

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Ecotoxicidad del diclofenaco de uso veterinario en
Hyalella curvispina (Amphypoda).**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO EN LA ESPECIALIDAD DE ECOLOGÍA Y
RECURSOS NATURALES**

**PRESENTADO POR:
Bach. ESCRIBA ESCALANTE, Hernán**

AYACUCHO – PERÚ

2016

Con mucho amor y cariño a mis
padres y hermanos.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por acogerme en sus aulas y materializar mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, por brindarme las facilidades para el logro y materialización de mis estudios en la carrera profesional de Biología.

A los docentes que han contribuido en mi formación, por ser portadores de sabiduría y sobre todo por su capacidad de transmitirla, que no solo aportaron en mi vida conocimientos científicos, sino que también me enseñaron acerca del mundo y de la vida real.

A mi asesor, Dr. Carlos Emilio Carrasco Badajoz por su orientación académica y contribución, que han permitido la elaboración y finalización del presente trabajo de tesis.

A todas aquellas personas que con su invaluable apoyo contribuyeron en la materialización del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Marco conceptual	8
2.2.1. Toxicidad	8
2.2.2. Dosis letal media (DL ₅₀)	8
2.2.3. Bioensayos	9
2.2.4. Bioindicadores	9
2.3. Bases teóricas	9
2.3.1. El diclofenaco	9
2.3.2. Los Anphypoda	12
2.3.3. Contaminación de ecosistemas acuáticos	14
2.3.4. Toxicidad en ecosistemas acuáticos	15
2.3.5. Efecto de la contaminación sobre los organismos acuáticos	15
2.3.6. Calidad de agua	16
2.4. Marco legal	17
2.4.1. Legislación y valoración del riesgo ambiental de los fármacos	17
2.4.2. Legislación de protección del agua en el Perú	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21

3.1.	Ubicación de la zona de estudio	21
3.2.	Población y muestra	21
3.2.1.	Población	21
3.2.2.	Muestra	21
3.2.3.	Unidad experimental	21
3.3.	Metodología y recolección de datos	22
3.3.1.	Obtención de <i>Hyaella curvispina</i>	22
3.3.2.	Aclimatación de <i>Hyaella curvispina</i>	22
3.3.3.	Adecuación del área de experimentación	22
3.3.4.	Ejecución de pruebas piloto	23
3.3.5.	Preparación de las unidades experimentales	23
3.3.6.	Determinación de la toxicidad	23
3.3.7.	Determinación de la calidad de agua	24
3.4.	Diseño experimental	24
3.5.	Análisis estadístico	25
IV.	RESULTADOS	27
V.	DISCUSIÓN	37
VI.	CONCLUSIONES	43
VII.	RECOMENDACIONES	45
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
	ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Valores promedios de la mortalidad de <i>Hyaella curvispina</i> en cuatro concentraciones de diclofenaco de uso veterinario a las 24 y 48 horas de exposición.	28
Tabla 2. Valores de la Concentración Letal Media (CL ₅₀) y los intervalos de confianza a las 24 y 48 horas de exposición para Diclofenaco de uso veterinario sobre <i>Hyaella curvispina</i> .	35
Tabla 3. Valores promedios de cuatro características fisicoquímicas de las unidades de experimentales con cuatro concentraciones de Diclofenaco de uso veterinario y un blanco.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química del diclofenaco.	10
Figura 2. Morfología externa del género <i>Hyaella</i> .	14
Figura 3. Promedios, mínimos y máximos de la mortalidad acumulada de <i>Hyaella curvispina</i> en cuatro concentraciones de Diclofenaco de uso veterinario y un testigo a las 24 horas de exposición.	29
Figura 4. Tendencia con ajuste lineal de la mortalidad acumulada de <i>Hyaella curvispina</i> en cuatro concentraciones de Diclofenaco de uso veterinario y un blanco a las 24 horas de exposición.	30
Figura 5. Promedios, valores máximos y mínimos de la mortalidad acumulada de <i>Hyaella curvispina</i> en cuatro concentraciones de Diclofenaco de uso veterinario y un blanco a las 48 horas de exposición.	31
Figura 6. Tendencia con ajuste lineal de la mortalidad acumulada de <i>Hyaella curvispina</i> en cuatro concentraciones de Diclofenaco de uso veterinario y un blanco a las 48 horas de exposición.	32
Figura 7. Tendencia de la mortalidad y concentración letal media (CL ₅₀) de diclofenaco de uso veterinario calculada mediante Probit sobre <i>Hyaella curvispina</i> a las 24 horas de exposición.	33
Figura 8. Tendencia de la mortalidad y concentración letal media (CL ₅₀) de diclofenaco de uso veterinario calculada mediante Probit sobre <i>Hyaella curvispina</i> a las 48 horas de exposición.	34

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Prueba de Shapiro Wilks para determinar el tipo de distribución de los porcentajes de mortalidad acumulada de <i>Hyalella curvispina</i>	52
Anexo 2. Prueba de Kruskal-Wallis para comprar la mortalidad de <i>Hyalella curvispina</i> en cuatro concentraciones creciente de Diclofenaco de uso veterinario y un testigo a las 24 horas de exposición.	53
Anexo 3. Coeficientes de regresión y análisis de varianza para el ajuste lineal de la mortalidad de <i>Hyalella curvispina</i> en cuatro concentraciones creciente de Diclofenaco de uso veterinario y un blanco a las 24 horas de exposición.	54
Anexo 4. Prueba de Kruskal-Wallis para comprar la mortalidad de <i>Hyalella curvispina</i> en cuatro concentraciones creciente de Diclofenaco de uso veterinario y un blanco a las 48 horas de exposición.	55
Anexo 5. Coeficientes de regresión y análisis de varianza para el ajuste lineal de la mortalidad de <i>Hyalella curvispina</i> en cuatro concentraciones creciente de Diclofenaco de uso veterinario y un blanco a las 48 horas de exposición.	56
Anexo 6. Percentiles (concentración letal en mg/L) de Diclofenaco de uso veterinario sobre <i>Hyalella curvispina</i> a las 24 horas de exposición.	57
Anexo 7. Percentiles (concentración letal en mg/L) de Diclofenaco de uso veterinario sobre <i>Hyalella curvispina</i> a las 24 horas de exposición.	58
Anexo 8. Prueba de Kruskal Wallis para comparar las características fisicoquímicas de las aguas contenidas en las unidades experimentales con crecientes concentraciones de Diclofenaco y un blanco.	59
Anexo 9. Preparación de los medios para realizar pruebas pilotos para la obtención de las concentraciones específicas que causaran la mortalidad.	60
Anexo 10. Disposición y preparación de los recipientes con la	61

solución del Diclofenaco.	
Anexo 11. Separación de los organismos de <i>Hyaella curvispina</i> para cada en base con la solución respectiva.	62
Anexo 12. Preparación de las unidades experimentales, constituidas en un recipiente con la respectiva concentración y los especímenes de <i>Hyaella curvispina</i> .	63
Anexo 13. Vista panorámica de las unidades experimentales con la diferentes concentraciones del Diclofenaco incluidas las <i>Hyaella curvispina</i> .	64
Anexo 14. Presentación comercial de diclofenaco de uso veterinario.	65
Anexo 15. Matriz de consistencia	66

RESUMEN

El diclofenaco, es de uso común tanto en los humanos y en animales domésticos, debido al alivio que generan, son frecuentemente empleados de manera excesivamente, por lo que fácilmente son diseminados en el ambiente ya que es eliminado del organismos a través de la orina y heces. Es frecuente hallar su presencia en ríos y lagunas como consecuencia de la escorrentía superficial de las precipitaciones pluviales generando efectos negativos en los seres vivos. Por lo señalado, el trabajo de investigación se desarrolló teniendo como objetivo evaluar el efecto ecotoxicológico del diclofenaco en las concentraciones de 0,125; 0,25; 0,50 y 1,0 mg/L sobre *Hyaella curvispina*, un anfípodo que frecuentemente es hallado en ecosistemas acuáticos continentales como ríos, lagunas y bofedales, para ello se preparó 20 unidades experimentales, los cuales estuvieron constituidos por un envase plástico de un litro de capacidad, conteniendo soluciones de cuatro concentraciones diferentes de diclofenaco de uso veterinario en el cual se colocaron 10 especímenes *Hyaella curvispina* procurando que fueran de tamaño homogéneo ($0,8 \pm 0,1$), para luego de las 24 y 48 horas determinar la mortalidad generada. De los resultados, se determinó que la mortalidad se incrementa significativamente ($p < 0,05$) a medida que se incrementa la concentración del diclofenaco, llegando a registrarse mortalidades de hasta el 70% y 97,5 % a las 24 y 48 horas respectivamente; por otro lado, la concentración letal media (CL_{50}) fue de 0,6981 y 0,3548 mg/L a las 24 y 48 horas respectivamente, mostrando que a medida que el tiempo de exposición se incrementa, la concentración letal media disminuye. Finalmente los valores de las características fisicoquímicas de las soluciones contenidas en las unidades experimentales sufren variación, resaltando el caso del pH, que disminuye a medida que la concentración del diclofenaco se incrementa, el cual muestra significancia estadística ($p < 0,05$), mientras que en el caso de conductividad eléctrica, sólidos disueltos totales y la salinidad, se incrementa a medida que la concentración del diclofenaco aumenta, el cual también es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Palabras clave: Ecotoxicidad, diclofenaco, *Hyaella curvispina*

I. INTRODUCCIÓN

Con el avance científico y tecnológico, han surgido muchos compuestos químicos que son empleados comúnmente por el hombre, sin embargo se constituyen como tóxicos potenciales al ser usados en exceso y sin control, ya que fácilmente son diseminados en el ambiente generando efectos negativos sobre los organismos vivos. Uno de los grupos más importantes, por su frecuencia de uso, son los fármacos y sus derivados, que aplicados al hombre y animales y posteriormente eliminados al ambiente a través de la orina y heces, tarde o temprano, llegan a ecosistemas acuáticos como ríos, lagunas, humedales, aguas subterráneas, etc; por lo que son motivo de preocupación, ya que afectan negativamente la salud y seguridad en el ambiente. Es por ello que estas sustancias, están comprendidas dentro de los denominados contaminantes emergentes, dentro del cual aparte de los productos farmacéuticos, se hallan otros como aquellos destinados al cuidado personal, surfactantes, aditivos industriales, plastificantes, plaguicidas y una gran variedad de compuestos químicos, que aunque se encuentran en bajas concentraciones son capaces de alterar las funciones de un ser vivo, es por ello que han llegado a ser en la actualidad un serio problema.¹

Los medicamentos de uso veterinario, en mayor medida que aquellos empleados para mejorar la salud del hombre, son usados sin las recomendaciones del profesional veterinario, lo que incrementa la probabilidad de que se convierta un problema ambiental, al incorporarse a cuerpos de agua tal como puede ser en ríos, lagunas, pantanos (como podría ser los bofedales) en la generarían graves problemas, como la muerte de organismos que son sensibles a dichos productos, como podría ser los anfípodos que por su abundancia y persistencia temporal son considerados como claves en los procesos de ciclaje de la materia y flujo de energía en dichos ecosistemas, por lo que su desaparición traería graves consecuencias.

El empleo de la *Hyaella curvispina* como organismo de prueba, para el estudio del efecto del fármaco antiinflamatorio no esteroideo como el diclofenaco, se fundamenta en que los Amphipodos son organismos un tanto estrictos en cuanto a sus requerimientos en las características de habitat, lo cual los restringe a aguas relativamente prístinas, por lo que pequeños cambios en dichas características desencadenará procesos que van a disminuir su densidad poblacional y posiblemente su desaparición; así mismo debido a que es un organismo que permanentemente se halla presente en dichos ecosistemas.

Por lo mencionado, se probó el efecto de toxicidad aguda del diclofenaco en concentraciones crecientes sobre *Hyaella curvispina*, bioensayos que se realizó en los ambientes del Laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, teniendo en cuenta los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar el efecto ecotoxicológico del diclofenaco sobre *Hyaella curvispina*.

Objetivos específicos

- a. Determinar el efecto de cuatro concentraciones de diclofenaco (0, 5, 1, 2 y 4 mg/L) sobre la mortalidad de *Hyaella curvispina*.
- b. Determinar el efecto de cuatro concentraciones de diclofenaco a las 24 y 48 horas de exposición sobre la mortalidad de *Hyaella curvispina*.
- c. Cuantificar la concentración letal media (CL₅₀) del diclofenaco a las 24 y 48 horas de exposición determinado en *Hyaella curvispina*.
- d. Determinar las variaciones de las características de pH, conductividad eléctrica, sólidos disueltos en el agua causados por la adición de diclofenaco al medio de cultivo.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Actualmente, existe un interés creciente por los “contaminantes emergentes”, entre los que se encuentran los fármacos y los productos de uso personal, surfactantes, retardantes de fuego, aditivos industriales, esteroides y hormonas, así como los subproductos de la desinfección. Se ha demostrado que los compuestos que forman parte de dichos productos, se encuentran profusamente diseminados en el ambiente, e incluso en las fuentes de abastecimiento de agua para consumo humano, en aguas subterráneas, en aguas de ecosistemas acuáticos superficiales. Estos contaminantes corresponden, en la mayoría de los casos, a contaminantes no regulados, que pueden ser candidatos a regulación futura en caso de que se pueda demostrar fehacientemente su efecto negativo sobre la vida, por lo que es necesario realizar estudios sobre sus efectos potenciales en la salud y los datos de monitoreo en cuerpos de agua con respecto a su incidencia.²

Entre los fármacos más prescritos en medicina humana destacan los analgésicos/antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenaco, los antiepilépticos como la carbamacepina, antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y los β -bloqueantes como el metoprolol. A éstos cabe añadir los, cada vez más utilizados en veterinaria, en actividades como la acuicultura, la ganadería, y la avicultura. Según las propiedades físico-químicas de los fármacos y sus metabolitos y productos de degradación, y las características de los suelos, estas sustancias pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica. En consecuencia, para una evaluación realista del medio acuático, es necesario un estudio integrado agua subterránea-suelo/sedimento-agua superficial-suelo. Los fármacos que se han detectado en el medio ambiente acuático, ya sea

directamente o sus metabolitos, incluyen analgésicos/antiinflamatorios, antibióticos, antiepilépticos, β -bloqueantes, reguladores de lípidos, medios de contraste en rayos X, anticonceptivos orales, esteroides y otros, como broncodilatadores, tranquilizantes³.

Cleuvers evaluó el potencial ecotoxicológico de diez fármacos recetados contra organismos acuáticos de diferentes clases taxonómicas, realizó un conjunto de biotests utilizando el cladóceros *Daphnia magna*, el clorofito *Desmodesmus subspicatus* y el macrófito *Lemna minor*. Los puntos finales fueron la inmovilización de *Daphnia* y la inhibición de la tasa de crecimiento promedio de *Desmodesmus* y *Lemna*. Para la mayoría de las sustancias, las toxicidades fueron moderadas, con EC_{50} en el rango de 10 a 100 mg/L⁻¹ o incluso muy por encima, mientras que *Lemna* fue la especie de prueba más sensible en la mayoría de todos los compuestos ensayados. Las pruebas con combinaciones de diversos productos farmacéuticos revelaron efectos más fuertes de lo esperado de los efectos medidos individualmente. Se ha descubierto que el ácido clofibrínico y la carbamazepina actúan por un modo de acción no específico (narcosis no polar) y con *Daphnia* el efecto combinado de estas sustancias sigue el concepto de adición de concentración, mientras que en la prueba de algas el concepto de acción independiente. Podría utilizarse para calcular la toxicidad de la mezcla. También se ha descubierto que los fármacos antiinflamatorios diclofenaco e ibuprofeno actúan de forma no específica por narcosis no polar y siguen el concepto de adición de concentración en la prueba de algas, así como en la prueba de *Daphnia*. Las toxicidades medidas de los productos farmacéuticos probados demuestran que el efecto agudo de sustancias individuales en el medio acuático es muy poco probable. Pero debemos tener en cuenta que pueden producirse efectos de combinación considerables y que se necesitan datos de toxicidad de estudios crónicos para evaluar el riesgo ambiental de residuos de fármacos.⁴

Se afirma que los residuos de productos farmacéuticos representan un riesgo ambiental debido a su persistencia y distribución en el agua, en el suelo, en el aire y en los alimentos. Su amplio uso hospitalario, veterinario y doméstico, aumenta sus descargas y la de sus productos de transformación en el ambiente, y su toxicidad se manifiesta en los componentes vivos de los ecosistemas. El desarrollo de metodologías de tratamiento de muestra y de técnicas instrumentales de análisis, ha permitido monitorear sus bajas concentraciones a

lo largo de los componentes de los ecosistemas acuáticos, del suelo y su biomagnificación en las cadenas tróficas. Asimismo, se desarrollan ensayos in vitro e in vivo para determinar su ecotoxicidad, clasificándolos como contaminantes emergentes, cuyas descargas no son cuantificables, pero su impacto sobre los ecosistemas es crónico y de graves repercusiones para la salud pública mundial.⁵

Peluso, en Argentina mencionan que los sedimentos contaminados llegan a ser un problema ambiental severo en numerosos puertos, estuarios y ríos de nuestra región. Para evaluar la peligrosidad de sedimentos (categorización), se pueden utilizar índices, mediante los cuales se logran unificar datos de bioensayos de toxicidad junto a información fisicoquímica en un único valor. En estudios previos se desarrolló un índice propio de categorización de la peligrosidad de sedimentos, el cual se aplicó a muestras de ríos y arroyos afluentes del Río de la Plata y permitió la categorización de sitios, con diferente grado de deterioro ambiental. Para ello, diseñaron una investigación para evaluar la peligrosidad de sedimentos en el marco de un programa de monitoreo de los principales tributarios de los Ríos Paraguay-Paraná. Se evaluaron muestras de sedimentos de fondo de la desembocadura de los principales tributarios desde el límite con Paraguay hasta el Río Luján y del curso principal del Paraná (total 23 sitios). Se realizaron ensayos con sedimento directo utilizando *Hyalella curvispina* como organismo prueba, como controles se utilizaron sedimentos de referencia y sedimento artificial. Como puntos finales se evaluaron la supervivencia y el crecimiento (longitud). La mayoría de las muestras no indujeron efectos adversos sobre los anfípodos expuestos, con excepción de las correspondientes a las desembocaduras de los arroyos San Lorenzo, Saladillo y Pavón, en las que se evidenciaron disminuciones significativas ($p < 0,05$) en la supervivencia con respecto a los controles. Los resultados hallados por dichos investigadores son congruentes con antecedentes de monitoreos previos de contaminación de estos cursos, a los que se asocia elevada peligrosidad para la biota acuática.⁶

En otra investigación empleando como modelo otras especie del género *Hyalella*, se evaluó el efecto tóxico de agua y sedimentos contaminados con Cu^{2+} en la supervivencia y el crecimiento de los juveniles de *Hyalella pseudoazteca*, para el cual se diseñó un experimento en el que se determinó que la CL_{50} a las 96 h de exposición a Cu^{2+} en el agua moderadamente dura fue de 0,17 mg/L, también se encontró que la concentración de 100 mg Cu^{2+} /kg en

sedimentos tiene un efecto inhibitor del crecimiento. Este estudio proporciona información sobre los efectos tóxicos de Cu^{2+} en una especie nativa bentónica que se halla en la región pampeana de Argentina y contribuye a validar, en esta región, el uso provisional de los valores de Cu^{2+} referenciales recomendado por las guías de calidad de sedimento para el hemisferio norte.⁷

Otras investigaciones reportan que la especie *Hyaella curvispina*, es sensible a la presencia de xenobióticos, así en un río de primer orden afectado por una explotación agrícola, se probó el efecto de los agroquímicos, Cipermetrina, Clorpirifos, Endosulfán y el Glifosato que se rociaron en un campo de cultivo durante todo el período estudiado. Se realizaron pruebas de toxicidad en condiciones controladas de laboratorio, empleando sedimento y agua corriente tomados luego de que dichas sustancias se rociaran, tanto en la estación lluviosa como en estiaje. Se determinó la existencia de toxicidad principalmente luego de la aplicación de los pesticidas en el campo de cultivo. La mortalidad llegó a un 100%, cuando las muestras de agua y suelo fueron tomados inmediatamente luego de la aplicación de los plaguicidas, este efecto continuó por 30 días posteriores, para luego no registrarse mortalidad. La toxicidad con más corta persistencia fue característica en muestras de agua del río, con un nivel intermedio en los sedimentos y de más duración en muestras de suelo.⁸

No se halló investigaciones que determinen el efecto del diclofenaco sobre *Hyaella curvispina*, sin embargo, se tienen información sobre la toxicidad producida en *Daphnia magna*, para el cual se realizó ensayos de toxicidad aguda y subletal, valorando para este último biomarcadores de estrés oxidativo como el grado de lipoperoxidación, la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y contenido de proteínas carboniladas, así como biomarcadores de daño al material genético. Los resultados obtenidos fueron: El ensayo agudo mostró que la CL_{50} a 48 horas fue de 116,6 y 96,6 mg/L, para neonatos y adultos de 14 días respectivamente, siendo entonces estos últimos más sensibles a la exposición al fármaco. El ensayo subletal, demostró que la exposición de *Daphnia magna* a este medicamento produce estrés oxidativo (incremento en el grado de lipoperoxidación y contenido de proteínas carboniladas, así como modificaciones en la actividad de las enzimas antioxidantes), así como daño al DNA. Concluyen que el diclofenaco produce daño oxidativo y genético a *Daphnia magna* y considerando que este tipo de organismo es fundamental para los ecosistemas

acuáticos, este medicamento debería ser calificado como ecotóxico y su incorporación al ambiente legislada.⁹

Del mismo modo se tienen información sobre la toxicidad del ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco producida en de estadios inmaduros de *Rhinella spinulosa* con diferentes concentraciones en dos tiempos de exposición (24 y 48 horas), de los resultados se observa que los porcentajes de mortalidad para cada fármaco fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$), según las concentración de los fármacos en las unidades experimentales, registrándose para el ibuprofeno mortalidades de 43,33 y 100% a 40,00 y 80 mg/L de concentración durante 24 horas y 40,00; 76,67 y 100% a 10,00; 20,00 y 40,00 mg/L de concentración a las 48 horas de exposición, para el naproxeno se obtuvo una mortalidad de 3,33 y 13,33% a 32,00 y 64,00 mg/L a las 24 horas y 23,33; 26,67; 50,00 y 73,33% a las 8,00; 16,00; 32,00 y 64,00 mg/L de concentración a las 48 horas de exposición. Finalmente para el diclofenaco se registró mortalidades de 13,33 y 100,00% a 60,00 y 120,00 mg/L a las 24 horas y 23,33; 60,00, 90,00 y 100,00% a 15,00; 30,00; 60,00 y 120,00 mg/L a las 48 horas, mostrando así para los tres fármacos estudiados, que a medida que se incrementa la concentración, aumenta el porcentaje de mortalidad. La concentración letal media para los fármacos ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco fueron de 68,6 mg/L, 106,6 mg/L y 120 mg/L respectivamente a las 24 horas de exposición y de 13,47 mg/L, 104,6 mg/L y 29,8 mg/L respectivamente a las 48 horas, mostrando así que la concentración letal media disminuye a medida que el tiempo de exposición se incrementa.¹⁰

Se afirma que la acción farmacológica de este compuesto es debida a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX_2) y en consecuencia de la síntesis de prostaglandinas. Este fármaco es biotransformado en el hígado mediante la acción del citocromo P450 produciendo 4-hidroxiciclofenaco, entre otros metabolitos. Diversos estudios realizados en mamíferos, han demostrado que el diclofenaco puede generar daño celular, así como apoptosis, debido a la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno durante su biotransformación, por lo que la evaluación del estrés oxidativo puede ser un buen biomarcador de daño. Se evaluó el posible estrés oxidativo producido por el diclofenaco adicionado al agua o sedimentos sobre *D. magna* y *H. azteca*. El estudio fue realizado en contenedores de plástico con 100 mL de agua adicionados con 9,66 $\mu\text{g}\cdot\text{L}$ de diclofenaco para la prueba con *D. magna*, y 100

mL de agua y 10 g de sedimento artificial adicionados con 4,67 µg/Kg para la prueba con *H. azteca* (las concentraciones corresponden a 1/10 CL previamente determinada en un ensayo agudo). Una vez alcanzado el equilibrio (2 h), se adicionó 1 g del respectivo organismo de prueba y después de 48 h de exposición se evaluaron los siguientes biomarcadores: grado de lipoperoxidación (LPX), contenido de proteínas oxidadas (PO) y actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX). Los resultados obtenidos muestran que el diclofenaco a concentraciones subletales produce incrementos significativos en LPX y PO y modificaciones de la actividad de las enzimas antioxidantes evaluadas en ambos organismos de prueba. Concluyen que el estrés oxidativo puede ser considerado como un buen biomarcador de daño temprano para la exposición de especies acuáticas a diclofenaco.¹¹

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Toxicidad

Se denomina toxicidad a la actividad tóxica y específica de una sustancia, vinculada a la estructura química de una sustancia exógena al organismo (xenobiótico) por su interacción con moléculas endógenas (receptor). Precisamente esta actividad biológica, es la que permite juzgar acerca de la capacidad que posee una sustancia para poder actuar como nociva para un organismo vivo, bajo unas determinadas condiciones. La toxicidad aguda es una respuesta de los organismos sometidos a la acción de detergentes, la que se mide en número de especímenes y también puede ser expresado en porcentaje. Es así que un potencial de un compuesto para causar lesiones o enfermedades, cuando se administra en dosis únicas o en dosis múltiples en un periodo corto (por ejemplo, 24 horas). Estos efectos se basan en los mecanismos de la acción química, en la cual se pueden apreciar alteraciones fisiológicas poco después de su administración (por ejemplo, la muerte).¹²

2.2.2. Dosis letal media (DL₅₀)

La DL₅₀, es la dosis que produce una mortalidad del 50% en una población animal. La DL₅₀, solía considerarse en la bibliografía más antigua, como una medida de la toxicidad aguda de las sustancias químicas. A mayor DL₅₀, menor toxicidad aguda. De una sustancia química muy tóxica (con una DL₅₀ baja) se dice que es potente. No hay una correlación necesaria entre la toxicidad aguda

y la toxicidad crónica. La DE_{50} (dosis efectiva) es la dosis que produce en el 50% de los animales un efecto específico no letal.¹³

2.2.3. Bioensayos

Los bioensayos, son definidos como el método utilizado para evaluar la potencia relativa de un agente tóxico (químico o no), sobre un organismo vivo, a través de la comparación de ese agente, con el efecto de una solución patrón o estándar. La prueba de toxicidad corresponde al método utilizado para detectar y evaluar la capacidad de un agente dado para producir efectos tóxicos sobre los organismos vivos; su objetivo primario, además de obtener datos para determinar los efectos sobre los sistemas biológicos, es caracterizar la relación concentración-respuesta del agente.¹⁴

2.2.4. Bioindicadores

Las especies indicadoras, son aquellos organismos (o restos de los mismos) que ayudan a descifrar cualquier fenómeno o acontecimiento actual (o pasado), relacionado con el estudio de un ambiente. Las especies tienen requerimientos físicos, químicos, de estructura del hábitat y de relaciones con otras especies. A cada especie o población, le corresponden determinados límites de estas condiciones ambientales, entre las cuales los organismos pueden sobrevivir (límites máximos), crecer (intermedios) y reproducirse (límites más estrechos). En general, cuando más estenoica sea la especie en cuestión, es decir, cuando más estrechos sean sus límites de tolerancia, mayor será su utilidad como indicador ecológico. Las especies bioindicadoras deben ser, en general, abundantes, muy sensibles al medio de vida, fáciles y rápidas de identificar, bien estudiadas en su ecología y ciclo biológico, y con poca movilidad.¹⁵

2.3. Bases teóricas

2.3.1. El diclofenaco

El diclofenaco es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), derivado del ácido benzoacético, que posee propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Es utilizado ampliamente para el alivio del dolor en inflamaciones agudas y crónicas, síndromes reumáticos, procesos degenerativos, dolor inflamatorio agudo de tipo lumbar, postoperatorio, tendinitis, bursitis, ciática, gota, cirugía dental, dismenorrea y cefalea. En México su venta no requiere receta médica y es uno de los más utilizados por la población.¹⁶

a. Características generales

El diclofenaco tiene las siguientes características¹⁶:

Nombre químico: Acido 2-2-(2,6-diclorofenil) amino fenil acético.

Formula química: C₁₄-H₁₁-Cl₂-N-02.

Solubilidad en agua (g/L): 21.3 (12).

Clasificación farmacológica: Antiinflamatorio no esteroideo (AINE).

Clasificación terapéutica: Antiinflamatorio, antirreumático.

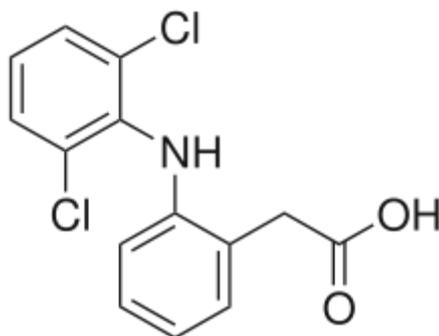


Figura N° 1. Estructura química del diclofenaco¹⁶

e. Farmacodinamia

El principal mecanismo de acción del diclofenaco, es la inhibición competitiva de la enzima ciclooxigenasa (COX), responsable de la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico, además bloquea la acción del glutamato neuromodulador periférica al dolor, activa la vía inhibitoria descendente serotoninérgica, es decir activa la liberación de opiodes endógenos y de serotonina, neurotransmisores involucrados en promover diversos grados de analgesia, e inhibe a la elastasa de los gránulos de los leucocitos polimorfonucleares, proteínas que participan en la degradación del cartílago en los procesos reumáticos crónicos.¹⁷

f. Farmacocinética

La farmacocinética del diclofenaco se caracteriza por los siguientes pasos:¹⁸

- **Absorción:** Después de la administración oral, el diclofenaco se absorbe rápida y completamente en el duodeno.
- **Distribución:** La concentración plasmática máxima se alcanza entre dos o tres horas después de su administración. La unión a proteínas es del 99%.
- **Biotransformación:** Se metaboliza en el hígado por acción de la isoenzima de la sub familia CYP₂C del citocromo P450 a 4-hidroxidiclofenaco que es el metabolito principal, y otras formas hidroxiladas, sufriendo posteriormente glucuronidación y sulfatación. También se ha identificado que el diclofenaco

sufre una biotransformación (10 al 50 %) por medio de las enzimas CYP2C8 y 9, a través de una glucoronidación por la enzima uridín 5'-difosfoglucuronosil transferasa (UGT_{2B754}) y diversas vías de hidroxilación. Otro metabolito generado es el 5, hidroxidiclofenaco, resultado de las enzimas CYP_{2C8}, CYP_{2C18}, CYP_{2C19} Y CYP_{2C8}, el diclofenaco glucoronizado es metabolizado por CYP_{2C8}.

- **Excreción:** Se excreta en la orina (65%) y por la bilis (35%). Más del 90% es excretado en 72 horas. El tiempo de vida media oscila alrededor de 2 horas. Se acumula en el líquido sinovial después de su ingestión, lo cual explica la duración del efecto terapéutico que es mucho más largo que su vida media plasmática.

g. Efectos adversos en humanos

En algunos pacientes se producen sangrado y ulceración de la pared gastrointestinal. Entre el 5 y 15% de los usuarios, se inducen ligeramente los niveles de transaminasas hepáticas en plasma. Es posible encontrar también efectos en el sistema nervioso central, erupciones, reacciones alérgicas, retención de líquido y edema. En raras ocasiones se presenta deficiencia en la función renal.¹⁹

h. Efecto tóxico del diclofenaco en diversas especies

En el 2004, el diclofenaco se consideró el responsable de la muerte de tres especies de buitres en la India y Pakistán. Estudios posteriores encontraron que, éste produjo falla renal debido a la acumulación de ácido úrico.²⁰ Por otro lado, Patiño, demostró que este fármaco, puede inducir apoptosis de hepatocitos humanos y de ratas, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno a causa de uno de sus metabolitos principales, el 5'OH-diclofenaco.²¹ Efectos similares fueron descritos en el pez japonés *Oryzias latipes*, mientras que en *Onchorynchus mykiss*, produjo alteraciones en el riñón y su acumulación en órganos como hígado y tejido muscular, por lo cual se concluyó que la exposición prolongada en el ambiente produce deficiencia en la condición general del pez.¹⁴ Por otro lado, también se menciona que el diclofenaco sódico, genera estrés oxidativo, formación de radicales libres y el efecto oxidativo sobre biomoléculas, tales como la lipoperoxidación, daño a proteínas, ADN y a las defensas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa). El daño directo a las proteínas o la modificación química de sus aminoácidos

producido por estrés oxidativo puede dar lugar a un incremento en el contenido de proteínas carboniladas y por lo tanto de las proteínas oxidadas.¹¹

2.3.2. Los Anphypoda

Los anfípodos son abundantes en los ambientes acuáticos y pueden representar una importante fracción de la biomasa total de los invertebrados. Por sus hábitos alimentarios, juegan un papel fundamental como productores secundarios y como fuente alimenticia para otros invertebrados, peces, anfibios y aves.²²

Existen representantes de los Anphypoda en las aguas continentales, tanto epigeas como hipogeas. Se estima que el 24% de las 7 000 especies de anfípodos, corresponde a formas dulceacuícolas. En comparación con otros continentes, en América del Sur los anfípodos están pobremente diversificados. Solo se conoce algo más de 60 especies dulceacuícolas epigeas e hipogeas sudamericanas. Estas especies corresponden en su gran mayoría a *Hyaella* (Gammaridea, Hyaellidae), único género de ambientes epigeos dulceacuícolas ampliamente distribuido en América del Sur. Entre los restantes Gammaridea, las familias representadas en las aguas epigeas y subterráneas continentales e insulares son Corophidae, Bogidiellidae, Paracrangonyctidae y Gammaridae.²³

a. Familia Hyaellidae

La familia *Hyaella* cuenta con más de 60 especies descritas, de las cuales al menos 50 son sudamericanas, mientras que en América del Norte se distribuyen 9 especies, entre ellas *H. azteca*, que comprende a un complejo de especies crípticas, morfológicamente indistinguibles. El Lago Titicaca presenta una notable concentración de especies, reconociéndose al menos 16 válidas, la gran mayoría endémicas. *Hyaella* ha sido tema de análisis de numerosos especialistas, que enfocaron los estudios desde la perspectiva taxonómica-sistemática y que en los últimos años han incorporado en sus investigaciones las modernas técnicas de análisis de datos moleculares.²³

Con respecto al estatus de Hyaellidae, se ha planteado una nueva propuesta de clasificación para la superfamilia Talitroidea (Amphipoda, Gammaridea) en base a una revisión cladística. Como resultado de esta revisión surge la propuesta de que Hyaellidae y Najnidae sean sinonimizados con Dogielinotidae y se le asigne a Hyaellidae la categoría de subfamilia. Este criterio aún no ha recibido consenso.²⁴

La utilidad de *Hyaella* como bioindicador de contaminación es un aspecto que recientemente se comenzó a tener en cuenta. Entre otros aportes, se ha

demostrado en ensayos, “in situ” que *H. curvispina* puede ser empleada para evaluar la contaminación por pesticidas en ríos de la pampa argentina.²⁵ Lo mencionado anteriormente es corroborado por estudios que a partir de bioensayos realizados con sedimentos costeros, *Hyaella curvispina* mostró una sensibilidad en concordancia con los niveles de contaminación química y caracterización de comunidades biológicas previamente reportados, a partir del cual fue discriminando zonas de alta y moderada contaminación. Finalmente afirma que sus resultados hallados permiten postular a esta especie como una herramienta sensible de alerta temprana para la vigilancia ambiental.²⁶

b. Clasificación taxonómica de *Hyaella curvispina*

La clasificación de dicha especie es la siguiente²⁴:

Reino	: Animalia
Phylum	: Artrópoda
Subphylum	: Crustácea
Clase	: Malacostraca
Orden	: Amphípoda
Familia	: Hyalellidae
Género	: <i>Hyaella</i>
Especie	: <i>curvispina</i>
Nombre científico	: <i>Hyaella curvispina</i>

Dentro de las principales características morfológicas, las especies de *Hyaella* miden, desde el extremo de la cabeza hasta el extremo del telson aproximadamente entre 2,5 a 20 mm. Los caracteres exclusivos del género comprenden la morfología del telson, que es entero, las mandíbulas sin palpo y la ausencia de la rama interna del Ur3. En *Hyaella*, cada pereómero o segmento del tórax lleva un par de apéndices. Estos apéndices torácicos comprenden 7 pares de pereiópodos, de los cuáles los 2 primeros pares son gnatópodos quelados (el propodo es la palma de los gnatópodos). Los machos de *Hyaella* son fácilmente reconocibles por el gran desarrollo del propodo del segundo par de gnatópodos (Gn2).

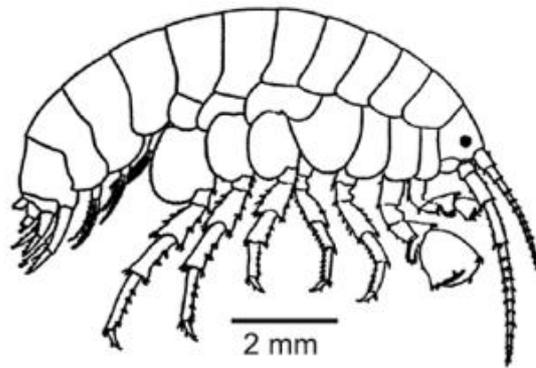


Figura 2.- Morfología externa del género Hyalella.

c. Los ecosistemas acuáticos

Los ecosistemas acuáticos, son el centro de interacción de un gran número de factores bióticos y abióticos que pueden ser drásticamente modificados. Estos ecosistemas incluyen las aguas de los océanos (ecosistemas marinos) y aguas continentales dulces (ríos, lagos y lagunas). Dentro de los ecosistemas acuáticos continental, existen de manera general, los sistemas lóticos (agua corriente) y los lénticos (agua estancada). En el caso de los ríos, se sabe que se producen diferencias a lo largo de su curso, ya que cada tramo presenta caudales, temperaturas y profundidades distintas.²⁷

2.3.3. Contaminación de ecosistemas acuáticos

El crecimiento de la población a nivel mundial ha incrementado los niveles de contaminación. Esta contaminación está relacionada con el vertido de agua de desecho de origen doméstico e industrial a los cuerpos de agua, incorporación de microorganismos y productos químicos. Estas materias deterioran la calidad del agua y la hacen inútil para los usos pretendidos. Como alternativa a estos inconvenientes, se ha propuesto el uso de indicadores microbianos que se puedan identificar mediante el uso de métodos sencillos, rápidos y económicos. El diagnóstico y posterior recuperación de las fuentes de agua naturales contaminadas, debe hacerse además, teniendo en cuenta las implicaciones que en términos ecológicos y sanitarios representa la degradación del recurso. En este trabajo de investigación, se utilizó los principales bioindicadores de contaminación y su significado en la evaluación de la calidad del agua.²⁸

La determinación de la calidad del agua, se fundamentó principalmente en análisis fisicoquímicos y bacteriológicos. Hoy en día, en los países desarrollados se han venido implementando sistemas de evaluación de la calidad del agua con

base en la investigación biológica de los macroinvertebrados en el agua, los cuales han demostrado su utilidad para establecer los niveles de contaminación de las fuentes acuáticas y planear, entonces, estrategias para la recuperación de las mismas.¹⁵

2.3.4. Toxicidad en ecosistemas acuáticos

La agricultura no es solamente el mayor consumidor de los recursos hídricos, sino que, debido a las ineficiencias en su distribución y aplicación, sus efluentes que retornan a los recursos de aguas superficiales o subterráneas contienen grandes cantidades de sales, nutrientes y productos agro-químicos, lo que también contribuye al deterioro de la calidad. Los problemas del agua, se centran, tanto en la calidad como en la cantidad. La comunidad debe conocer la importancia de la "calidad" de la misma y esa misma comunidad de encargarse de su cuidado y preservación. Los primeros en contaminar las aguas, son los pesticidas, llevados hasta los ríos por la lluvia y la erosión del suelo, cuyo polvo vuela hacia los ríos o el mar y los contamina. Además, los campos pierden fecundidad por abuso de las técnicas agrícolas. La sal acarreada en el invierno desde las rutas hasta los ríos es otro factor envenenante. Lo mismo que los diques y las represas, que "barren" amplias franjas de cultivo. La agricultura da cuenta de alrededor del 70% del uso global del agua.²⁹

2.3.5. Efecto de la contaminación sobre los organismos acuáticos

Los organismos vivos que habitan en los cursos de agua, presentan estas adaptaciones evolutivas a unas determinadas condiciones ambientales, y presentan unos límites de tolerancia, a las diferentes alteraciones de las mismas. Estos límites de tolerancia varían, y así, frente a una determinada alteración se encuentran organismos "sensibles" que no soportan las nuevas condiciones impuestas, comportándose como "intolerantes", mientras que otros, que son "tolerantes" no se ven afectados. Si la perturbación llega a un nivel letal para los intolerantes, estos mueren y su lugar es ocupado por comunidades de organismos tolerantes. Cada especie en particular, gracias a su conformación genética específica, está en la capacidad de sobrevivir únicamente dentro de determinados rangos ambientales. Aquellas que pueden soportar grandes espectros fisicoquímicos, reciben el nombre de euritípicas y por ello se presentan en un gran número de regiones geográficas o están ampliamente dispersas dentro de un mismo ecosistema. Contrariamente, las especies estenotípicas son aquellas cuyos rangos de tolerancia ambiental, son estrechos y por ellos son

indicadoras de una condición fisicoquímica concreta. De este modo, la presencia de una de estas especies, señala condiciones ambientales particulares, o lo que es igual, al encontrarse una variable fisicoquímica en un rango definido, se sugiere su presencia o ausencia.¹⁵

2.3.6. Calidad de agua

La composición química de aguas naturales, es regulada por factores climáticos tales como las precipitaciones, procesos de erosión, meteorización, evaporación, sedimentación y también la influencia de componentes biológicos del sistema, como por ejemplo la vegetación, la actividad microbiológica del suelo que influye en la composición de las aguas de escurrimiento.²⁷

La contaminación del agua en la actualidad, se ha convertido en uno de los factores más importantes que modifica de manera determinante e importante, las características fisicoquímicas del agua, agregando a ella, sustancias que son nuevas o incrementado de manera dramática aquellas de manera natural existen en el seno del agua.³⁰ Algunos aspectos que pudieran considerarse como indicadores primarios de la contaminación del agua son los siguientes:

a. Conductividad eléctrica

Se expresa en microsiemens por cm ($\mu\text{S}/\text{cm}$), este mide la cantidad total de iones presentes en el agua, la conductividad de un cuerpo de agua natural, esta mediatizada por el terreno que atraviesa y por la posibilidad de disolución de rocas y materiales, el tipo de sales presentes, el tiempo de disolución, temperatura, gases disueltos, pH, y toda serie de factores que pueden afectar la solubilidad del soluto en agua.³¹

b. El pH

Es una expresión del carácter ácido o básico de un sistema acuoso, en un sentido estricto, es una medida de la concentración molar del ion hidrogenión en un medio acuoso. Los conceptos de pH, alcalinidad y acidez, se relacionan mutuamente debido a que el pH de la muestra se utiliza como criterio para determinar si la capacidad amortiguadora de la muestra se mide en función de su acidez o en función de su alcalinidad; en este sentido, los conceptos de pH, acidez y alcalinidad, se asemejan mucho a los de temperatura y calor³¹. El pH de las aguas naturales es regido, en gran medida por la interacción de los iones H^+ , de la disociación de H_2CO_3 y los iones OH^- proveniente de la hidrólisis de los bicarbonatos. Sus valores oscilan entre 2 y 12, donde las aguas con valores inferiores a 4, provienen de regiones volcánicas que reciben ácidos minerales

fuerteras, debido a la oxidación de la pirita y arcillas. Las aguas naturales ricas en materia orgánica disuelta, presentan valores bajos de pH, especialmente en aquellas zonas donde predominan las turberas.³²

c. Sólidos disueltos totales

Los sólidos disueltos totales (SDT), se refieren a la concentración total de minerales presentes en aguas naturales. La turbiedad define el grado de opacidad producido en el agua, por la materia particulada en suspensión, debido a que los materiales que provocan la turbiedad son los responsables del color. La concentración de las sustancias, determina la transparencia del agua, puesto que limita el paso de luz a través de ella.²⁷

Esta materia particulada proviene de la erosión de suelos y rocas, suelen estar revertidas de restos orgánicos. Los aportes de aguas turbias de escorrentía en época de lluvias ricas en materias minerales, causan aumentos en turbidez en aguas de ríos.³³

2.4. Marco legal

2.4.1. Legislación y valoración del riesgo ambiental de los fármacos

Los requerimientos legales en algunas regiones como Europa, Estados Unidos y Canadá, exigen una valoración del riesgo ambiental para los nuevos fármacos que van a ser introducidos al mercado, para lo cual se realizan estudios toxicológicos en tres o cuatro especies diferentes (algas, *Daphnia sp* y peces) para valorar su comportamiento en el ambiente.³⁴

Para estos estudios, es necesario calcular la concentración de fármaco que va a ser introducida al ambiente, basada en cinco años de producción. Si la concentración del medicamento o la de alguno de sus metabolitos es menor a 1µg/L (1ppb), es considerado como aceptable y se le asigna una categoría de exclusión para posteriores análisis. Por el contrario si es mayor a 1µg/L se tiene que realizar una batería de pruebas toxicológicas, las cuales incluyen efectos en la respiración microbiana y pruebas de toxicidad aguda en al menos una especie de alga, un invertebrado y un pez. Las pruebas de toxicidad crónica son necesarias si el fármaco tiene la capacidad de bioacumularse.

La agencia Europea de medicina publicó una guía para la evaluación del riesgo ambiental de productos farmacéuticos de uso humano, en la cual se especifican las consideraciones generales y los procedimientos para su realización.³⁵

En el Perú se ha legislado la protección del recurso agua en normas ambientales, en normas sectoriales de relevancia ambiental y en el código penal.

2.4.2. Legislación de protección del agua en el Perú

a. Ley General del Ambiente (Ley N° 28611)

- En el Artículo 98° menciona que la conservación de los ecosistemas se orienta a conservar los ciclos y procesos ecológicos, a prevenir procesos de su fragmentación por actividades antrópicas, y a dictar medidas de recuperación y rehabilitación, dando prioridad a ecosistemas especiales o frágiles.
- El artículo 120° menciona que el Estado, a través de las entidades señaladas en la Ley, está a cargo de la protección de la calidad del recurso hídrico del país. Asimismo, el Estado promueve el tratamiento de las aguas residuales con fines de su reutilización, considerando como premisa la obtención de la calidad necesaria para su reúso, sin afectar la salud humana, el ambiente o las actividades en las que se reutilizarán.
- En el Artículo 121° menciona que el Estado emite en base a la capacidad de carga de los cuerpos receptores, una autorización previa para el vertimiento de aguas residuales domésticas, industriales o de cualquier otra actividad desarrollada por personas naturales o jurídicas, siempre que dicho vertimiento no cause deterioro de la calidad de las aguas como cuerpo receptor, ni se afecte su reutilización para otros fines, de acuerdo a lo establecido en los ECA (Ente Costarricense de Acreditación) correspondientes y las normas legales vigentes.

b. Código Penal

- En sus artículos 304° y 305° prohíben la contaminación por vertimiento de residuos sólidos, líquidos, gaseosos o de cualquier otra naturaleza con infracción de las normas ambientales y por encima de los límites máximos permisibles, que causen o puedan causar perjuicio o alteraciones en la flora, fauna y recursos hidrobiológicos.
- El Artículo 307° prohíbe el vertimiento de desechos industriales o domésticos en lugares no autorizados, o sin cumplir con las normas sanitarias y de protección al ambiente.

c. Ley de Recursos Hídricos (Ley N° 29338)

Regula el uso y gestión integrada de los recursos hídricos, que comprende agua superficial, subterránea, continental y los bienes asociados a ésta. Según el ordenamiento legal peruano, el agua es un recurso natural renovable que

constituye patrimonio de la Nación y es un bien de uso público, cuya administración solo puede ser otorgada y ejercida en armonía con el bien común, la protección ambiental y el interés de la Nación. En consecuencia no hay propiedad privada sobre el agua, correspondiendo al Estado la asignación de derechos patrimoniales a particulares, condicionado a su disponibilidad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de estudio

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el distrito de Ayacucho, ubicado políticamente en la provincia de Huamanga. Teniendo como centros de investigación el Laboratorio de Biodiversidad y Sistemas de Información Geográfica de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) ,de la Universidad Nacional de san Cristóbal de Huamanga (UNSCH).

Geográficamente la ubicación del lugar donde se desarrolló el trabajo de investigación es la siguiente (sistema de coordenadas proyectada Universal Transversal de Mercator, UTM):

Longitud (m) : 634788,67
Latitud (m) : 8603575,11
Altitud (m.s.n.m) : 2791

Los especímenes de *Hyalella curvispina* empleadas en el experimento fueron colectadas de la Laguna Punquiccocha, ubicada en el distrito de Anco, provincia La Mar, en la región de Ayacucho, la que geográficamente se halla ubicada de la siguiente manera

Longitud (m) : 639078
Latitud (m) : 8552123
Altitud (m.s.n.m) : 3609

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Diclofenaco comercial (solución inyectable), expedido en la ciudad de Ayacucho.

3.2.2. Muestra

50 ml del producto comercial diclofenaco.

3.2.3. Unidad experimental

Recipientes de plásticos de 1 litro de capacidad conteniendo 0,5 L agua con 10 unidades de *Hyalella curvispina*.

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Obtención de *Hyaella curvispina*

Los especímenes de *Hyaella curvispina*, se obtuvieron de la laguna Punquiccocha ubicada en el distrito de Anco, provincia de La Mar a unos 3600 m.s.n.m; empleándose para su captura y colección una red tipo D-net modificada, la cual fue arrastrada por la zona litoral de dicho ecosistema. Una vez realizada la colección, ésta fue colocada en una bandeja con la finalidad de eliminar el material indeseable, como restos vegetales, piedras, barro, para luego ser colocado en un balde plástico los individuos de la especie que mostraron mayor actividad natatoria, lo que posteriormente trasladados a los laboratorios de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, para dicho proceso se colocó agua en el balde hasta el 50% de su capacidad y el que posteriormente fue cerrado de manera hermética, siendo examinado periódicamente durante las 4 horas que duró el viaje con la finalidad de verificar el buen estado de los anfípodos.

3.3.2. Aclimatación de *Hyaella curvispina*

Los especímenes capturados de *Hyaella curvispina* fueron llevados al Laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica de la Facultad de Ciencias Biológicas, donde fueron aclimatados a las condiciones ambientales reinantes en el lugar por un tiempo de aproximadamente de 7 días antes de iniciar el experimento, para el cual fueron estabulados en tres baldes de 20 litros de capacidad, con una profundidad de 10 ± 2 cm, al cual se colocó un sistema de aireación consistente en mangueras de silicona terminadas en piedras difusoras conectadas a una bomba de aire. En este periodo de tiempo, en forma diaria se realizó recambios con agua potable declorada y la alimentación fue en base alimento balanceado para peces (trucha), el cual se suspendió a las 24 horas antes de efectuarse los bioensayos.

3.3.3. Adecuación del área de experimentación

El área de experimentación sobre el cual se establecieron las unidades experimentales estuvo constituida por una mesa de aproximadamente 2 metros de largo y 0,70 metros de ancho. El experimento se llevó a cabo en condiciones ambientales donde no hubo incidencia directa de rayos solares y donde la temperatura promedio del agua de las unidades experimentales fue de $16\pm 1.5^{\circ}\text{C}$, lugar donde se minimizó el tránsito de personas.

3.3.4. Ejecución de pruebas piloto

Al realizar la pruebas de toxicidad con las concentraciones mencionadas en los objetivos del proyecto, se halló que causaron mortalidades del 100% en menos de 24 horas en casi todas las unidades experimentales, por lo que posteriormente fue necesario realizar pruebas pilotos con la finalidad de identificar el rango de las concentraciones que causen mortalidades menores a 100%, para el cual se realizaron cuatro pruebas piloto, en la que paulatinamente se fue disminuyendo la concentración del diclofenaco a la mitad, para finalmente identificar las concentraciones de 0,125; 0,25; 0,50 y 1,0 mg/L, como las más adecuadas y a partir de las mortalidades generadas en *Hyaella curvispina* calcular la concentración letal media (CL₅₀).

3.3.5. Preparación de las unidades experimentales

Para la realización de los bioensayos de toxicidad se empleó 20 unidades experimentales constituida por recipientes de plástico de 1 litro de capacidad, en los cuales se colocó 1 litro ml de agua con la respectiva concentración del antiinflamatorio y 10 especímenes de *Hyaella curvispina* (número recomendado para estudios de toxicidad en la que se emplea como modelos a organismos como insectos, anfibios y peces). Los organismos colocados en los recipientes fueron seleccionados aleatoriamente del recipiente en los que fueron aclimatados, así mismo la disposición de las unidades experimentales en el área de experimentación fue determinada de la misma manera.

3.3.6. Determinación de la toxicidad

Los especímenes de *Hyaella curvispina* empleado en el bioensayo fueron mantenidas en ayunas con una anticipación de 24 horas antes de inicio del experimento. Se colocó 10 unidades de *Hyaella curvispina* por unidad experimental de acuerdo a las recomendaciones que se da cuando se hace estudios de toxicidad²², estos organismos fueron seleccionados aleatoriamente de los recipientes de aclimatación, siendo capturados mediante una pipeta plástica y trasladados a un vaso descartable con agua hasta completar las 10 unidades, para posteriormente ser aisladas mediante una tela tul y colocadas inmediatamente en los recipientes de experimentación. La determinación de la mortalidad se realizó a las 24 y 48 horas, luego de iniciado el experimento, para el cual se observó cuidadosamente una a una las unidades experimentales, considerándose como muertos a aquellos que no presentaron ningún movimiento al ser tocados por una palito de brocheta, lo que fueron aislados

inmediatamente. Para calcular la concentración letal media (CL₅₀) se hizo por el método Probit con la ayuda del paquete estadístico MINITAB 16, dicho método es un tipo particular de regresión lineal que tiene como objetivo conocer la relación que existe entre una variable independiente (CL₅₀) y una variable dependiente (mortalidad) para una especie y una exposición determinada en la que se procesa datos basados en medición dicotómica (muertos y no muertos). Para ello la respuesta de los organismos (mortalidad acumulada) se transformó a unidades Probit (eje Y) la concentración del tóxico se transformó logarítmicamente (eje X). El resultado es una recta en la cual se pudo interpolar el 50% de la respuesta y conocer que concentración del tóxico causa esa respuesta (CL₅₀).²⁴

3.3.7. Determinación de la calidad de agua

Con la finalidad de determinar la posible variación de las características fisicoquímicas del agua como consecuencia de agregar diclofenaco a las unidades experimentales, se registró en ellas la temperatura, pH, sólidos disueltos totales y conductividad eléctrica al momento de inicio y finalización del experimento, con el equipo multiparamétrico Modelo HI98130 el que posteriormente fue promediado.

3.4. Diseño experimental

El experimento se adecuó a un diseño donde se probó un solo factor (A) representando por las concentraciones del diclofenaco (0,125; 0,25; 0,50 y 1,00 mg/L) sobre la mortalidad acumulada de *Hyalella curvispina* a las 24 y 48 horas de exposición.

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

μ : Es una constante común a todos los niveles (media poblacional)

α_i : Es el efecto producido por el i-ésimo nivel (efecto del tratamiento)

ϵ_i : Error

Lo que se pretendió probar, se expresa en el siguiente sistema de hipótesis:

Para las 24 horas

Ho: En todas las concentraciones probadas la mortalidad acumulada registrada es igual

Hi: Por lo menos en una concentración probada la mortalidad acumulada registrada es diferente

Para las 24 horas

Ho: En todas las concentraciones probadas la mortalidad registrada es igual

Hi: Por lo menos en una concentración probada la mortalidad registrada es diferente

Se tuvo cuatro repeticiones para cada concentración probada, al igual que el blanco.

3.5. Análisis estadístico

Con los datos colectados se construyó una matriz de datos en el software EXCEL, el que posteriormente fue exportado a los softwares estadísticos de SPSS22, MINITAB 16 e InfoStat, a partir de los cuales se obtuvo estadísticos descriptivos de tendencia central y de dispersión los que se presentan en tabla y figuras.

Para determinar las posibles diferencias de mortalidad entre los tratamientos considerados, se utilizó el análisis de varianza no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis), para comparar los efectos de las cuatro concentraciones del diclofenaco y un blanco. La toma de decisión estadística sobre las hipótesis planteadas fue en base a una confianza del 95% ($\alpha=0,05$).

Para calcular la concentración letal media (CL_{50}) se hizo uso del método de análisis Probit con la ayuda del paquete estadístico MINITAB 16.

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Valores promedios de la mortalidad de *Hyalella curvispina* en cuatro concentraciones de diclofenaco de uso veterinario a las 24 y 48 horas de exposición.

Concentración (mg/L)	Nº de muertos acumulados en 24 horas	Nº de muertos acumulados en 48 horas	Muertos acumulados a las 24 horas (%)	Muertos acumulados a las 48 horas (%)
0,000	0,00	0,00	0,00	0,00
0,125	0,25	2,50	2,50	25,00
0,250	2,25	4,75	22,50	47,50
0,500	4,25	6,75	42,50	67,50
1,000	7,00	9,75	70,00	97,50
Total	2,75	4,75	27,50	47,50

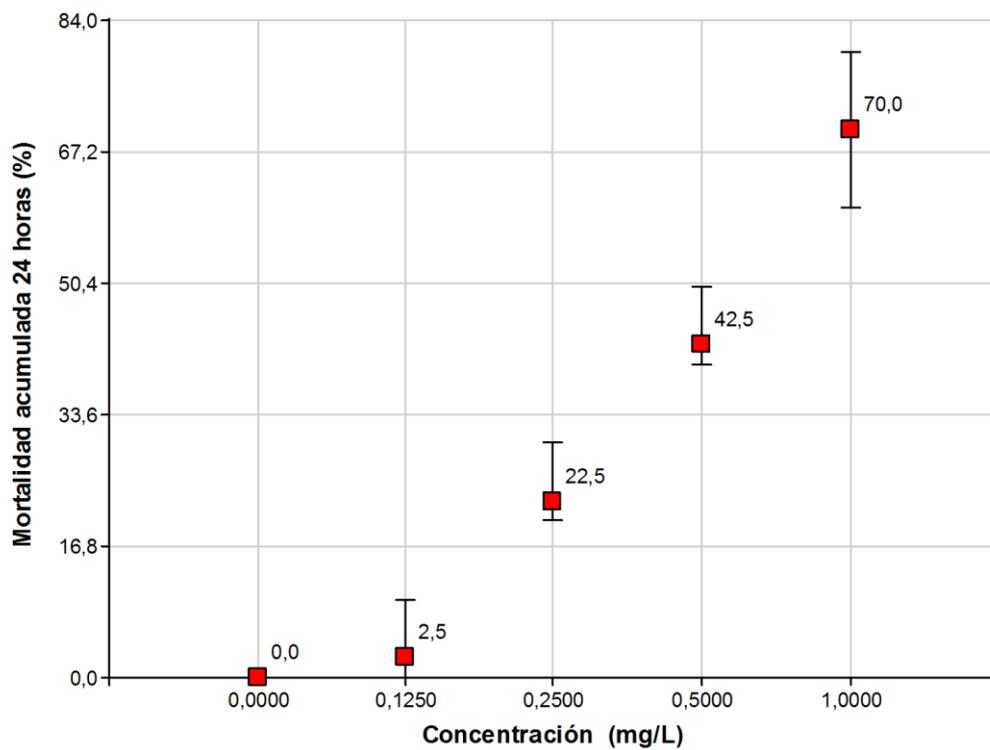


Figura 3. Valores promedios, mínimos y máximos de la mortalidad acumulada de *Hyalella curvispina* en cuatro concentraciones de Diclofenaco de uso veterinario y un testigo a las 24 horas de exposición – Ayacucho 2016.

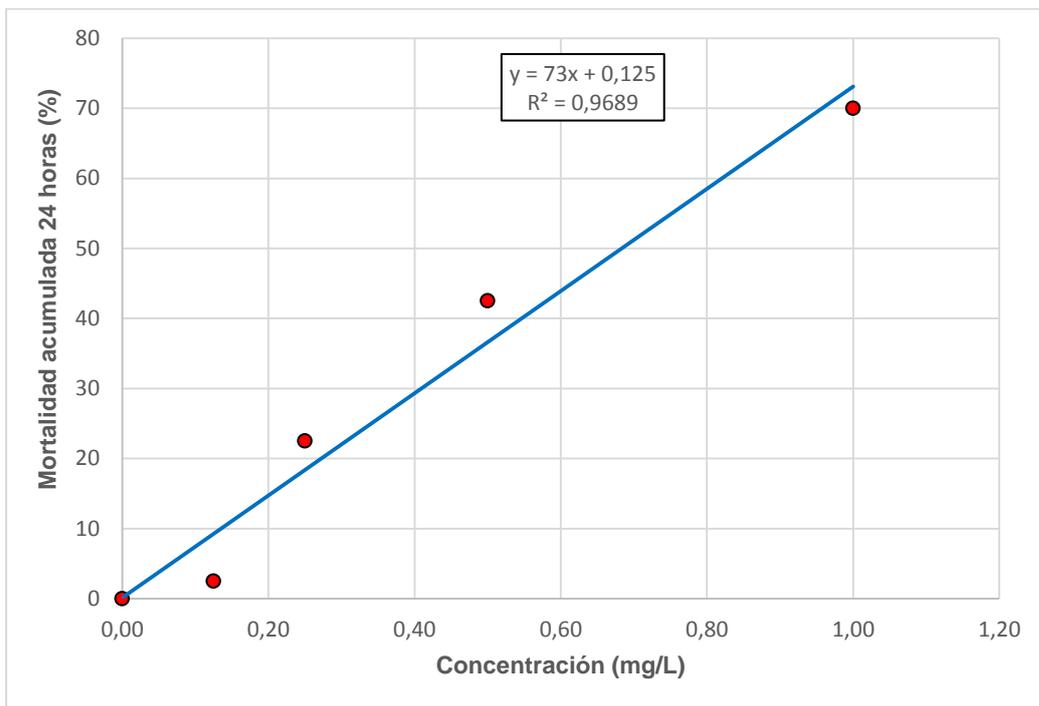


Figura 4. Tendencia con ajuste lineal de la mortalidad acumulada de *Hyalella curvispina* en cuatro concentraciones de Diclofenaco de uso veterinario y un blanco a las 24 horas de exposición – Ayacucho 2016.

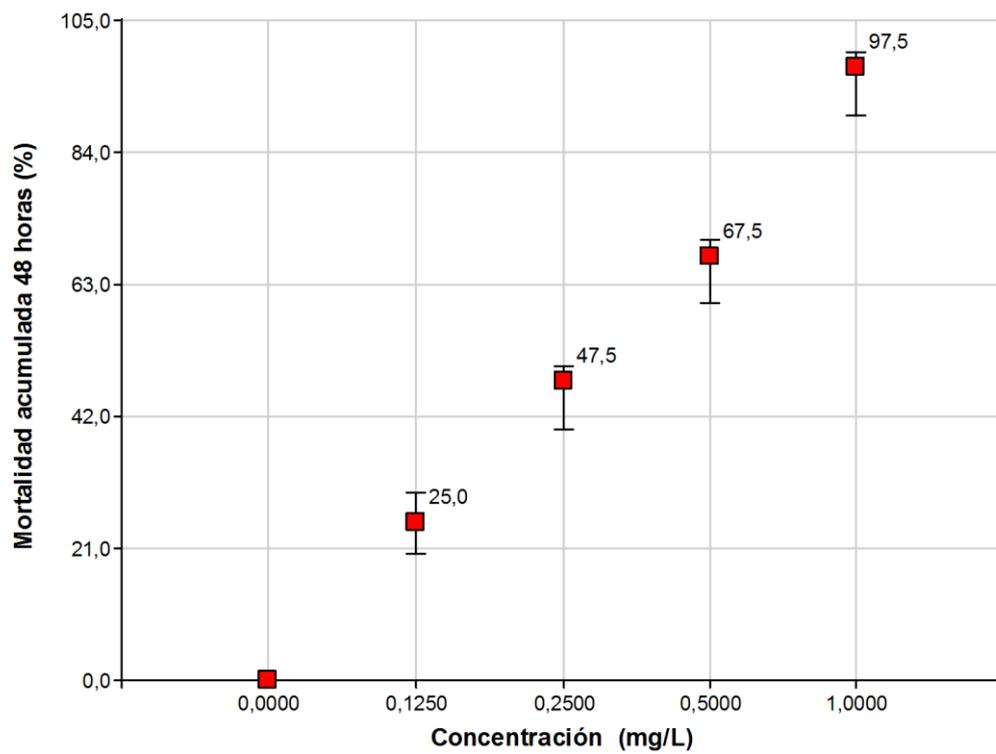


Figura 5. Valores promedio, valores máximos y mínimos de la mortalidad acumulada de *Hyalella curvispina* en cuatro concentraciones de Diclofenaco de uso veterinario y un blanco a las 48 horas de exposición – Ayacucho 2016.

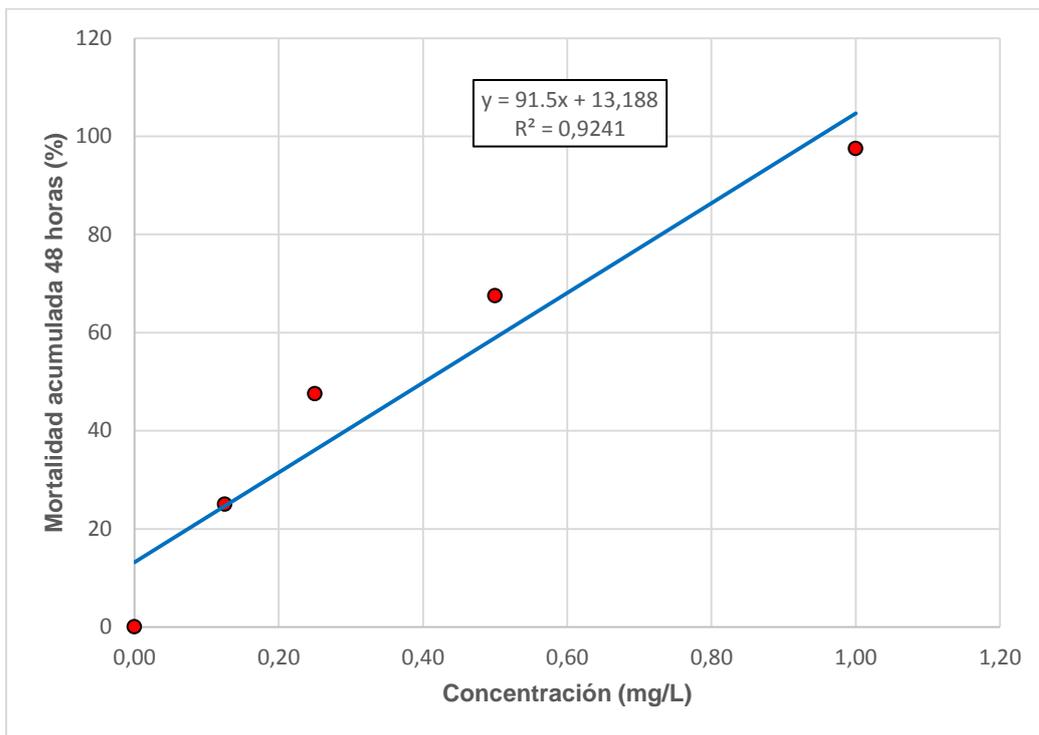


Figura 6. Tendencia con ajuste lineal de la mortalidad acumulada de *Hyalella curvispina* en cuatro concentraciones de Diclofenaco de uso veterinario y un blanco a las 48 horas de exposición – Ayacucho 2016.

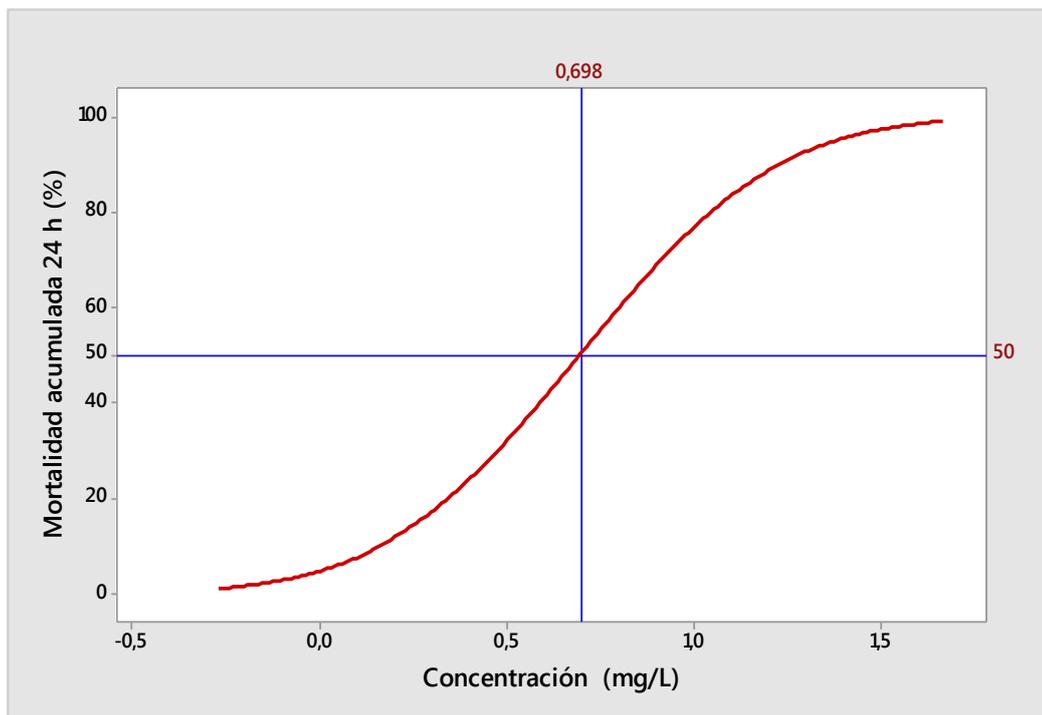


Figura 7. Tendencia de la mortalidad y concentración letal media (CL₅₀) de diclofenaco de uso veterinario calculada mediante Probit sobre *Hyalella curvispina* a las 24 horas de exposición – Ayacucho 2016.

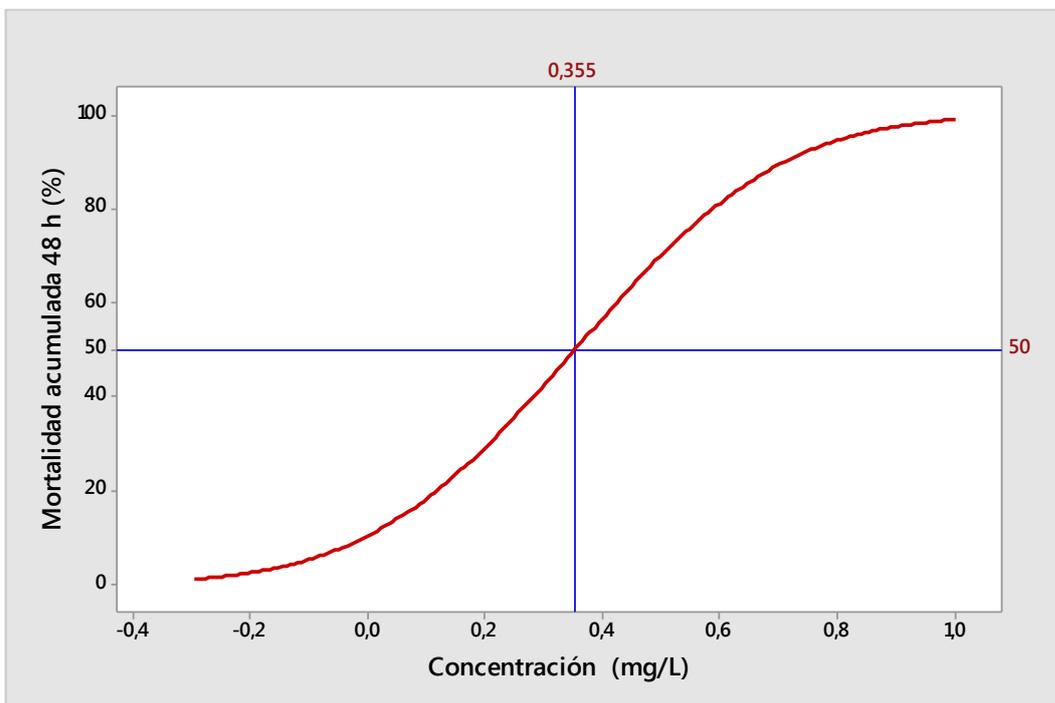


Figura 8. Tendencia de la mortalidad y concentración letal media (CL₅₀) de diclofenaco de uso veterinario calculada mediante Probit sobre *Hyalella curvispina* a las 48 horas de exposición – Ayacucho 2016.

Tabla 2. Valores de la Concentración Letal Media (CL₅₀) y los intervalos de confianza a las 24 y 48 horas de exposición para diclofenaco de uso veterinario sobre *Hyalella curvispina*.

Tiempo de exposición (h)	CL ₅₀ (mg/L)	Intervalo de Confianza (95%)	
		Inferior	Superior
24	0,6981	0,6031	0,8238
48	0,3548	0,2950	0,4248

CL₅₀: Concentración Letal Media

Tabla 3. Valores promedios de cuatro características fisicoquímicas de las unidades de experimentales con cuatro concentraciones de diclofenaco de uso veterinario y un blanco

Características fisicoquímicas	Concentración (mg/L)					Kruskal Wallis (p)
	0	0,125	0,25	0,5	1	
pH	8,0	7,9	7,8	7,7	7,5	0,011
Conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	299,3	310,5	315,3	324,1	386,1	0,009
Sólidos disueltos totales (mg/L)	156,5	159,6	165,0	167,3	198,3	0,009
Salinidad (mg/L)	146,6	155,6	159,3	163,6	197,0	0,009

V. DISCUSIÓN

En la Tabla 1, se muestra los valores promedios de mortalidad absoluta y relativa de *Hyalella curvispina* en cuatro concentraciones de diclofenaco de uso veterinario, a las 24 y 48 horas de exposición, donde la mortalidad acumulada se incrementa a medida que la concentración del diclofenaco se incrementa. Otro aspecto que es importante resaltar es que en forma general se observa que el antiinflamatorio generó una mortalidad promedio general de 59,4%, sin considerar lo registrado en el blanco. El resultado obtenidos se debe al efecto tóxico del diclofenaco sobre los organismos probados, por lo que claramente se puede inferir que estando presente en el ambiente pueden provocar alteraciones ambientales graves, más aún en aquellos en el cual se halla *Hyalella curvispina*. Jimenez³⁶ menciona que el diclofenaco posee una formulación compleja y que sus coayudantes generan productos de transformación, que interactúan con la materia orgánica y bajo las condiciones propias del ecosistema, pueden ser potencialmente más tóxicos, más recalcitrantes e incluso más bioacumulables.

En la Figura 3, se muestra los valores promedios, mínimos y máximos de la mortalidad de *Hyalella curvispina*, en cuatro concentraciones de diclofenaco, más un blanco, a las 24 horas de exposición. Se observa que las mortalidades, expresadas en porcentajes, van desde 2,5% registrado para 0,125 mg/L, hasta 70% para una concentración de 1 mg/L. Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis con la finalidad de comparar los porcentajes de mortalidad registrados en las diferentes concentraciones probadas, se halló significancia estadística (los resultados se muestran en el Anexo 2), por lo que se puede afirmar de la existencia de evidencia que permite afirmar que las mortalidades son diferentes en las concentraciones probadas, razón por el cual se procedió a la jerarquización de las concentraciones (Anexo 2), donde se identifica a las concentraciones de 1 y 0,5 mg/L como los que generaron la mayor mortalidad en los anfípodos en comparación con las otras concentraciones, con un promedio

de 70% y 42,5%; mientras que la menor mortalidad fue detectada en la concentración de 0,125 mg/L con un promedio de 2,5%. También es necesario resaltar que en el blanco no fue registrada mortalidad alguna, por lo que no fue necesario realizar correcciones en los datos colectados. Es de destacar que el efecto toxicológico del fármaco probado sobre los especímenes de *Hyalella curvispina*, muy probablemente se debe a dicho compuesto y sus metabolitos genera estrés oxidativo, con el consecuente incremento del grado de lipoperoxidación y proteínas oxidadas, así como la alteración de la actividad de las enzimas antioxidantes y como consecuencia genera alteraciones en las biomoléculas, generando falla generalizada en el funcionamiento del organismo con la consecuente muerte, tal como lo menciona Valdés.³⁷ Así mismo, Alanís,¹¹ menciona que en estudios realizados en mamíferos, el diclofenaco puede generar daño celular, así como apoptosis, debido a la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno durante su biotransformación.

Al realizar el ajuste a una tendencia lineal de los datos de mortalidad de *Hyalella curvispina* en cuatro concentraciones de Diclofenaco de uso veterinario expresado en porcentaje, la que se observa en la Figura 4, nos muestra que en el rango de concentraciones experimentado, el ajuste tiene un índice de determinación del 0,9689, lo que se interpreta como que la mortalidad registrada en los anfípodos es debido en un 96,89% al incremento de las concentraciones del diclofenaco, considerándose por lo tanto que el ajuste planteado es adecuado, más aun considerando que la prueba de análisis de varianza (Anexo 3) para determinar la significancia del modelo de tendencia lineal es significativo ($p < 0,05$). La pendiente del modelo generado, tiene una pendiente de 73%, interpretándose como que la mortalidad se incrementa en dicho porcentaje, cuando la concentración del diclofenaco se incrementa en una unidad. Los resultados mostrados en la Figura referida nos hace ver que el efecto del diclofenaco sobre la *Hyalella curvispina* son dramático, en la que se eleva rápidamente la mortalidad al incrementarse su concentración; por otro lado, de acuerdo a la clasificación de peligrosidad ambiental y de acuerdo al valor de riesgo de los ingredientes de los insumos de los antiinflamatorios y antibióticos, siendo una de ellas el diclofenaco, está clasificado como peligroso para el ambiente y se considera además como potencialmente bioacumulable.³⁸

En la Figura 5, se muestra los valores promedios, máximos y mínimos de la mortalidad expresada en porcentaje de *Hyalella curvispina* en cuatro

concentraciones de diclofenaco de uso veterinario a las 48 horas de exposición y un blanco, en la que resalta que los valores de la mortalidad se incrementa a medida que la concentración del desinflamante también se incrementa, así se registra un promedio porcentual de mortalidad acumulada de 25% para una concentración de 0,125 mg/L, de 47,5% para 0,25 mg/L, de 67,5% y de 97,5% para concentraciones de 0,5 y de 1 mg/L respectivamente, es decir que dentro de las concentraciones probadas en el presente trabajo de investigación, la mortalidad registrada en los anfípodos se relaciona directamente con la concentración del desinflamante probado. Al realizar la comparación de las mortalidades entre las concentraciones a través de la prueba de Kruskal Wallis, (Anexo 4), se observa que existe diferencia estadística ($p < 0,05$), lo que quiere decir que los porcentajes de mortalidad generados en las concentraciones probadas son diferentes, es por ello que se procedió a realizar su jerarquización, la misma que se muestra en el mismo anexo, resaltando que, en la concentración de 1 mg/L se registró la mayor mortalidad con un promedio de 97,5%, seguida de la concentración de 0,5 mg/L con un 67,5%, mientras que la concentración que causó menor mortalidad fue el de 0,125 mg/L, resaltando que en el blanco no se registró mortalidad alguna. Como ya se mencionó anteriormente, los resultados hallados se debe a la presencia de diclofenaco en las unidades experimentales, observándose que el porcentaje de mortalidad se incrementa a medida que pasa el tiempo, esto debido probablemente a la acumulación del desinflamante en los especímenes empleados como modelos biológicos, ya éste produce mayor daño cuanto mayor tiempo es la exposición.³⁹ Otro aspecto que resalta en los datos de las mortalidades registradas, es que los mayores porcentajes de mortalidad de los especímenes de *Hyalella curvispina*, se registraron dentro de las 24 horas luego de iniciado el experimento, así por ejemplo para la concentración de 0,125 mg/L, a las 24 horas se registró 2,5% de mortalidad, incrementándose a 25% a las 48 horas, es decir que entre las 24 y 48 horas se registró una mortalidad de 22,5%; mientras que para la concentración de 1 mg/L, se registró una mortalidad del 70%, a las 24 horas, para luego incrementarse a 97,5% a las 48 horas, es decir hubo un incremento de 27,5%, este efecto probablemente se debe a que los organismos vivos al estar en contacto permanente con el diclofenaco provoca alteraciones en la fisiología del organismos, siendo uno de los más importantes el daño que causa a las enzimas que protegen las células, lo cual ocasionan que se oxiden las

moléculas que son componentes de las membranas celulares como los lípidos y las proteínas, alterando la integridad de la permeabilidad celular, tal como lo menciona Davila.⁴⁰

En la Figura 6, se muestra una figura de dispersión, con los datos promedios de mortalidad acumulada de *Hyalella curvispina* en función de las concentraciones de diclofenaco probadas, ajustadas a una tendencia lineal. Resalta que dicho ajuste tiene una índice de determinación de 0,9241, lo que se interpreta como que las mortalidades registradas están explicadas en un 92,41% por el incremento de las concentraciones del desinflamante, lo que se podría considerar que es un valor elevado. Al realizar el análisis de varianza con la finalidad de determinar si dicho ajuste es adecuado (Anexo 5), se observa que existe significancia ($p < 0,05$) estadística, por lo que se puede afirmar que el ajuste lineal es adecuado. Por otro lado, también se observa en la Figura en mención que, el ajuste lineal tiene como pendiente el valor de 91,5%, es decir que de acuerdo al modelo propuesto, al incrementarse en una unidad la concentración del diclofenaco, se esperaría el incremento de la mortalidad en dicho porcentaje. Estos resultado concuerda con lo afirmado por Cleuvers⁴ quien mencionan que el diclofenaco es un medicamento ambientalmente dañino para los organismos acuáticos, categorizándolo como un medicamento de alto riesgo. En la Figura 7 y 8 se observa la tendencia de la mortalidad de *Hyalella curvispina*, a las 24 y 48 horas de exposición, determinada mediante el análisis Probit, donde en ambos casos se observa un incremento progresivo de mortalidad a medida que se incrementa las concentraciones del diclofenaco, donde para las menores concentraciones probadas existe una menor mortalidad, para luego incrementarse ostensiblemente de manera exponencial a medida que la concentración del diclofenaco se incrementa, para luego observarse una parte asintótica cuando la mortalidad se acerca al 100%. En las dos figuras citadas, también se muestran los valores de la concentración letal media (CL_{50}) calculada, que viene a ser la concentración del diclofenaco al cual 50% de los especímenes *Hyalella curvispina* sometidos a la acción del medicamento mueren; siendo para el caso de las 24 horas de exposición, un valor de 0,698 mg/L de diclofenaco, mientras que para una exposición de 48 horas (Figura 4) el valor es de 0,355 mg/L.

En la Tabla 2, se muestra los valores de la concentración letal media y sus respectivos intervalos de confianza al 95% de diclofenaco sobre *Hyalella*

curvispina, tanto a las 24 y 48 horas de exposición. Resalta el hecho de que dichos valores disminuyen a mayor tiempo de exposición, es así que a las 24 horas la CL_{50} es de 0,6981 mg/L con intervalos de confianza al 95% de 0,6031 y de 0,8238 mg/L, mientras que para las 48 horas es de 0,3548 mg/L con intervalos de confianza comprendidos entre 0,2950 y de 0,4248 mg/L, Como se puede apreciar, la disminución del valor de la concentración letal media fue de casi el 100%, lo que nos hace hacer ver que la toxicidad medida como mortalidad se incrementa de manera ostensible a medida que existe mayor tiempo de exposición al tóxico.

En la Tabla 3, se muestran los valores promedios de las características fisicoquímicas registradas en las aguas de las unidades experimentales en la que se tiene cuatro concentraciones de diclofenaco más un testigo, en la que se puede resaltar lo siguiente, el pH de las soluciones tienden a disminuir a medida que la concentración de diclofenaco se incrementa, así por ejemplo para una concentración de 0,125 mg/L se tiene un valor promedio de 7,9; mientras que para las concentraciones de 0,25; 0,5 y 1, se registra valores de 7,8; 7,7 y 7,5; al realizar la prueba de Kruskal Wallis se halló significancia estadística ($p < 0,05$), por lo que podemos afirmar que existe diferencia estadística de pH entre las cuatro concentraciones de Diclofenaco incluyendo el blanco (Anexo 8), en la que los menores valores de pH fueron registrados en los medios con mayor concentración del desinflamante. Con respecto a la conductividad eléctrica, sólidos disueltos totales y la salinidad, se observa que sus valores se incrementan a medida que la concentración del diclofenaco se incrementa, así por ejemplo para el caso de la conductividad eléctrica, la concentración de diclofenaco de 0,125 mg/L muestra un valor promedio de 310,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$, mientras que las concentraciones de 0,25, 0,5 y 1 mg/L, valores de conductividad eléctrica de 315,3, 324,1 y 386,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectivamente; la prueba de Kruskal Wallis (Anexo 8), halló significancia estadística ($p < 0,05$), por lo que se puede afirmar que los valores de las características señaladas, son diferentes en las unidades experimentales con concentraciones de diclofenaco diferentes, incrementándose a medida que existe una mayor concentración.

VI. CONCLUSIONES

- a. Las cuatro concentraciones de diclofenaco probadas 0,1250, 0,250, 0,5 y 1 mg/L a las 24 horas generaron mortalidades acumuladas crecientes en *Hyalella curvispina*, desde 2,5 %, en la menor concentración hasta 70% en la máxima; teniendo similar comportamiento las mortalidades a las 48 horas, con 25% y 97,5% a la menor y mayor concentración, respectivamente.
- b. La mortalidad acumulada de *Hyalella curvispina* a las 24 horas de exposición en las cuatro concentraciones de diclofenaco (0, 5, 1, 2 y 4 mg/L) fueron crecientes, con valores promedios que van desde 2,5% a 70%. La misma tendencia se observó a las 48 horas donde la mortalidad acumulada promedio mínima fue de 25% y la máxima de 97,5%.
- c. La concentración letal media (CL₅₀) de diclofenaco probado sobre *Hyalella curvispina* a las 48 horas (0,3548 mg/L) presenta un valor menor a lo registrado a las 24 horas (0,6981).
- d. Las características físicoquímicas de los medios de cultivo de *Hyalella curvispina* en el experimento mostraron diferencias donde el pH disminuye a mayor concentración de diclofenaco, la conductividad eléctrica, los sólidos disueltos y la salinidad tienden a incrementarse.

VII. RECOMENDACIONES

- a. Realizar investigaciones sobre el efecto ecotoxicológico de otros medicamentos que son de uso común y rutinario en animales domésticos, principalmente aquellos que son criados en grandes cantidades y que se hallen confinados en ecosistemas frágiles como los bofedales.
- b. Realizar investigaciones sobre el efecto crónico de productos veterinarios, pesticidas y fertilizantes, en organismos como la *Hyalella curvispina*, ya que por lo general la cantidad de estos contaminantes emergentes en los ecosistemas como ríos, lagunas y bofedales son mínimas.
- c. Realizar estudios sobre el manejo y las prácticas rutinarias que realizan los ganaderos, incidiendo sobre los medicamentos empleados en sus animales y la sobredosis en *Hyalella curvispina*.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jimenez C. Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmaceuticos. Revista Lasallista de Investigación [Internet]. 12 de diciembre de 2011 [citado 26 de marzo de 2016];8(2). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-44492011000200016&script=sci_abstract
2. Becerril Bravo JE. Contaminantes emergentes en el agua [Internet]. Revista Digital Universitaria. 2009 [citado 19 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www.ru.tic.unam.mx:8080/handle/DGTIC/60733>
3. Hernando MD, Mezcuca M, Fernández-Alba AR, Barceló D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*. Abril de 2006;69(2):334-42.
4. Cleuvers M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett*. 15 de mayo de 2006;142(3):185-94.
5. Jiménez Cartagena C. Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmaceuticos. *Rev Lasallista Investig*. julio de 2011;8(2):143-53.
6. Peluso L, Almada P, Abelando M, Ronco A. Evaluación de la toxicidad de sedimentos de los ríos Paraguay-Paraná utilizando *Hyaella curvispina*. En *La Plata Argentina*; 2012.
7. Giusto A, Ferrari L. Copper Toxicity on Juveniles of *Hyaella pseudoazteca* González and Watling, 2003. *Bull Environ Contam Toxicol*. 29 de mayo de 2008;81(2):169-73.
8. Mugni H, Ronco A, Bonetto C. Insecticide toxicity to *Hyaella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicol Environ Saf*. marzo de 2011;74(3):350-4.
9. Valdés A. Evaluación de la toxicidad producida por Diclofenaco sobre *Daphnia magna* [Internet] [Thesis]. [México D.F.]: Instituto Politécnico Nacional, Escuelas Nacional de Ciencias Biológicas; 2011 [citado 13 de abril de 2016]. Disponible en: <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/8067>
10. Rayme Chalco M. Toxicidad de tres farmacos antiinflamatorio no esteroideo (AINEs) sobre estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*. [Ayacucho Perú]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2014.
11. Galar-Martínez M, Gómez-Oliván L, Amaya-Chávez A, Valdés-Alanís A, Oviedo-Gómez D, Razo-Estrada C, et al. Estrés oxidativo producido por diclofenaco adicionado al agua y sedimentos sobre *Daphnia magna* y *Hyallolela azteca*. *Biologist*. 2009;7(1-2).
12. Repetto M. *Toxicología Fundamental*. Ediciones Díaz de Santos; 1997. 430 p.
13. Castillo GC. *Ensayos Toxicológicos Y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas*. IDRC; 2004. 190 p.
14. Moreno MD. *Toxicología ambiental: evaluación de riesgo para la salud humana*. McGraw-Hill; 2003. 370 p.
15. Ramirez AR. *Ecología aplicada: diseño y análisis estadístico*. U. Jorge Tadeo Lozano; 1999. 344 p.
16. Castellano AL, Villagrana V, Moreno L. *Manual de Farmacología: Guía para el uso racional del medicamento*. Barcelona, España: Elsevier España; 2010. 426 p.
17. Fernández PL, Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. 18 a. Edición. Ed. Médica Panamericana; 2010. 1404 p.

18. González C.Á. Guía farmacológica de analgésicos. Madrid: Arán Ediciones; 2006. 272 p.
19. Tiziani A. Havard. Fármacos en enfermería. México: Editorial El Manual Moderno; 2011. 740 p.
20. Capó MA. Principios de Ecotoxicología. Editorial Tebar; 2007. 322 p.
21. Patiño NM. Farmacología medica / Medical Pharmacology. Ed. Médica Panamericana; 2008. 994 p.
22. Hickman C, Roberts L, Keen S, Larson A, l'Anason H, Eisenhour D. Integrated Principles of Zoology. McGraw-Hill; 2008. 932 p.
23. Domínguez E, Fernandez H. Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos: sistemática y biología. Fundación Miguel Lillo; 2009. 654 p.
24. Serejo CS. Cladistic revision of talitroidean amphipods (Crustacea, Gammaridea), with a proposal of a new classification. Zool Scr. 1 de noviembre de 2004;33(6):551-86.
25. Chen J, Guô C. Ecosystem Ecology Research Trends. Nova Publishers; 2008. 380 p.
26. Bouvier M. Respuestas comportamentales de *Hyaella curvispina* Shoemaker, 1942 (Crustacea, Amphipoda) como herramientas para la detección de toxicidad de sedimentos [Internet]. Universidad de la República de Uruguay, Facultad de Ciencias; 2013 [citado 1 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=FCT.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=002645>
27. Roldan G, Ramírez JJR. Fundamentos de limnología neotropical. Universidad de Antioquia; 2008. 464 p.
28. Lampert W, Sommer U. Limnoecology: The Ecology of Lakes and Streams. OUP Oxford; 2007. 336 p.
29. Odum EP, Barrett GW. Fundamentos de Ecología. Cengage Learning Latin America; 2006. 614 p.
30. Molles MC. Ecología: conceptos y aplicaciones. McGraw-Hill Interamericana de España S.L.; 2006. 704 p.
31. Margalef R. Limnología. Ediciones Omega; 1983. 1036 p.
32. Wetze R, Comellas M. Limnología [Internet]. Editorial Omega; 1981 [citado 11 de noviembre de 2013]. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=52175>
33. Marqués RS, Moreto FV. El agua en el medio ambiente: muestreo y análisis. Plaza y Valdes; 2003. 220 p.
34. Länge R, Dietrich D. Evaluación del riesgo ambiental de las sustancias-conceptuales de drogas farmacéuticas consideraciones. Toxicol Lett. 10 de mayo de 2002;131(1-2):97-104.
35. García Galán MJ. Estudio de la presencia y comportamiento de las sulfamidas en el medio ambiente. [Tesis Doctoral]. [Barcelona, España]: Universitat de Barcelona; 2013.
36. Jiménez Cartagena C. Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmaceuticos. Rev Lasallista Investig. 2012;8(2).
37. Valdes Alanis A. Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco sobre *Daphnia magna*. [Internet] [Tesis]. 2011 [citado 4 de septiembre de 2014]. Disponible en: <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/8067>
38. Escher BI, Pronk W, Suter MJ-F, Maurer M. Monitoring the Removal Efficiency of Pharmaceuticals and Hormones in Different Treatment Processes of Source-Separated Urine with Bioassays. Environ Sci Technol. Agosto de 2006;40(16):5095-101.

39. Carlsson C, Johansson A-K, Alvan G, Bergman K, Kühler T. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants?: Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci Total Environ.* 1 de julio de 2006;364(1–3):67-87.
40. Dávila R. Fármacos antiinflamatorios provocan efectos tóxicos en organismos acuáticos. [Internet]. *JOURNALMEX Periodistas de México.* [citado 15 de abril de 2015]. Disponible en: <https://journalmex.wordpress.com/2010/06/11/farmacos-antiinflamatorios-provocan-efectos-toxicos-en-organismos-acuaticos/>

ANEXOS

Anexo 1

Prueba de *Shapiro Wilks* para determinar el tipo de distribución de los porcentajes de mortalidad acumulada de *Hyalella curvispina*

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Mortalidad acumulada 24 horas	20	27,5	27,31	0,83	0,0037
Mortalidad acumulada 48 horas	20	47,5	34,77	0,88	0,04

Anexo 2

Prueba de *Kruskal-Wallis* para comparar la mortalidad de *Hyaella curvispina* en cuatro concentraciones creciente de Diclofenaco de uso veterinario y un testigo a las 24 horas de exposición.

Variable	Concentración (mg/L)	N	Medias	H	p
Mortalidad acumulada 24 horas	0	4	0	17,43	0,0011
Mortalidad acumulada 24 horas	0,125	4	2,5		
Mortalidad acumulada 24 horas	0,25	4	22,5		
Mortalidad acumulada 24 horas	0,5	4	42,5		
Mortalidad acumulada 24 horas	1	4	70		

Trat.	Ranks		
0,000	4	A	
0,125	5	A	
0,250	10,5	A	B
0,500	14,5		B
1,000	18,5		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 3

Coefficientes de regresión y análisis de varianza para el ajuste lineal de la mortalidad de *Hyalella curvispina* en cuatro concentraciones creciente de Diclofenaco de uso veterinario y un blanco a las 24 horas de exposición.

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor
const	0,13	2,24	-4,59	4,84	0,06	0,9562
Concentración (mg/L)	73	4,35	63,86	82,14	16,77	<0,0001

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	13322,5	1	13322,5	281,3	<0,0001
Concentración (mg/L)	13322,5	1	13322,5	281,3	<0,0001
Error	852,5	18	47,36		
Total	14175	19			

Anexo 4

Prueba de Kruskal-Wallis para comprar la mortalidad de *Hyalella curvispina* en cuatro concentraciones creciente de Diclofenaco de uso veterinario y un blanco a las 48 horas de exposición.

Variable	Concentración (mg/L)	N	Medias	H	p
Mortalidad acumulada 48 horas	0	4	0	18,29	0,0009
Mortalidad acumulada 48 horas	0,125	4	25		
Mortalidad acumulada 48 horas	0,25	4	47,5		
Mortalidad acumulada 48 horas	0,5	4	67,5		
Mortalidad acumulada 48 horas	1	4	97,5		

Trat.	Ranks			
0,000	2,5	A		
0,125	6,5	A	B	
0,250	10,5	A	B	C
0,500	14,5		B	C
1,000	18,5			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 5

Coefficientes de regresión y análisis de varianza para el ajuste lineal de la mortalidad de *Hyalella curvispina* en cuatro concentraciones creciente de Diclofenaco de uso veterinario y un blanco a las 48 horas de exposición.

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor
const	13,19	3,47	5,89	20,49	3,8	0,0013
Concentración (mg/L)	91,5	6,74	77,34	105,66	13,58	<0,0001

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20930,63	1	20930,63	184,29	<0,0001
Concentración (mg/L)	20930,63	1	20930,63	184,29	<0,0001
Error	2044,38	18	113,58		
Total	22975	19			

Anexo 6

Percentiles (concentración letal en mg/L) de Diclofenaco de uso veterinario sobre *Hyalella curvispina* a las 24 horas de exposición.

Porcentaje	Percentiles	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
1	-0,269258	0,109369	-0,551614	-0,0948482
2	-0,1559	0,0960	-0,4018	-0,0017
3	-0,0840	0,0878	-0,3073	0,0580
4	-0,0299	0,0818	-0,2366	0,1032
5	0,0141	0,0770	-0,1794	0,1403
6	0,0516	0,0731	-0,1309	0,1721
7	0,0844	0,0698	-0,0886	0,2002
8	0,1138	0,0669	-0,0510	0,2256
9	0,1406	0,0644	-0,0169	0,2489
10	0,1652	0,0621	0,0143	0,2705
20	0,3481	0,0491	0,2383	0,4386
30	0,4800	0,0458	0,3869	0,5727
40	0,5927	0,0480	0,5028	0,6983
50	0,6981	0,0539	0,6031	0,8238
60	0,8034	0,0623	0,6979	0,9549
70	0,9161	0,0732	0,7954	1,0989
80	1,0480	0,0875	0,9065	1,2706
90	1,2310	0,1088	1,0574	1,5118
91	1,2556	0,1117	1,0776	1,5444
92	1,2823	0,1150	1,0994	1,5799
93	1,3117	0,1185	1,1234	1,6189
94	1,3446	0,1226	1,1501	1,6626
95	1,3820	0,1272	1,1806	1,7124
96	1,4260	0,1326	1,2163	1,7711
97	1,4801	0,1393	1,2601	1,8432
98	1,5521	0,1483	1,3182	1,9393
99	1,6654	0,1626	1,4095	2,0909

Anexo 7

Percentiles (concentración letal en mg/L) de Diclofenaco de uso veterinario sobre *Hyalella curvispina* a las 24 horas de exposición.

Porcentaje	Percentiles	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
1	-0,293446	0,0832692	-0,51078	-0,16181
2	-0,2175	0,0739	-0,4093	-0,1001
3	-0,1693	0,0681	-0,3452	-0,0607
4	-0,1330	0,0638	-0,2972	-0,0309
5	-0,1036	0,0603	-0,2582	-0,0065
6	-0,0785	0,0574	-0,2251	0,0143
7	-0,0565	0,0550	-0,1962	0,0327
8	-0,0367	0,0528	-0,1704	0,0492
9	-0,0188	0,0508	-0,1470	0,0643
10	-0,0023	0,0491	-0,1256	0,0783
20	0,1203	0,0376	0,0307	0,1854
30	0,2086	0,0321	0,1375	0,2685
40	0,2842	0,0304	0,2223	0,3460
50	0,3548	0,0319	0,2950	0,4248
60	0,4253	0,0358	0,3623	0,5092
70	0,5009	0,0420	0,4301	0,6037
80	0,5893	0,0509	0,5060	0,7176
90	0,7118	0,0648	0,6081	0,8788
91	0,7283	0,0668	0,6217	0,9007
92	0,7463	0,0689	0,6364	0,9245
93	0,7660	0,0713	0,6525	0,9507
94	0,7880	0,0740	0,6704	0,9800
95	0,8131	0,0770	0,6909	1,0135
96	0,8426	0,0807	0,7149	1,0529
97	0,8788	0,0852	0,7442	1,1014
98	0,9270	0,0913	0,7832	1,1659
99	1,0030	0,1009	0,8444	1,2679

Anexo 8.

Prueba de Kruskal Wallis para comparar las características fisicoquímicas de las aguas contenidas en las unidades experimentales con crecientes concentraciones de Diclofenaco y un blanco.

Características fisicoquímicas	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintótica
pH	13,148	4	0,011
Conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	13,5	4	0,009
Sólidos Disueltos Totales (mg/L)	13,5	4	0,009
Salinidad (mg/L)	13,5	4	0,009

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Concentración (mg/L)

Anexo 9.

Preparación de los medios para realizar pruebas piloto para la obtención de las concentraciones específicas que causaran la mortalidad.



Anexo 10.

Disposición y preparación de los recipientes con la solución del Diclofenaco.



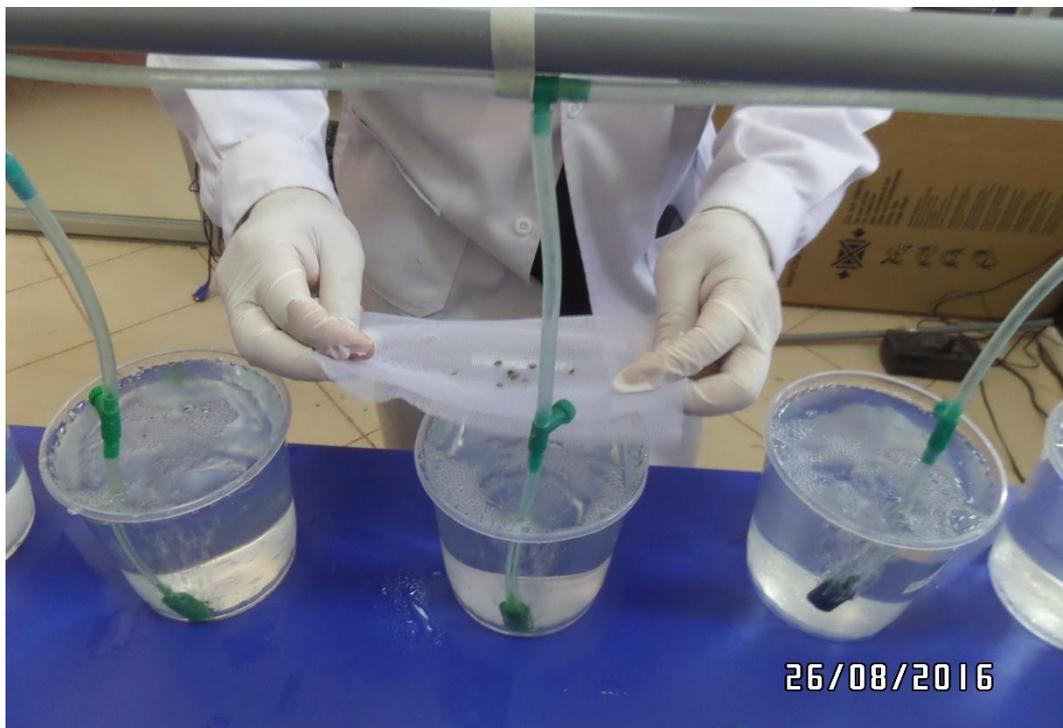
Anexo 11

Separación de los organismos de *Hyaella curvispina* para cada en base con la solución respectiva.



Anexo 12.

Preparación de las unidades experimentales, constituidas en un recipiente con la respectiva concentración y los especímenes de *Hyaella curvispina*.



Anexo 13.

Vista panorámica de las unidades experimentales con la diferentes concentraciones del Diclofenaco incluidas las *Hyalella curvispina*



Anexo 14.

Presentación comercial de diclofenaco de uso veterinario.



Anexo 14.

Matriz de consistencia

TÍTULO: Ecotoxicidad del diclofenaco de uso veterinario en *Hyaella curvispina* (Amphypoda).

AUTOR: ESCRIBA ESCALANTE, Hernán

ASESOR: CARRASCO BADAJOZ, Carlos Emilio

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>PROBLEMA PRINCIPAL ¿Cuál es el efecto ecotoxicológico del diclofenaco de uso veterinario sobre <i>Hyaella curvispina</i>?</p>	<p>GENERAL Evaluar el efecto ecotoxicológico del diclofenaco en alevinos de <i>Hyaella curvispina</i></p> <p>ESPECÍFICOS</p> <ol style="list-style-type: none"> Determinar el efecto de cuatro concentraciones de diclofenaco sobre la mortalidad de alevinos de <i>Hyaella curvispina</i>. Determinar el efecto de cuatro concentraciones de diclofenaco a las 24 y 48 horas de exposición sobre la mortalidad de <i>Hyaella curvispina</i> Cuantificar la concentración letal media (CL50) del diclofenaco a las 24 y 48 horas de exposición determinado <i>Hyaella curvispina</i> Determinar la variaciones de las características de pH, conductividad eléctrica, sólidos disueltos causados por la adición de diclofenaco al medio de cultivo 	<p>Diclofenaco</p> <p>Características generales</p> <p>Efectos adversos en humanos</p> <p>Efectos tóxicos en otras especies</p> <p>Los ecosistemas acuáticos</p> <p>Contaminación de los ecosistemas acuáticos</p> <p>Toxicidad en ecosistemas acuáticos</p>	<p>A mayor concentración y tiempo de exposición del diclofenaco, mayor es el efecto ecotoxicológico sobre alevinos de <i>Hyaella curvispina</i></p>	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE</p> <ol style="list-style-type: none"> Concentraciones de diclofenaco de uso veterinario <p>Indicador:</p> <p>Cuatro concentraciones crecientes de diclofenaco</p> <ol style="list-style-type: none"> Tiempo de exposición al diclofenaco <p>Indicador: 12, 24 y 48 horas</p> <p>VARIABLE DEPENDIENTE</p> <ol style="list-style-type: none"> Ecotoxicidad <p>Indicador: Mortalidad (nº de individuos de <i>Hyaella curvispina</i> muertos)</p> <p>Porcentaje de mortalidad de <i>Hyaella curvispina</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Concentración letal media (CL₅₀) a las 12, 24 y 48 horas <p>Indicador:</p> <p>Concentración del diclofenaco (mg/L) que causa el 50% de mortalidad de la población expuesta</p>	<p>TIPO DE INVESTIGACIÓN Básica</p> <p>NIVEL DE INVESTIGACIÓN: Experimental</p> <p>DISEÑO: Experimental</p> <p>MUESTRO: Aleatorio</p> <p>TÉCNICAS: Observación Determinación</p> <p>INSTRUMENTOS: Observación</p>