividades metabólicas de los organismos no destinatarios causando daño significativo en los tejidos, metabolismo y reproducción, y por ende en la perpetuidad de la especie (Ferrari *et al.*, 2003). Su amplio uso tanto doméstico y hospitalario para el tratamiento de enfermedades, además de veterinario aumenta su caudal de descarga y por ende también, la de sus productos de transformación en el medio ambiente, manifestando su toxicidad en organismos no destinatarios. Las aguas residuales domésticas, hospitalarias y vertederos son la principal vía por la que estos compuestos llegan al medio acuático (Holm *et al.*, 1995). En adición, productos farmacéuticos de uso veterinario pueden entrar en los sistemas acuáticos a través de la aplicación de estiércol a los campos y el escurrimiento posterior, así como también por la aplicación directa en la piscicultura (Santos *et al.*, 2010). Cabe resaltar, que la contaminación por compuestos farmacéuticos puede ocurrir incluso en concentraciones típicamente en el rango de ng/L a µg/L, las cuales son relativamente bajas y muy difíciles de detectar. Sin embargo, concentraciones de ibuprofeno y diclofenaco han sido reportados en concentraciones superiores a 1750 ng/L (Fent *et al.*, 2006), significando un riesgo potencial para la biodiversidad acuática, principalmente para aquellas comunidades más susceptibles, como lo es el zooplancton.

La información disponible sobre los efectos de los compuestos activos de los fármacos sobre los organismos en el medio acuático y terrestre está aumentando, pero aún sigue siendo insuficiente (Fent *et al.*, 2006). Se ha encontrado que altas concentraciones de algunos compuestos, es decir, en el intervalo de g por litro producen efectos agudos en organismos que habitan en el ecosistema acuático. Cifras a nivel mundial, demuestran que muchos compuestos farmacéuticos no logran degradarse fácilmente en las plantas de tratamiento de aguas residuales, moléculas de diclofenaco solo han sido removidas en un 10% por las plantas de tratamiento de aguas residuales (Térnes, 2004), asimismo muchos metabolitos son resistentes al tratamiento de aguas residuales y tienen una persistencia significativa en el medio ambiente (Heberer *et al.*, 2001). En este sentido, es importante destacar que la eliminación de medicamentos no utilizados en el medio acuático también suma a la carga ambiental (Bound & Voulvoulis, 2004).

Los sistemas de autodepuración de aguas residuales y alcantarillado no están equipados ni tampoco específicamente diseñados para su eliminación. A la fecha, el Perú no cuenta con algún tipo de legislación que establezca los límites permisibles de estos en el ambiente. La carencia de regulación y fiscalización por parte del estado de estos compuestos con potencial tóxico para los ecosistemas de agua dulce es un problema emergente a nivel mundial, ya que se sabe que de las más de 90 millones de sustancias químicas registradas, tan sólo un 0.03% están reguladas (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2015). Para el entendimiento de esta problemática ambiental, concerniente a la presencia de



productos farmacéuticos en los ecosistemas acuáticos dulceacuícolas, y su grado de toxicidad en los organismos que en ellos habitan, es necesario la simulación de escenarios en laboratorio bajo condiciones controladas, que permitan comparar la toxicidad de los compuestos y conocer el nivel de sensibilidad de las diferentes especies. El desarrollo de estas pruebas ecotoxicológicas, permiten establecer de criterios de calidad para la protección de organismos acuáticos blancos y no blancos, así como también, para proponer estándares de calidad ambiental para el fármaco en evaluación (Iannacone *et al.*, 2011). En adición a lo mencionado en líneas anteriores, cabe resaltar que este tipo de evaluaciones ecotoxicológicas proporcionan mayor objetividad, frente a los métodos convencionales de evaluación de la calidad de agua (Wong & Pak, 2004).

En el contexto nacional, la carencia en el Perú de Estándares de Calidad Ambiental (ECA) o Límites Máximos Permisibles (LMP) que permitan establecer los niveles máximos permitidos de los productos farmacéuticos o sus principios activos en los ambientes dulceacuícolas, es un tema emergente de hoy en día. De acuerdo al Decreto Legislativo 1278 que aprueba la Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos y el Decreto Supremo 014-2017-MINAM que aprueba su reglamento, se establece que son considerados residuos peligrosos aquellos residuos generados resultantes de la producción, preparación y utilización de productos farmacéuticos, además de aquellos residuos de establecimientos de atención de salud y afines. Si bien existen esfuerzos por establecer un manejo correcto de los mismos, su introducción al medio ambiente es materia de preocupación, básicamente por los problemas en su segregación y por ende en

su correcta disposición final en rellenos de seguridad. Además de las deficiencias en cuanto a la gestión de los mismos que garantizan su introducción a los ecosistemas, el porcentaje de excreción por las redes de alcantarillado es considerable, además de la carencia de tecnologías apropiadas en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTARs) para su remoción.

A pesar de la existencia de la Ley N°29459 “Ley de Productos Farmacéuticos, Dispositivos médicos y Productos Sanitarios”, en donde se establecen requisitos para el registro sanitario de los productos farmacéuticos necesarios para asegurar su eficiencia, seguridad y calidad, no se incorporan indicadores de evaluación que permitan saber cuál será el impacto del producto en el medio ambiente. De acuerdo al Diagnóstico de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (SUNASS,2015), se aprecia una desigualdad en la cobertura de tratamiento de aguas residuales de la capital con relación al resto del país. Asimismo, al año 2007, se estimó una cobertura de tratamiento del 27% (SUNASS,2008). Definitivamente este escenario que atraviesa el país en materia de tratamiento de efluentes tanto domésticos como industriales, además de fallas respecto al diseño y construcción, falta de equipamiento y recursos financieros contribuyen al aumento en la carga de compuestos farmacéuticos en los cuerpos de agua del territorio nacional, con especial énfasis en aquellos efluentes provenientes de centros médicos.

A la fecha, en el Perú, son prácticamente insuficientes las investigaciones encaminadas a cuantificar y/o monitorear la presencia de compuestos farmacéuticos en los cuerpos de agua, a diferencia de otros países, sin embargo,

ha de suponerse, que, en base a la ausencia de un marco normativo regulatorio específico, déficit en la cobertura de tratamiento y ausencia de tecnologías y procesos altamente efectivos que garanticen su remoción en las PTARs, además de planes de farmacovigilancia a nivel nacional, su presencia en los ecosistemas dulceacuícolas ha de ser significativa, generando así un riesgo ambiental considerable, el cual amerita un diagnóstico por parte de los sectores y profesionales afines.

En base a la problemática planteada, acerca de la toxicidad que podrían estar generando los compuestos farmacéuticos en organismos dulceacuícolas no destinatarios, es necesario la puesta en marcha de estudios ecotoxicológicos para el establecimiento de futuras normativas en el Perú que busquen preservar el medio dulceacuícola mediante el establecimiento de estándares de protección de la vida acuática que tengan por objetivo la conservación tanto de las especies como de los servicios ecosistémicos.

## II. MARCO TEÓRICO

### 1. Bases Teóricas

#### *1.1 Contaminantes Emergentes*

Son definidos como aquellos contaminantes no regulados, los cuales pueden ser candidatos a futuras regulaciones dependiendo de sus efectos potenciales a los ecosistemas y salud humana (Barceló, 2003). Por ello, con el avance de las nuevas técnicas de detección y el aumento en el entendimiento de las implicaciones que involucran la presencia de estos compuestos en la salud humana y el medio ambiente, la importancia de su estudio y la necesidad de establecer límites en sus descargas y consumos ha ido en aumento a nivel mundial (Suthersan & Payne, 2005).

En las últimas dos décadas ha cobrado interés el estudio de la presencia de los compuestos orgánicos emergentes en el ambiente, los cuales forman parte de productos de uso diario, como lo son fármacos, (antibióticos, antiinflamatorios, reguladores, etc), productos para el cuidado e higiene personal (fragancias, protectores solares, repelentes de insectos), así como compuestos con efectos de disrupción endocrina como son los aditivos de gasolinas, plastificantes y detergentes, además de surfactantes y productos de desinfección (Barceló, 2003).

La característica más relevante de este grupo de contaminantes es que a pesar de poseer niveles de persistencia bajos el medio debido a sus procesos de transformación, su introducción al medio ambiente es continua, como en el caso de los compuestos farmacéuticos. Desafortunadamente, para muchos de estos

tipos de contaminantes, no hay datos disponibles que indiquen su presencia, riesgo y ecotoxicidad, por lo que es difícil predecir cuales serían sus efectos (Barceló,2003).

### *1.2 La Industria Farmacéutica*

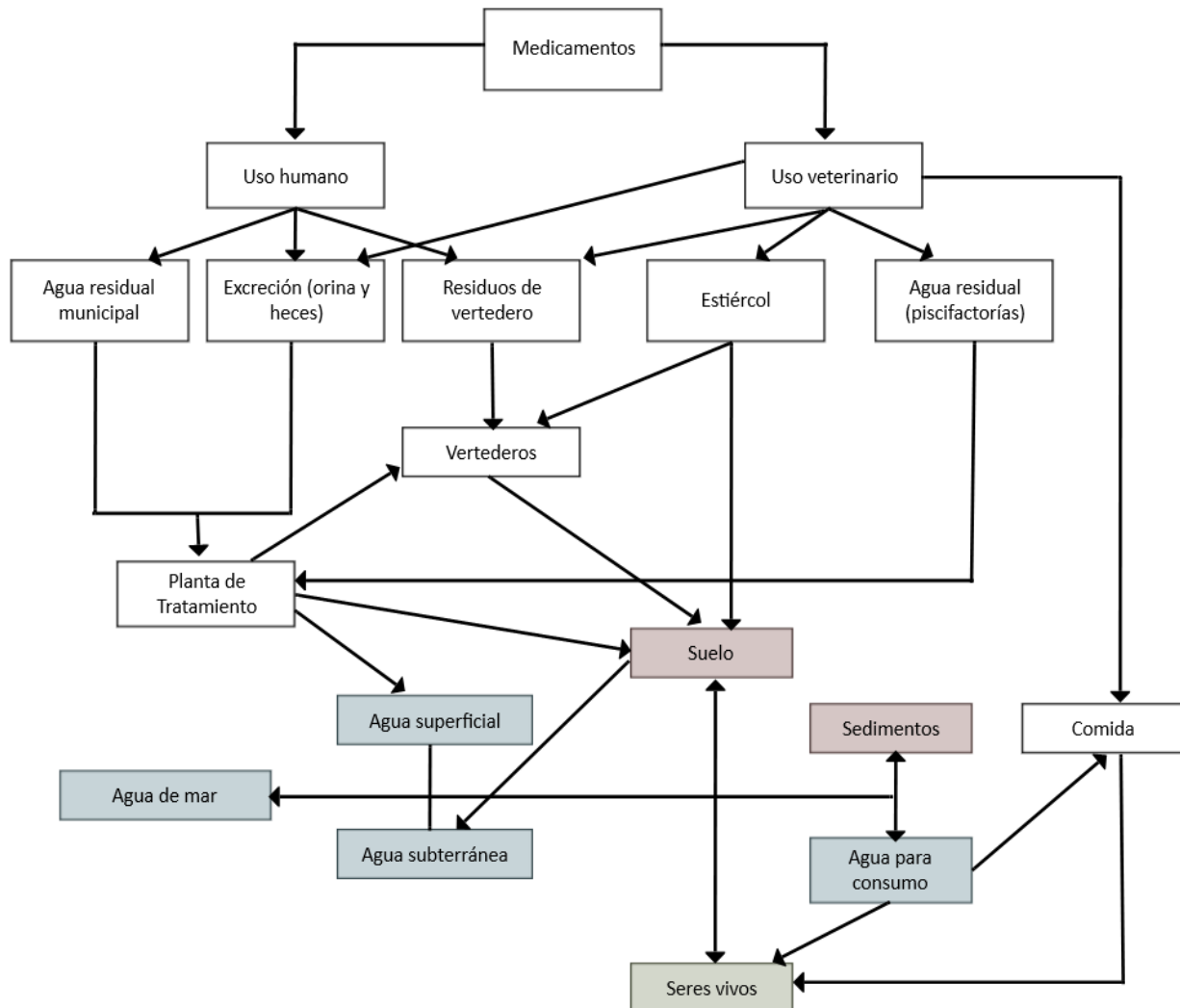
La evaluación del efecto de los fármacos se encuentra entre las principales líneas de investigación a cargo de los organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental. En este sentido, un fármaco no es más que una sustancia química, que producirá un efecto biológico cuando se administra a un organismo.

#### *a. Fuentes y distribución de los fármacos en el ambiente*

Debido al amplio consumo de medicamentos por la población a nivel mundial, gran cantidad de residuos de medicamentos se liberan diariamente al medioambiente (Figura 1). Si los fármacos y sus metabolitos no son eliminados en las plantas de tratamiento, estos pueden entrar a los ecosistemas acuáticos y eventualmente llegar al agua subterránea (Daughton & Ternes, 1999; Kümmerer, 2004).

De manera general los productos farmacéuticos resultan en una contaminación generalizada de los ecosistemas debido a: i) La eliminación incorrecta de medicamentos no deseados por el drenaje o por el inodoro (y luego a través de Plantas de Tratamiento). ii) La medicina que se consume y se excreta en forma

de metabolitos (aguas residuales municipales), iii) Desde sitios de producción farmacéuticas, instalaciones médicas o uso veterinario.



**Figura 1:** Entradas y destino de los fármacos en el medio ambiente.

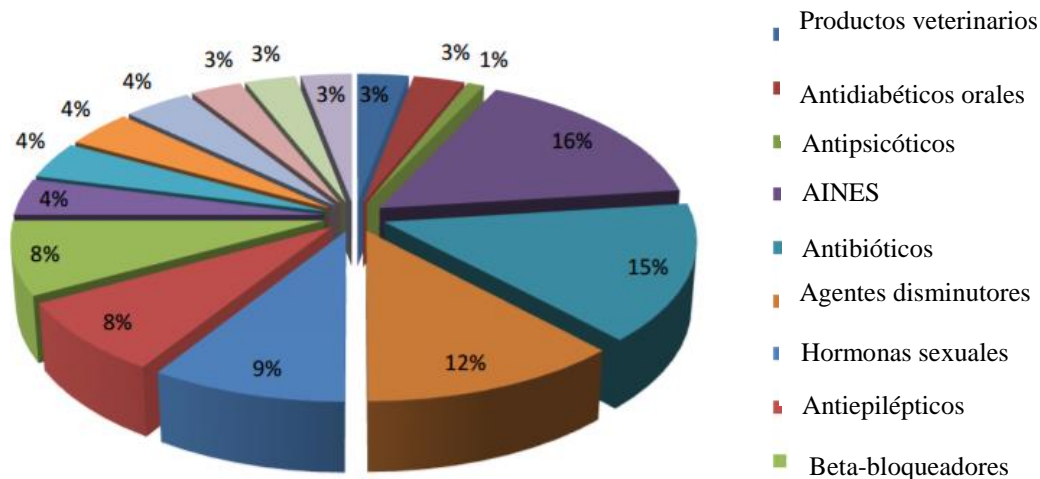
*Fuente:* Kummerer, 2004; Santos *et al.*, 2010

La distribución de productos farmacéuticos en el medio ambiente ocurrirá principalmente a través del transporte acuoso, pero también a través de la transferencia al suelo en el contexto agrícola (estiércol) y en cierta medida a través de la bioacumulación.

La liberación de los ingredientes farmacéuticos activos y sus metabolitos en el medio ambiente acuático se produce a través de varias vías de exposición, pero las dos principales fuentes lo conforman los efluentes domésticos y hospitalarios,

Los fármacos son metabolizados en el cuerpo humano en variados y distintos metabolitos o conjugados, los cuales pueden ser excretados junto con el fármaco inalterado por la orina o las heces fecales.

En la Figura 2, se presenta la clasificación de los grupos de medicamentos de mayor consumo, reportados en 134 artículos entre los años 1997 y 2009. Como se puede apreciar, grupo de los antiinflamatorios no esteroides (AINEs) es el más abundante en el ambiente con un 16% respecto a los demás grupos farmacéuticos.



**Figura 2:** Clases terapéuticas detectadas en el ambiente. Información recolectada a partir de 134 artículos publicados entre los años 1997 y 2009 (Santos *et al.*, 2010).

*b. Comportamiento y dinámica de los fármacos en el ambiente*

En el medio ambiente los fármacos pueden fotodegradarse o biotransformarse por microorganismos tales como bacterias y hongos, pudiendo formarse en metabolitos más tóxicos que el compuesto original (Santos *et al.*, 2010; Groning *et al.*, 2007) e incluso migrar a los distintos compartimientos medioambientales (sistema terrestre, acuático, aire y biota) en función de sus propiedades y las condiciones ambientales (Kummerer, 2004; Fent *et al.*, 2006). Por otra parte, los



residuos de medicamentos producen diferentes efectos adversos dependiendo del tipo de medicamento, la concentración, el tiempo de exposición y la sensibilidad de los organismos expuestos (Kummerer, 2004; Caliman & Gavrilesco, 2009; Ruiz & Font, 2011; Gottschall *et al*, 2012). Además, la persistencia de algunos medicamentos favorece la acumulación en organismos vivos (Arnold *et al*, 2014; Schmidt & Redshaw, 2015).

La biodegradación es en muchos casos la principal vía de eliminación de algunos componentes farmacéuticos, sin embargo, este proceso dependerá no de las características fisicoquímicas del compuesto, sino también de las condiciones ambientales, las características bióticas, entre otras. Dentro de los principales procesos que pueden experimentar los compuestos farmacéuticos en el ambiente acuático se destacan la Dispersión y dilución, Volatilización, Sorción, Hidrólisis, Fotólisis y biodegradación (Gurr & Reinhard., 2006).

Es importante además precisar que los productos farmacéuticos son pues estructuras complejas que generarán subproductos propios del metabolismo, los cuales, bajo las condiciones propias del ecosistema en el cual se encuentren, pueden ser potencialmente más bioacumulables e incluso mucho más tóxicos que el compuesto original (Jiménez, 2011).

En toxicología ambiental, las propiedades fisicoquímicas de mayor relevancia e implicancia para el estudio de la dinámica de un fármaco son la solubilidad en agua, además del coeficiente de partición n-octanol/agua (Kow) y de adsorción (Koc). Estas propiedades descritas tendrán influencia directa en su distribución y desplazamiento del fármaco en el medio, además de proporcionar información

de interés para determinar el procedimiento analítico ideal para su identificación y comprensión.

Compuestos farmacéuticos con alta solubilidad en agua, no tienden a acumularse en el suelo ni en la biota al ser muy polares, y, por consiguiente, tienden a degradarse preferentemente por hidrólisis. Por el contrario, fármacos con baja solubilidad, como el caso puntual del diclofenaco (2.37mg/L), no seguirá estas rutas de degradación y presentará una mayor movilidad en el cuerpo hídrico en comparación con los demás AINEs.

El valor de Kow está intrínsecamente relacionado con la capacidad de adsorción o potencial de bioconcentración del compuesto farmacéutico en los tejidos grasos. Valores elevados de Kow, representaran una alta probabilidad de acumularse en organismos vivos, y por ende a ser compuestos más tóxicos, como en el caso del diclofenaco e ibuprofeno, con valores de 3.97 y 4.51 respectivamente. Así este valor es una medida de la bioconcentración del compuesto en organismos.

En la tabla 1, se observa la afinidad del compuesto por los tejidos grasos animales en función del valor de Kow:

**Tabla 1**

*Afinidad de los compuestos por tejidos grasos animales en función del coeficiente de partición octanol-agua (Kow)*

Afinidad	Log Kow
Alta	>5
Media Alta	3,5 - 5
Media	3 - 3,5
Media Baja	1 - 3
Baja	<1

*Fuente: Extraído del Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de productos químicos (SGA)*

Tanto el ibuprofeno como el diclofenaco tendrán una afinidad media alta a los tejidos grasos, prueba de ello explica la bioacumulación de diclofenaco reportada en las tres especies de buitres, desencadenante de lesiones renales. El coeficiente de adsorción (Koc) es un indicador aproximado del grado de adsorción entre una sustancia o compuesto y el sorbente o matriz (suelo). Compuestos con un valor elevado de Koc, tendrán a adsorberse en el suelo. Por último, compuestos con valores de BCF elevados se bioacumularán en organismos blanco y podrán biomagnificarse a través de las redes tróficas, aumentando así su peligrosidad (Brooks *et al.*,2012).

A mayor persistencia del fármaco, mayor será su peligrosidad, ya que aumentaría su probabilidad de que interactúe con los seres vivos antes de degradarse en el medio. Por ende, cuando un evento contaminante ocurra por un compuesto farmacéutico muy persistente, las acciones correctivas planteadas serán mucho más complicadas y menos efectivas (Castro *et al.*, 2015).

*c. Legislación y Valorización del Riesgo Ambiental de Fármacos*

Los datos de ecotoxicidad de un compuesto farmacéutico serán importantes para completar la evaluación del riesgo ambiental. Para ello, se suele emplear datos de toxicidad aguda y crónica para la obtención de parámetros de evaluación en toxicología como: CL<sub>50</sub>, CE<sub>50</sub> y NOEC.

La evaluación de los parámetros citados en líneas anteriores, constituyen los indicadores de riesgo que deberán ser reportados a las agencias regulatorias antes de que salga al mercado un nuevo medicamento.

Estados Unidos, la Unión Europea y China, son considerados los primeros países en contemplar y regular la presencia de fármacos. Estos países poseen un marco regulatorio que incorpora el monitoreo y evaluación de los efectos de los fármacos sobre la salud y el medio ambiente (Holm *et al.*, 2013).

De acuerdo a la normatividad europea compuestos con CL<sub>50</sub> menor a 1 mg/L se clasifican como extremadamente tóxicos, compuestos con CL<sub>50</sub> entre 1 y 10 mg/L serán tóxicos y compuestos con valores de CL<sub>50</sub> entre 10 y 100 mg/L corresponden a sustancias peligrosas (Commission on the European Communities, 1996).

### 1.3 Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

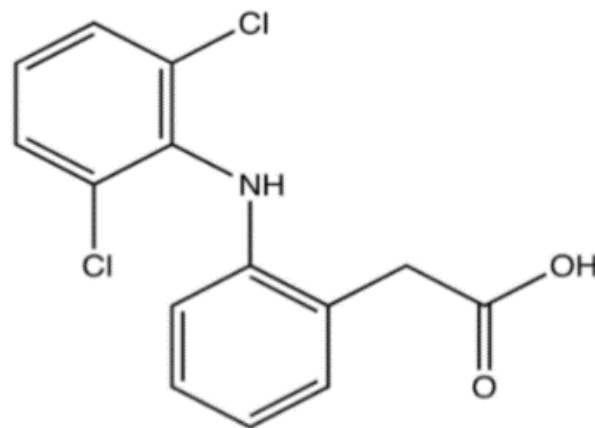
Los AINEs son un grupo variado y químicamente heterogéneo de fármacos principalmente antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos, por lo que se usan para la reducción de síntomas de la inflamación, dolor y fiebre respectivamente (Page *et al.*,1998).

La acción principal de todos los AINES es inhibir la acción de la enzima ciclooxigenasa, responsable de la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. De esta forma, al inhibir a la ciclooxigenasa y la subsecuente síntesis de prostaglandinas, se inhibe la producción de fiebre, dolor e inflamación. El nuevo conocimiento de que existen dos isoenzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), abre un camino para el desarrollo de inhibidores selectivos de la COX-2, ya que la inhibición de esta a comparación de la COX-1, es mucho más segura y con menores efectos adversos. Se ha demostrado que los AINEs con afinidad a la inhibición de la COX-1 pueden ser más tóxicos a nivel gastrointestinal y renal. Por su parte, AINEs de modo no selectivo, inhiben los 2 subtipos: COX-1 Y COX-2, como el diclofenaco e ibuprofeno.

Los AINEs poseen un efecto positivo en la salud; sin embargo, su introducción y persistencia en los compartimientos medioambientales en de gran preocupación. En general, tienden a permanecer en la fase acuosa y no son eliminados por completo en las PTARs, he de allí por qué estos productos antiinflamatorios y sus metabolitos son detectados comúnmente en aguas superficiales. Dentro de los principales grupos de AINEs encontramos al Diclofenaco e Ibuprofeno.

a. *Diclofenaco*

El diclofenaco (Figura 3) es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) derivado del ácido benzenoacético con propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Este es un derivado fenilacético.



**Figura 3:** Estructura química del Diclofenaco

Es usado comúnmente para el alivio de inflamaciones agudas y crónicas.

Su principal mecanismo de acción del diclofenaco es la inhibición de la enzima ciclooxigenasa. Además, de bloquear la acción del glutamato (Roberts & Morrow,2007).

Su clasificación y propiedades fisicoquímicas de interés se muestran en la Tabla N°2.

**Tabla 2**

*Clasificación y propiedades fisicoquímicas del Diclofenaco*

<b>Clasificación y Propiedades</b>	
<b>Fórmula química</b>	C <sub>14</sub> -H <sub>11</sub> -Cl <sub>2</sub> -N-O <sub>2</sub>
<b>Número CAS</b>	15307-86-5
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	4.51
<b>pK<sub>a</sub></b>	4.15
<b>Solubilidad en H<sub>2</sub>O</b>	2.37 mg/L a 25°C
<b>BCF</b>	3
<b>Uso común</b>	Analgésico
<b>Proporción excretado (Prop-Excretada urinaria)</b>	65%

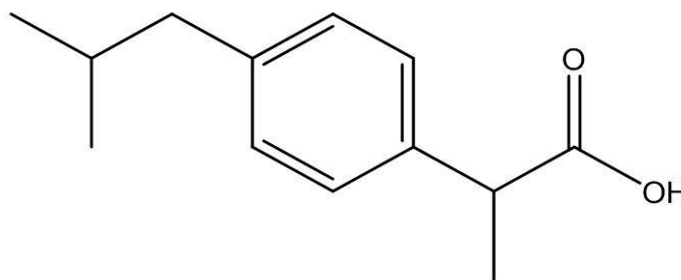
*Fuente:* PubChem.

El consumo mundial de diclofenaco se estima en 940 toneladas por año en forma de cápsulas, supositorios, tabletas, solución intravenosa y ungüentos (Zhang *et al.*, 2008). Su presencia ha sido reportada en efluentes de agua residuales, municipales, superficiales, subterránea y potable en concentraciones del orden de ng/L a mg/L (Kolpin *et al.*, 2002).

A la fecha, a nivel nacional, no se han llevado a cabo investigaciones para determinar la concentración de diclofenaco en los distintos cuerpos de agua dulce del Perú ni tampoco se cuenta con información actualizada referente al consumo de diclofenaco en el territorio nacional.

b. Ibuprofeno

El ibuprofeno es un AINE, con movilidad relativamente alta en el ambiente, pero de baja persistencia en comparación con otros productos farmacéuticos (Buser *et al.*, 1999). La estructura química del ibuprofeno se muestra en la figura 4.



**Figura 4:** Estructura química del Ibuprofeno

Este fármaco, inhibe la actividad de la enzima ciclooxigenasa, dando lugar a una disminución de precursores de las prostaglandinas.

Suele ser usado, al igual que otros AINEs, para el alivio de cuadros inflamatorios. La vida media del Ibuprofeno ha sido estimada en 32 días en campo (Tixier *et al.*, 2003). La clasificación y propiedades físicoquímicas del ibuprofeno se muestran en la Tabla N°3.



**Tabla 3**

*Clasificación y propiedades fisicoquímicas del ibuprofeno.*

<b>Clasificación y Propiedades</b>	
<b>Fórmula química</b>	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
<b>Número CAS</b>	15687-27-1
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	3.14
<b>pK<sub>a</sub></b>	5.2
<b>Solubilidad en H<sub>2</sub>O</b>	21 mg/L (at 25 °C)
<b>BCF</b>	3
<b>Uso común</b>	Analgésico
<b>Proporción excretado (Prop-Excretada urinaria)</b>	90%

*Fuente:* Kummerer (2004), Jjemba (2006) & PubChem.

La presencia de ibuprofeno y sus metabolitos fueron detectados en efluentes de plantas de tratamiento de agua residual (Ternes,1998; Boyd *et al.*, 2003), en aguas superficiales en concentraciones superiores a 1 µg/L (Kolpin *et al.*,2002) y en agua de mar (Thomas & Hilton,2004; Weigel *et al.*,2004). A la fecha, a nivel nacional, no se han llevado a cabo investigaciones para determinar la concentración de ibuprofeno en los distintos cuerpos de agua dulce del Perú ni tampoco se cuenta con información actualizada referente al consumo de ibuprofeno en el territorio nacional.

#### *1.4 Evaluación de la Toxicidad*

En general, la toxicidad se refiere a la posibilidad de que una sustancia produzca efectos adversos en la biota. Un tóxico, entonces, es simplemente un agente, más a menudo un agente químico que produce un efecto adverso en un sistema biológico, causando la muerte o el daño a la estructura o función de un organismo.

Las pruebas de toxicidad determinan el nivel de respuesta biológica por los efectos adversos mostrados en los organismos de prueba después de la exposición. Las pruebas de toxicidad se realizan con mayor frecuencia como experimentos realizados en entornos controlados de laboratorio donde la concentración de exposición es una variable primaria de preocupación, particularmente con respecto a los efectos biológicos adversos relacionados con los productos químicos. Las pruebas se estandarizan para maximizar la comparabilidad y reproducibilidad. Los métodos de prueba frecuentemente especifican la exposición como una serie de concentraciones de ensayo de un producto químico o mezcla de productos químicos durante un período de tiempo definido (Sparling,2016).

Cabe resaltar que la “toxicidad” se puede determinar solamente sobre un organismo (Jorgensen,2010). La selección del organismo de prueba es un elemento que define un procedimiento específico de ensayo de toxicidad. Las especies de prueba se seleccionan basándose en la facilidad del cultivo en laboratorio, la disponibilidad de información de antecedentes adecuada, tales

como fisiología, genética y comportamiento y la alta sensibilidad frente a una amplia gama de sustancias tóxicas (Sparling,2016).

Una parte esencial de la descripción experimental en la evaluación de la toxicidad es la duración de la prueba. Existen varias instituciones mundiales preocupadas por estandarizar tales pruebas incluyendo la Asociación Americana de Salud Pública, US EPA, la Sociedad Americana de Ensayos y Materiales, la Organización Internacional de Normalización, entre otras (Rand *et al.*,1985). Las pruebas estandarizadas ofrecen la capacidad de comparar los resultados entre los laboratorios y son útiles en el componente regulador de los contaminantes (Sparling,2016).

*a. Parámetros para expresar y caracterizar la toxicidad*

**Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>):** Concentración, obtenida estadísticamente de una sustancia, que puede esperarse que produzca la muerte del 50% de los organismos expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado. Se expresa en mg/L (Sparling, 2016).

**Concentración Efectiva Media (CE<sub>50</sub>):** Concentración calculada estadísticamente de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos de experimentación de una población dada, bajo un conjunto de condiciones definidas.

**NOEC:** *No Observed Effect Concentration*. Concentración más alta de tóxico de las empleadas en un bioensayo que no causa un efecto estadísticamente significativo al ser comparado con el control (Rand *et al.*,1985).

**LOEC:** *Lowest Observed Effect Concentration*. Concentración más baja de tóxico de las empleadas en un bioensayo que causa un efecto estadísticamente significativo al ser comparado con el control (Rand *et al.*, 1985).

#### *b. Toxicidad aguda*

Las pruebas de toxicidad aguda determinan si las concentraciones químicas de una muestra producirán efectos adversos en un grupo de organismos de ensayo durante una exposición a corto plazo bajo condiciones controladas. Suelen llevarse a cabo entre las primeras 48 a 96 horas. En un experimento, el punto final más utilizado para caracterizar la toxicidad aguda es la CL<sub>50</sub>. Una CL<sub>50</sub> para un producto químico se calcula a partir de los datos de supervivencia (número de animales vivos al término de la prueba) usando uno de los diversos métodos estadísticos disponibles (Newman, 2015). Los resultados de las pruebas agudas se utilizan con frecuencia como guías para el diseño de pruebas de toxicidad crónica. Dentro de los métodos de ensayo agudos se destacan: mortalidad para peces, inmovilidad para invertebrados y crecimiento para microalgas.

Las pruebas de toxicidad crónicas son generalmente más sensibles que las pruebas agudas, principalmente porque las medidas de toxicidad se centran en puntos finales distintos de la supervivencia, que se utilizan mejor para definir los niveles de efectos adversos.

*c. Efectos subletales*

Un efecto subletal es aquel que se produce por debajo del nivel que causa la muerte frente a la exposición de la especie frente a un determinado tóxico. Mientras se realizan pruebas de toxicidad crónica, los efectos subletales son puntos finales que se estudian.

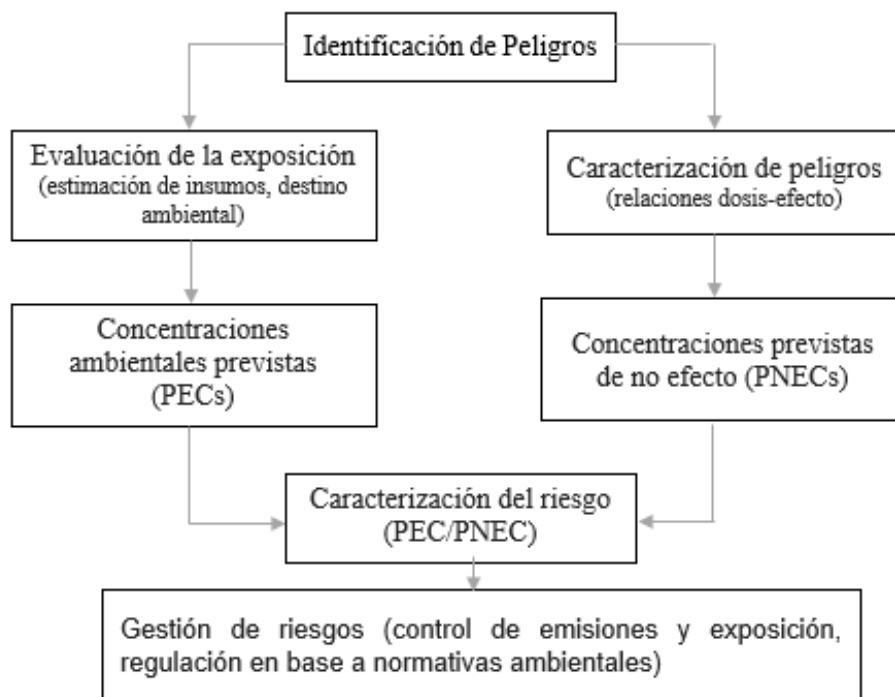
Estos parámetros incluyen cambios de comportamiento, fisiológicos, bioquímicos e histológicos (Rand *et al.*, 1985).

Los efectos subletales tienen una importancia vital en ecotoxicología, ya que, aunque no causan la mortalidad directamente, afectan a las posibilidades de supervivencia en el medio natural. De manera ilustrativa, la lectura final de los efectos de una sustancia sobre la clorosis y necrosis de una especie vegetal, pueden ser ejemplos de efectos subletales.

### 1.5 Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA)

Existen en la actualidad modelos de valoración de riesgos que nos permiten pronosticar situaciones adversas sobre el medio ambiente a partir de la liberación de sustancias químicas, en este caso de productos farmacéuticos. Cuando las propiedades fisicoquímicas de un compuesto predicen la exposición en el agua, generalmente se necesita una evaluación del peligro acuático (efectos). La evaluación del riesgo ambiental (ERA), es un mecanismo para la toma de decisiones en este campo.

La metodología actualmente en uso para la evaluación convencional de riesgos se ilustra en la Figura N°5.



**Figura 5:** Principios generales para la evaluación del riesgo ambiental

*Fuente: EEA, 1998*

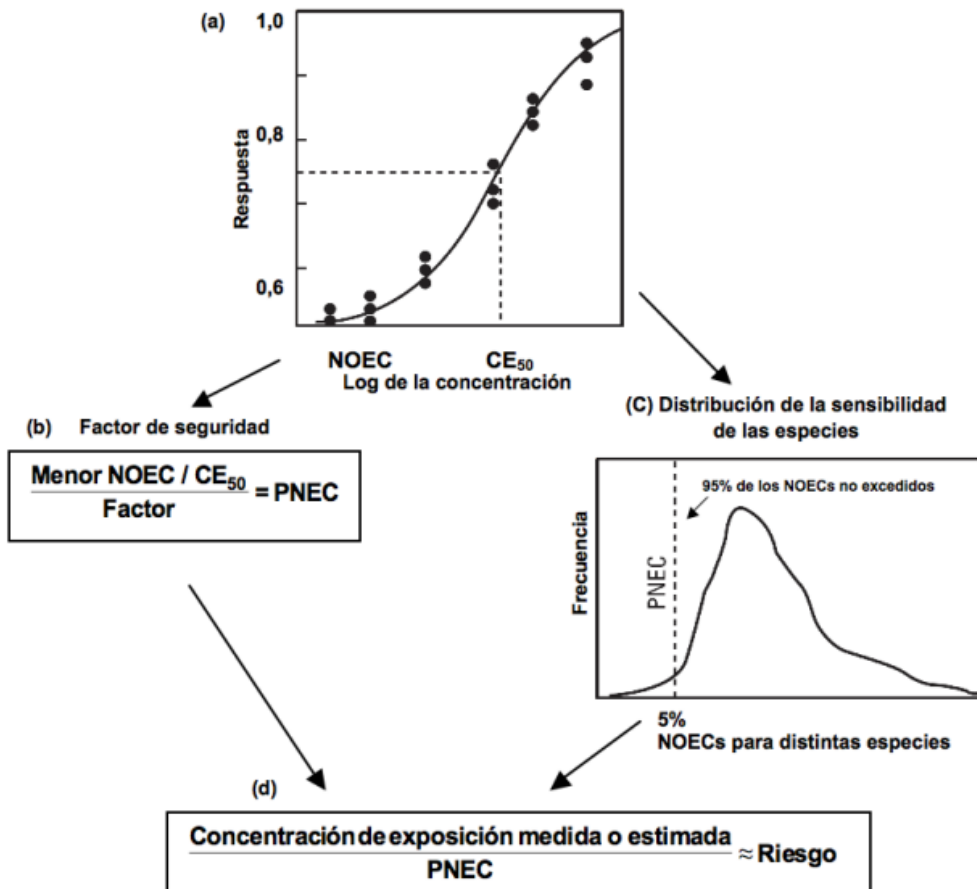
*a. Parámetros para evaluar el Riesgo Ambiental*

***Concentración prevista de no efecto (PNEC)***

Se define como la concentración de un producto químico que marca el límite al cual no se mide ningún efecto adverso de la exposición en un ecosistema. Los valores de PNEC están destinados a predecir la concentración a la cual un producto químico probablemente no tendrá ningún efecto tóxico. Los valores de PNEC se utilizan a menudo en la evaluación del riesgo ambiental como una herramienta en la ecotoxicología (Manuilova, 2003).

Una PNEC para un producto químico puede calcularse con datos de toxicidad aguda o de toxicidad crónica de una sola especie, datos de especies múltiples de distribución de sensibilidad de especies (SSD), datos de campo o datos de ecosistemas modelo. Dependiendo del tipo de datos utilizados, se utiliza un factor de evaluación para tener en cuenta la confianza de que los datos de toxicidad se extrapolan a todo un ecosistema. Normalmente, las concentraciones predichas sin efecto (PNEC) para agua dulce se basan en pruebas crónicas con plantas, crustáceos y peces. A partir de estos datos, se utiliza la concentración del efecto no observado experimental (NOEC) más sensitiva como base para el cálculo del PNEC de agua dulce (Kümmerer, 2008).

Los enfoques para estimar PNEC se muestran en la Figura N°6.



**Figura 6:** Enfoques para estimar efectos ecológicos. *Fuente:* Calow & Forbes (2003).



### **Concentración Ambiental Prevista (PEC)**

La concentración ambiental prevista (PEC) se define como la concentración del compuesto de interés al que los organismos estarían expuestos en el medio ambiente (por ejemplo, agua superficial)

De acuerdo con el EMEA, la siguiente fórmula se debe usar para estimar el PEC en el agua superficial durante la Fase 1.

$$PEC_{\text{Agua Superficial}} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{\text{Dosis}(\text{hab}) * F_{\text{pen}}}{\text{AR}(\text{hab}) * F_{\text{dil}}}$$

Donde:

Dosis(hab) = Dosis diaria máxima consumida por habitante. ( $\text{mg} \cdot \text{hab}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Se deberá usar la dosis recomendada más alta.

F<sub>pen</sub> = Fracción de penetración en el mercado (asumir 0.01)

AR(hab) = Cantidad de aguas residuales por habitante por día. ( $\text{L} \cdot \text{hab}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )

F<sub>dil</sub> = Factor de dilución (asumir 10 de acuerdo a protocolo)

### **Coefficiente de Riesgo (CR)**

El coeficiente de riesgo se define como:

$$CR = \frac{PEC}{PNEC}$$

Se considera que existe riesgo si el valor del cociente es mayor que 1 ( $PEC > PNEC$ ); por el contrario, valores menores a 1 ( $PEC < PNEC$ ) no representa un riesgo para el ecosistema.

***Ratio Agudo Crónico (RAC)***

El ratio agudo-crónico (RAC) o relación agudo-crónica se calcula a partir de:

$$RAC = \frac{CL(E)_{50}}{NOEC}$$

## 5.6 Especies Bioindicadoras

### a. *Daphnia magna* (Straus, 1820)

La clasificación científica de *D. magna* se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4**

Ficha taxonómica de *D. magna*.

<b>Ficha Taxonómica: <i>D. Magna</i></b>	
Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Branchiopoda
Orden	Cladóceras
Familia	Daphniidae
Género	<i>Daphnia</i>
Especie	<i>Daphnia magna</i>

*Fuente:* Linnaeus, 1758.

*D. magna* es un pequeño crustáceo planctónico. Ha recibido el nombre común de pulga de agua debido a su semejanza con la pulga terrestre. Esta similitud se deriva tanto de su estructura general del cuerpo, que es aplanado como el de una pulga, y su forma de moverse a través del agua por sus antenas mediante saltos. Las hembras alcanzan hasta 5 mm de tamaño, los machos alrededor de 2 mm, y por lo tanto se encuentran entre las especies más grandes del género (Benzie, 2005). El cuerpo está protegido por un carapacho translúcido, hecho de quitina, un polisacárido transparente (Ebert, 2005). Este carapacho se extiende hacia los escudos de la cabeza, una importante característica de diagnóstico

para esta especie. *D. magna* se reproduce sexual y asexualmente en un proceso llamado partenogénesis, donde los gametos masculinos son innecesarios.

En la Figura 7, se aprecia la morfología de *D. magna*.



Duro, R. (2005). *Micrografía de luz de una pulga de agua (Daphnia magna)*. Aumento: 35x a 10 cm de ancho.

**Figura 7:** *D. magna*.

### ***Distribución e importancia ecológica***

*D. magna* es una especie clave en los ecosistemas. Vive en lagos y estanques poco profundos ricos en sedimentos de materia orgánica, principalmente en la parte superior de la columna de agua cerca de la superficie rica en algas del agua, pero a menudo se desplazan hacia arriba o hacia abajo de la columna dependiendo de las estaciones o depredadores en un proceso llamado migración vertical.

Aunque las daphnias no son utilizadas por los seres humanos como fuente de alimento directamente, están involucradas en muchas de las cadenas alimentarias. Son un suministro de alimentos primarios para muchas especies, dentro de ellos peces, anfibios, entre otros. Además, casi cualquier ecosistema

de agua dulce depende de la capacidad de *Daphnia* para convertir el fitoplancton y la materia en descomposición en una forma más utilizable. Son típicamente los principales herbívoros de algas, bacterias, protozoos, y el forraje primario de peces (Carpenter *et al.*, 1987). Su alimentación es principalmente a partir de crustáceos y rotíferos, pero normalmente se alimentan por filtración. Debido a su posición central en las redes alimenticias, se utilizan ampliamente como especie indicadora para evaluar la respuesta de los ecosistemas al cambio ambiental (Colbourne, 2011).

### ***Características del hábitat***

*D. magna* se encuentra en hábitats de agua dulce y salobre (hasta 8 ppt de salinidad), incluidos lagos, ríos y charcas temporales. Aunque prefieren temperaturas entre 18-22 ° C, pueden tolerar un rango mucho más amplio. (Ebert, 2005).

### ***Uso en ensayos de toxicidad***

La especie ha sido objeto de investigación biológica desde el siglo XVIII. Es ampliamente utilizado en estudios ecológicos y evolutivos, y en ecotoxicología. El género *Daphnia*, se utiliza a escala mundial para el monitoreo y control ambiental de sustancias tóxicas. Este género juega un rol importante en el establecimiento de criterios de protección por parte de las agencias regulatorias (EPA, OECD, entre otras) y en consecuencia representan el 8% de todos los datos experimentales para organismos acuáticos dentro de las bases de datos toxicológicos (Denslow *et al.*, 2007). La amplia distribución geográfica de este

grupo, su papel en las redes tróficas acuáticas, la facilidad de cultivo en laboratorio, su reproducción por partenogénesis, el ciclo de vida corto con alto número de crías y la alta sensibilidad a tóxicos, hacen a este grupo de organismos ideal para pruebas de toxicidad (Díaz *et al.*,2007). Pruebas de toxicidad con *Daphnia* (principalmente *D. magna*) se usan para definir mecanismos de acción y para probar la seguridad y eficacia de compuestos farmacéuticos. Prueba de ello lo conforman protocolos recomendados por el EMEA en la evaluación del riesgo de compuestos farmacéuticos, dentro de ellos la Prueba de Reproducción, *Daphnia* sp. (OECD,211).

b. *Lemna gibba* (Linneo, 1753)

**Taxonomía**

La clasificación científica de *L. gibba* se muestra en la Tabla 5:

**Tabla 5**

*Ficha taxonómica de L. gibba.*

<b>Ficha Taxonómica: <i>L. gibba</i></b>	
Reino	Plantae
Clase	Liliopsida
Orden	Alismatales
Familia	Araceae
Género	<i>Lemna</i>
Especie	<i>Lemna gibba</i>

*Fuente:* Linneo, 1851.

**Morfología y distribución**

*L. gibba* es una planta angiosperma, monocotiledónea. Es una de las especies de angiospermas más pequeñas reportadas (Raven *et al.* 1971). Su cuerpo no diferencia el tallo de las hojas. Su tamaño oscila aproximadamente entre los 2 a 6 mm de longitud y los 3 a 5 mm de diámetro. A diferencia de *L. minor*, esta posee grandes celdas transparentes similares a burbujas debajo de la hoja. La superficie superior de la hoja es comúnmente de color verde apagado o en algunos casos de marrón rojizo. Asimismo, posee solo una sola raíz que cuelga en el agua.

En la Figura 8, se puede apreciar la morfología de *L. gibba*.



Watts, B. *L. gibba*

**Figura 8:** *L. gibba*.

Su forma de reproducción más común es la asexual por gemación. La especie se encuentra generalmente en aguas mesotrópicas a eutróficas (Cook, 1996) y en aguas ricas en nitratos y carbonato (Sharma *et al.*, 2010). Es una especie cosmopolita distribuida a lo largo de todo el mundo tanto en regiones climáticas cálidas y mediterráneas.

#### ***Características del hábitat***

Posee un crecimiento óptimo entre los 15° y 18°C, no obstante, suele adaptarse bien a cualquier condición de iluminación. Esta hierba flota libremente y crece en aguas estancada, lagos, zanjas, marismas y humedales. Crece normalmente en ambientes estancados ricos en nutrientes, con altos niveles de nitrógeno y fosfatos. Su pH óptimo de crecimiento se encuentra entre los 4,5 y 7,5, aunque también puede soportar un rango más amplio (Rook 2002).



### ***Uso en ensayos de toxicidad***

Su uso como bioindicador dentro de las evaluaciones ecotoxicológicas está normada y aceptada internacionalmente, dentro de las principales guías, se encuentra las Pautas de prueba de efectos ecológicos OCSP 850.4400: Prueba de toxicidad de plantas acuáticas utilizando *Lemna sp* (EPA,2012) y las Directrices de la OECD para la prueba de productos químicos con *Lemna sp*. Prueba de inhibición del crecimiento (OECD, 2006).

*L. gibba* se utiliza a menudo en la evaluación del riesgo ambiental y se puede suponer que los parámetros generalmente evaluados serán confiables incluso para evaluar el riesgo de productos farmacéuticos. Se suelen evaluar principalmente efectos en el crecimiento vegetativo, tales como: número de frondas, área total de las frondas, peso seco y húmedo, % de clorofila, clorosis y necrosis en un corto periodo de tiempo (OECD, 2006). Asimismo, muchas plantas del género *lemna* son usadas para el biomonitoreo *in situ* de contaminantes transmitidos por el agua (Wang, 1990).

c. *Paracheiroduon innesi* (Myers, 1936)

**Taxonomía**

La clasificación científica de *P.innesi* se muestra en la Tabla 6:

**Tabla 6**

*Ficha taxonómica de P. innesi*

<b>Jerarquía Taxonómica: <i>P. innesi</i></b>	
Reino	Animalia
Clase	Actinopterygii
Orden	Characiformes
Familia	Characidae
Género	<i>Paracheiroduon</i>
Especie	<i>Paracheiroduon innesi</i>

Fuente: Myers, 1936.

**Morfología y distribución**

*P. innesi*, conocido comúnmente como pez tetra neón, es una de las especies más conocidas y buscadas por los acuaristas amazónicos, oscilando su tamaño entre 4 a 5 cm (Gonzalez & Preest, 1999). Algo muy característico de esta especie, es la presencia de una franja azul fosforescente que recorre su cuerpo hasta la aleta adiposa. Viven entre los 21 y 28 °C. Son omnívoros, y dentro de su dieta, suelen incluir principalmente daphnias, artemias y alimento liofilizado (Herbert & Dauner, 2002). Es originario del oeste de Sudamérica. En la Figura 9, se puede apreciar la morfología de *P. innesi*.



*Karwath A (2007) Neón tetra (P. innesi)*

**Figura 9:** *P. innesi*

***Características del hábitat***

Principalmente habita corrientes forestales y tributarios menores en lugar de canales principales. El agua es típicamente ácida, de dureza y conductividad despreciable de carbonato y manchada de color marrón debido a la presencia de sustancias húmicas liberadas por la descomposición de materia orgánica, aunque también se ha recolectado de hábitats similares que contienen agua clara transparente y sin manchas.

***Uso en ensayos de toxicidad***

Los peces son extremadamente sensibles a la perturbación ambiental. Numerosos peces han sido propuestos como modelos biológicos para evaluar la ecotoxicidad de sustancias químicas contaminantes.

En esta especie se han realizado varios estudios fisiológicos con relación a adaptaciones cromáticas por variaciones de luminosidad a nivel de la piel y ocular (Hayashi *et al*, 1993), así como efectos de la calidad del agua (pH, dureza

y metales pesados), plaguicidas, factores nutricionales (vitaminas) y formas parasitarias sobre la fisiología de *P. innesi* (Pannevis & Earle, 1994).

A la fecha, el uso de *P. innesi* como modelo biológico para la evaluación de zonas perturbadas viene cobrando mayor importancia en los últimos años, siendo Perú uno de los primeros países en proponer su uso como especie bioindicadora. Dentro de los principales estudios ecotoxicológicos en el contexto nacional, se destaca el llevado a cabo frente al plaguicida Carbofurano (Iannacone *et al.*, 2011), al insecticida Cartap (Iannacone *et al.*, 2007a) y al insecticida Metamidofós (Iannacone *et al.*, 2007b), siendo este último catalogado como extremadamente y altamente peligroso tras la exposición a *P. innesi*. Asimismo, también ha sido usado para evaluar toxicidad de metales pesados como el arsénico, cadmio, mercurio y plomo (Tomaila & Iannacone, 2018). No obstante, no se cuenta con estudios en donde esta especie haya sido expuesta previamente a productos farmacéuticos, específicamente a diclofenaco e ibuprofeno.

## 2. Antecedentes

A la fecha, en el contexto nacional son prácticamente insuficientes las publicaciones científicas encaminadas a la evaluación del grado de toxicidad de los AINEs en organismos de agua dulce al tratarse de un tema emergente. Toda la información científica disponible acerca de la naturaleza del problema descrito procede principalmente del continente europeo, Estados Unidos, Canadá y Brasil. A continuación, se listan los principales aportes tanto internacionales como nacionales para el presente trabajo.

En general, los datos de toxicidad varían para cada fármaco, sin embargo, para muchas pruebas el diclofenaco resultó ser el compuesto que tiene la toxicidad aguda más alta dentro de la clase de AINEs, ya que para las pruebas realizadas las concentraciones de efecto fueron inferiores a 100 mg /L (Fent,2006). La toxicidad aguda más corta fue analizada en algas e invertebrados (Webb, 2001; Cleuvers, 2003), asimismo, se encontró que el fitoplancton reaccionaba de forma más sensible, con una  $CE_{50}(96h) = 14.5$  mg/L (Ferrari *et al.*,2004), mientras que el zooplancton con una menor  $CE_{50}(96h) = 22.43$  mg/L (Ferrari *et al.*,2004). Estudios preliminares sobre el efecto de AINEs en organismos, revelaron que las toxicidades agudas eran relativamente bajas, con valores de concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) obtenidos usando *Daphnia* en el rango de 68 a 166mg.L<sup>-1</sup> (Cleuvers 2003, 2004).

En el año 2012, el diclofenaco fue incluido en la lista de sustancias prioritarias de la Directiva del Marco del Agua en los Estados Unidos. Científicos se alarmaron cuando se encontró evidencia de que los residuos de diclofenaco en

ganado muerto que habían sido tratados con diclofenaco fueron responsables de los drásticos casos de muerte de 3 especies buitres (*Gyps bengalensis*, *Gyps indicus*, y *Gyps tenuirostris*) en India y Pakistán (Oaks *et al.*2004). Se observó un descenso de la población mayor al 95%. En consecuencia, estos buitres han sido catalogados como críticamente en peligro de extinción. Mientras tanto el diclofenaco ha sido prohibido para el tratamiento de ganado.

Su toxicidad en organismos acuáticos menores, como lo son los peces, parece estar relacionada con una enzima ciclooxigenasa similar a la COX-2 que los humanos tienen (Zou *et al.*,1999). Existen investigaciones que reportan la toxicidad de este fármaco sobre las aves y estudios de laboratorio que han demostrado sus efectos subletales en los peces a exposiciones de alrededor de 1 mg/L. En los peces, tal y como ocurre en los mamíferos, el diclofenaco dificulta la estimulación de la síntesis de prostaglandinas en el riñón. A la fecha, no se han reportado evaluaciones toxicológicas sobre el pez tropical *P. innesi* expuesto a diclofenaco.

Asimismo, Valdés (2009), determinó que el efecto del diclofenaco sódico a las 48h en el estadio larvario y adulto de *D.magna* se reflejan en el estrés oxidativo, formación de radicales libres y el efecto oxidativo sobre biomoléculas, tales como la lipoperoxidación, daño a proteínas, daño al ADN y daños a las defensas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa).

Kummerová *et al.*, (2015), concluyó que los indicadores tempranos y sensibles del estrés por fitotoxicidad de diclofenaco sobre la lenteja de agua son

principalmente los cambios en los procesos bioquímicos, conectados con la activación de mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo. Asimismo, se reportó inhibición en parámetros de crecimiento, decrecimiento en los pigmentos fotosintéticos (clorofila A y B) y el aumento de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno en las raíces.

Cleuvers (2003), evaluó la ecotoxicidad acuática de 10 productos farmacéuticos, dentro de ellos el ibuprofeno y diclofenaco, incluida la evaluación de sus efectos combinados sobre *D. magna*, *L. minor* y el alga *D. subspicatus*. El punto final de lectura para daphnia fue inmovilización a las 48h, mientras que, para las otras dos especies, la inhibición en la tasa de crecimiento. Se obtuvo un CE<sub>50</sub> para daphnia de 68 mg.L<sup>-1</sup> y 174 mg.L<sup>-1</sup>, mientras que para lemna, valores de 7.5 mg.L<sup>-1</sup> y 24,2 mg.L<sup>-1</sup> para diclofenaco e ibuprofeno respectivamente. *Lemna* resultó ser la especie más sensible de las tres. Dentro de los AINES evaluados, el diclofenaco resultó ser el más tóxico, seguido del ibuprofeno y del naproxeno respectivamente. Se concluyó, además, que los fármacos antiinflamatorios diclofenaco e ibuprofeno actúan inespecíficamente por la narcosis no polar y siguen el concepto de adición de concentración tanto en la prueba de algas como en la prueba de Daphnia.

En la literatura, Cleuvers (2003), reportó una CE<sub>50</sub> (7d) para *L. minor* de 22 mg/L expuesta a ibuprofeno resultando en la inhibición del crecimiento. No obstante, Pomati *et al.*, (2004), encontró un 25% de inhibición del crecimiento en cultivos de *L. minor* expuestos a 1mg/L de ibuprofeno. Estas evaluaciones demuestran el alto grado de sensibilidad de esta especie frente a la presencia del fármaco en

mención, haciéndolo un candidato importante para posteriores evaluaciones. Iannacone & Alvariano (2009), ambos investigadores peruanos, reportaron una  $CL_{50}$  de  $175 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  sobre *D. magna* a las 96 h de exposición.

A la fecha, no se han reportado evaluaciones toxicológicas sobre el pez tropical *P. innesi* expuesto a ibuprofeno. Investigaciones recientes señalan que la toxicidad crónica de este fármaco se debe principalmente a sus metabolitos (80% del compuesto original se transforma en hidroxibuprofeno y carboxibuprofeno) que son más tóxicos que el compuesto original (Ruiz & Font, 2011).

En una investigación llevado a cabo en la Universidad Agraria La Molina, Lima-Perú, por Iannacone & Alvariano (2009), llevo a cabo una evaluación de 7 productos farmacéuticos, dentro de ellos el diclofenaco e ibuprofeno, en el ambiente dulceacuícola, el ibuprofeno ocupó el tercer lugar con  $175 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en una escala de ecotoxicidad decreciente en términos de concentración letal media frente a las 96h de exposición. El ibuprofeno obtuvo un Ratio Agudo Crónico (RAC) de 1.16.

Debido a la naturaleza del objeto de estudio, las evaluaciones del riesgo ambiental en AINEs en el contexto nacional son alarmantemente escasas.



### III. OBJETIVOS/HIPÓTESIS

#### 1. Hipótesis

La presencia de ibuprofeno y diclofenaco en ecosistemas dulceacuícolas, provocará efectos letales y subletales en bioindicadores representativos de la cadena trófica: *D. magna*, *L. gibba* y *P. innesi*, por lo que será necesario la evaluación del riesgo ambiental de ambos compuestos farmacéuticos con el objetivo de proponer estándares de calidad ambiental en la categoría de conservación del ambiente acuático para ambos contaminantes.

#### 2. Objetivos

##### a. Objetivo Principal

- Evaluar la toxicidad y riesgo ambiental producido por dos contaminantes emergentes: diclofenaco e ibuprofeno, en organismos bioindicadores del ecosistema dulceacuícola: *D. magna*, *L. gibba* y *P. innesi*; con el objetivo de estimar estándares de calidad ambiental en la categoría de conservación del ambiente acuático, contribuyendo así a la generación de un marco normativo regulatorio de ambos compuestos farmacéuticos en los ecosistemas dulceacuícolas.

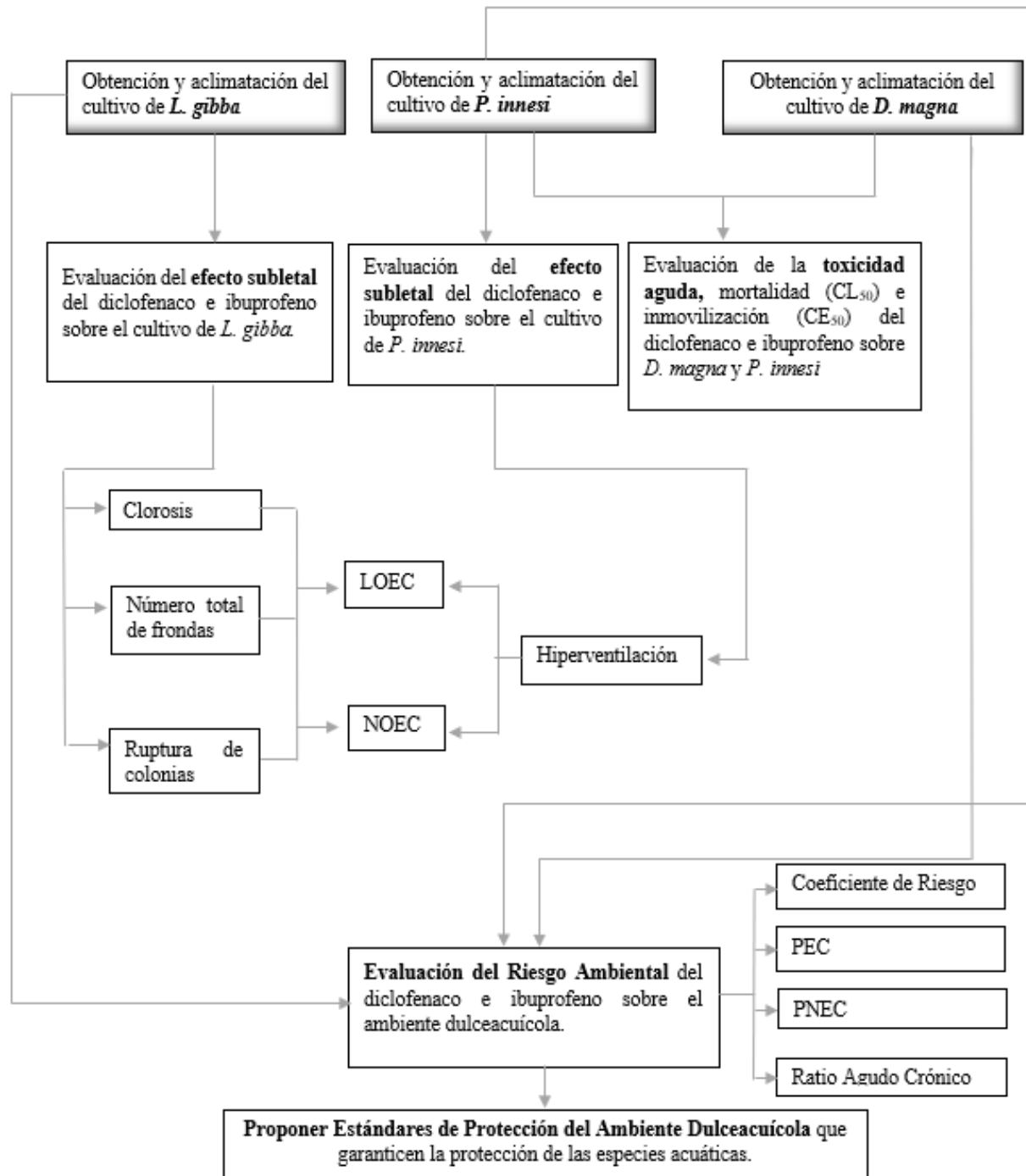
##### b. Objetivos Específicos

- Realizar un análisis ecotoxicológico, con el fin de determinar si la presencia del diclofenaco e ibuprofeno generaría un riesgo ambiental para la conservación de los ecosistemas dulceacuícolas en el territorio nacional.

- Proponer los valores de los Estándares de Calidad Ambiental (ECAs) en la categoría de la conservación del ambiente acuático, para ambos compuestos farmacéuticos.
- Realizar un análisis toxicológico, con el fin de determinar que compuesto farmacéutico presenta mayor grado de toxicidad sobre los tres modelos biológicos empleados: *D. magna*, *L. gibba* y *P. innesi*
- Evaluar la toxicidad aguda producida por el diclofenaco e ibuprofeno sobre *D. magna* y *P. innesi*.
- Evaluar el efecto subletal producido por el diclofenaco e ibuprofeno sobre *L. gibba* y *P. innesi*.
- Proponer el modelo biológico más sensible para la evaluación de productos farmacéuticos.

**IV. METODOLOGÍA**

**1. *Diseño Experimental***



**Figura 10:** Diseño Experimental.

*Fuente:* Elaboración propia

## **2. Metodología**

### *2.1. Obtención y aclimatación de los cultivos*

#### ***L. gibba***

Los organismos fueron recolectados de un afloramiento de agua superficial ubicado en Pantanos de Villa-Chorrillos, con ayuda de un recipiente de plástico previamente esterilizado y llevados al laboratorio de Investigación del Pabellón de Biología Marina – UCSUR para su identificación. Una muestra de agua del sitio de 5 litros del lugar de colecta fue trasladada a un laboratorio certificado para la medición de los parámetros físico-químicos respectivos y la cuantificación de metales pesados, encontrándose estos últimos en todos los casos con valores por debajo de la normativa peruana (DS 004-2017-MINAM, Categoría 4: Conservación del ambiente acuático)

Se identificó *L. gibba* de acuerdo con los criterios de identificación propuestos por la Sociedad Botánica de Islas Británicas (BSBI). La crianza y aclimatación del cultivo de lemnas se realizó dos semanas previa a la ejecución de los ensayos en un acuario de 60 cm largo x 30 cm de ancho x 30 cm de alto con un alto contenido de sales nutritivas. El cultivo de 7 litros, estuvo conformado por 3.5 litros del agua de colecta previamente filtrada, y por 3.5 de agua cielo con soluciones nutritivas de tipo A y B. En el acuario se consideró una profundidad de agua mayor de 80 mm y la instalación de fluorescentes de luz blanca sumando un total de 6500 lux, de acuerdo con el protocolo estipulado en la guía para ensayos con *Lemna sp.* (OECD,2006). Al décimo primer día de la instalación del cultivo, se realizó un recambio del agua de la pecera por 7 litros de agua de mesa cielo, la cual presentó un pH de 7.59, agua neutra. Al culminar

la segunda semana de aclimatación, se procedió a la instalación de las concentraciones.

#### ***D. magna***

El cultivo de *D. magna*, obtenido a partir del laboratorio de Larvicultura Experimental del Pabellón de Biología Marina- UCSUR fue aclimatado con un sistema de aireación continuo y alimentado diariamente con *Chlorella vulgaris* por el lapso de 7 días. Se mantuvo a una temperatura de 18-22°C de acuerdo con el protocolo de ensayo de inmovilización y reproducción con *Daphnia sp.* (OECD,1984)

Para el ensayo, se emplearon neonatos con menos de 24 horas de vida. Estos fueron obtenidos a partir de la selección de hembras adultas partenogénicas que presentaban una formación completa del neonato en su bolsa incubadora con ayuda de un estereoscopio. Al día siguiente, los neonatos recién nacidos fueron trasladados con ayuda de una pipeta previamente esterilizada a las respectivas concentraciones para dar inicio al bioensayo en el laboratorio de Ingeniería Ambiental -UCSUR.

#### ***P. innesi***

Se acondicionó un acuario de vidrio de 80 cm de largo x 30 cm ancho x 30 cm de alto el cual fue llenado al 90% de su capacidad con agua de mesa Cielo. Dentro del acuario se implementó un termómetro para la lectura de mediciones instantáneas de la temperatura del agua, una piedra difusora regulable para garantizar que la concentración de oxígeno disuelto fuera el apropiado, un filtro tipo flauta con 2 etapas de filtrado: mecánica (esponja) y biológica (canutillos), y

un termostato para alcanzar los 24-28°C al tratarse de una especie tropical. Se dejó funcionar el sistema del acuario, pero sin contener peces por una semana. Esto con la finalidad de que las bacterias nitrificantes colonicen el medio acuático, sobre todo las esponjas del filtro, proceso denominado “ciclado”. Estas bacterias son las encargadas de consumir y transformar los compuestos nitrogenados tóxicos generados por la descomposición del exceso de comida de los peces, así como de sus desechos, en compuestos no tóxicos.

Los organismos juveniles fueron adquiridos de un acuario Amazónico especializado en peces Neotropicales. Se identificó *P. innesi* tomando como referencia la presencia de una franja azul fosforescente que recorre su cuerpo desde el morro hasta la aleta adiposa. Posteriormente los organismos fueron trasladados al laboratorio en bolsas de polietileno, conteniendo 2/4 de agua cielo y 2/4 de oxígeno. Antes de la aclimatación en el laboratorio se descartaron los individuos que hubieran sufrido daños mecánicos durante el transporte.

Los neones fueron colocados dos semanas previas a la ejecución de las pruebas ecotoxicológicas en el acuario. Neón tetra fue alimentado diariamente con alimento en escamas para peces tropicales (Nutrafin Max®) y expuestos a un fotoperiodo de 12h de luz y 12h de oscuridad. Se introdujo *Elodea sp.* para evitar el estrés de los neones. Se midió los parámetros fisicoquímicos del agua 3 veces por semana considerando una temperatura promedio de 26°C, conductividad ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), pH, dureza y compuestos nitrogenados, tales como amonio ( $\text{NH}_4$ ), nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3$ ).

## *2.2. Obtención de los productos farmacéuticos*

Ambos productos farmacéuticos fueron obtenidos a partir de sus respectivos ingredientes activos contenidos en sus productos comerciales para ser usados en los ensayos ecotoxicológicos. Para la obtención de diclofenaco se usó pastillas de 100mg (Genfar®). Cada tableta contuvo 100mg de diclofenaco sódico y excipientes c.s.

Para el ibuprofeno se emplearon pastillas de 400mg de FARMAINDUSTRIA S.A. Cada tableta contuvo 400mg de ibuprofeno (aproximadamente 44,450 mg de ibuprofeno DC 90) y excipientes c.s.p.

### 2.3. Protocolo experimental

#### *L. gibba*

El protocolo experimental para los medios de cultivo de *L. gibba* se muestran en la Tabla 7.

#### Tabla N°7

*Protocolo experimental para los medios de cultivo de L. gibba.*

Parámetros	Condiciones
Tipo de Ensayo	Estático
Duración del bioensayo	7 días (168 horas)
Factor de dilución	2.1
Temperatura ambiental (C°)	24 [+/- 2] °C
Calidad de luz	Blanca (6500lux)
Fotoperiodo	24 horas luz
Material, color, forma y tamaño del envase	Vidrio, Transparente, circular, 50mL
Número de organismos por réplica	10
Número de frondas	2 del mismo tamaño.
Color y aspecto de la fronda	Verde uniforme, saludable
Número de réplicas por concentración	4
Aireación de la solución prueba	NO
Alimentación durante la prueba	NO
Sustrato	NO
Parámetros físicoquímicos	pH, T°, OD

*Fuente:* Elaboración Propia. Directrices de la OECD para la prueba de productos químicos. *Lemna sp.* Inhibición del crecimiento (OECD,2006)



### ***D. magna***

El protocolo experimental para los medios de cultivo con *D. magna* se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8**

*Protocolo experimental para los medios de cultivo de D. magna.*

<b>Parámetros</b>	<b>Condiciones</b>
Tipo de Ensayo	Estático
Duración del bioensayo	2 días (48 horas)
Factor de Dilución	1.25
Temperatura del agua	21-22°C
Calidad de luz	Iluminación ambiental del laboratorio
Fotoperiodo	16 h de luz, 8 de oscuridad
Número de organismos por réplica	5
Edad de los organismos	Neonatos (<24 horas)
Número de réplicas por concentración	4
Aireación de la solución prueba	NO
Alimentación durante la prueba	NO
Sustrato	NO
Parámetros fisicoquímicos	pH, T°, OD

*Fuente:* Elaboración Propia. Adaptado de OCDE, 1984.

***P. innesi***

El protocolo experimental para los medios de cultivo de *P. innesi* se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9**

*Protocolo experimental para los medios de cultivo de P. innesi*

<b>Parámetros</b>	<b>Condiciones</b>
Tipo de Ensayo	Estático
Duración del bioensayo	4 días (96 horas)
Factor de Dilución	1.18
Temperatura del agua	24-28°C
pH	6-7 (Ligeramente ácido a neutro)
Dureza del agua	5-15 dGH
Calidad de luz	Iluminación ambiental del laboratorio
Fotoperiodo	12h de luz: 12h de oscuridad
Número de organismos por réplica	5
Tamaño de los organismos	1.5 a 2cm
Número de réplicas por concentración	4
Aireación de la solución prueba	NO
Alimentación durante la prueba	NO
Sustrato	NO
Parámetros fisicoquímicos	pH, T°

*Fuente:* Elaboración propia.

## 2.4 Diseño experimental y lectura

### *L. gibba*

Se trabajó con 5 concentraciones y un control, con un total de cuatro repeticiones por cada tratamiento.

Se empleó un total 24 envases de vidrio de 50mL por cada fármaco, debidamente rotulados. En cada recipiente se colocó 10 *lemnas* de acuerdo con el diseño experimental propuesto. En base a valores de CE<sub>50</sub> disponibles en la literatura, se estimaron las respectivas concentraciones a utilizarse por cada fármaco con un factor de dilución de 2.1 (ver tabla 10).

**Tabla 10**

*Concentraciones de Diclofenaco e Ibuprofeno para el diseño experimental con L. gibba.*

	Control	C1	C2	C3	C4	C5
<b>Diclofenaco (mg/L)</b>	0	7,0	14,7	30,9	64,8	136,1
<b>Ibuprofeno (mg/L)</b>	0	10,0	21,0	44,1	92,6	194,5

*Fuente:* Elaboración propia

Una vez realizada la instalación, se procedió 7 días después a la lectura de los efectos subletales mediante la evaluación de los siguientes parámetros: a) clorosis (pérdida de tonalidad verdosa en más del 50% de la fronda, b) número de frondas totales y c) ruptura de colonias.

### ***D. magna***

Para el desarrollo de la prueba de toxicidad aguda con *D. magna* se emplearon neonatos menores a 24 h de nacidos (OCDE, 1984). Durante el bioensayo no se suministró alimento a fin de garantizar la biodisponibilidad del tóxico de prueba. En base a valores de CL<sub>50</sub> y CE<sub>50</sub> obtenidos en el ensayo preliminar y en la literatura, se estimaron las respectivas concentraciones a utilizarse por cada fármaco con un factor de dilución de 1.25 (ver tabla 11).

**Tabla 11**

*Concentraciones de Diclofenaco e Ibuprofeno para el diseño experimental con D. magna.*

	<b>Control</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>
<b>Diclofenaco (mg/L)</b>	0	58,0	72,5	90,6	113,3	141,6
<b>Ibuprofeno (mg/L)</b>	0	75,0	93,8	117,2	146,5	183,1

*Fuente:* Elaboración propia.

La lectura se realizó a las 24 h y 48 h de exposición. A cada beaker de vidrio de 250 mL se procedió a agregar 200 mL de cada una de las concentraciones, a los que se transfirió 5 neonatos de *D. magna*. Antes de realizar las lecturas se agitó los envases en forma circular para reactivar el movimiento de los organismos que poseen inmóviles en el fondo (Castillo, 2004).

La carencia de movilidad o la ausencia de ritmo cardiaco a 20s de observación al estereoscopio fue considerado como criterio de mortalidad. Cuando la especie no presentó algún tipo de movilidad (nado) dentro de los 15s siguientes a la agitación del fue considerado como criterio para evaluar la inmovilización (OECD, 1984).

### ***P. innesi***

Los neones tetra usados en los bioensayos fueron extraídos del cultivo al culminar las dos semanas de aclimatación. Los peces seleccionados tuvieron una apariencia externa saludable para su uso en los bioensayos. Previamente al ensayo definitivo, se realizó una prueba límite con el fin de definir las concentraciones de efecto para ambos fármacos. Las concentraciones definitivas usadas para el bioensayo se ilustran en la tabla 12.

**Tabla 12**

*Concentraciones del Diclofenaco e Ibuprofeno para el diseño experimental con P. innesi.*

	<b>Control</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>
<b>Diclofenaco (mg/L)</b>	0	98,0	115,7	136,5	161,1	190,1
<b>Ibuprofeno (mg/L)</b>	0	95,4	112,6	132,9	156,8	185,1

*Fuente:* Elaboración propia.

Las lecturas se realizaron a las 24 h ,48 h, 72 h y 96 h de exposición. *P. innesi* no se alimentó durante los bioensayos. Se consideró 3 parámetros como puntos

finales de lectura: 1) Muerte: al tocar el pez con un estilete y si después de 10 segundos no realiza ningún movimiento e 2) Inmovilización: el pez posa inmóvil en el recipiente; y 1 subletal e 3) Hiperventilación: el pez respira aceleradamente.

### *2.5. Análisis estadístico*

La eficacia de los tratamientos para cada punto de lectura de las tres especies evaluadas se evaluó a través de un Análisis de Varianza (ANOVA), previa transformación de los datos mediante el método de Box-Cox, con el fin de cumplir con los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Levene), en caso haya sido necesario.

A continuación, se utilizó la prueba de Tukey para determinar entre qué grupos hubo diferencias significativas, y con ello establecer las significancias y calcular los valores de NOEC y LOEC. Las CE50s se calcularon usando el software TRAP v.1.30a (EPA, Environmental Protection Agency de los EE.UU.) y considerando límites de confianza al 95%. Se aplicó la prueba de ANOVA de muestras pareadas a los valores de los tratamientos de diferentes horas y puntos de lectura para hallar diferencias significativas entre las CE50s.

Los análisis ya mencionados se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico R v.3.5.1., considerando un nivel de significancia de 0,05.

*2.6. Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA) y  
Formulación de Estándares de Protección del Ambiente  
Dulceacuícola*

La evaluación se llevó a cabo de acuerdo con la guía de Medicina Europea (EMEA, 2006), adaptada con datos locales. Para el cálculo del PEC en agua superficial, se consideró una dosis de ingesta diaria máxima por habitante de 225mg hab.<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> para el diclofenaco y de 3400mg hab.<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> para ibuprofeno (FDA, USA). Se asumió un factor de penetración de 0.01 (EMEA,2006), un consumo de 142 l.inh<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> a nivel local (OEFA,2014) además de un factor de dilución de 2, correspondiente a la relación efluente/superficie para ambos fármacos (O'Brien & Dietrich,2004).

Para el cálculo del PNEC se empleó un factor de seguridad de 1000 al tener al menos un dato de toxicidad a corto plazo (CE<sub>50</sub>) en cada uno de los tres niveles tróficos (daphnias, peces y plantas acuáticas) (OECD,1992). La caracterización del Coeficiente de riesgo (CR) se determinó a partir de la relación PEC/PNEC. Asimismo, se halló los valores del Ratio Agudo Crónico (RAC), NOEC y LOEC.

En base a la determinación del valor del PNEC de la especie más sensible expuesta al fármaco, se propusieron los estándares de calidad ambiental para la protección del ambiente dulceacuícola frente a la presencia de diclofenaco e ibuprofeno respectivamente.

## V. RESULTADOS

### 1. *Daphnia magna*

#### 1.1 Diclofenaco

En la tabla 13 se muestran los resultados referentes al efecto del diclofenaco sobre *D. magna*.

**Tabla 13.**

Efecto del diclofenaco sobre *D. magna* a las 24 y 48 h de exposición tomando como puntos de lectura el % de mortalidad y % de inmovilización.

Tratamiento (mg·L <sup>-1</sup> )	% mortalidad 24 h		% mortalidad 48 h		% inmovilización 24 h		% inmovilización 48 h	
	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.
<b>Control</b>	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a
<b>58,0</b>	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	5,0 ± 10,0	ab	30,0 ± 11,5	b
<b>72,5</b>	5,0 ± 10,0	a	30,0 ± 11,5	b	20,0 ± 0,0	b	65,0 ± 10,0	cd
<b>90,6</b>	10,0 ± 11,5	ab	45,0 ± 10,0	bc	50,0 ± 11,5	cd	70,0 ± 11,5	d
<b>113,3</b>	20,0 ± 16,3	bc	65,0 ± 10,0	c	65,0 ± 10,0	d	100,0 ± 0,0	e
<b>141,6</b>	65,0 ± 10,0	c	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	e	100,0 ± 0,0	e
<b>NOEC</b>	<b>90,6</b>		<b>58,0</b>		<b>58,0</b>		<b>&lt;58,0</b>	
<b>LOEC</b>	<b>113,3</b>		<b>72,5</b>		<b>72,5</b>		<b>58,0</b>	
<b>CL(E)<sub>50</sub></b>	<b>132,5</b>		<b>95,4</b>		<b>95,4</b>		<b>69,5</b>	
<b>LCL</b>	126,7		92,0		91,9		65,8	
<b>UCL</b>	138,4		98,9		98,8		73,2	

SIG= Significancia. Letras iguales en sentido vertical señalan que los promedios son estadísticamente iguales. Prueba de Tukey (R v.3.5.1).

NOEC=Concentración de efecto no observado. LOEC= Concentración mínima de efecto observado. CL(E)<sub>50</sub>= Concentración letal/efectiva media. LCL= Nivel mínimo de confianza. UCL= Nivel de confianza superior.

Se observó efecto tóxico del diclofenaco sobre el % de mortalidad y % de inmovilización a las 24 y 48 h de exposición en *D. magna* (tabla 13).

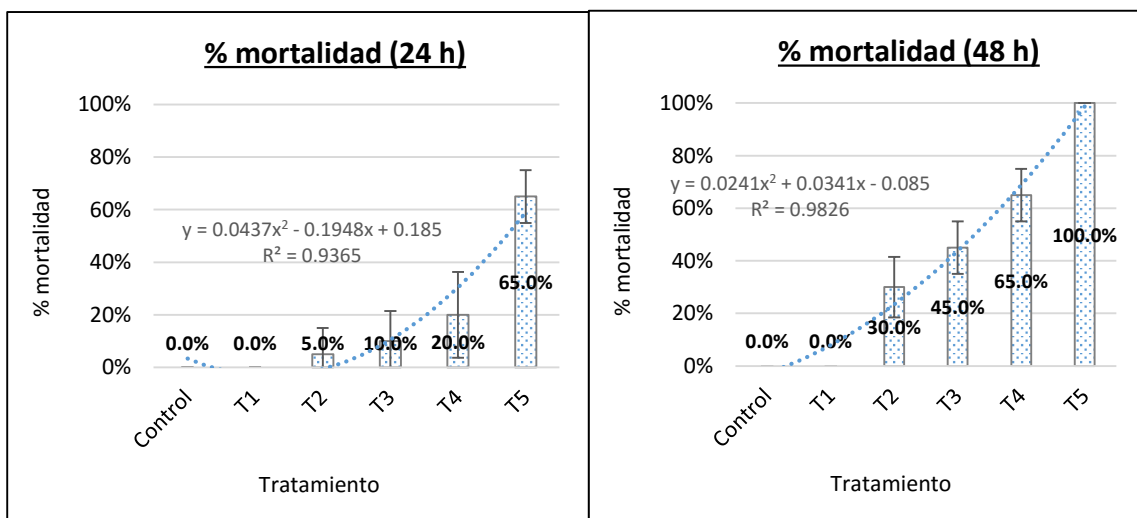
Los valores de CL(E)<sub>50</sub>, NOEC y LOEC reportados sobre *D. magna* tras la exposición a diclofenaco a las 48 h, fueron más sensibles que los reportados a



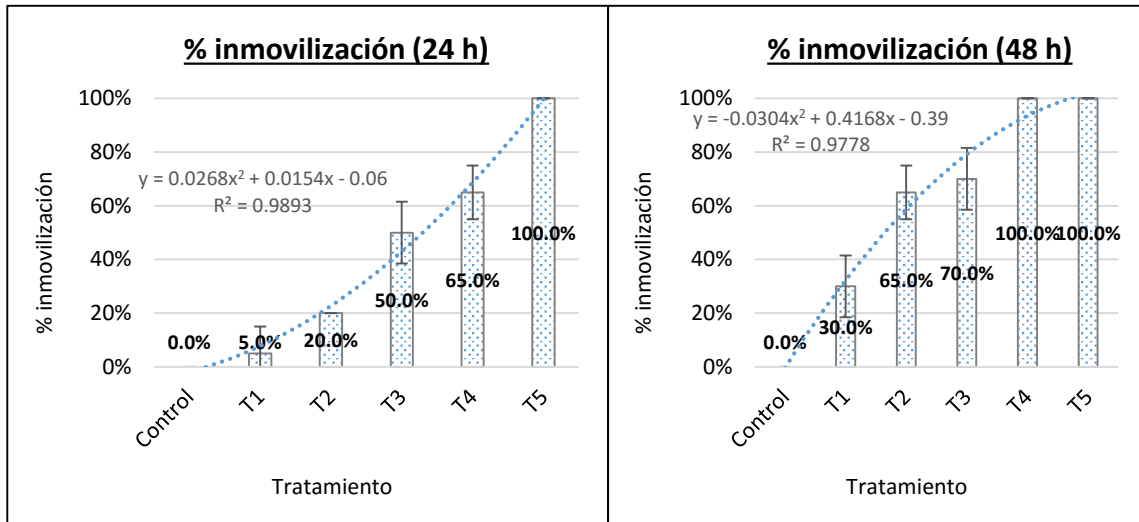
las 24 h para ambos puntos de evaluación (tabla 13). Esto se traduce, en un mayor efecto tóxico del diclofenaco, a medida que el tiempo de exposición transcurre.

Los valores de inmovilización de CL(E)<sub>50</sub>, NOEC y LOEC a las 48 h fueron más sensibles en comparación a los de mortalidad registradas en *D. magna* (tabla 13).

En las figuras 11 y 12, se ilustra mediante diagramas de barras, el comportamiento de cada tratamiento vs el porcentaje de mortalidad o inmovilización, además de las ecuaciones de regresión y línea de tendencia que rigen el comportamiento para ambos parámetros evaluados tras la exposición de *D. magna* a diclofenaco.



**Figura 11.** Gráfico de barras acerca del efecto del diclofenaco en *D. magna* sobre el porcentaje (%) de mortalidad a las 24 y 48 h de exposición.



**Figura 12.** Gráfico de barras acerca del efecto del diclofenaco en *D. magna* sobre el porcentaje (%) de inmovilización a las 24 y 48 h de exposición.

*b. ibuprofeno*

En la tabla 14 se muestran los resultados referentes al efecto del diclofenaco sobre *D. magna*.

**Tabla 14.**

Efecto del ibuprofeno sobre *D. magna* a las 24 y 48 h de exposición tomando como puntos de lectura el % de mortalidad y % de inmovilización.

Tratamiento (mg·L <sup>-1</sup> )	% mortalidad 24 h		% mortalidad 48 h		% inmovilización 24 h		% inmovilización 48 h	
	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.
<b>Control (0)</b>	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a
<b>75,0</b>	0,0 ± 0,0	a	10,0 ± 11,5	a	15,0 ± 10,0	ab	15,0 ± 10,0	a
<b>93,8</b>	5,0 ± 10,0	ab	30,0 ± 11,5	b	30,0 ± 11,5	b	70,0 ± 11,5	b
<b>117,2</b>	20,0 ± 16,3	b	70,0 ± 20,0	c	65,0 ± 10,0	c	100,0 ± 0,0	c
<b>146,5</b>	60,0 ± 0,0	c	100,0 ± 0,0	d	95,0 ± 10,0	d	100,0 ± 0,0	c
<b>183,1</b>	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	c
<b>NOEC</b>	<b>93,8</b>		<b>75,0</b>		<b>75,0</b>		<b>75,0</b>	
<b>LOEC</b>	<b>117,2</b>		<b>93,8</b>		<b>93,8</b>		<b>93,8</b>	
<b>CL(E)<sub>50</sub></b>	<b>137,0</b>		<b>103,9</b>		<b>105,6</b>		<b>87,3</b>	
<b>LCL</b>	133,1		100,6		101,7		85,0	
<b>UCL</b>	140,9		107,2		109,4		89,5	

SIG= Significancia. Letras iguales en sentido vertical señalan que los promedios son estadísticamente iguales. Prueba de Tukey (R v.3.5.1).

NOEC=Concentración de efecto no observado. LOEC= Concentración mínima de efecto observado. CL(E)<sub>50</sub>= Concentración letal/efectiva media. LCL= Nivel mínimo de confianza. UCL= Nivel de confianza superior.

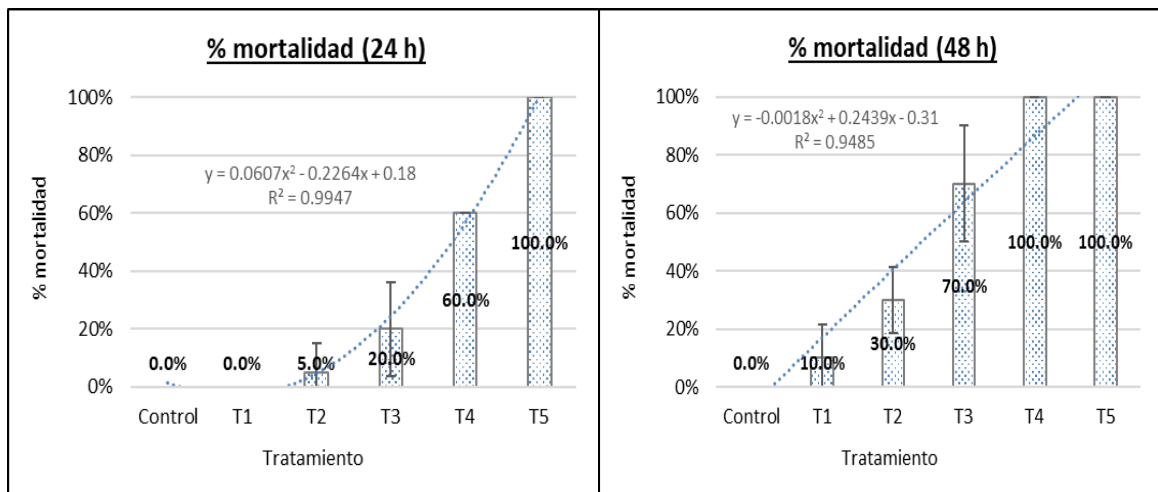
Se observó efecto tóxico del ibuprofeno sobre el % de mortalidad y % de inmovilización a las 24 y 48 h de exposición en *D. magna* (tabla 14).

Los valores de CL(E)<sub>50</sub>, NOEC y LOEC reportados sobre *D. magna* tras la exposición a ibuprofeno a las 48 h, fueron más sensibles que los reportados a

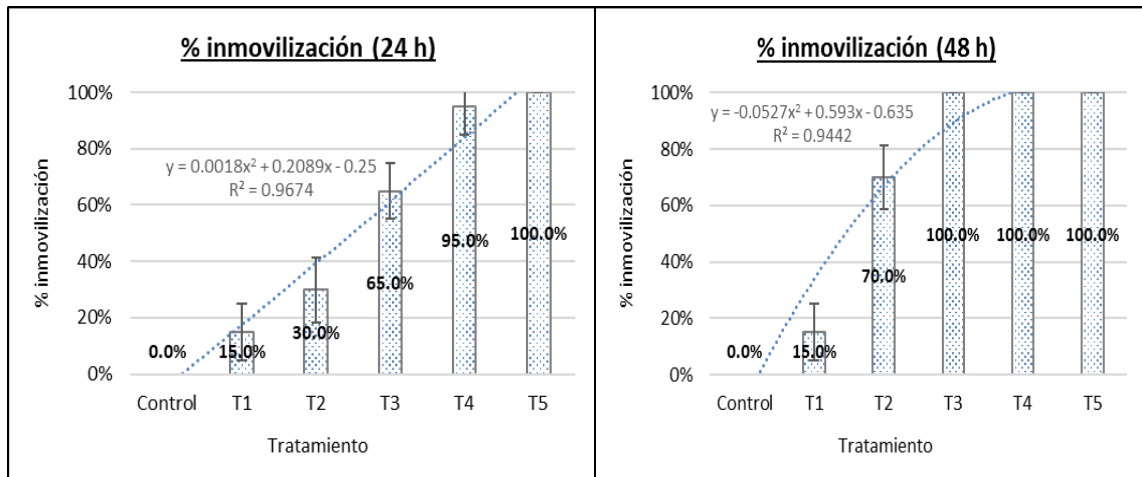
las 24 h para ambos puntos de evaluación (tabla 14). Esto se traduce, en un mayor efecto tóxico del ibuprofeno, a medida que el tiempo de exposición transcurre.

Los valores de CL(E)<sub>50</sub> a las 48 h fueron más sensibles en comparación a los de mortalidad registradas en *D. magna* (tabla 14).

En las figuras 13 y 14, se ilustra mediante diagramas de barras, el comportamiento de cada tratamiento vs el porcentaje de mortalidad o inmovilización, además de las ecuaciones de regresión y línea de tendencia que rigen el comportamiento para ambos parámetros evaluados tras la exposición de *D. magna* a ibuprofeno.



**Figura 13.** Gráfico de barras acerca del efecto del ibuprofeno en *D. magna* sobre el porcentaje (%) de mortalidad a las 24 y 48 h de exposición.



**Figura 14.** Gráfico de barras acerca del efecto del ibuprofeno en *D. magna* sobre el porcentaje (%) de inmovilización a las 24 y 48 h de exposición.

## 2. Paracheiroidon innesi

### 2.1 Diclofenaco

#### a. Mortalidad

En la tabla 15 se muestran los resultados referentes al efecto del diclofenaco sobre *P. innesi*.

**Tabla 15.**

Efecto del diclofenaco sobre *P. innesi* a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición tomando como punto final de lectura el porcentaje (%) de mortalidad.

Tratamiento (mg·L <sup>-1</sup> )	% mortalidad							
	24 h		48 h		72 h		96 h	
	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.
<b>Control</b>	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a
<b>98,0</b>	5,0 ± 10,0	a	5,0 ± 10,0	a	15,0 ± 19,1	a	15,0 ± 19,1	a
<b>115,7</b>	30,0 ± 11,5	b	60,0 ± 28,3	b	65,0 ± 30,0	b	80,0 ± 16,3	bc
<b>136,5</b>	80,0 ± 23,1	c	80,0 ± 23,1	c	85,0 ± 19,1	c	95,0 ± 10,0	cd
<b>161,1</b>	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	c	100,0 ± 0,0	d
<b>190,1</b>	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	c	100,0 ± 0,0	d
<b>NOEC</b>	<b>98,0</b>		<b>98,0</b>		<b>98,0</b>		<b>98,0</b>	
<b>LOEC</b>	<b>115,7</b>		<b>115,7</b>		<b>115,7</b>		<b>115,7</b>	
<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>123,3</b>		<b>117,9</b>		<b>113,5</b>		<b>108,9</b>	
<b>LCL</b>	120,7		115,1		110,6		106,5	
<b>UCL</b>	125,9		120,6		116,4		111,4	

SIG= Significancia. Letras iguales en sentido vertical señalan que los promedios son estadísticamente iguales. Prueba de Tukey (R v.3.5.1).

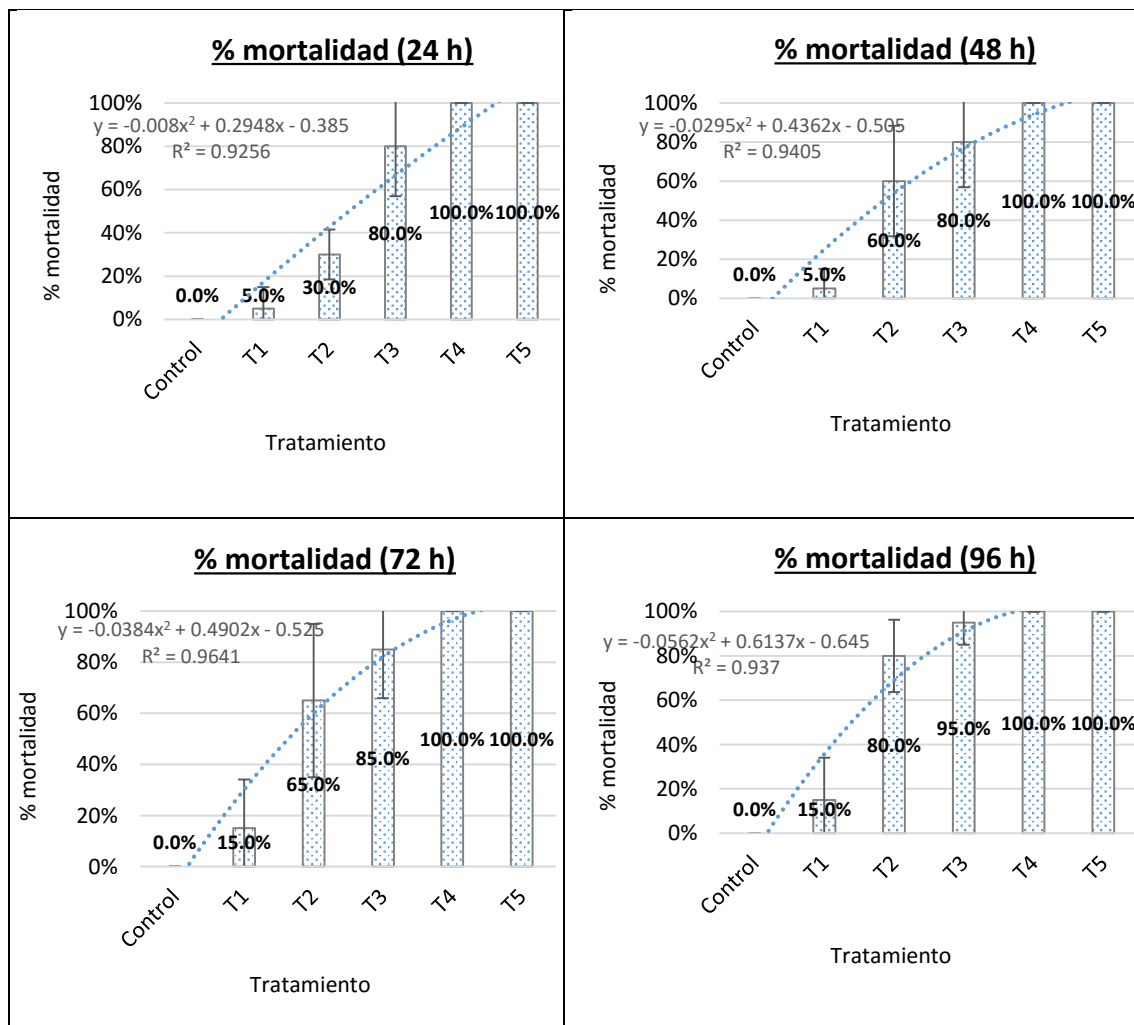
NOEC=Concentración de efecto no observado. LOEC= Concentración mínima de efecto observado. CL<sub>50</sub>= Concentración letal media. LCL= Nivel mínimo de confianza. UCL= Nivel de confianza superior.

Se observó efecto tóxico del diclofenaco sobre el % de mortalidad a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición en *P. innesi* (tabla 15). El valor de CL<sub>50</sub> reportado sobre *P. innesi* tras la exposición a diclofenaco a las 96 h, fue más sensible que los reportados a las 24, 48 y 72 h (tabla 15). Esto se traduce, en un mayor efecto

tóxico del diclofenaco sobre el porcentaje de mortalidad, a medida que el tiempo de exposición transcurre. En las concentraciones de ensayo de 161,1 y 190,1 mg·L<sup>-1</sup> se reportó un porcentaje de mortalidad del 100% en *P. innesi*.

Para los cuatro horizontes de evaluación, se obtuvo un LOEC de 115,7 mg·L<sup>-1</sup> y un NOEC de 98,0 mg·L<sup>-1</sup> (tabla 15). Este último nos indica que por debajo de esta concentración no se registraron efectos sobre *P. innesi*.

En la figura 15, se ilustra las ecuaciones de regresión y línea de tendencia que rigen el comportamiento de cada tratamiento respecto al porcentaje de mortalidad tras la exposición de *P. innesi* a diclofenaco.



**Figura 15.** Gráfico de barras acerca del efecto del diclofenaco en *P. innesi* sobre el porcentaje (%) de mortalidad a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

**b. Inmovilización**
**Tabla 16.**

Efecto del diclofenaco sobre *P. innesi* a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición tomando como punto de lectura el porcentaje (%) de inmovilización.

Tratamiento (mg·L <sup>-1</sup> )	% inmovilización							
	24 h		48 h		72 h		96 h	
	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.
<b>Control</b>	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a
<b>98,0</b>	5,0 ± 10,0	a	5,0 ± 10,0	a	15,0 ± 19,1	a	15,0 ± 19,1	a
<b>115,7</b>	45,0 ± 25,2	b	60,0 ± 28,3	b	65,0 ± 30,0	b	80,0 ± 16,3	bc
<b>136,5</b>	80,0 ± 23,1	c	80,0 ± 23,1	c	85,0 ± 19,1	c	95,0 ± 10,0	cd
<b>161,1</b>	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	c	100,0 ± 0,0	d
<b>190,1</b>	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	c	100,0 ± 0,0	d
<b>NOEC</b>	<b>98,0</b>		<b>98,0</b>		<b>98,0</b>		<b>98,0</b>	
<b>LOEC</b>	<b>115,7</b>		<b>115,7</b>		<b>115,7</b>		<b>115,7</b>	
<b>CE<sub>50</sub></b>	<b>120,6</b>		<b>117,9</b>		<b>113,5</b>		<b>108,9</b>	
<b>LCL</b>	118,0		115,1		110,6		106,5	
<b>UCL</b>	123,3		120,6		116,4		111,4	

SIG= Significancia. Letras iguales en sentido vertical señalan que los promedios son estadísticamente iguales. Prueba de Tukey (R v.3.5.1).

NOEC=Concentración de efecto no observado. LOEC= Concentración mínima de efecto observado. CE<sub>50</sub>= Concentración efectiva media. LCL= Nivel mínimo de confianza. UCL= Nivel de confianza superior.

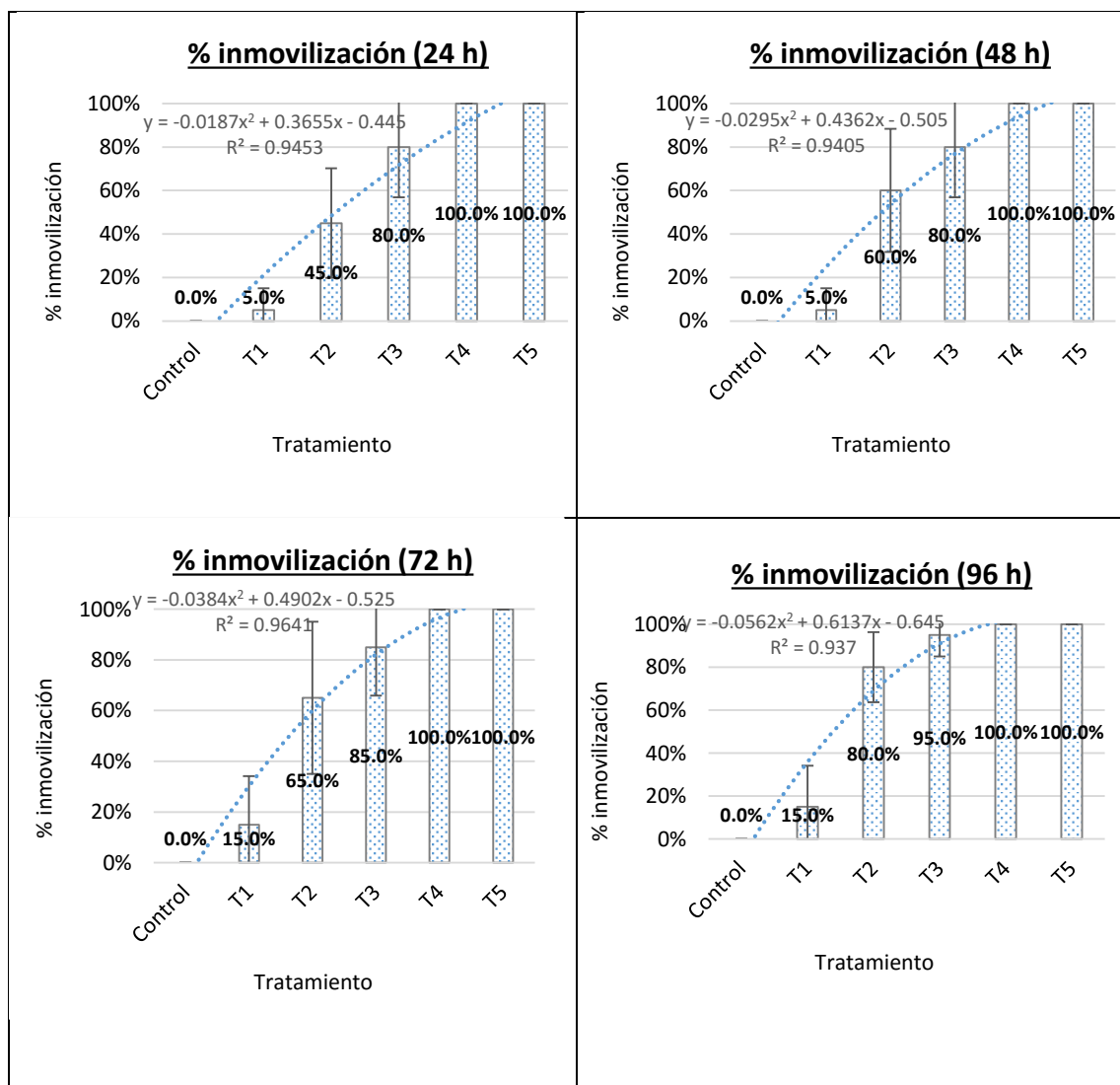
Se observó efecto tóxico del diclofenaco sobre el % de inmovilización a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición en *P. innesi* (tabla 16).

El valor de CE<sub>50</sub> reportado sobre *P. innesi* tras la exposición a diclofenaco a las 96 h, fue más sensible que los reportados a las 24, 48 y 72 h (tabla 16). Esto se traduce, en un mayor efecto tóxico del diclofenaco sobre el porcentaje de inmovilización, a medida que el tiempo de exposición transcurre. En las concentraciones de ensayo de 161,1 y 190,1 mg·L<sup>-1</sup> se reportó un porcentaje de inmovilización del 100% en *P. innesi*.



Para los cuatro horizontes de evaluación, por debajo de los 98,0 mg·L<sup>-1</sup> no se registraron efectos sobre el porcentaje de inmovilización en *P. innesi*, además de una concentración mínima de efecto observado (LOEC) de 115,7 mg·L<sup>-1</sup> (tabla 16)

En la figura 16, se ilustra las ecuaciones de regresión y línea de tendencia que rigen el comportamiento de cada tratamiento respecto al porcentaje de inmovilización tras la exposición de *P. innesi* a diclofenaco.



**Figura 16.** Gráfico de barras acerca del efecto del diclofenaco sobre *P. innesi* sobre el porcentaje (%) de inmovilización a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

### c. Hiperventilación

**Tabla 17.**

Efecto del diclofenaco sobre *P. innesi* a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición tomando como punto de lectura el porcentaje (%) de hiperventilación.

Tratamiento (mg·L <sup>-1</sup> )	% hiperventilación							
	24 h		48 h		72 h		96 h	
	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.
Control	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a
<b>98,0</b>	5,0 ± 10,0	a	5,0 ± 10,0	a	15,0 ± 19,1	a	15,0 ± 19,1	a
<b>115,7</b>	45,0 ± 25,2	b	60,0 ± 28,3	b	75,0 ± 25,2	bc	80,0 ± 16,3	bc
<b>136,5</b>	80,0 ± 23,1	c	85,0 ± 19,1	c	90,0 ± 20,0	cd	95,0 ± 10,0	cd
<b>161,1</b>	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	d
<b>190,1</b>	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	d	100,0 ± 0,0	d
<b>NOEC</b>	<b>98,0</b>		<b>98,0</b>		<b>98,0</b>		<b>98,0</b>	
<b>LOEC</b>	<b>115,7</b>		<b>115,7</b>		<b>115,7</b>		<b>115,7</b>	
<b>CE<sub>50</sub></b>	<b>120,6</b>		<b>116,8</b>		<b>110,7</b>		<b>108,9</b>	
<b>LCL</b>	118,0		114,3		108,0		106,5	
<b>UCL</b>	123,3		119,4		113,5		111,4	

SIG= Significancia. Letras iguales en sentido vertical señalan que los promedios son estadísticamente iguales. Prueba de Tukey (R v.3.5.1).

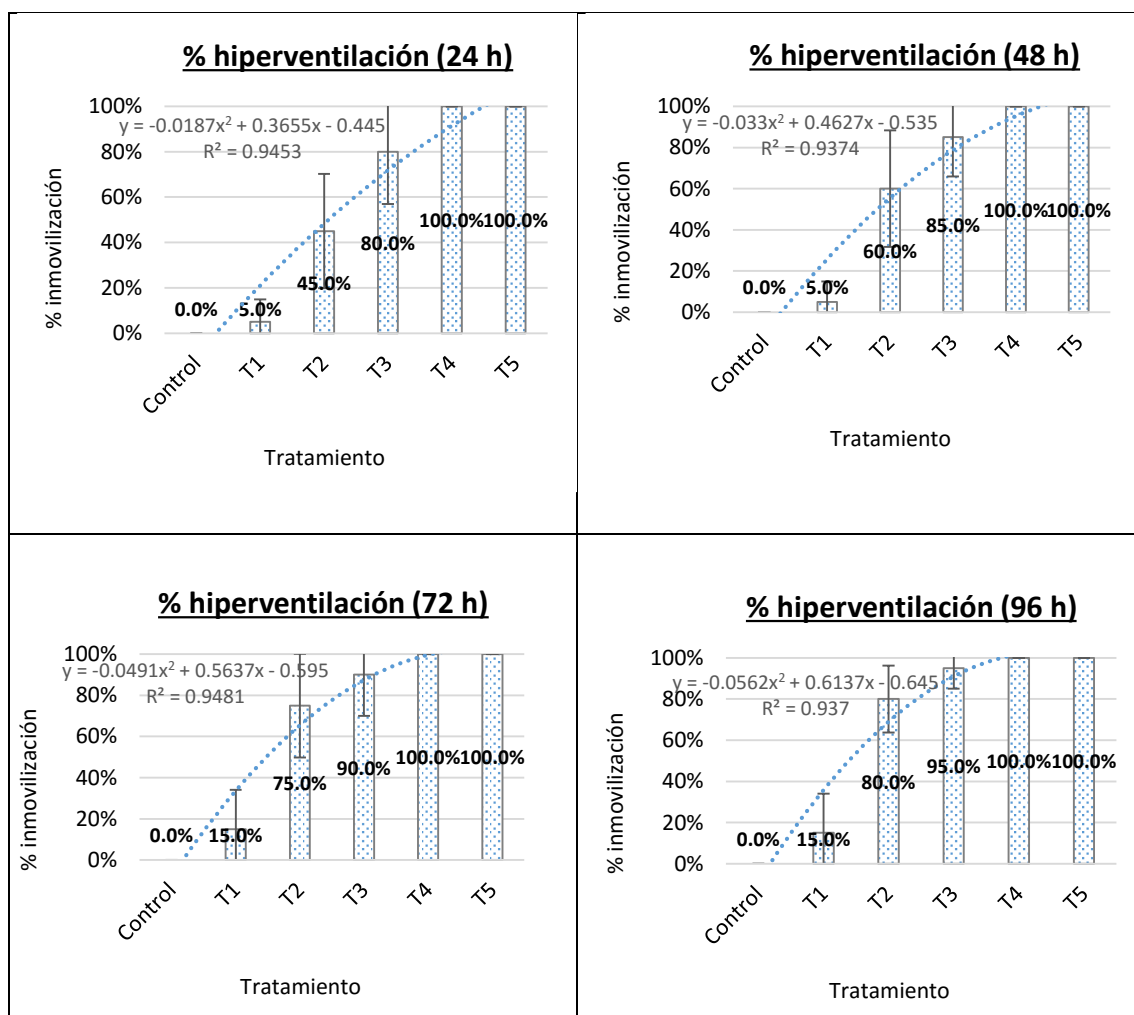
NOEC=Concentración de efecto no observado. LOEC= Concentración mínima de efecto observado. CE<sub>50</sub>= Concentración efectiva media. LCL= Nivel mínimo de confianza. UCL= Nivel de confianza superior.

Se observó efecto tóxico del diclofenaco sobre el % de hiperventilación a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición en *P. innesi* (tabla 17).

El valor de CE<sub>50</sub> reportado sobre *P. innesi* tras la exposición a diclofenaco a las 96 h, fue más sensible que los reportados a las 24, 48 y 72 h (tabla 17). Esto se traduce, en un mayor efecto tóxico del diclofenaco sobre el porcentaje de hiperventilación, a medida que el tiempo de exposición transcurre. En las concentraciones de ensayo de 161,1 y 190,1 mg·L<sup>-1</sup> se reportó un porcentaje de inmovilización del 100% en *P. innesi*.

Para los cuatro horizontes de evaluación, por debajo de los 98,0 mg·L<sup>-1</sup> no se registraron efectos sobre el porcentaje de inmovilización en *P. innesi*, además de una concentración mínima de efecto observado (LOEC) de 115,7 mg·L<sup>-1</sup> (tabla 17).

En la figura 17, se ilustra las ecuaciones de regresión y línea de tendencia que rigen el comportamiento de cada tratamiento respecto al porcentaje de hiperventilación tras la exposición de *P. innesi* a diclofenaco.



**Figura 17.** Gráfico de barras acerca del efecto del diclofenaco sobre *P. innesi* sobre el porcentaje (%) de nado hiperventilación a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

## 2.2. Ibuprofeno

### a. Mortalidad

**Tabla 18.**

Efecto del ibuprofeno sobre *P. innesi* a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición tomando como punto de lectura el porcentaje (%) de mortalidad.

Tratamiento (mg·L <sup>-1</sup> )	% mortalidad							
	24 h		48 h		72 h		96 h	
	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.
Control	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a
95,4	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	5,0 ± 10,0	a
112,6	0,0 ± 0,0	a	5,0 ± 10,0	ab	5,0 ± 10,0	a	5,0 ± 10,0	a
132,9	5,0 ± 10,0	a	15,0 ± 19,1	b	25,0 ± 10,0	b	35,0 ± 10,0	b
156,8	25,0 ± 30,0	b	50,0 ± 20,0	c	60,0 ± 16,3	c	70,0 ± 11,5	c
185,1	80,0 ± 28,3	c	85,0 ± 19,1	d	85,0 ± 19,1	d	90,0 ± 11,5	d
<b>NOEC</b>	<b>132,9</b>		<b>112,6</b>		<b>112,6</b>		<b>112,6</b>	
<b>LOEC</b>	<b>156,8</b>		<b>132,9</b>		<b>132,9</b>		<b>132,9</b>	
<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>168,9</b>		<b>157,9</b>		<b>153,3</b>		<b>145,9</b>	
<b>LCL</b>	165,2		153,9		149,4		142,0	
<b>UCL</b>	172,5		161,9		157,2		149,8	

SIG= Significancia. Letras iguales en sentido vertical señalan que los promedios son estadísticamente iguales. Prueba de Tukey (R v.3.5.1).

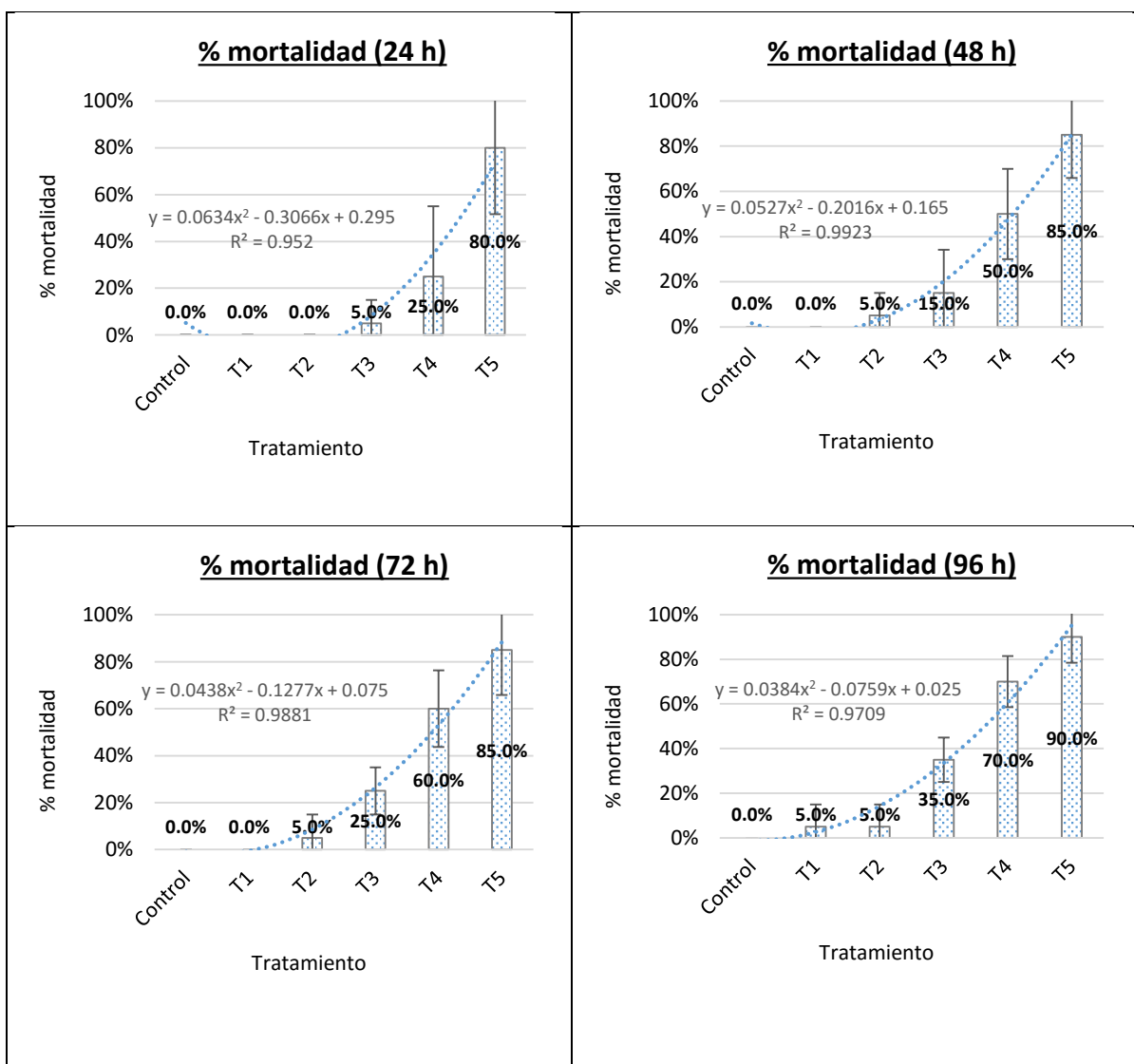
NOEC=Concentración de efecto no observado. LOEC= Concentración mínima de efecto observado. CL<sub>50</sub>= Concentración letal media. LCL= Nivel mínimo de confianza. UCL= Nivel de confianza superior.

Se observó efecto tóxico del ibuprofeno sobre el % de mortalidad a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición en *P. innesi* (tabla 18).

El valor de CL<sub>50</sub> reportado sobre *P. innesi* tras la exposición a ibuprofeno a las 96 h, fue más sensible que los reportados a las 24, 48 y 72 h (tabla 18). Esto se

traduce, en un mayor efecto tóxico del diclofenaco sobre el porcentaje de mortalidad, a medida que el tiempo de exposición transcurre.

En la figura 18, se ilustra las ecuaciones de regresión y línea de tendencia que rigen el comportamiento de cada tratamiento respecto al porcentaje de mortalidad tras la exposición de *P. innesi* a ibuprofeno.



**Figura 18.** Gráfico de barras acerca del efecto del ibuprofeno en *P. innesi* sobre el porcentaje (%) de mortalidad a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

### b. Inmovilización

**Tabla 19.**

Efecto del ibuprofeno sobre *P. innesi* a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición tomando como punto de lectura el porcentaje (%) de inmovilización.

Tratamiento (mg·L <sup>-1</sup> )	% inmovilización							
	24 h		48 h		72 h		96 h	
	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.
<b>Control</b>	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a
<b>95,4</b>	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	5,0 ± 10,0	a
<b>112,6</b>	0,0 ± 0,0	a	5,0 ± 10,0	ab	5,0 ± 10,0	a	5,0 ± 10,0	a
<b>132,9</b>	5,0 ± 10,0	a	15,0 ± 19,1	b	25,0 ± 10,0	b	35,0 ± 10,0	b
<b>156,8</b>	30,0 ± 34,6	b	50,0 ± 20,0	c	60,0 ± 16,3	c	70,0 ± 11,5	c
<b>185,1</b>	80,0 ± 28,3	c	85,0 ± 19,1	d	85,0 ± 19,1	d	90,0 ± 11,5	d
<b>NOEC</b>	<b>132,9</b>		<b>112,6</b>		<b>112,6</b>		<b>112,6</b>	
<b>LOEC</b>	<b>156,8</b>		<b>132,9</b>		<b>132,9</b>		<b>132,9</b>	
<b>CE<sub>50</sub></b>	<b>167,7</b>		<b>157,9</b>		<b>153,3</b>		<b>145,9</b>	
<b>LCL</b>	164,0		153,9		149,4		142,0	
<b>UCL</b>	171,3		161,9		157,2		149,8	

SIG= Significancia. Letras iguales en sentido vertical señalan que los promedios son estadísticamente iguales. Prueba de Tukey (R v.3.5.1).

NOEC=Concentración de efecto no observado. LOEC= Concentración mínima de efecto observado. CE<sub>50</sub>= Concentración efectiva media. LCL= Nivel mínimo de confianza. UCL= Nivel de confianza superior.

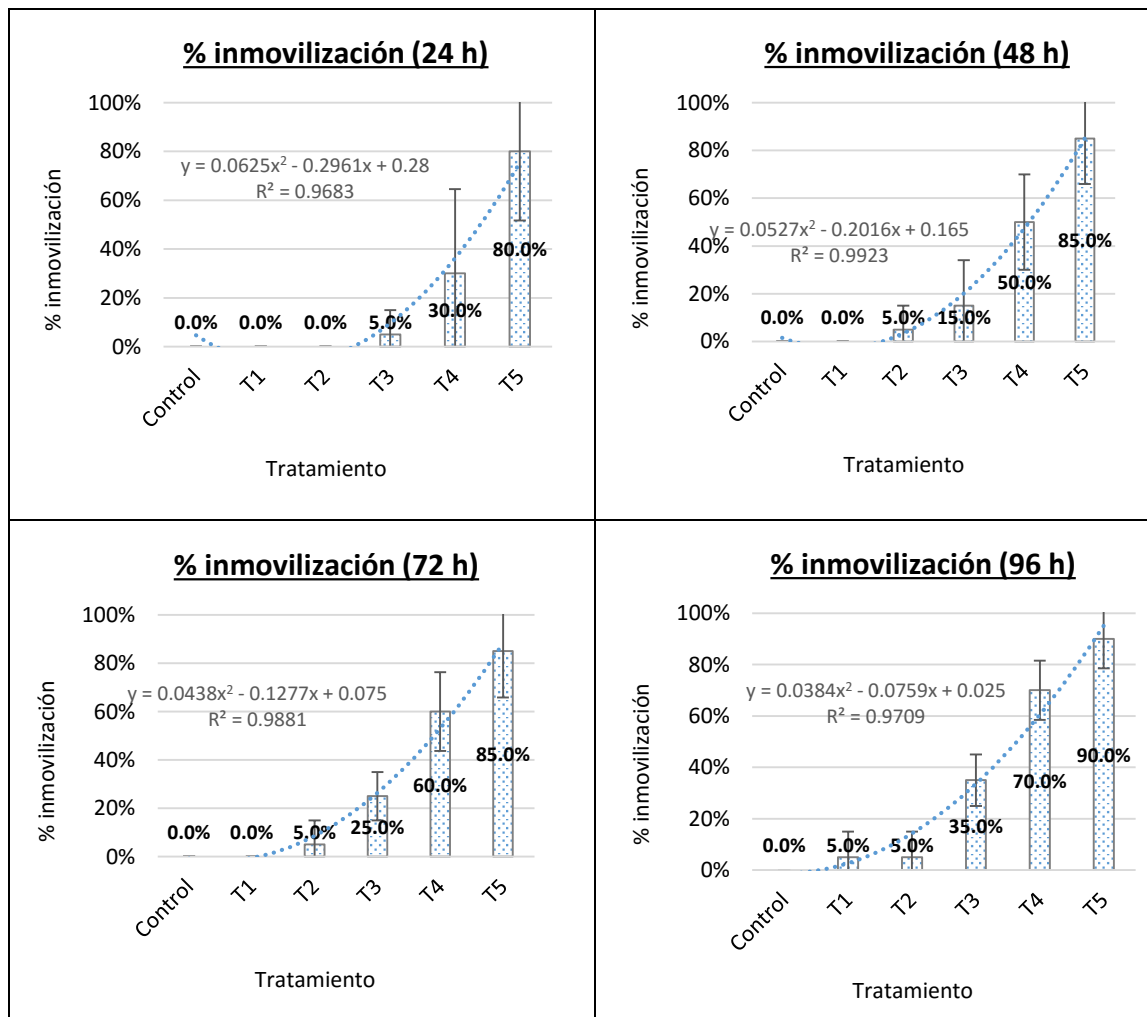
Se observó efecto tóxico del ibuprofeno sobre el % de inmovilización a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición en *P. innesi*. En las concentraciones de ensayo de 156,8 y 185,1 mg·L<sup>-1</sup> se evidenciaron efectos estadísticamente significativos (tabla 19).

El valor de CE<sub>50</sub> para inmovilización reportado sobre *P. innesi* tras la exposición a ibuprofeno a las 96 h, fue más sensible que los reportados a las 24, 48 y 72 h

(tabla 19). Esto se traduce, en un mayor efecto tóxico del ibuprofeno sobre el porcentaje de inmovilización, a medida que el tiempo de exposición transcurre.

El NOEC menos sensible registrado fue en el periodo de tiempo de evaluación más corto (24 h). Para las 48, 72 y 96 h, por debajo de los 112,6 mg·L<sup>-1</sup> no se registraron efectos sobre el % de inmovilización (tabla 19)

En la figura 19, se ilustra las ecuaciones de regresión y línea de tendencia que rigen el comportamiento de cada tratamiento respecto al porcentaje de inmovilización tras la exposición de *P. innesi* a ibuprofeno.



**Figura 19.** Gráfico de barras acerca del efecto del ibuprofeno sobre *P. innesi* sobre el porcentaje (%) de inmovilización a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

### c. Hiperventilación

**Tabla 20.**

Efecto del diclofenaco sobre *P. innesi* a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición tomando como punto de lectura el porcentaje (%) de hiperventilación.

Tratamiento (mg·L <sup>-1</sup> )	% hiperventilación							
	24 h		48 h		72 h		96 h	
	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.
Control	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a
95,4	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	0,0 ± 0,0	a	5,0 ± 10,0	a
112,6	0,0 ± 0,0	a	5,0 ± 10,0	ab	5,0 ± 10,0	a	5,0 ± 10,0	a
132,9	5,0 ± 10,0	a	15,0 ± 19,1	b	30,0 ± 11,5	b	35,0 ± 10,0	b
156,8	40,0 ± 28,3	b	60,0 ± 16,3	c	65,0 ± 10,0	c	70,0 ± 11,5	c
185,1	85,0 ± 19,1	c	85,0 ± 19,1	d	85,0 ± 19,1	d	90,0 ± 11,5	d
<b>NOEC</b>	<b>132,9</b>		<b>112,6</b>		<b>112,6</b>		<b>112,6</b>	
<b>LOEC</b>	<b>156,8</b>		<b>132,9</b>		<b>132,9</b>		<b>132,9</b>	
<b>CE<sub>50</sub></b>	<b>163,6</b>		<b>155,4</b>		<b>151,0</b>		<b>145,9</b>	
<b>LCL</b>	160,1		151,6		147,1		142,0	
<b>UCL</b>	167,0		159,3		154,9		149,8	

SIG= Significancia. Letras iguales en sentido vertical señalan que los promedios son estadísticamente iguales. Prueba de Tukey (R v.3.5.1).

NOEC=Concentración de efecto no observado. LOEC= Concentración mínima de efecto observado. CE<sub>50</sub>= Concentración letal/efectiva media. LCL= Nivel mínimo de confianza. UCL= Nivel de confianza superior.

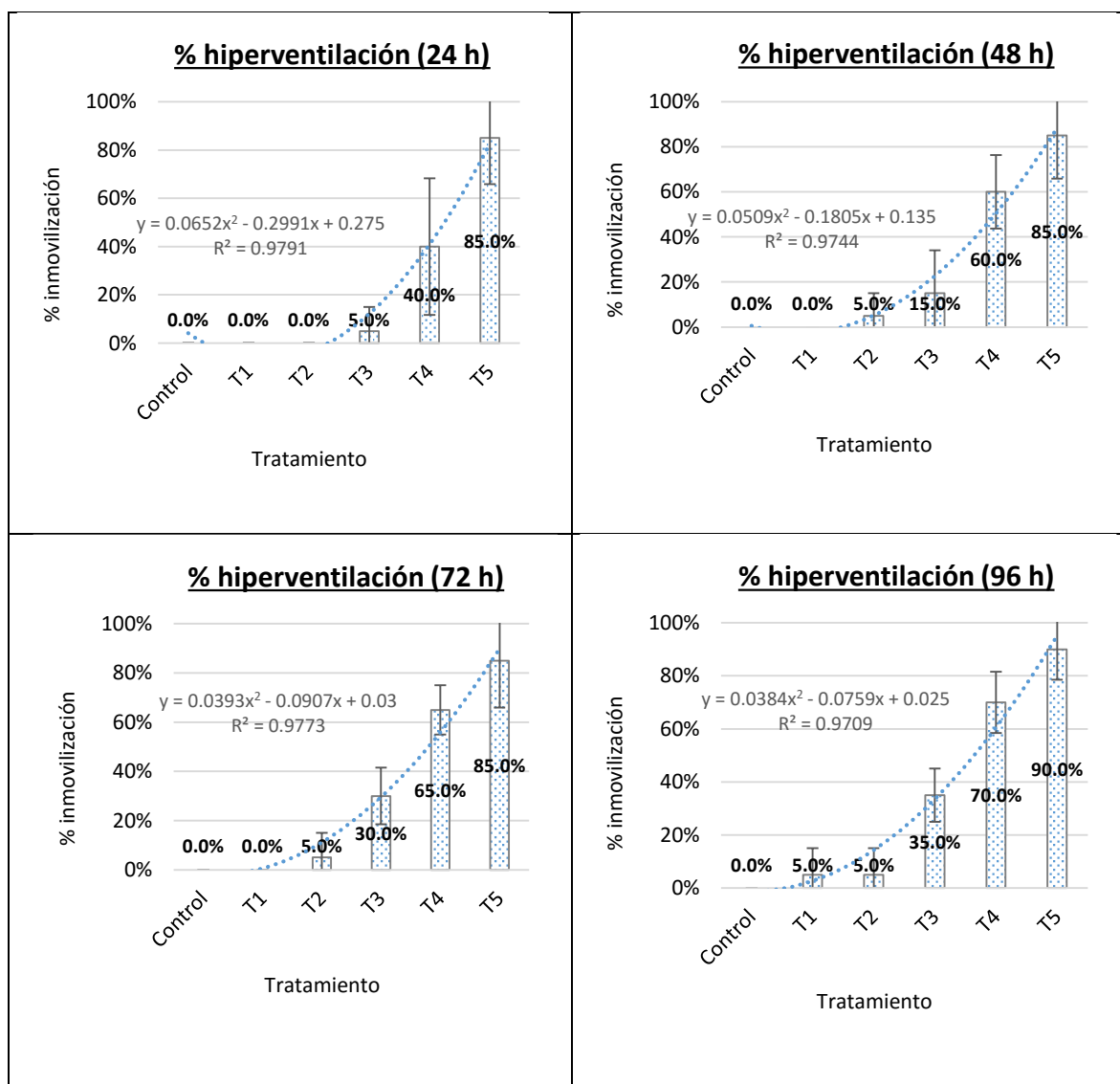
Se observó efecto tóxico del ibuprofeno sobre el % de hiperventilación a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición en *P. innesi*. En las concentraciones de ensayo de 156,8 y 185,1 mg·L<sup>-1</sup> se evidenciaron efectos estadísticamente significativos (tabla 20).

El valor de CE<sub>50</sub> para hiperventilación reportado sobre *P. innesi* tras la exposición a ibuprofeno a las 96 h, fue más sensible que los reportados a las 24, 48 y 72 h (tabla 20). Esto se traduce, en un mayor efecto tóxico del ibuprofeno sobre el porcentaje de hiperventilación, a medida que el tiempo de exposición transcurre.



El NOEC menos sensible registrado fue en el periodo de tiempo de evaluación más corto (24 h). Para las 48, 72 y 96 h, por debajo de los 112,6 mg·L<sup>-1</sup> no se registraron efectos sobre el % de inmovilización (tabla 20).

En la figura 20, se ilustra las ecuaciones de regresión y línea de tendencia que rigen el comportamiento de cada tratamiento respecto al porcentaje de hiperventilación tras la exposición de *P. innesi* a ibuprofeno.



**Figura 20.** Gráfico de barras acerca del efecto del ibuprofeno sobre *P. innesi* sobre el porcentaje (%) de nado hiperventilación a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

### **3 Lemna gibba**

#### *3.1. Diclofenaco*

**Tabla 21.**

Efecto del diclofenaco sobre *L. gibba* a las 168 h de exposición tomando como puntos de lectura el n° total de frondas, el porcentaje (%) de ruptura de colonias y el porcentaje (%) de clorosis.

Tratamiento (mg·L <sup>-1</sup> )	N° total de frondas 168 h		% ruptura de colonias 168 h		% clorosis 168 h	
	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.
<b>Control</b>	38,3 ± 2,5	a	0,6 ± 1,3	a	3,7 ± 3,1	a
<b>7,0</b>	36,0 ± 0,8	ab	0,7 ± 1,4	a	20,4 ± 10,0	b
<b>14,7</b>	33,8 ± 5,1	b	3,1 ± 2,7	ab	24,3 ± 1,8	b
<b>30,9</b>	30,0 ± 1,4	b	9,2 ± 2,0	b	46,4 ± 5,5	c
<b>64,8</b>	28,8 ± 4,9	b	37,8 ± 10,4	c	58,8 ± 4,4	d
<b>136,1</b>	25,5 ± 0,6	bc	55,8 ± 4,7	d	68,4 ± 10,4	e
<b>NOEC</b>	<b>7,0</b>		<b>14,7</b>		<b>&lt;7,0</b>	
<b>LOEC</b>	<b>14,7</b>		<b>30,9</b>		<b>7,0</b>	
<b>CL(E)<sub>50</sub></b>	<b>ND</b>		<b>114,1</b>		<b>56,9</b>	
<b>LCL</b>	ND		100,7		8,2	
<b>UCL</b>	ND		127,6		105,6	

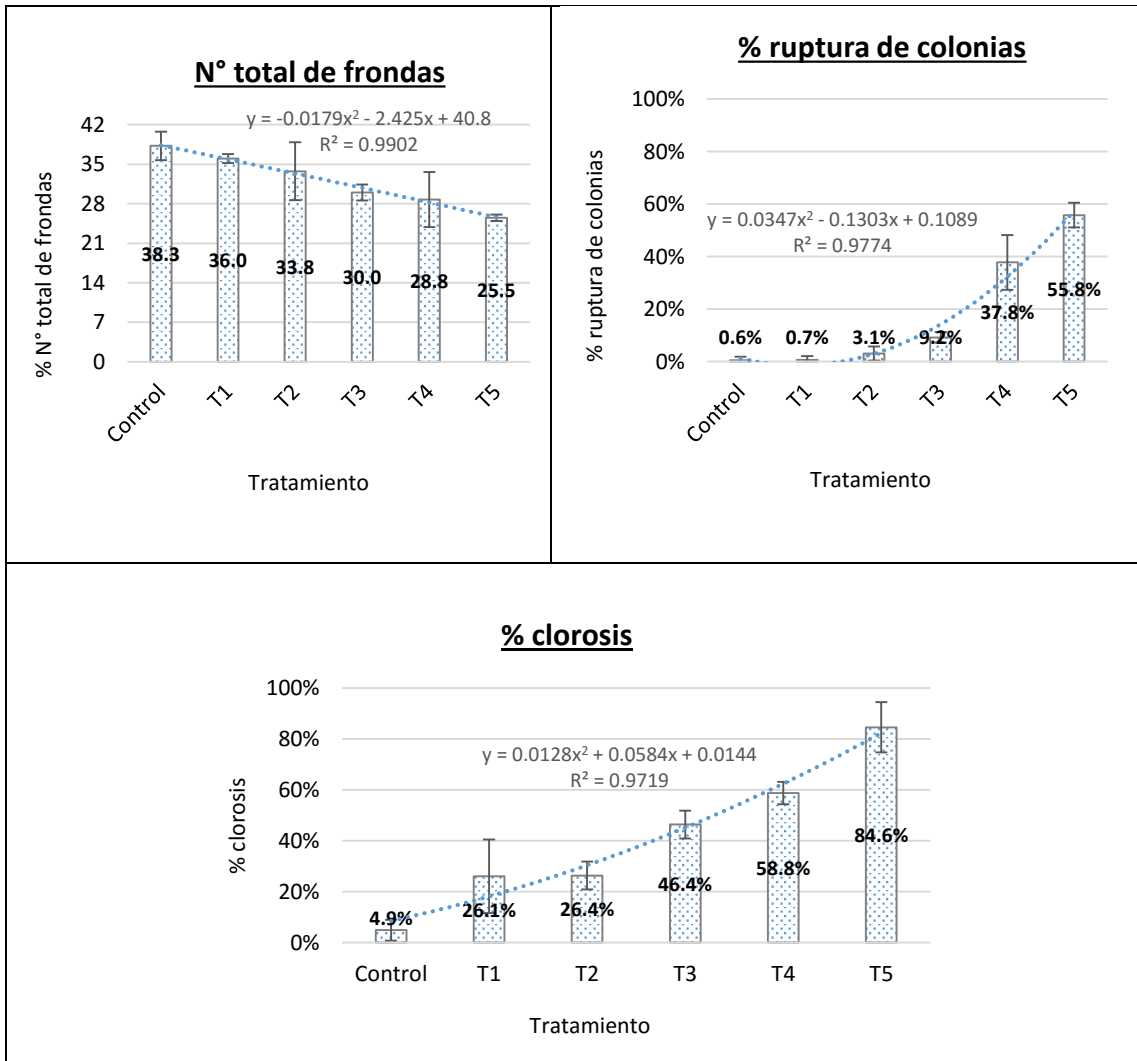
SIG= Significancia. Letras iguales en sentido vertical señalan que los promedios son estadísticamente iguales. Prueba de Tukey ((R v.3.5.1).

NOEC=Concentración de efecto no observado. LOEC= Concentración mínima de efecto observado. CL(E)50= Concentración letal/efectiva media. LCL= Nivel mínimo de confianza. UCL= Nivel de confianza superior.

Se observó efecto tóxico del diclofenaco sobre el % de ruptura de colonias y % de clorosis a las 168 h de exposición en *L. gibba* (tabla 21).

El número total de frondas fue el parámetro menos sensible de los evaluados, al obtener un efecto por debajo del 50%.

En la figura 21, se ilustra las ecuaciones de regresión y línea de tendencia que rigen el comportamiento de cada punto de lectura (n° total de frondas, porcentaje de ruptura de colonias, porcentaje de clorosis) tras la exposición de *L. gibba* a diclofenaco.



**Figura 21.** Gráfico de barras acerca del efecto del diclofenaco sobre *L. gibba* sobre el n° total de frondas, el porcentaje (%) de ruptura de colonias y el porcentaje (%) de clorosis a las 168 h de exposición.

### 3.2 Ibuprofeno

**Tabla 22.**

Efecto del ibuprofeno sobre *L. gibba* a las 168 h de exposición tomando como puntos de lectura el n° total de frondas, el porcentaje (%) de ruptura de colonias y el porcentaje (%) de clorosis.

Tratamiento (mg·L <sup>-1</sup> )	N° total de frondas 168 h		% ruptura de colonias 168 h		% clorosis 168 h	
	Valor	Sig.	Valor	Sig.	Valor	Sig.
<b>Control</b>	39,8 ± 3,9	a	0,6 ± 1,2	a	2,6 ± 3,1	a
<b>10,0</b>	38,8 ± 6,7	a	0,0 ± 0,0	a	11,3 ± 1,1	ab
<b>21,0</b>	38,0 ± 2,2	a	2,0 ± 1,3	a	23,1 ± 9,8	b
<b>44,1</b>	30,8 ± 1,0	b	10,6 ± 1,8	b	37,0 ± 9,7	c
<b>92,6</b>	29,3 ± 1,9	b	32,5 ± 5,5	c	48,8 ± 13,0	d
<b>194,5</b>	27,0 ± 0,8	b	52,9 ± 6,0	d	53,2 ± 30,0	e
<b>NOEC</b>	<b>21,0</b>		<b>21,0</b>		<b>21,0</b>	
<b>LOEC</b>	<b>44,1</b>		<b>44,1</b>		<b>44,1</b>	
<b>CE50</b>	<b>ND</b>		<b>171,3</b>		<b>126,7</b>	
<b>LCL</b>	ND		151,9		16,5	
<b>UCL</b>	ND		190,7		236,9	

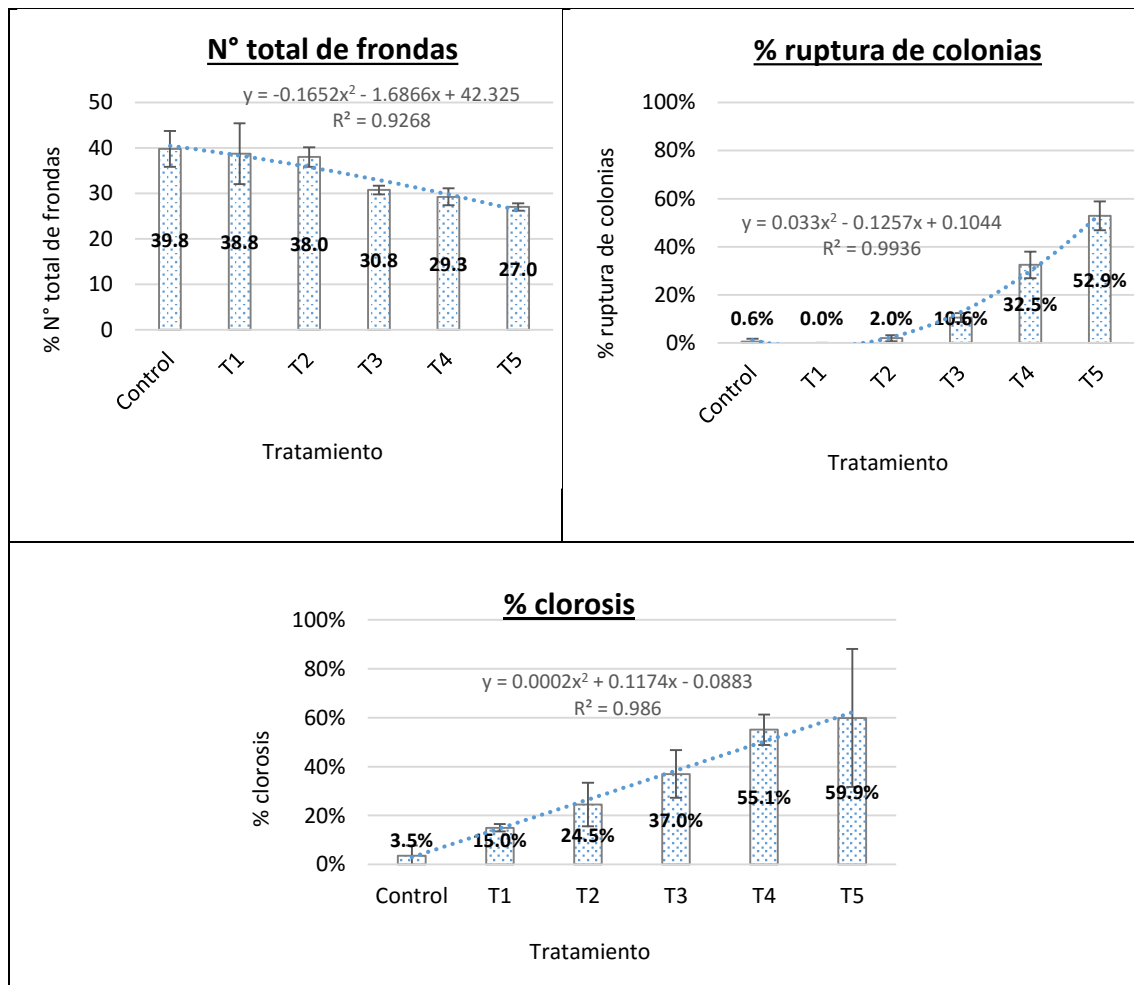
SIG= Significancia. Letras iguales en sentido vertical señalan que los promedios son estadísticamente iguales. Prueba de Tukey (R v.3.5.1).

NOEC=Concentración de efecto no observado. LOEC= Concentración mínima de efecto observado. CL(E)50= Concentración letal/efectiva media. LCL= Nivel mínimo de confianza. UCL= Nivel de confianza superior.

Se observó efecto tóxico del ibuprofeno sobre el % de ruptura de colonias y % de clorosis a las 168 h de exposición en *L. gibba* (tabla 22).

El número total de frondas fue el parámetro menos sensible de los evaluados, al obtener un efecto por debajo del 50%. No obstante, a mayor concentración del fármaco, se observó una inhibición en el número de frondas.

En la figura 22, se ilustra las ecuaciones de regresión y línea de tendencia que rigen el comportamiento de cada punto de lectura (n° total de frondas, porcentaje de ruptura de colonias, porcentaje de clorosis) tras la exposición de *L. gibba* a ibuprofeno.



**Figura 22.** Gráfico de barras acerca del efecto del ibuprofeno sobre *L. gibba* sobre el n° total de frondas, el porcentaje (%) de ruptura de colonias y el porcentaje (%) de clorosis a las 168 h de exposición.

### 9.4 Evaluación del Riesgo Ambiental

**Tabla 23.**

Resumen de la evaluación del riesgo ambiental (ERA) del diclofenaco sobre 3 especies bioindicadoras del ecosistema dulceacuícola adaptado a escala nacional.

Especie	Efecto	Periodo (h)	Toxicidad CL(E) <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	NOEC	RAC CL(E)50 / NOEC	PEC (mg.L <sup>-1</sup> )	PNEC NOEC /1000	Cociente de Riesgo PEC/PNEC	Riesgo
<i>D.magna</i>	Mortalidad	24	132.5	90.6	1.46	0.01	0.0906	0.1	NO
<i>D.magna</i>	Mortalidad	48	95.4	58.0	1.64	0.01	0.058	0.2	NO
<i>D.magna</i>	Inmovilización	24	95.4	58.0	1.64	0.01	0.058	0.2	NO
<i>D.magna</i>	Inmovilización	48	69.5	58.0	1.20	0.01	0.058	0.2	NO
<i>P.innesi</i>	Mortalidad	24	123.3	98.0	1.26	0.01	0.098	0.1	NO
<i>P.innesi</i>	Mortalidad	48	117.9	98.0	1.20	0.01	0.098	0.1	NO
<i>P.innesi</i>	Mortalidad	72	113.5	98.0	1.16	0.01	0.098	0.1	NO
<i>P.innesi</i>	Mortalidad	96	108.9	98.0	1.11	0.01	0.098	0.1	NO
<i>P.innesi</i>	Inmovilización	24	120.6	98.0	1.23	0.01	0.098	0.1	NO
<i>P.innesi</i>	Inmovilización	48	115.9	98.0	1.18	0.01	0.098	0.1	NO
<i>P.innesi</i>	Inmovilización	72	110.6	98.0	1.13	0.01	0.098	0.1	NO
<i>P.innesi</i>	Inmovilización	96	111.4	98.0	1.14	0.01	0.098	0.1	NO
<i>P.innesi</i>	Hiperventilación	24	120.6	98.0	1.23	0.01	0.098	0.1	NO
<i>P.innesi</i>	Hiperventilación	48	116.8	98.0	1.19	0.01	0.098	0.1	NO
<i>P.innesi</i>	Hiperventilación	72	110.7	98.0	1.13	0.01	0.098	0.1	NO
<i>P.innesi</i>	Hiperventilación	96	106.5	98.0	1.09	0.01	0.098	0.1	NO
<i>L.gibba</i>	Clorosis	168	72.9	7.0	10.41	0.01	0.007	1.3	SI
<i>L.gibba</i>	Número de Frondas	168	ND	7.0	ND	0.01	0.007	1.3	SI
<i>L.gibba</i>	Ruptura de colonias	168	114.1	14.7	7.76	0.01	0.0147	0.6	NO

CL(E)50= Concentración letal/efectiva media. NOEC=Concentración de efecto no observado.

RAC=Ratio Agudo Crónico. PEC= Concentración ambiental esperada, PNEC= Concentración prevista de no efecto, CR = Coeficiente de Riesgo

**Tabla 24.**

Resumen de la evaluación del riesgo ambiental (ERA) del ibuprofeno sobre 3 especies bioindicadores del ecosistema dulceacuícola adaptado a escala nacional.

Especie	Efecto	Periodo (h)	Toxicidad CL(E) <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	NOEC	RAC CL(E)50 / NOEC	PEC (mg.L <sup>-1</sup> )	PNEC NOEC /1000	Cociente de Riesgo PEC/PNEC	Riesgo
<i>D.magna</i>	Mortalidad	24	137	93.8	1.46	0.48	0.137	3.50	SI
<i>D.magna</i>	Mortalidad	48	103.9	75	1.39	0.48	0.1039	4.61	SI
<i>D.magna</i>	Inmovilización	24	105.6	75	1.41	0.48	0.1056	4.53	SI
<i>D.magna</i>	Inmovilización	48	87.3	75	1.16	0.48	0.0873	5.49	SI
<i>P.innesi</i>	Mortalidad	24	168.9	132.9	1.27	0.48	0.1689	2.84	SI
<i>P.innesi</i>	Mortalidad	48	157.9	112.6	1.40	0.48	0.1579	3.03	SI
<i>P.innesi</i>	Mortalidad	72	153.3	112.6	1.36	0.48	0.1533	3.12	SI
<i>P.innesi</i>	Mortalidad	96	145.9	112.6	1.30	0.48	0.1459	3.28	SI
<i>P.innesi</i>	Inmovilización	24	167.7	132.9	1.26	0.48	0.1677	2.86	SI
<i>P.innesi</i>	Inmovilización	48	157.9	112.6	1.40	0.48	0.1579	3.03	SI
<i>P.innesi</i>	Inmovilización	72	153.3	112.6	1.36	0.48	0.1533	3.12	SI
<i>P.innesi</i>	Inmovilización	96	145.9	112.6	1.30	0.48	0.1459	3.28	SI
<i>P.innesi</i>	Hiperventilación	24	163.6	132.9	1.23	0.48	0.1636	2.93	SI
<i>P.innesi</i>	Hiperventilación	48	155.4	112.6	1.38	0.48	0.1554	3.08	SI
<i>P.innesi</i>	Hiperventilación	72	151	112.6	1.34	0.48	0.151	3.17	SI
<i>P.innesi</i>	Hiperventilación	96	145.9	112.6	1.30	0.48	0.1459	3.28	SI
<i>L.gibba</i>	Clorosis	168	126.7	21	6.03	0.48	0.1267	3.78	SI
<i>L.gibba</i>	Número de Frondas	168	ND	21	ND	0.48	0.021	22.80	SI
<i>L.gibba</i>	Ruptura de colonias	168	171.3	21	8.16	0.48	0.1713	2.80	SI

CL(E)50= Concentración letal/efectiva media. NOEC=Concentración de efecto no observado.

RAC=Ratio Agudo Crónico. PEC= Concentración ambiental esperada, PNEC= Concentración prevista de no efecto, CR = Coeficiente de Riesgo

## VI. DISCUSIÓN

Dentro del grupo de AINEs, el diclofenaco e ibuprofeno, debido a sus características fisicoquímicas, patrones de consumo y antecedentes ecotoxicológicos han sido materia de estudio en el presente trabajo de investigación. Los valores de toxicidad del diclofenaco reportados sobre los organismos de ensayo (*L. gibba*, *P. innesi* y *D. magna*) fueron superiores a los reportados tras la exposición a ibuprofeno. Desde un análisis toxicológico, se puede concluir que el diclofenaco a concentraciones más pequeñas que el ibuprofeno, causaría efectos estadísticamente significativos mayores. De igual forma, Fent (2006) & Cleuvers (2003), reportaron también en sus respectivos estudios que el diclofenaco fue el compuesto con la toxicidad aguda más alta dentro de la clase de AINEs.

Sin embargo, desde un análisis ecotoxicológico, en donde se incorporan nuevas variables a considerar, haciendo uso del coeficiente de Riesgo (CR) y tomando información del contexto nacional peruano, la presencia de diclofenaco en cuerpos dulceacuícolas provocaría riesgo ambiental sobre las plantas acuáticas, mientras que la presencia de ibuprofeno conllevaría a un riesgo ambiental mucho mayor, al abarcar los tres niveles tróficos evaluados (zooplancton, plantas acuáticas y peces menores). Estos resultados alarmantes, ameritan de igual forma la evaluación del ibuprofeno sobre especies bioindicadores terrestres, considerando además que al poseer un coeficiente de adsorción suelo/agua ( $K_{oc}$ ) elevado, tenderá a absorberse en el suelo, haciéndolo blanco para los microorganismos o plantas que habitan en el suelo.



Si bien la presencia del diclofenaco no se traduce en un riesgo para los peces menores de acuerdo al coeficiente de riesgo, es importante destacar que este fármaco posee un coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) muy elevado, lo cual aumenta el riesgo de bioconcentración en peces y por lo tanto efectos secundarios en la cadena alimenticia, principalmente en las aves, los cuales son organismos muy sensibles al diclofenaco resultando en lesiones renales que conllevan drásticamente al decaimiento de sus poblaciones (Hussain *et al.*,2008; Oaks *et al.*2004). Estas propiedades del compuesto en mención lo hacen candidato para evaluaciones posteriores.

Por el contrario, a pesar que los valores de toxicidad  $CL(E)_{50}$  reportados del diclofenaco fueron mayores que los del ibuprofeno sobre las especies evaluadas, al hacer un análisis del riesgo ambiental, se deben de considerar nuevos indicadores. En el caso del ibuprofeno el riesgo ambiental fue mucho mayor que la del diclofenaco, puesto que este posee patrones de consumo y dosis diarias que difieren en mayor proporción a la del diclofenaco.

Si bien la técnica empleada del coeficiente de riesgo indica que la presencia de ambos fármacos puede desencadenar riesgo al ambiente dulceacuícola, solamente para el caso de *D.magna* y *L. gibba* expuestos diclofenaco y *D.magna* a ibuprofeno se obtuvieron valores significativos para los ensayos agudos al tener valores de  $CL(E)_{50}$  menores a 100mg/L, siendo clasificados en la categoría 3, como sustancias nocivas para los organismos acuáticos de acuerdo a la clasificación de sustancias

peligrosas para el ambiente acuático según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA).

De acuerdo al coeficiente de riesgo (CR), *L. gibba* resultó ser la especie más sensible, seguido de *D. magna* y *P. innesi* tras la exposición a ambos fármacos. De igual forma al hacer lectura del ratio agudo crónico (RAC), se puede apreciar que la planta acuática *L. gibba* fue la especie más sensible dentro de los bioindicadores empleados. De igual forma, Cleuvers (2003), en la evaluación acuática de 10 productos farmacéuticos, dentro de ellos el diclofenaco e ibuprofeno, *Lemna* resultó ser la especie más sensible. Por consiguiente, se puede concluir que el género *Lemna* es un modelo biológico muy útil para la evaluación de la toxicidad y riesgo ambiental de productos farmacéuticos.

Los estándares de calidad ambiental establecidos por el MINAM, fijan los valores máximos permitidos del contaminante en el ambiente. En este sentido, para el presente estudio, en la categoría de conservación del ambiente acuático, se propone para el caso del diclofenaco un valor de 0,007 mg/L, mientras que para el ibuprofeno un valor de 0,021 mg/L. Estos valores establecen una concentración umbral sin efecto para diferentes grupos de organismos no destinatarios o representativos del medio. Concentraciones del fármaco por encima de estos valores, ya estarían generando un efecto negativo sobre las especies acuáticas. Estos estándares propuestos sientan el primer aporte científico nacional en

materia de protección de los ecosistemas acuáticos respecto a la presencia de AINEs.

Por otra parte, de acuerdo al Decreto Legislativo N°1278 que aprueba la Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos en el territorio nacional, ambos fármacos en mención, serían considerados como Residuos peligrosos al no estar dentro del anexo V del reglamento y de cumplir con características de peligrosidad tóxicas (efectos agudos y crónicos) y ecotóxicas demostradas en el presente trabajo. Por ende, su tratamiento deberá realizarse en rellenos de seguridad de acuerdo a ley.

Finalmente, se puede evidenciar la existencia de efectos negativos de estos compuestos farmacéuticos sobre organismos no destinatarios que ponen en riesgo la conservación de la flora y fauna que habita en los ecosistemas dulceacuícolas con la finalidad de ampliar el abanico de información y la puesta en marcha de planes de farmacovigilancia a nivel nacional que busquen gestionar de manera correcta la introducción de los mismos a los ecosistemas.

## VII. CONCLUSIONES

- Desde un análisis ecotoxicológico, la presencia de diclofenaco en los ecosistemas dulceacuícolas del territorio nacional generará riesgo ambiental para las plantas menores. En el caso del ibuprofeno, el riesgo ambiental será mucho mayor, al abarcar tres niveles tróficos: zooplancton, plantas acuáticas y peces menores.
- En la categoría de conservación del ambiente acuático, se propone para el caso del diclofenaco e ibuprofeno valores de 0,007 y 0,021 mg/L respectivamente. Estos valores establecen una concentración umbral sin efecto para diferentes grupos de organismos no destinatarios o representativos del medio.
- Desde un análisis toxicológico, el diclofenaco presentó mayor grado de toxicidad que el ibuprofeno en los tres modelos biológicos empleados (*D. magna*, *P. innesi* y *L. gibba*)
- Se observaron efectos agudos estadísticamente significativos sobre el % de mortalidad e inmovilización en *D. magna* y *P. innesi* tras la exposición a diclofenaco e ibuprofeno.
- Se observaron efectos subletales estadísticamente significativos sobre el % de hiperventilación en *P. innesi* y % de ruptura de colonias y clorosis tras la exposición a diclofenaco e ibuprofeno.

- *L. gibba* resultó ser la especie más sensible, seguida de *D. magna* y *P. innesi* respectivamente.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arnold, K., Brown, A., Ankley, G., & Sumpter, J. (2014). *Medicating the environment: Assessing risks of pharmaceuticals to wildlife ecosystems*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 369: 20130569.

Ashton, D., Hilton, M., & Thomas, K. (2004). *Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom*. *Sci Total Environ* 333: 167-184.

Barceló, D. (2003.). *Emerging Pollutants in water analysis*. TrAc. Trends in Analytical Chemistry.

Benzie, J (2005). Cladocera: The genus Daphnia (including Daphniosis). Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world. No. 21. Kenobi Productions, Ghent, 376 p

Bound, J., & Voulvoulis, N. (2004). *Pharmaceuticals in the aquatic environment - a comparison of risk assessment strategies*. *Chemosphere*. 56: 1143-1155.

Bound, J., & Voulvoulis, N. (2005). *Household Disposal of Pharmaceuticals as a Pathway for Aquatic Contamination in the United Kingdom*. *Environ Health Perspect*. 113(12): 1705–1711.

Boyd, G., Reemtsma, H., Grimm, D., & Mitra, S. (2003). *Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada*. *Sci.Total Environ*. 311 (1-3), 135-149.

Brooks, B., Hugget, D., & Duane, B. (2012). *Human Pharmaceutical in the Environment. Current and future perspectives*. Volume 4. New York: Springer.

Buser, H., Poiger, T., & Müller, M. (1998). *Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface water: rapid photodegradation in a lake*. *Environ Sci. Technol*. 32:3449-3456.

Busser, H., Poiger, T., & Muller, M. (1999). *Ocurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface water and in wastewater*. Environ. Sci. Technol. 33(15), 2529-2535.

Calow P, Forbes VE. (2014). *Ecotoxicology*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Caliman, F., & Gavrilescu, M. (2009). Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment. A review. Clean 37, 277-303.

Carpenter, S., Kitchell, J., Hodgson, P., Elser, J., Elser, M., Lodge, D., . . . Von Ende, C. (1987). *Ecology: Regulation of Lake Primary Productivity by Food Web Structure*.

Castillo, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua, estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Mexico.

Castro, L., Baños, M., Lopez, M., & Torres, B. (2015). *Ecofarmacovigilancia en México: Perspectivas para su implementación*. Rev Mex Cienc Farm 46 (3).

Cleuvers, M. (2003). *Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects*. Toxicology Letter; 142:185-194.

Cleuvers, M. (2004). *Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid*. Ecotoxicol Environ Saf. 59(3):309-15.

Colbourne, J., & et al. (2011). *The Ecoresponsive Genome of Daphnia Pulex*. Science 331, 555.

*Commisionn of the European Communities. Technical Guidance Document in Support of Commision Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Comission Regulation (EC) NO. 1488/94 on Risk Assessment*. . (1996). Luxemburg: Office for official Publications on the European Communities .

Cook, C. (1996). *Aquatic and Wetland Plants of India*. . Oxford: Oxford University Press.

Cuñat, Z., & Ruiz, M. (2016). *Ensayos de ecotoxicidad de los fármacos y efectos tóxicos en el medio ambiente: Revisión*. *Rev.Toxicol* (2016) 33:108-119.

Daughton, C., & Ternes, T. (1999). *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?* *Environ Health Perspect.* 6:907-38.

Denslow, N., Colbourne, J., Dix, D., Freedman, J., Helbing, C., Kennedy, S., & Williams, P. (2007). *Selection of surrogate animal species for comparative toxicogenomics*. Washington, DC.

Díaz , M., Granados , Y., & Ronco, A. (2007). *Bioensayo de Toxicidad aguda con Daphnia magna. Ensayos Toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Entandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. México DF: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. P52-63.

Ebert, D. (2005). *Ecology, Epidemiology and Evolution of Parasitism in Daphnia*. National Center for Biotechnology Information: ISBN. Obtenido de Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2036>

EMA. (2005). *Note for Guidance on Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use*. London: The European Agency for the Evaluation of Medical Products (EMA).

EPA. (2006). *Pautas de prueba de efectos ecológicos OCSPP 850.4400: Prueba de toxicidad de plantas acuáticas utilizando Lemna spp.*

Farre, M., Ferrer, I., Ginebreda, A., Figueras, M., Olivella , L., Tirapu , L., . . . Barcelo , D. (2001). *Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography and mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with Vibrio fischeri*. . *J Chromatogr A* 938:187–197.



FDA. *Guidelines for Ecological Risk Assessment. U.S. Environmental Protection Agency (EPA).* (1998).

Fent , K., Weston , A., & Caminada , D. (2006). *Ecotoxicology of human pharmaceuticals* . *Aqua Toxicol.* 76(2):122-159.

Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxeus, N., Lo Giudice, R., . . . Garric, J. (2004). *Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment?* *Environ. Toxicol.Chem* 23(5), 1344-1354.

Ferrari, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., & Garric , J. (2003). *Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac.* *Ecotoxicol Environ Saf.* 55(3):350-70.

Goosens, H., Ferech, M., Coenen, S., & Stephens, P. (2007). *European surveillance of antimicrobial consumption project group Comparison of outpatient systemic antibacterial use in 2004 in the United States and 27 European countries.* *Clinical infectious Diseases.* 44:1091-1095.

Gonzalez, R.J., and M.R. Preest. 1999. Ionoregulatory specializations for exceptional tolerance of ion-poor, acidic waters in the neon tetra (*Paracheirodon innesi*). *Physiol. Biochem. Zool.* 72:156-163.

Gottschall , N., Topp, E., Metcalife, C., Edwards, M., Payne, M., Kleywegt, S., . . . Lapen, D. (2012). *Pharmaceuticals and personal care products in groundwater, subsurface, drainage, soil, and wheat grain, following a single application of municipals biosolids to the field.* *Chemosphere* 87: 194-203.

Greiner, P., & Rönnefahrt, I. (2003). *Management of environmental risks in the life cycle of pharmaceuticals. European Conference on Human and Veterinary Pharmaceuticals in the Environment.* Lyon, <http://www.envirpharma.org/presentation/speeche/ronnefahrt.pdf> Acceso: 4 de Mayo del 2017.

Groning, J., Held, C., Garten, C., Claubnitzer, U., Kaschabek, S., & Schlomann, M. (2007). *Transformation of diclofenac by the indigenous*

*microflora of river sediments and identification of a major intermediate.* Freiberg, Germany: Chemosphere 69:509-516.

Gurr, C., & Reinhard, M. (2006). *Harnessing natural attenuation of pharmaceuticals and hormones in rivers.* . Environmental Science and Technology, 272-276.

Hayashi, H., M. Sugimoto , N. Oshima & R. Fujii. (1993). Circadian motile activity of erythrocytes in the red abdominal skin of tetra fishes and its possible significance in chromatic adaptation. Pigment Cell Research 6: 29-36.

Heberer, T. (2002). *Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water.* En: Journal of Hydrology. Vol 266, No.3-4. p.175-189.

Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Bäumler , K., Tsipi, D., Koutsouba, V., & Hiskia, A. (2001b). *Ocurrance of pharmaceutical residues in sewage, river, ground and drinking water in personal care products in the environment: scientific and regulatory issues.* American Chemical Society: Washington DC, US pp 70-83.

Heberer, T., Verstraeten, I., Meyer, M., Mechlinski, A., & Reddersen, K. (2001a). *Ocurrance and fate of pharmaceuticals during bank filtration- Preliminary results from investigations in Germany and the United States.* Water Research Vol 120: Iss 1, Article 2.

Herbert R, Dauner E. 2002. Enciclopedia de peces de acuario de agua dulce. España: Hispano Europea. 1010 p.

Holm, G., Snape, J., Murray-Smith , R., Talbot, J., Taylor , D., & Sorme, P. (2013). *Implementing Ecopharmacovigilance in Practice: Challenges and Potential Opportunities.* Drug Saf. 36(7): 533-546.

Holm, J., Rugge, K., Bjerg, P., & Christensen, T. (1995). *Ocurrance and distribution of pharmaceutical organic-compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark).* Environ. Sci. Technol. 29(5), 1415-1420.

Hussain, I., M. Zargham, K., Khan, A., Javed, I., & Saleemi, K. (2008). *Toxicological effects of diclofenac in four avian species*. Avian Pathology, 37:3, 315-321.

Iannacone, J., & Alvarino, L. (2009). *Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre Daphnia Magna*. Ecología Aplicada, 8(2), 2009 .

Iannacone, J., Alvarino, L., Paredes, C., Alayo, M., Mamani, N., Bonifacio, J., . . . Miglio, M. (2011). *Evaluación del riesgo ambiental de carburofano en bioensayos con organismos no blanco*. Acta. Toxicol. Argent. 19:19-31.

Iannacone, J., Onofre, R., Huanqui, S., Giraldo A, Mamani, P., Miglio, T., & Alvarino, F. (2007b). *Evaluación del riesgo ambiental del insecticida metamidofós en bioensayos con cuatro organismos no destinatarios*. Agricultura Técnica Chile 67(2):126-128.

Iannacone, J., Onofre, R., & Huanqui, O. (2007a). *Efectos ecotoxicológicos del cartap sobre la Poecilia reticulata "guppy" (Poeciliidae) y Paracheirodon innesi "neón tetra" (Characidae)*. Gayana: Scielo .

IUCLID Dataset Substance. (2000). Recuperado el 09 de 05 de 2017, de <http://ecb.jrc.it/IUCLID-Data-Sheet/15687271.pdf>

IWW. (2014). *Presentation by: F-A Weber (IWW Water Center, Germany) on the Global Occurrence of Pharmaceuticals in the Environment: Results of a Global Database of Measured Environmental Concentrations*.

Jiménez, C. (2011). *Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos*. Revista Lallista de Investigación. 8(2): 143-153.

Jjemba, P. (2006). *Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 63: 113-130.

Jones, O., Voulvoulis, N., & Lester, J. (2004). *Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically*

*active compounds in the aquatic environment. Critical Reviews in Toxicology*, 34(4): 335-350.

Jorgensen, S. (2010). *Ecotoxicology, a derivative of Encyclopedia of Ecology*. . New York: Elsevier-Academic Press,402 pp.

Kallenborn, R., Fick, R., Lindberg, R., Moe, M., & Nielsen, K. (2008). *Pharmaceuticals residues in northern European environment: consequences and perspectives*. See Ref 7, pp.61-74.

Kolpin, D., Skopec, M., Meyer, M., Furlong, E., & Zaugg, S. (2002). *Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S streams 1999-2000: a national reconnaissance*. *Environ.Sci.Technol.*36(6), 1202-1211.

Koutsouba, V., Heberer, T., Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D., & Hiskis, A. (2003). *Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass espectrometry*. *Chemosphere*: 51:69-75.

Kümmerer, K. (2004). *Pharmaceuticals in the environment. Sources, Fate, Effects and Risks*. (2nd edition ed.). New York: Springer.

Kümmerer, K. (2008). *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*. 3erd edition Berlin: Springer.

Kümmerer, K. (2010). "*Pharmaceuticals in the environment*". *Annual Review of Environment and Resources* 35:57-75.

Kummerova, M., Zezulka S., Babula P., Triska J (2015). Possible ecological risk of two pharmaceuticals diclofenac and paracetamol demonstrated on a model plant *Lemna minor*. Elsevier.

MINAM. (2016). *Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos*. El Peruano.

MINAM. (2017). *Reglamento del Decreto Legislativo N°1278 que Aprueba la Ley de Gestión Integral de Residuos Sólidos. RM N°014-2017* . El Peruano.

MINSA. (2009). *Ley de Productos Farmaceuticos, Dispositivos médicos y Productos Sanitarios*. El Peruano.

Mompelat, S., Le Bot, B., & Thomas , O. (2009). *Ocurrence and fate of pharmaceuticals products and by-products, from resource to drinking water*. *Environ Int* 35(5): 803-814.

Manuilova, A. (2003). *Methods and Tools Available for Assessment of Environmental Risk*. Dantes.

Muniategui Lorenzo, S., & Simal-Lozano, J. (2013). *Medioambiente y salud: Una visión analítica sobre los contaminantes prioritarios y de interés emergente*. Santiago de Compostela.

Newman, M. (2015). *Fundamentals of ecotoxicology. The science of pollution. 4th ed.* . Boca Raton, FL: CRC Press.

Oaks, J., Gilbert, M., Virani, M., Watson, R., Meteyer, C., Rideout, B., . . . Khan, A. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 247. (6975), 630-633.

OECD. (1992). *Report of the OECD workshop on the Extrapolation of Laboratory Aquatic Toxicity Data to the Real Environment*. Environment Monograph 59, OECD, Paris.

Pannevis, M.C. & K.E. Earle. (1994). Nutrition of ornamental fish: water soluble vitamin leaching and growth of *Paracheirodon innesi*. *Journal of Nutrition* 124: 2633-2635.

Page, C., Curtis, M., Sutter, M., Walker, M., & Hoffman, B. (1998). *Farmacología Integrada*. España: Elsevier.

Pomati, F., Netting , A., Calamari , D., & Neilan , B. (2004). Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquat Toxicol*.

PubChem. (s.f.). *PubChem Search*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology information. Obtenido de <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acceso 20 de Abril del 2017.

Ramírez-Sánchez, I., Martínez-Austria, P., Quiroz-Alfaro, M., & Bandala, E. (2015). *Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente*. *Tecnol.Cienc.Agua*. 6(5):31-42.

Rand, G., & Petrocelli, S. (1985). *Fundamentals of aquatic ecotoxicology. Methods and applications*. Washington: Hemisphere Publishing.

Rang, H., Dale, M., Ritter, J., & Moore, P. (2004). *Farmacología. Vol 5*. Río de Janeiro. 904 pp.: Elsevier.

Raven, P. R. (1971). *Biology of plants*. New York:Worth. : 5ed.

*REACH Regulation: Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*. (2015). Obtenido de Reach-Serv.com.: <http://www.reach-serv.com/>. Acceso 20 Abril 2017.

Rook, E. (2002). *Flora, fauna, earth and sky. The natural history of northwoods*. Disponible en: [www.rook.org/earl/bwca/nature/aquatics/lemna.html](http://www.rook.org/earl/bwca/nature/aquatics/lemna.html).

Ruiz, M., & Font, G. (2011). Ecotoxicological Effects of Pharmaceuticals in the Environment. En: *Ecotoxicology around the globe*. Visser JE (ed): Nova Science Publishers, Inc., pp 227-246.

Santos, H., Araujo, A., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J.Hazard.Mater*. 175,.

Schmidt, W., & Redshaw, C. (2015). *Evaluation of biological endpoint in crop plants after exposure to non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): Implication for phytotoxicological assessment of novel contaminants*. *Ecotox.Environ.Saf* 112,212-222.

Sharma, D., Subramanian, B., & Arunachalam, A. (2010). *Bioethanol production of Lemna gibba*. *Current Science* 98(9): 1162-1163.

Sparling, D. (2016). *Ecotoxicology Essentials. Environmental contaminants and their biological effects on animals and plants*. London: Elsevier.



- Stumpf, M., Ternes, T., Wilken, R., Rodrigues, S., & Baumman, W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ* 225: 135-141.
- Suthersan, S., Payne, F. (2005). *In Situ Remediation Engineering*. Boca Raton: CRC Press.
- SUNASS. (2008). *Diagnóstico Situacional de los Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales en las EPS del Perú y Propuesta de Solución*. Lima: RyF Publicaciones .
- SUNASS. (2015). *Diagnóstico de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales en el ámbito de operación de las entidades prestadoras de Servicios de Saneamiento*. Lima.
- Taxe-Wuersch, A., De Alencastro, L., Grandjean, D., & Tarradellas, J. (2005). *Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment*. *Water Res* 39:1761-1772.
- Ternes T. 1998. *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*. *Water research*, 32:3245-3260.
- Thomas, K., & Hilton, M. (2004). *The occurrence of selected human pharmaceuticals compounds in UK estuaries*. *Mar. Pollut. Bull.* 49(5/6), 436-444.
- Tixier , C., Singer, H., Oellers, S., & Müller , S. (2003). *Occurrence and fate of carbamazepine, clofibrac acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surface waters*. *Environ Sci Technol* 37: 1061-1068.
- Tomaila, J., & Iannacone, J. (2018). *Toxicidad letal y subletal del arsénico, cadmio, mercurio y plomo sobre el pez Paracheirodon innesi (Characidae)*. Lima: *Rev. Toxicol.* 35:95-105.
- Valdés Alanis, A. (2009). *Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco sobre Daphnia Magna*. México.DF.
- Verbrugh , H., & Neeling, A. (2003). *Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands*.

Wang, W. (1990). *Literature review on duckweed toxicity testing*. Environ. Res. 52 (1990) 7-22.

Webb, S. (2001). *A data based perspective on the environmental risk of human pharmaceuticals II: Aquatic risk and characterization*. . Berlin, pp. 319-343.

Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., & Huhnerfuss, H. (2004). *Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromso/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites*. Chemosphere 56(6), 583-592.

Wong , C., & Pak, A. (2004). *Acute and subchronic toxicity of the heavy metals copper, chromium, nickel, and zinc, individually and in mixture, to the freshwater copepod Mesocyclops pehpeiensis*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 73:190-196.

Zhang, Y. G. (2008). *Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies*. Chemosphere 73, 1151–1161.

Zou, J., Neumann, N., Holland, J., Belovesic, M., Cunningham, C., Secombes, C., & Rowley, A. (1999). *Fish macrophages express a cyclooxygenase-2 homologue after activation*. Biochem 153-159.

Zwiener, C., & Frimmel, F. (2000). *Oxidative treatment of pharmaceuticals in water*. Water Res. 34: 1881-1885.



## IX. ABREVIATURAS

**CE<sub>50</sub>** Concentración Efectiva Media

**CL<sub>50</sub>** Concentración Letal Media

**CR** Coeficiente de Riesgo

**LOEC** Concentración Mínima de Efecto Observado

**NOEC** Concentración de Efecto no Observado

**PEC** Concentración Ambiental Esperada

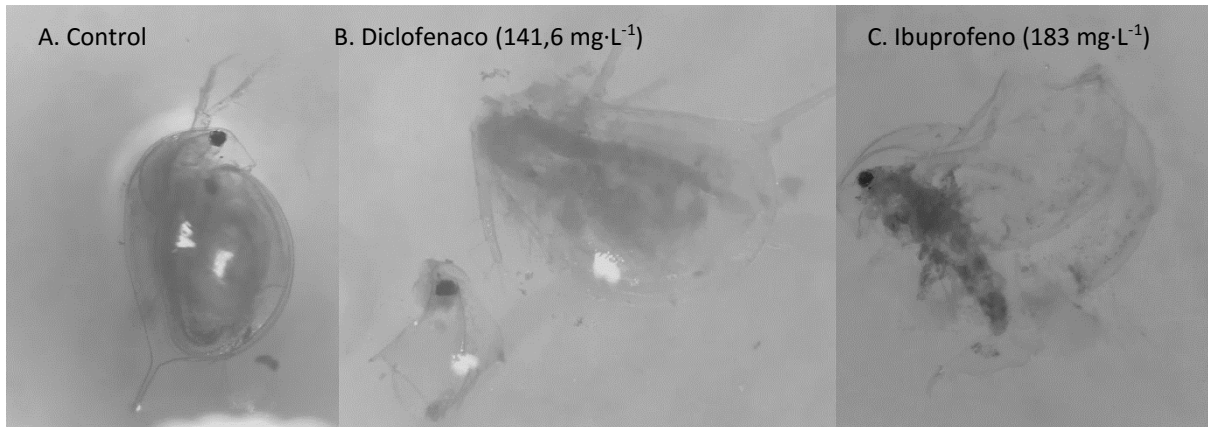
**PNEC** Concentración Prevista de no Efecto

**RAC** Ratio Agudo Crónico

**X. ANEXOS**

Anexo A: Galería Fotográfica del registro de Resultados

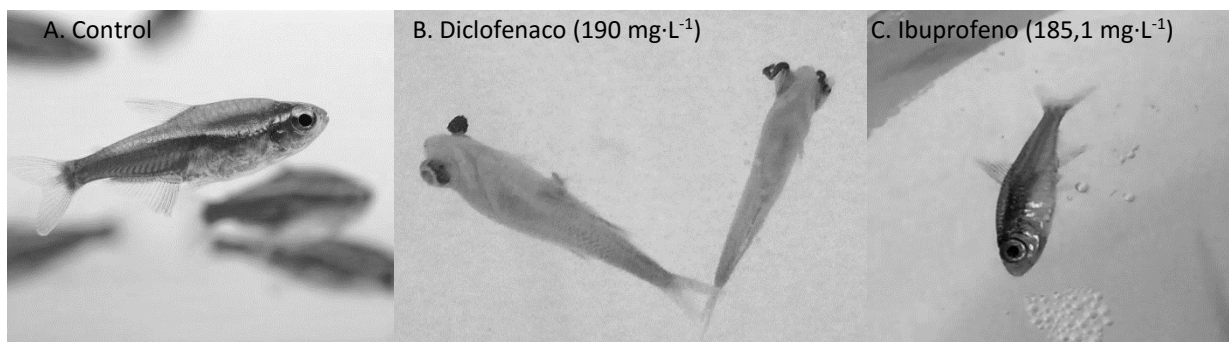
**Figura 1A.** Vista al estereoscopio (100X) de *D. magna* al ser expuesta a Diclofenaco e Ibuprofeno tras 48 h de exposición



**Figura 1B.** Registro fotográfico de *L. gibba* al ser expuesta a Diclofenaco e Ibuprofeno tras 7 días de exposición. Se observó pérdida de pigmentación, ruptura de colonias y un decaimiento en el número de frondas.



**Figura 1C.** Registro fotográfico de *P. innesi* al ser expuesto a Diclofenaco e Ibuprofeno tras 96 h de exposición.



Anexo B: Registro Fotográfico de la aclimatación de los organismos de ensayo.

**Figura 1B:** Pecera para aclimatación de *P. innesi*.



El registro fotográfico se obtuvo del laboratorio de Ingeniería Ambiental – UCSUR

**Figura 2B:** Aclimatación del cultivo de *D.magna*.



La tonalidad verdosa en la botella de aclimatación refiere a la presencia del alga *Chlorella vulgaris*, el cual sirvió como alimento para la reproducción de la pulga.

El registro fotográfico se obtuvo en el laboratorio de Larvicultura Experimental – UCSUR.

**Figura 3C:** Aclimatación del cultivo de *L. gibba* de acuerdo a protocolo.



El registro fotográfico se obtuvo del laboratorio de Investigación situado en el Pabellón de Biología Marina – UCSUR.



Anexo C: Resultados del laboratorio certificado respecto a la  
Calidad de agua de colecta de *L. gibba*



**INFORME DE ENSAYO N° 0898-18<sup>I</sup>**

<b>Solicitante</b>	: MATVEY SANCHEZ GONZALES
<b>Dirección del Solicitante</b>	: Monte Umbroso 408 - Surco
<b>Atención Proyecto</b>	: Matvey Sánchez Gonzales
	: "Evaluación de toxicidad y riesgo ambiental por dos contaminantes emergentes, Diclofenaco e Ibuprofeno, en organismos bioindicadores del ecosistema dulceacuícola: <i>Daphnia magna</i> (pulga de agua), <i>Lemna gibba</i> (lenteja de agua) y <i>Paracheirodon innesi</i> (pez tetra neón) para la estimación de estándares de calidad ambiental"
<b>Plan de Muestreo</b>	: Aguas Naturales
<b>Lugar de Muestreo</b>	: Pantanos de Villa - Chorrillos
<b>Tipo de Muestra</b>	: Afloramiento de Agua Natural (Superficial)
<b>Fecha de Monitoreo</b>	: 25/04/18
<b>Fecha de Recepción de Muestra</b>	: 25/04/18
<b>Fecha de Inicio de Análisis</b>	: 25/04/18
<b>Fecha de Término de Análisis</b>	: 30/04/18

**CALIDAD DE AGUA**

Código de Laboratorio	0898-1	Límite Detección	Unidad
Código de Cliente	A-01		
<b>Parámetros Físicoquímicos</b>			
Temperatura	23,6	0,1	°C
pH	7,00	---	Unid. pH
ST	3000	4	mg/L
TSS	4	4	mg/L
TDS	2900	4	mg/L
Aceites y Grasas	<1,0	1,0	mg/L
DBO <sub>5</sub>	3,3	2,0	mg/L
DQO	11	4	mg/L
Turbidez	1,20	0,30	NTU

LB-F-14  
 Av. Victor Alzamora 348, Urb. Barrio Medico  
 Surquillo - Lima  
 Teléfonos: 242-2696 / 444-8987  
 web: www.labecoperu.com  
 e-mail: labeco@labecoperu.com, labecoperu@gmail.com

1 de 3  
 Revisión: 22

"EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE."



# LABECO

ANÁLISIS AMBIENTALES S.C.R.L.

## METALES ICP

Parámetros	Código de Laboratorio		Código de Cliente		0898-1
	Unidad	L.D.	A-01	Resultados	
Aluminio	mg/L	0,006		<0,006	
Antimonio	mg/L	0,008		<0,008	
Arsénico	mg/L	0,003		<0,003	
Bario	mg/L	0,003		0,020	
Berilio	mg/L	0,0007		<0,0007	
Boro	mg/L	0,002		<0,002	
Cadmio	mg/L	0,0002		<0,0002	
Calcio	mg/L	0,1		43,4	
Cerio	mg/L	0,05		<0,05	
Cobalto	mg/L	0,0003		<0,0003	
Cobre	mg/L	0,0005		<0,0005	
Cromo	mg/L	0,0004		<0,0004	
Estaño	mg/L	0,002		<0,002	
Estroncio	mg/L	0,0004		<0,0004	
Fósforo	mg/L	0,010		<0,010	
Hierro	mg/L	0,008		0,048	
Litio	mg/L	0,002		<0,002	
Magnesio	mg/L	0,01		58,85	
Manganeso	mg/L	0,001		<0,001	
Molibdeno	mg/L	0,0008		<0,0008	
Níquel	mg/L	0,001		<0,001	
Plata	mg/L	0,001		<0,001	
Plomo	mg/L	0,006		0,050	
Potasio	mg/L	0,03		17,98	
Selenio	mg/L	0,007		<0,007	
Sílice	mg/L	0,009		10,184	
Sodio	mg/L	0,04		478,90	
Talio	mg/L	0,006		<0,006	
Titanio	mg/L	0,0009		<0,0009	
Vanadio	mg/L	0,001		<0,001	
Zinc	mg/L	0,008		0,051	

- Muestra tomada por el cliente.
- La fecha de muestreo es dato proporcionado por el cliente.
- Lugar y condiciones ambientales del muestreo: Indicado por el cliente.
- Condición y Estado de la muestra ensayada: Las muestras llegaron refrigeradas.
- El cliente renuncia al derecho de la dirimencia.

LB-F-14

Av. Víctor Alzamora 348, Urb. Barrio Medico  
 Surquillo - Lima  
 Teléfonos: 242-2696 / 444-8987  
 web: www.labecoperu.com  
 e-mail: labeco@labecoperu.com, labecoperu@gmail.com

2 de 3

Revisión: 22

"EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE"