

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA**



**Toxicidad de tres fármacos antiinflamatorios no
esteroideos (AINEs) sobre estados inmaduros de
Rhinella spinulosa. Ayacucho 2014.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA**

PRESENTADO POR:

Bach. RAYME CHALCO, Marisol

AYACUCHO – PERÚ

2015


Acta de Sustentación de Tesis
R.D.N° 043 – FC de la S- UNSCH-2015
Bach. Marisol RAYME CHALCO

En la ciudad de Ayacucho, siendo las 4:10; de la tarde del día once de agosto del dos mil quince en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, con la asistencia de los docente Dr. Edwin Carlos Enciso Roca (Miembro y presidente encargado con memorándum N° 075 - FC - de la S. UNSCH 2015), Mg. Martin Tenorio Bautista (Asesor) Y el MgQE. Enrique Javier Aguilar Felices (cuarto Jurado) y la Mg QF. Nancy Victoria Castilla Torres, (Secretaria docente), para recepcionar la exposición de la tesis titulada "Toxicidad de tres fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) sobre estados inmaduros *Rhinella spinulosa*. Ayacucho 2014, presentado por la bachiller en Farmacia y Bioquímica. Marisol Rayme Chalco, quien pretende obtener el título profesional de Farmacia y Bioquímica, en la Facultad de Ciencias de la Salud. El Presidente (e) Dr. Edwin Carlos Enciso Roca inicia el acto de sustentación solicitando a la secretaria en cargada Nancy Castilla Torres que da lectura a la Resolución Decanal N° 043-FC – de la S – UNSCH – 2015. de fecha 03 de agosto del 2015, para luego solicitar a la sustentante que inicie la exposición de su trabajo de investigación en el tiempo correspondiente.

En la segunda etapa los docentes miembros del jurado realizaron las observaciones, aclaraciones y preguntas pertinentes, para la evaluación de la bachiller sustentante; concluida esta etapa, el presidente (e) solicita a la sustentante y al público en general. Para que momentáneamente abandone el auditorio, dejando al jurado para que deliveren y procedan a calificar según el siguiente detalle.

Miembros de Jurado	Exposición	Rpta a Preg.	Promedio
Dr. Edwin C. Enciso Roca	17	16	17
Mg. Martin Tenorio Bautista	18	18	18
Mg. Enrique Javier Aguilar Felices	17	15	16
	Promedio Total		17

De la evaluación realizada la sustentante obtiene la nota de diecisiete (17). Luego de solicitar el ingreso de la sustentante y el público, el presidente (e) comunica la evaluación del jurado y procede a juramentar a la sustentante como una nueva Químico Farmacéutica. Siendo las cinco y cincuenta, se culmina con el acto de sustentación y para dar fe de lo actuado, los miembros del jurado estampan su firma al pie del acta en señal de conformidad.



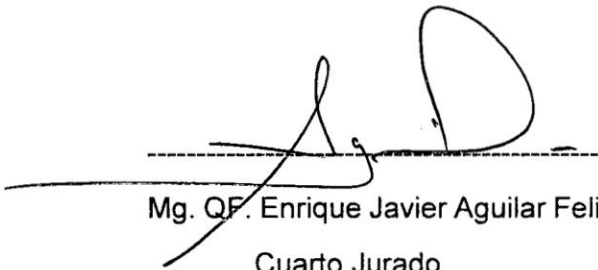
Dr. Edwin Carlos Enciso Roca

Miembro - Presidente



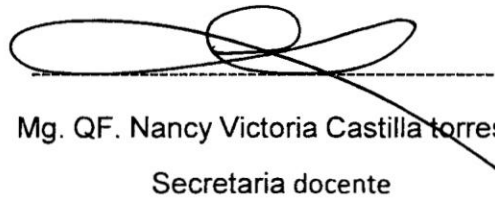
Mg. Martin Tenorio Bautista

Asesor



Mg. QF. Enrique Javier Aguilar Felices

Cuarto Jurado



Mg. QF. Nancy Victoria Castilla Torres

Secretaria docente

A mis padres y hermanos, a mi hijo
y a todos aquellos que participaron
directa o indirectamente en la
elaboración de esta tesis. ¡Gracias
a ustedes!

AGRADECIMIENTO

Mi sincero agradecimiento a mi *Alma Mater* "Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga" por ampliar mi visión y conocimiento.

En especial a la Facultad de Ciencias Biológicas y a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica y a su plana docente, por sus valiosas enseñanzas durante mi formación profesional.

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, Mg. Saturnino Martín Tenorio Bautista por su orientación académica y contribución, que han permitido la elaboración y finalización del presente trabajo de tesis.

Al Dr. Carlos Carrasco Badajoz, por haberme brindado todas las facilidades del laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica, para realizar la parte experimental.

A todas aquellas personas que con su apoyo contribuyeron en la elaboración 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	7
2.2.1. Fármacos	7
2.2.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	7
2.2.4. Porcentaje de mortalidad	7
2.2.5. Concentración Letal Media (CL ₅₀)	7
2.2.6. <i>Rhinella spinulosa</i>	8
2.2.7. Estado inmaduro de <i>Rhinella spinulosa</i>	8
2.3. Bases teóricas	8
2.3.1. El agua	8
2.3.2. Productos farmacéuticos en el agua	8
2.3.3. Contaminación del agua por productos farmacéuticos	9
2.3.4. Comportamiento de los fármacos	10
2.3.5. Metabolismo de fármacos	10
2.3.6. Propiedades fisicoquímicas de los fármacos y su distribución en el ambiente	11
2.3.7. Efectos de los productos farmacéuticos sobre la biota	11
2.3.8. Efectos tóxicos de los fármacos en el ambiente	12
2.3.9. Toxicidad	12
2.3.10. Dosis letal media (DL ₅₀) y concentración letal media (CL ₅₀)	13
2.3.11. Antiinflamatorios	13
2.3.12. Ibuprofeno	14
2.3.13. Naproxeno	17
2.3.14. Diclofenaco	19
2.3.15. Orden anura: familia Bufonidae	21
2.4. Marco legal	22
2.4.1. Legislación y valoración del riesgo ambiental de los fármacos	22

2.4.2.	Legislación de protección del agua en el Perú	23
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1.	Ubicación de la zona de estudio	25
3.1.1.	Ubicación política	25
3.1.2.	Ubicación geográfica	25
3.2.	Población y muestra	25
3.2.1.	Población	25
3.2.2.	Muestra	25
3.2.3.	Unidad experimental	26
3.2.4.	Sistema de muestreo	26
3.3.	Metodología y recolección de datos	26
3.3.1.	Obtención de los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> .	26
3.3.2.	Preparación de las soluciones de fármacos comerciales (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco)	27
3.3.3.	Preparación de las unidades experimentales	27
3.4.	Tipo de investigación	28
3.5.	Análisis estadístico	29
IV.	RESULTADOS	31
V.	DISCUSIÓN	45
VI.	CONCLUSIONES	53
VII.	RECOMENDACIONES	55
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
	ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Principales ácidos del grupo de AINEs.	14
Tabla 2. Principales no ácidos del grupo de AINEs	14
Tabla 3. Principales Inhibidores de la COX-2 del grupo de AINEs.	14
Tabla 4. Disposición de los envases con diferentes concentraciones de fármacos.	27
Tabla 5. Distribución de las unidades experimentales según la concentración de los fármacos.	28
Tabla 6. Valores de la Concentración Letal Media (CL ₅₀) y los intervalos de confianza a las 24 y 48 horas de exposición para los fármacos ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco. Ayacucho, 2014.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Trayecto de los productos farmacéuticos hacia el ambiente.	9
Figura 2. Estructura química del ibuprofeno.	14
Figura 3. Esquema básico de inhibición de la síntesis de prostaglandinas por los AINEs.	16
Figura 4. Estructura química de naproxeno.	17
Figura 5. Estructura química del diclofenaco.	19
Figura 6. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco ibuprofeno. Ayacucho, 2014.	31
Figura 7. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco ibuprofeno. Ayacucho, 2014.	32
Figura 8. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco naproxeno. Ayacucho, 2014.	33
Figura 9. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco naproxeno. Ayacucho, 2014.	34
Figura 10. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco diclofenaco. Ayacucho, 2014.	35
Figura 11. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco diclofenaco. Ayacucho, 2014.	36
Figura 12. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> en función de las concentraciones del fármaco ibuprofeno y el valor de la	37

concentración letal media (CL_{50}) a las 24 horas de exposición. Ayacucho, 2014.

- Figura 13. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco ibuprofeno y el valor de la concentración letal media (CL_{50}) a las 48 horas de exposición. Ayacucho, 2014. 38
- Figura 14. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco naproxeno y el valor de la concentración letal media (CL_{50}) a las 24 horas de exposición. Ayacucho, 2014. 39
- Figura 15. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco naproxeno y el valor de la concentración letal media (CL_{50}) a las 48 horas de exposición. Ayacucho, 2014. 40
- Figura 16. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco diclofenaco y el valor de la concentración letal media (CL_{50}) a las 24 horas de exposición. Ayacucho, 2014. 41
- Figura 17. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco diclofenaco y el valor de la concentración letal media (CL_{50}) a las 48 horas de exposición. Ayacucho, 2014. 42

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> sometidos a cuatro concentraciones crecientes del fármaco ibuprofeno registrados a las 24 horas de exposición.	63
Anexo 2. Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> sometidos a cuatro concentraciones crecientes del fármaco ibuprofeno registrados a las 48 horas de exposición.	64
Anexo 3. Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> sometidos a cuatro concentraciones crecientes del fármaco naproxeno registrados a las 24 horas de exposición.	65
Anexo 4. Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> sometidos a cuatro concentraciones crecientes del fármaco naproxeno registrados a las 48 horas de exposición.	66
Anexo 5. Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> sometidos a cuatro concentraciones crecientes del fármaco diclofenaco registrados a las 24 horas de exposición.	67
Anexo 6. Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> sometidos a cuatro concentraciones crecientes del fármaco diclofenaco registrados a las 48 horas de exposición.	68
Anexo 7. Percentiles (concentración letal media en mg/L) de fármaco ibuprofeno sometidas a las 24 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.	69

Anexo 8. Percentiles (concentración letal media en mg/L) de fármaco ibuprofeno sometidas a las 48 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.	70
Anexo 9. Percentiles (concentración letal media en mg/L) de fármaco naproxeno sometidas a las 24 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.	71
Anexo 10. Percentiles (concentración letal media en mg/L) de fármaco naproxeno sometidas a las 48 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.	72
Anexo 11. Percentiles (concentración letal media en mg/L) de fármaco diclofenaco sometidas a las 24 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.	73
Anexo 12. Percentiles (concentración letal media en mg/L) de fármaco diclofenaco sometidas a las 48 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.	74
Anexo 13. Bandejas con estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> listas para el experimento.	75
Anexo 14. Realizando la medida del tamaño de los estadios inmaduros <i>Rhinella spinulosa</i> utilizados para el experimento.	76
Anexo 15. Disposición y preparación de los recipientes con soluciones de los fármacos ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco.	77
Anexo 16. Separando los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> para cada envase con la solución respectiva del medicamento.	78
Anexo 17. Matriz de Consistencia.	79

RESUMEN

El agua es un líquido vital para la existencia de todos los organismos vivos. Sin embargo este recurso se encuentra amenazado por el rápido crecimiento de la población y la contaminación. La toxicidad producida por contaminantes como metales pesados, hidrocarburos y plaguicidas en ambientes acuáticos han sido ampliamente evaluada, pero pocos son los estudios sobre el efecto de los productos farmacéuticos, por lo que se desarrolló este trabajo de investigación teniendo como objetivo evaluar la toxicidad de tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) con diferentes concentraciones en dos tiempos de exposición (24 y 48 horas) sobre estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, experimento que se realizó en el laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica de la Facultad de Ciencias Biológicas, para lo cual se construyeron 40 unidades de experimentales constituidas por envases de plástico de 1 litro de capacidad, con la respectiva concentración de cada fármaco además de contar con unidades de control sin presencia de fármaco. En cada unidad experimental se colocó 10 unidades de estadios inmaduros de *Rhinella spinulosa* con un tamaño aproximado de 2 a 2,5 cm, en cada uno de los envases, para luego determinar la mortalidad generada durante las 24 y 48 horas de exposición. De los resultados se puede observar 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.

Palabras clave: Toxicidad, AINEs, *Rhinella spinulosa*.

I. INTRODUCCIÓN

El agua es un líquido vital para la existencia de todos los organismos vivos. Sin embargo, este recurso se encuentra amenazado por el rápido crecimiento de la población, la contaminación producida por contaminantes como metales pesados, hidrocarburos y plaguicidas en ambientes acuáticos ha sido ampliamente evaluada, pero pocos son los estudios sobre el efecto de los productos farmacéuticos.¹

Los productos farmacéuticos son sustancias que intentan curar, mitigar o prevenir en su aplicación en el cuerpo humano o animal, de enfermedades, sufrimiento, daño corporal y problemas patológicos. Los productos de cuidado personal y cosméticos como las fragancias, champús y cosméticos en conjunto con los fármacos activos o emergentes debido a su uso intenso y extensivo ingresan al ambiente cada año, y estiman que su cantidad es similar al total de plaguicidas utilizados durante el mismo periodo.² Estos productos farmacéuticos, tales como analgésicos, antiinflamatorios, antibióticos, anticonvulsivantes, psiquiátricos, hormonas y otros, se han encontrado en cuerpos de agua alrededor de todo el mundo, siendo introducidos al ambiente después del uso en pacientes y animales, ya que son excretados de forma inalterada o como metabolitos a través de la orina o las heces en las descargas de agua doméstica hacia los ríos.

Una cantidad desconocida de estos componentes son evacuados al ambiente vía las aguas residuales o cuando las heces son usadas con residuos farmacéuticos para la fertilización de tierras agrícolas.³

Una de las formas más comunes para detectar las alteraciones, es mediante estudios ecotoxicológicos que determina los efectos de las concentraciones crecientes de los compuestos de los fármacos generando información de la

concentración máxima permisible en los cuerpos de agua, sin que cause daño significativo a los organismos acuáticos.

Se empleó los estadios inmaduros del *Rhinella spinulosa* como organismo de prueba, para el estudio del efecto de los fármacos, se fundamenta en que estos seres vivos son resistentes a las aguas contaminadas, ya que su hábitat es por lo general en aguas estancadas, además de la disponibilidad de individuos en grandes cantidades en las estaciones de verano.

Por lo mismo, se utilizó tres fármacos, en cuatro concentraciones crecientes y en dos tiempos de exposición como agentes de toxicidad sobre los estadios inmaduros del *Rhinella spinulosa*, bioensayos que se realizó en los ambientes de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, durante los meses de noviembre a diciembre del 2014

Objetivos generales

Evaluar la toxicidad de tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) con diferentes concentraciones en dos tiempos de exposición (24 y 48 horas) sobre estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*.

Objetivos específicos

1. Determinar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, sometidas a tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) en dos tiempos de exposición.
2. Calcular la concentración letal media (CL₅₀) de tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco), en dos tiempos de exposición sobre los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*.
3. Comparar la mortalidad y la concentración letal media (CL₅₀) generado por tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) en dos tiempos de exposición los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

De acuerdo a la información hallada respecto al problema planteado, se encontró los siguientes trabajos que se detallan a continuación:

Jiménez,⁴ menciona en un trabajo de investigación 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 métodos de tratamiento de muestra y de técnicas instrumentales de análisis ha permitido monitorear a 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. Esta revisión compila investigaciones de los últimos diez años acerca de la presencia de algunos fármacos en los cuerpos de agua, al igual que llama la atención del impacto de la actividad farmacéutica sobre el ambiente.

Borgmann *et al.*,⁵ realizan una investigación de una mezcla de siete agentes farmacéuticos comunes (paracetamol, diclofenaco, gemfibrozilo, ibuprofeno, naproxeno, ácido salicílico, y triclosan) para determinar sus efectos sobre el *Hyalella azteca* anfípodo de agua dulce más de tres generaciones. La concentración objetivo de cada producto químico (100 ng l^{-1}) era representativo de la gama superior observado para estas sustancias en las aguas frescas de Canadá, excepto en las inmediaciones de las descargas de efluentes. No se

observaron efectos estadísticamente significativos en la supervivencia, el apareamiento, el tamaño del cuerpo o la reproducción. La proporción de sexos cambió ligeramente a un 17% más a los hombres. Los siete medicamentos probados no parecen ser sustancias de gran preocupación para la mayoría de los canadienses *Hyalella* en aguas dulces, pero los impactos más significativos pueden ser observados en áreas cercanas a las descargas de efluentes.

Heckmann *et al.*,⁶ mencionan de acuerdo a un trabajo de investigación que el fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) ibuprofeno (IB) es un fármaco ampliamente utilizado que se puede encontrar en varios ecosistemas de agua dulce. Estudios de toxicidad aguda con *Daphnia magna* indican que en 48 horas CE_{50} (inmovilización) es 10-100 mg IB l⁻¹. Sin embargo, actualmente no existen datos de toxicidad crónica del IB en las poblaciones de artrópodos, y los impactos de vida acuática de tales fármacos analgésicos aún no están definidas. Se realizó una exposición de 14 días de *Daphnia magna* a IB como un compuesto modelo (rango de concentración: 0, 20, 40 y 80 mg IB l⁻¹) medir los efectos crónicos en los rasgos de historia de vida y el desempeño de la población. Tasa de crecimiento se redujo significativamente en todas las concentraciones del IB, aunque la supervivencia sólo se afectó a 80 mg IB l⁻¹. Reproducción, sin embargo, se vio afectada en concentraciones inferiores de IB (de 14 días de EC_{50} de 13,4 mg IB l⁻¹), y se inhibió completamente a la concentración de ensayo más alta. Los resultados de este estudio indican que las consecuencias a largo plazo de la población de crustáceos de una exposición IB crónica a concentraciones ambientales realistas (ng l⁻¹ a l⁻¹ mg) lo más probable es de menor importancia. Se discuten los resultados en relación con los estudios genómicos recientes, que sugieren que el mecanismo potencial de toxicidad en *Daphnia magna* es similar al modo de acción en los mamíferos, donde IB inhibe la biosíntesis de eicosanoides.

El estudio de contaminantes emergentes, entre ellos los compuestos farmacéuticos, se ha convertido en una de las mayores inquietudes en investigaciones ambientales actuales. Por lo que Elorriaga *et al.*,⁷ mencionan que los fármacos son utilizados en grandes cantidades y variedad. Dando una importante fracción luego de su ingesta que se excreta por el individuo, a través de orina y heces, ingresando de manera continua a aguas residuales. Los tratamientos de depuración resultan inefficientes para su completa eliminación. El

perfil de composición y niveles de concentración encontrados varían dependiendo del país y consumo. Los efectos letales sugieren un bajo riesgo ecotoxicológico, aunque al considerarse efectos subletales y crónicos esta situación es diferente. Los organismos acuáticos resultan expuestos a bajas concentraciones de forma continua durante el ciclo de vida, observándose efectos adversos asociados (ej.: sobre crecimiento y reproducción, alteraciones morfológicas, genotoxicidad, entre otros). Si bien aún no suponen un riesgo inmediato para humanos, están siendo incorporados a listados en estándares de calidad de agua de bebida. El objetivo del presente trabajo es analizar resultados obtenidos en monitoreos de descargas cloacales y aguas superficiales del país, compuestos prevalentes y concentraciones, identificar y categorizar cuerpos receptores y su incidencia sobre la calidad de agua, contrastarlos con datos de otras partes del mundo. Se colectaron muestras de vertidos cloacales (crudos o con tratamiento primario) y en aguas superficiales (estuario del Río de la Plata, lagunas pampeanas, afluentes del Río Paraná). Las determinaciones se realizaron por SPE-HPLC/DAD/MS. Los compuestos prevalentes fueron: analgésicos y antiinflamatorios no esteroides, antibióticos, antiepilépticos, beta-bloqueantes, estimulantes. Se observaron diferentes perfiles de compuestos detectados en zonas urbanas, comparadas con las rurales. Se concluye que es necesario incrementar el conocimiento sobre esta nueva generación de contaminantes, para proponer los mecanismos de tratamiento del agua, con el fin de garantizar una calidad idónea y sin efectos para la salud humana y los organismos acuáticos.

Gómez *et al.*,⁸ mencionan que los problemas ecológicos producidos en el medio ambiente acuático son debidos, entre otros factores, a la contaminación del agua por diferentes xenobióticos tales como metales pesados y compuestos orgánicos (hidrocarburos y plaguicidas). Actualmente los medicamentos se han convertido en una fuente importante de contaminación. Los contaminantes derivados de principios activos farmacéuticos (PAF) muestran una gran persistencia en ambientes acuáticos y su posible efecto toxicológico en cuerpos de agua no está comprobado ya que están presentes en concentraciones traza, pero la exposición crónica a niveles bajos de múltiples sustancias bioactivas es una causa que no se descarta ya que no hay estudios de la concentración de medicamentos ni sus efectos en el medio ambiente acuático en el país. Por lo

anterior, es importante, caracterizar la respuesta tóxica, por la presencia de estos contaminantes en agua y sedimentos.

En un trabajo de investigación realizado por Valdes,¹ quien tuvo como objetivo evaluar la toxicidad producida por el diclofenaco sobre *Daphnia magna*, mediante 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 CL₅₀ 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 sub letal, 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. En conclusión, 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.

García *et al.*,⁹ mencionan que el profesional veterinario debe conocer no sólo los efectos terapéuticos derivados del empleo de ciertos agentes farmacológicos, sino también los posibles riesgos medio ambientales que su actividad puede ocasionar. A través del presente trabajo se repasan las enormes posibilidades terapéuticas de la ivermectina como antiparasitario en el ganado ovino, pero también se hace hincapié en sus efectos ambientales, intentando concienciar al veterinario acerca de su importante papel como profesional implicado en la protección del medio ambiente.

Oviedo *et al.*,¹⁰ mencionan que la evaluación ecotoxicológica de productos farmacéuticos en el ambiente acuático dulce acuícola es un área de investigación emergente a nivel global. Por lo que el objetivo del siguiente trabajo fue evaluar el efecto ecotoxicológico agudo de siete productos farmacéuticos ampliamente usados en el Perú: cuatro antimicrobianos (amoxicilina, ciprofloxacino y trimetoprima + sulfametoxazol), dos analgésicos (ibuprofeno y

paracetamol), y un sedativo (diázepan)-sobre la pulga del agua *Daphnia magna* Strauss, 1820 (Crustacea: Daphniidae), y su relación con las principales características fisicoquímicas y de relación de componentes de la molécula, y a partir de estos resultados evaluar su riesgo ambiental acuático. Las pruebas de toxicidad aguda se evaluarán con cinco concentraciones más un control o testigo, y con cuatro repeticiones. Se observó la siguiente secuencia de ecotoxicidad decreciente en términos de CL₅₀ (mg/L) a 96 h de exposición sobre *D. magna*: diazepam (17,1 mg/L) > paracetamol (62,3 mg/L) > Ibuprofeno (175 mg/L) > ciprofloxacino (230,6 mg/L) > trimetoprima (296 mg/L) > sulfamametoxazol (1480 mg/L) > amoxicilina (6950 mg/L). No se encontró relación entre el LogCL₅₀ y la proporción de producto excretado, el log Kow y la solubilidad de los fármacos empleados. La ecotoxicidad potencial indicó que el diazepam ocasionó el mayor riesgo en el ambiente acuático. En cambio a través del cociente de riesgo solo el paracetamol produjo riesgo en el ambiente acuático.

2.2. Marco conceptual

- 2.2.1. Fármacos:** Sustancia que interactúa con el organismo y modifica las funciones biológicas produciendo un efecto con actividad terapéutica (prevención, diagnóstico o tratamiento de enfermedades).¹¹
- 2.2.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs):** Son un grupo de agentes de estructura química diferente que tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas, a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa. Estas drogas comparten acciones farmacológicas y efectos indeseables semejantes.¹²
- 2.2.3. Toxicidad aguda:** La toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia, usualmente, el punto final es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50.¹³
- 2.2.4. Porcentaje de mortalidad:** Frecuencia de individuos muertos o inmóviles en relación con el total de individuos sometidos a la acción de un agente químico.¹³
- 2.2.5. Concentración Letal Media (CL₅₀):** Refleja la dosis necesaria, obtenida estadísticamente, en mg contaminante/kg de peso corporal para matar el 50% de una población de animales (50% de muerte en 14 días).¹⁴

2.2.6. *Rhinella spinulosa*: son especies de la familia Bufonidae son de vida acuática por lo que son afectados directamente si el medio acuático donde viven son contaminados.¹⁵

2.2.7. Estado inmaduro de *Rhinella spinulosa*: son larvas de los anfibios anuros, se caracterizan por respirar mediante branquias externas y residen permanentemente en el agua, estas larvas carecen de patas y poseen una larga cola con la que nadan.¹⁵

2.3. Bases teóricas

2.3.1. El agua

El agua es un líquido vital para la existencia de todos los organismos vivos, ya que es indispensable en los procesos biológicos y es hábitat de múltiples comunidades acuáticas. Su extracción para uso doméstico, agrícola minero, industrial, para la generación de energía, así como el vertido de contaminantes, puede llevar a un deterioro en su calidad y cantidad, impactando no solo al ecosistema acuático, sino también a la disponibilidad de agua segura para consumo humano.¹⁶

2.3.2. Productos farmacéuticos en el agua

Los productos farmacéuticos no eran considerados contaminantes ambientales dado que se desconocía su acumulación o la de sus productos de transformación en suelos, aguas, aire, tejidos vegetales y tejidos animales. Por lo anterior, la concentración de estos en matrices ambientales y en especial en los cuerpos de agua es indeterminada, y solo a partir de los años noventa (90) se empezaron a cuantificar en aguas, concentraciones entre partes por billón (ppb) y partes por trillón (ppt). En publicaciones recientes, se reporta que en países como España, Italia, Alemania, Canadá, Brasil, Grecia y Francia hay descargas al agua de aproximadamente 500 toneladas de analgésicos por año, en donde el ácido salicílico y el diclofenaco han alcanzado concentraciones de 0,22µg/L y 3,02µg/L, respectivamente.⁴

Factores como la demanda, la frecuencia de administración, la automedicación, el consumo ilícito de drogas y los procesos fisiológicos determinan la carga y la persistencia de principios activos en aguas; un caso particular se reporta en Alemania donde cientos de toneladas de principios activos farmacéuticos de alta demanda son incorporados al ambiente. De igual forma, los sistemas hospitalarios incorporan antimicrobianos al agua, promoviendo la generación de microorganismos resistentes y alteraciones en la actividad enzimática de la

- microbiota, lo cual interrumpe los procesos de biodegradación propia de materia orgánica en los cuerpos de agua. Sin embargo, poco se conoce de los efectos crónicos de fármacos en el ambiente, aunque algunos ensayos ecotoxicológicos alertan del gran problema.⁴

2.3.3. Contaminación del agua por productos farmacéuticos

Los fármacos son componentes biológicamente activos, empleados para restablecer la salud tanto de los seres humanos como de los animales. Estas sustancias pueden tener efectos parecidos, incluyendo los adversos, en mamíferos y no mamíferos, ya que comparten muchos receptores y moléculas blanco similares, que se han conservado a través de la evolución. Sin embargo, pueden producir respuestas inesperadas en organismos menores debido a diferencias farmacocinéticas, fármaco dinámicas y fisiológicas.¹⁷

Los fármacos pueden ser introducidos al ambiente después de uso en pacientes y animales, ya que son excretada de forma inalterada o como metabolitos a través de la orina o las heces en las descargas de agua domestica hacia ríos y lagos. Aunque una pequeña parte de estos productos puede ser removida por plantas de tratamiento de agua, la gran mayoría no logra eliminarlos en su totalidad.¹⁸

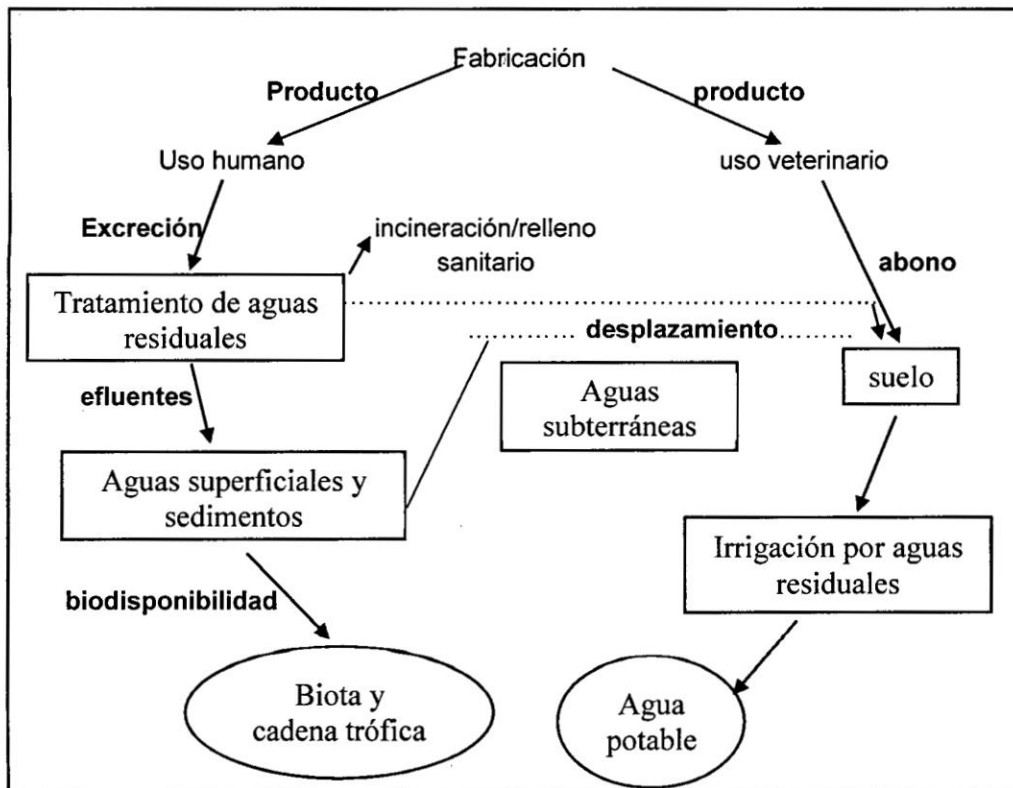


Figura 1. Trayecto de los productos farmacéuticos hacia el ambiente.¹⁸

2.3.4. Comportamiento de los fármacos

Dentro de los procesos que pueden sufrir los productos farmacéuticos en el ambiente acuático están:

- **Dispersión y dilución:** la concentración del componente puede disminuir y así la concentración no será suficiente para producir un efecto en los organismos. Este proceso sucede solo en regiones que reciben volúmenes importantes de precipitaciones pluviales.¹⁹
- **Volatilización:** Sucede con las sustancias que tienen una constante de Henry elevada.¹⁹ (La Ley de Henry fue formulada en 1803 por William Henry y enuncia que, a una temperatura constante, la cantidad de gas disuelto en un líquido es directamente proporcional a la presión parcial que ejerce ese gas sobre el líquido. Esta ley fue formulada para explicar la volatilidad de las sustancias, es decir la facilidad con que una sustancia disuelta en agua se transforma en gas y pasa a la atmósfera).²⁰
- **Absorción:** Este proceso incluye tanto adsorción como absorción. La captación de los contaminantes por los sedimentos y por los sólidos suspendidos es una forma importante de mitigación, pero este material puede volver a la columna de agua cuando exista turbulencia en el medio.¹⁹
- **Fotólisis.** Es el proceso de disociación de las moléculas por efecto de la luz, y se divide en directa (cuando el toxico absorbe la luz y como resultado directo se transforma) e indirecta (cuando otras especies excitadas transfieren energía, electrones o átomos de hidrogeno provocando una transformación).¹⁹
- **Biodegradación y biotransformación:** Se lleva a cabo a través de enzimas producidas por las bacterias presentes en el ambiente para su utilización como fuente de energía.¹⁹

2.3.5. Metabolismo de fármacos

La transformación de los xenobióticos (fármacos y otros) en subproductos de eliminación a través de los sistemas enzimáticos, estos son expuestos a reacciones de óxido reducción e hidrólisis, y posteriormente son conjugados para aumentar la solubilidad y facilitar su excreción. Estos subproductos de eliminación son de difícil identificación analítica, debido a escasez de patrones primarios o de técnicas de identificación, lo que hace necesario disponer de protocolos de tamizaje que permitan su identificación y determinar su ecofarmacotoxicidad.⁴

- Usualmente inactiva el fármaco.
- Puede producir metabolitos activos (diazepam).
- Puede producir metabolitos tóxicos (isoniazida).
- A menudo resulta en productos polares muy ionizados.
- Algunos fármacos se eliminan sin metabolizar (digoxina).

2.3.6. Propiedades fisicoquímicas de los fármacos y su distribución en el ambiente

A diferencia de otros contaminantes en el agua, los fármacos son moléculas con actividad biológica sobre diferentes organismos, y sus propiedades fisicoquímicas determinan su persistencia en el ambiente y facilitan su bioacumulación. La complejidad y Heterogeneidad molecular de estos permite que sus propiedades dependan del ambiente. Parámetros fisicoquímicos como el coeficiente de distribución octanol/agua, constante de Henry y la constante de disociación permiten describir su equilibrio químico y dinámico, y proporcionan información sobre el procedimiento analítico ideal para su identificación.⁴

La gran mayoría de fármacos son ácidos y bases débiles, por lo que su distribución depende del pH del medio y la constante de acidez (K_a). Lo anterior indica que la bilis de algunos peces, por su naturaleza lipofílica, constituye una buena matriz para el análisis y biomagnificación de fármacos en ecosistemas acuáticos; asimismo, evidencia que las propiedades fisicoquímicas de los fármacos condicionan su distribución, su bioacumulación y su biomagnificación.⁴

2.3.7. Efectos de los productos farmacéuticos sobre la biota

Diversas investigaciones han demostrado que los fármacos y sus metabolitos en el ambiente producen efectos tóxicos sobre la biota. Indican que algunos antibióticos inhiben el crecimiento de las bacterias encargadas de la degradación de la materia orgánica y por lo tanto interfieren con el proceso de nitrificación desnitrificación.¹⁸ Por su parte Nentwing,²¹ reportó que la fluoxetina disminuye el crecimiento del alga *Pseudokirchneriella subcapitata* y la fecundidad de *Ceriodaphnia dubia*, por lo que este fármaco afecta a los organismos que habitan en los sedimentos así como en la columna de agua.

En peces se ha reportado que los medicamentos beta-bloqueadores tienen un efecto inhibitorio de la actividad espermática en algunas especies.¹⁸

Otros estudios refieren la producción de vitelogenina en peces machos debido a componentes estrogénicos en el agua que habitan, de tal modo que afectan el contenido de sus hormonas sexuales y su homeostasis.⁵

Un estudio de toxicidad crónica realizado con ibuprofeno (antiinflamatorio no esteroide) sobre *Daphnia magna* mostró la disminución del crecimiento, así como la reducción de la reproducción de los organismos.⁶

2.3.8. Efectos tóxicos de los fármacos en el ambiente

Los efectos aún no son comprendidos en su totalidad, sin embargo, muchos de estos modulan el sistema endocrino y el sistema inmune, indicando su potencialidad sobre la homeostasis de los organismos acuáticos. Los modelos ecotoxicológicos utilizan microorganismos, especies ícticas, crustáceos, entre otros, pero estos no logran describir el efecto de los fármacos sobre las comunidades acuáticas.⁴

2.3.9. Toxicidad

La toxicidad es la capacidad inherente de una sustancia química de producir efectos adversos en los organismos vivos. Efectos de deterioro de tipo funcional, lesiones patológicas que afectan el funcionamiento del organismo y reducen su capacidad de respuesta a factores de riesgo o estrés. De acuerdo con el tiempo de exposición para que se llegue a manifestar el efecto tóxico o de la duración del mismo, éstos se dividen en dos grupos: agudos y crónicos. También se considera tóxica una sustancia, si tiene el potencial de causar la muerte, lesiones graves, efectos perjudiciales para la salud del ser humano si se ingiere, inhala o entra en contacto con la piel. Se ha optado por una definición de toxicidad totalmente cualitativa para evitar análisis sofisticados de laboratorio para la clasificación de los residuos. Sin embargo, una definición más exacta requiere la utilización de límites cuantitativos de contenido de sustancias tóxicas el uso de definiciones que establecen la LC₅₀ (concentración letal media que mata al 50% de los organismos de laboratorio).¹⁴

El efecto tóxico es el producido por uno o varios agentes tóxicos sobre un organismo, población o comunidad que se manifiesta por cambios biológicos. Su grado se evalúa por una escala de intensidad o severidad y su magnitud está relacionada con la dosis (cantidad de sustancia administrada, expresada generalmente por unidad de peso corporal) o la concentración (sustancia aplicada en el medio) del agente tóxico.¹³

2.3.10. Dosis letal media (DL₅₀) y concentración letal media (CL₅₀)

El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio, es un importante parámetro de caracterización denotado como DL₅₀ o como concentración letal media CL₅₀. El periodo de tiempo durante el cual se expone el estímulo debe ser especificado, por ejemplo, 24 horas DL₅₀, esto con el fin de comparar y estimar la potencia relativa del estímulo. La determinación de la DL₅₀, se utiliza para encontrar umbrales de toxicidad para determinadas sustancias; en el desarrollo de pesticidas se utiliza para determinar los límites de resistencia de insectos, por ejemplo, ante ciertos biocidas a concentraciones altas se puede llegar a correlacionar la bioactividad con el valor de la DL₅₀ y al mismo tiempo su grado de toxicidad.¹⁴

Concentración letal media, es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado. El valor de la CL₅₀ se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen de aire normal (miligramos por litro, mg/L). Mientras que Dosis Letal media es la dosis individual de una sustancia que provoca la muerte del 50% de la población animal debido a la exposición a la sustancia por cualquier vía distinta a la inhalación. Normalmente expresada como miligramos o gramos de material por kilogramo de peso del animal.¹³

2.3.11. Antiinflamatorios

a. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Se trata de un conjunto de fármacos analgésicos que los componentes de este grupo comparten las tres acciones que lo definen (analgésica, antitérmica y antiinflamatoria), su eficacia relativa para cada una de ellas puede ser diferente; es decir, un fármaco concreto puede mostrar mayor actividad antiinflamatoria o analgésica que otro, o viceversa. Asimismo, su toxicidad puede coincidir con la del grupo o ser más o menos específica. De ahí que su utilización clínica dependa tanto de su eficacia como de su toxicidad relativa.¹¹

b. Mecanismo general de acción

Los principales efectos terapéuticos, y muchas de las reacciones adversas de los AINE pueden explicarse por su efecto inhibitorio de la actividad de las ciclooxigenasas (COX), enzimas que convierten el ácido araquidónico que se

encuentra en las membranas celulares en endoperoxidos cíclicos inestables, los cuales se transforman en prostaglandinas y tromboxanos.¹¹

c. Principales grupos de AINEs

Tabla 1. Principales ácidos del grupo de AINEs

Ácidos del grupo de AINEs	
Salicílico	Fármaco prototipo ácido acetil salicílico
Enólicos	pirazolonas: metamizol
	pirazolonas: metamizol oxicams: piroxicam, meloxicam
Acético	indolacético: indometacina
	pirrolacético: ketorolaco
	fenilacético: diclofenaco
Propionico	naproxeno
Antranílico	ácido mefenamico
Nicotínico	clonixina

Fuente: Farmacología Humana. Jesús Flórez Beledo *et al.*,¹¹

Tabla 2. Principales no ácidos del grupo de AINEs

No ácidos del grupo de AINEs	
Sulfoanilidas	nimesulidas
Alcanonas	nabumetona

Fuente: Farmacología Humana. Jesús Flórez Beledo *et al.*,¹¹

Tabla 3. Principales inhibidores de la COX-2 del grupo de AINEs

Inhibidores de la COX-2 del grupo de AINEs	
Sulfoamida	celecoxib
Metilsulfopenilo	rofecoxib

Fuente: Farmacología Humana. Jesús Flórez Beledo *et al.*,¹¹

2.3.12. Ibuprofeno

a. Características generales

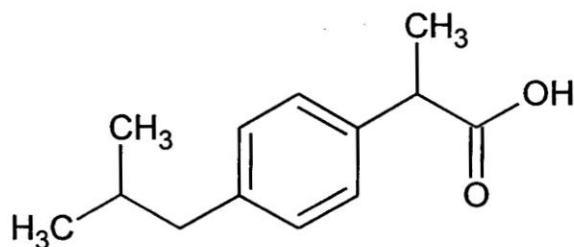


Figura 2. Estructura química del ibuprofeno.²⁰

- **Nombre químico:** ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil) propiónico
- **Formula química:** C₁₃H₁₈O₂
- **Peso molecular:** 206.29 g/mol
- **Biodisponibilidad:** ~49 - 73%
- **Unión proteica:** 99%
- **Metabolismo:** hepático (CYP2C9)
- **Vida media:** 1.8-2 h
- **Excreción:** Renal

b. Farmacocinética

Ibuprofeno se absorbe con rapidez después de la administración oral. El 80% de la dosis oral se absorbe en el hombre; pudiendo observarse concentraciones plasmáticas máximas después de 1 a 2 horas. La vida media plasmática es alrededor de 2 horas la absorción rectal es también eficaz aunque más lenta. Después de una dosis oral de 400 mg se alcanzan concentraciones máximas totales (libre y conjugado) de 30 a 40 microgramos/ml (~ 150 microgramos/ml) en el plasma en un plazo de 90 minutos.²²

Estos valores disminuyen hasta aproximadamente 45 micras/M después de 4 horas y a valores casi imposibles de medir al cabo de 12 a 16 horas. Del 45 al 80% de la droga se eliminará en un plazo de 24 horas se ha calculado que sólo se queda sin fijar 1% del medicamento, los valores máximos de la droga libre son ~1.5 micras/M que se comparan favorablemente con 1C50 sinovial reumatoide de 2.0 micras/M.²²

Ibuprofeno se une en forma extensa en 99% a las proteínas plasmáticas pero sólo ocupa una fracción de todos los lugares de unión con fármaco en las concentraciones habituales, pasa con lentitud a los espacios sinoviales y puede permanecer allí en concentraciones mayores cuando las concentraciones plasmáticas declinan.²²

La excreción de ibuprofeno es rápida y completa. Más del 90% de una dosis ingerida se excreta por la orina como metabolitos.²²

Los metabolitos que se encuentran son 2 (2-carboxipropil) p-hexilpropiónico (ácido 37%) o sus conjugados y no se encuentra presentes en la orina, sólo 1% de la dosis se encuentra en orina sin cambios.²²

Los metabolitos principales resultantes son un compuesto hidroxilado y uno carboxilado.²²

c. Farmacodinámica

Es un fármaco inhibidor de prostaglandinas que logra mediante este mecanismo de acción controlar inflamación, dolor y fiebre, su mecanismo de acción: como todos los antiinflamatorios no esteroideos de la familia de los ácidos arilpropionicos, el ibuprofeno inhibe la acción de las enzimas COX-1 y COX-2. Los efectos anti-inflamatorios del ibuprofeno son el resultado de la inhibición periférica de la síntesis de prostaglandinas subsiguiente a la inhibición de la ciclo oxigenasa. El ibuprofeno inhibe la migración leucocitaria a las áreas inflamadas, impidiendo la liberación por los leucocitos de citoquinas y otras moléculas que actúan sobre los receptores nociceptivos.²²

El ibuprofeno, como otros AINEs, no altera el umbral del dolor ni modifica los niveles de prostaglandinas cerebrales, concluyéndose que sus efectos son periféricos. La antipiresis es consecuencia de la vasodilatación periférica debido a una acción central sobre el centro regulador de la temperatura del hipotálamo.²²

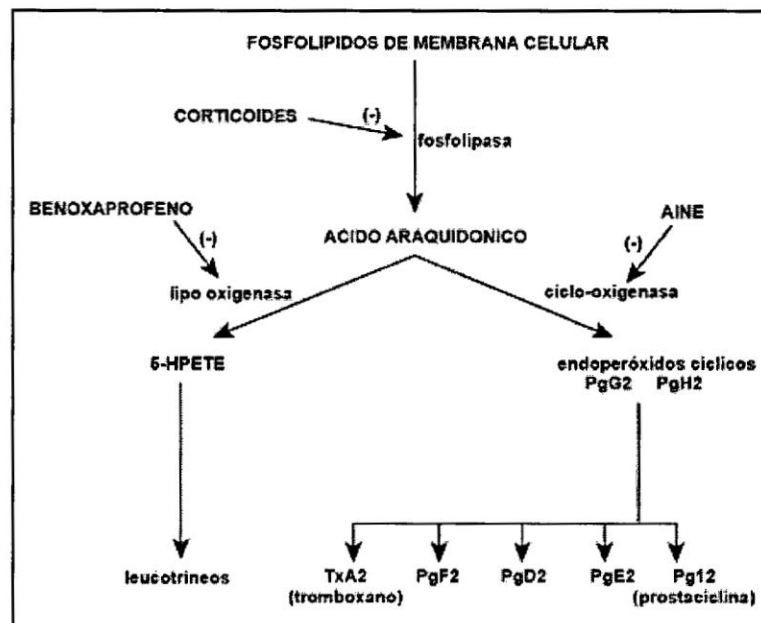


Figura 3. Esquema básico de inhibición de la síntesis de prostaglandinas por los AINEs.²³

d. Reacciones secundarias y adversas

En 10 a 15% de los pacientes se ha suspendido la administración de Ibuprofeno debido a intolerancia a la sustancia. Del 5 al 15% presentan datos de intolerancia gastrointestinal, lo más común son epigastralgias, náuseas, pirosis, sensación de plenitud en tracto gastrointestinal la pérdida oculta de sangre es infrecuente.²⁴

Otras reacciones secundarias reportadas son trombocitopenia erupciones cutáneas, cefalea, mareos y visión borrosa, en algunos casos se presentó ambliopía tóxica, retención de líquidos y edema.²⁴

Se aconseja la suspensión del fármaco en los pacientes que presentan alteraciones oculares.²⁴

Otros efectos reportados con el uso de Ibuprofeno son diarrea, constipación; en pacientes asmáticos se ha reportado obstrucción de vías respiratorias por la retención de líquidos, puede presentarse una insuficiencia cardíaca congestiva o edema pulmonar en enfermos con función cardíaca límite.²⁴

2.3.13. Naproxeno

El naproxeno es un antiinflamatorio no esteroideo (AINEs) derivado del ácido propiónico utilizado en tratamiento de enfermedades reumáticas, tales como: artritis reumatoidea, osteoartritis, espondilitis anquilosante, artritis juvenil.²⁵

Tratamiento del dolor, tratamiento de artritis gotosa aguda o enfermedad aguda de depósito de pirofosfato de calcio, tratamiento de la fiebre, tratamiento de la dismenorrea, tratamiento y profilaxis del dolor de cabeza vascular.²⁵

a. Características generales

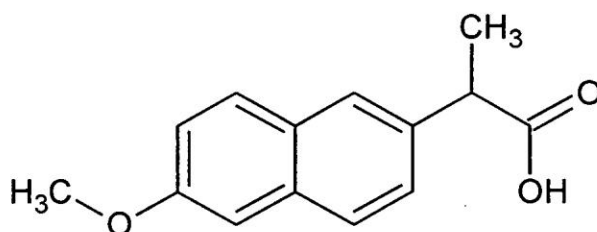


Figura 4. Estructura química de naproxeno²⁴

- **Nombre químico:** Acido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoicoamino.
- **Formula química:** C₁₄-H₁₄-O₃.
- **Solubilidad en agua (g/L):** Soluble (pH>6).
- **Clasificación farmacológica:** Antiinflamatorio no esteroideo (AINEs).
- **Clasificación terapéutica:** Antiinflamatorio, antirreumático.

b. Farmacodinamia

Como AINE: inhibe la actividad de la ciclo oxigenasa, disminuyendo la formación de precursores de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico.

Como antirreumático y antigotoso: actúa vía mecanismos antiinflamatorios y analgésicos.²⁴

Como antipirético: actúa probablemente por acción en el centro termorregulador hipotalámico para producir vasodilatación periférica, que produce aumento del flujo sanguíneo a través de la piel, sudoración y pérdida de calor. La acción central probablemente involucra la reducción de la actividad de prostaglandinas en el hipotálamo.²⁴

Como antidismenorréico: actúa inhibiendo la síntesis y la actividad de las prostaglandinas intrauterinas, disminuyendo la contractilidad y la presión uterinas, aumentando la perfusión uterina y aliviando la isquemia así como el dolor espasmódico.²⁴

Como profiláctico y supresor de la cefalea vascular: además de la actividad analgésica, la inhibidora de prostaglandinas responsables de dilatación o constricción de los vasos sanguíneos cerebrales puede contribuir en prevenir o aliviar la cefalea con esta etiología.²⁴

c. Farmacocinética

- **Absorción:** Después de la administración oral, se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal.²⁴
- **Distribución:** Tiene un volumen de distribución de 0,16 L/Kg. Se une más de 99% a las proteínas plasmáticas a dosis terapéuticas normales.²⁴
- **Metabolismo:** El naproxeno se metaboliza ampliamente en el hígado 6-O-desmetil-naproxeno.²⁴
- **Excreción:** Aproximadamente 95% del naproxeno se excreta en la orina, principalmente como naproxeno, en menor cantidad, menos del 3% se excreta por las heces. Su tiempo de vida media es aproximadamente de 13 horas.²⁴

d. Reacciones adversas

- **Frecuentes:** Dolor abdominal dolor y sensación de quemazón epigástrica, constipación, náuseas vértigo, zumbidos somnolencia, cefalea leve a moderada, rash cutáneo, edema, dificultad respiratoria.²⁵
- **Poco frecuentes:** Indigestión, diarrea, estomatitis, aftas, sed continua, equimosis, diplopía, visión borrosa, disminución auditiva incremento de sudoración.²⁵
- **Raras:** Vomito, colitis, hemorragia, perforaciones o ulceraciones gastrointestinales, confusión y depresión mental.²⁵

2.3.14. Diclofenaco

El diclofenaco es un antiinflamatorio no esteroideo (AINEs) 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 ventano requiere receta médica y es uno de los más utilizados por la población.¹⁰

a. Características generales

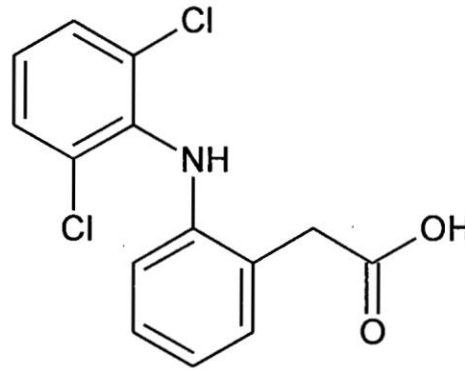


Figura N° 5. Estructura química del diclofenaco.²⁶

- **Nombre químico:** Acido 2-2-(2,6-diclorofenil) amino fenil acético
- **Formula química:** C₁₄-H₁₁-Cl₂-N-02
Log k_{ow}: 1.56.
Log D: 1.22.
pK_a: 3.90.⁽²⁶⁾⁽²⁵⁾
- **Solubilidad en agua (g/L):** 21.3.
- **Clasificación farmacológica:** Antiinflamatorio no esteroideo (AINE).⁽²⁶⁾⁽²⁵⁾
- **Clasificación terapéutica:** Antiinflamatorio, antirreumático.⁽²⁶⁾⁽²⁵⁾

b. 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 polimorfo

nucleares, proteínas que participan en la degradación del cartílago en los procesos reumáticos crónicos.¹

c. Farmacocinética

- **Absorción:** Después de la administración oral, el diclofenaco se absorbe rápida y completamente en el duodeno.¹³
- **Distribución:** La concentración plasmática máxima se alcanza entre dos o tres horas después de su administración. La unión a proteínas es del 99%.¹³
- **Biotransformación:** Se metaboliza en el hígado por acción de la isoenzima de la sub familia CYP2C del citocromo P450 a 4-hidroxiciclofenaco 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 glucuronidación por la enzima uridin 5'-difosfoglucuronosil transferasa (UGT2B754) y diversas vías de hidroxilación. Otro metabolito generado es el 5, hidroxidiclofenaco resultado de las enzimas CYP2C8, CYP2C18, CYP2C19 Y CYP2C8, el diclofenaco glucoronizado es metabolizado por CYP2C8.(12)
- **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.¹²

d. 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.¹

e. Efecto toxico 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.¹ Por otro lado, Gómez *et al.*,²⁷ demostraron 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. 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. Por su parte, Han *et al.*,²⁸ encontraron un incremento en la expresión del gen para la producción de vitalonogenina, por lo que el diclofenaco también puede ser un potencial agente estrogénico.²⁹

2.3.15. Orden anura: familia Bufonidae

Los bufónidos (Bufonidae) son una familia del orden Anura, perteneciente a la clase de los anfibios. Muchas de sus especies se conocen con el nombre común de sapos; no obstante, numerosas especies pertenecientes a otras familias también son comúnmente denominados sapos.¹⁵

Los bufónidos carecen de dientes y tienen glándulas parotoides en la parte trasera de su cabeza. Estas glándulas contienen diferentes toxinas que tienen diferentes efectos¹⁵

Como todos los anuros, sufren una metamorfosis durante su desarrollo. Comienzan su vida como renacuajos con su cuerpo similar a un pez, sin patas y respirando a través de las branquias. Durante su metamorfosis, aparecen las patas, desaparece la cola y la respiración pasará a ser pulmonar.¹⁵

a. Características morfológicas

Cabeza ancha, redondeada. Hocico corto, abultado. Sin crestas cefálicas. Tímpano visible. Parotoides pequeñas, redondeadas. Macho con antebrazo desarrollado. Mano con tubérculos metacarpales desarrollados. Pie con membrana interdigital variable según la subespecie; tubérculos metatarsales desarrollados; los subarticulares cónicos. Piel dorsal glandular y verrucosa, con espinas queratinosas. Vientre liso pero muy plegado en algunas zonas. Machos con callosidades nupciales amarronadas; sin saco vocal. Dorso amarronado u oliva manchado irregularmente, especialmente en las hembras. Palmas y plantas anaranjado o amarillento en algunas poblaciones y en juveniles. Machos: 68-78 mm. Hembras 74-83 mm. Renacuajos: Dorso y cola negro aterciopelado. Los recién metamorfoseados son muy oscuros y con la superficie inferior de manos y pies amarillos claro. Se encuentran desde septiembre hasta mayo o junio. Formula dentaria: 1,1-1/3.³⁰

b. Ciclo biológico

Entre la eclosión y la formación de un sapo adulto pasan unos 4 meses, aunque eso depende de las condiciones. A las 6 semanas se insinúan las patas traseras y 2 más tarde ya están formadas. A las 12 ya han aparecido las delanteras y la cabeza es como la de un sapo.³⁰

c. Hábitat y comportamiento

Reproducción; otoño e invierno temprano. Huevos en ristras en pequeños arroyos andinos. En meses calurosos en cuevas de arroyos o debajo de piedras. Resistentes a la desecación. Los juveniles generalmente están en ambientes áridos.³⁰

d. Clasificación taxonómica

Reino	: Animalia
Filo	: Chordata
Clase	: Amphibia
Orden	: Anura
Familia	: Bufonidae
Género	: Rhinella
Especie	: <i>spinulosa</i>
Nombre científico	: <i>Rhinella spinulosa</i> Wiegmann, 1834
Nombre Vulgar	: "sapo"

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.³¹

Para estos estudios es necesario calcular la concentración de fármaco que va 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.³²

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.³³

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.³³
- 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.³³
- 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.³³

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.³³

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.³³

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Sistema de Información Geográfica y Biodiversidad de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.1.1. Ubicación política

Región : Ayacucho

Provincia : Huamanga

Distrito : Ayacucho

Lugar : Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

3.1.2. Ubicación geográfica

La Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga se encuentra ubicado en el en la Av. Independencia S/N. a diez minutos de la plaza Mayor de Huamanga.

Coordenadas Geográficas

Latitud sur : 13° 08' 42"

Longitud oeste : 74° 13' 17"

Coordenadas UTM

Este : 0584386

Norte : 8546645

Altitud : 2791 m.s.n.m.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Tres fármacos (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) expendidos en la ciudad Ayacucho.

3.2.2. Muestra

- 3 gr. de ibuprofeno

Composición de cada tableta contiene: Ibuprofeno 400 mg

Excipiente c.s.p.

Lote: 1051275

Laboratorio: Portugal genéricos

- 3 gr. de naproxeno

Composición de cada tableta contiene: Naproxeno 550 mg

Excipiente c.s.p.

Lote: 1090294

Laboratorio: Portugal genéricos

- 3 gr. de diclofenaco

Composición de cada tableta contiene: Diclofenaco 50 mg

Excipiente c.s.p.

Lote: 3139055

Laboratorio: La sante

3.2.3. Unidad experimental

10 unidades de estadios inmaduros de *Rhinella spinulosa*, en envases de 1 litro de capacidad, conteniendo cada solución.

3.2.4. Sistema de muestreo

El sistema de muestreo a través del que se seleccionó la cantidad de fármaco a emplear fue aleatorio, para el cual se tomó 3 gr. aproximadamente de cada fármaco, las que fueron trituradas y molidas de las pastillas que se obtuvieron.

Por otro lado, con la finalidad de también darle aleatoriedad a la disposición de las unidades experimentales, se sorteó la posición en la fila y la columna en el conjunto de los envases que tenían como contenido las diferentes concentraciones más los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*.

3.3. Metodología y recolección de datos

El instrumento empleado para la recolección de datos fue la observación, a través del cual se pudo determinar el número de individuos muertos (no presentan movimiento al toque con una brocheta) a las 24 y 48 horas de exposición de las diferentes concentraciones de los tres fármacos.

3.3.1. Obtención de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*.

Los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* fueron obtenidos del río Huatatas cerca de la ciudad de Ayacucho. Las cuales fueron transportadas en baldes al laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica de la Facultad de Ciencias Biológicas, las que fueron colocadas en bandejas con agua declorada, 24 horas antes de la prueba de toxicidad, para evitar que las excretas

y restos orgánicos interfiera en los resultados del experimento. Dichos individuos fueron seleccionados de un tamaño homogéneo de aproximadamente 2 a 2,5 cm.

3.3.2. Preparación de las soluciones de fármacos comerciales (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco)

Para la preparación se utilizó tabletas de cada medicamento, las que fueron trituradas hasta ser pulverizadas, para su fácil solubilidad en el agua de clorada.

Por otro lado se tuvo que probar diferentes concentraciones antes del experimento, ya que no se contaban con concentraciones recomendadas por el producto. Para ello se realizó pruebas piloto, a partir de los cuales se determinó las concentraciones que se muestran en la Tabla 4.

Por otro lado se consideró que los tratamientos estuvieran constituidos por recipientes conteniendo cuatro concentraciones crecientes de cada fármaco comercial (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) más un testigo.

Tabla 4. Disposición de los envases con diferentes concentraciones de fármacos.

Recipiente	N° de individuos (estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i>)	Concentración del fármaco ibuprofeno (mg/L)	Concentración del fármaco naproxeno (mg/L)	Concentración del fármaco diclofenaco (mg/L)
Testigo	10	0	0	0
1	10	10,00	8,00	16,00
2	10	20,00	16,00	30,00
3	10	40,00	32,00	60,00
4	10	80,00	64,00	120,00

Se consideró cuatro grupos similares de unidades experimentales, siendo constituido un grupo de recipientes conteniendo soluciones del fármaco ibuprofeno, otro grupo de recipientes conteniendo soluciones con fármaco naproxeno, otro grupo de recipientes conteniendo soluciones con fármaco diclofenaco y finalmente un grupo de testigo las cuales no contenían ningún fármaco.

Las soluciones de los fármacos fueron preparados en las concentraciones señaladas una hora antes de iniciar el bioensayo, todas en agua de clorada.

3.3.3. Preparación de las unidades experimentales

Se consideró 40 unidades experimentales constituida por envases de plásticos de un litro de capacidad, en los cuales se colocaron 1 litro de agua con la respectiva concentración del fármaco y 10 estados inmaduros de *Rhinella*

spinulosa (número recomendado para estudios de toxicidad en la que se emplea como modelos a organismos como insectos, anfibios y peces).

Con la finalidad de minimizar el efecto de factores no considerados (luz, ruido, etc) en el estudio, las unidades experimentales fueron ubicadas en un ambiente aislado.

Tabla 5. Distribución de las unidades experimentales según la concentración de los fármacos.

Fármaco	Concentración del fármaco (mg/L)	N° de recipientes (repeticiones)	Total de recipientes
Ibuprofeno	10,00	3	12
	20,00	3	
	40,00	3	
	80,00	3	
Naproxeno	8,00	3	12
	16,00	3	
	32,00	3	
	64,00	3	
Diclofenaco	16,00	3	12
	30,00	3	
	60,00	3	
Testigo	120,00	3	4
	0,00	4	

Cabe señalar que, se considera la existencia de cuatro concentraciones por cada tratamiento.

Una vez establecidos los individuos de *Rhinella spinulosa* en los envases conteniendo las concentraciones respectivas de los fármacos, se realizaron las inspecciones cada 24 horas con la finalidad de determinar el número de individuos muertos en cada envase, para el cual con la ayuda de unas brochetas se tocaron aquellos individuos inmóviles, si en el caso de seguir inmóvil, fueron considerados como muertos y extraídos de las unidades experimentales, este mismo procedimiento se realizó a las 24 y 48 horas.

3.4. Tipo de investigación

El tipo de investigación realizado fue básica - experimental ya que la principal contribución es la de generar nuevos conocimientos sobre el efecto de los fármacos sobre los organismos acuáticos, tomando como modelo a los estadios

inmaduros de *Rhinella spinulosa* y experimental ya que se manipularon dos variables, la primera fue referida a tres tipos de fármacos y la segunda, a la manipularon de concentraciones crecientes.

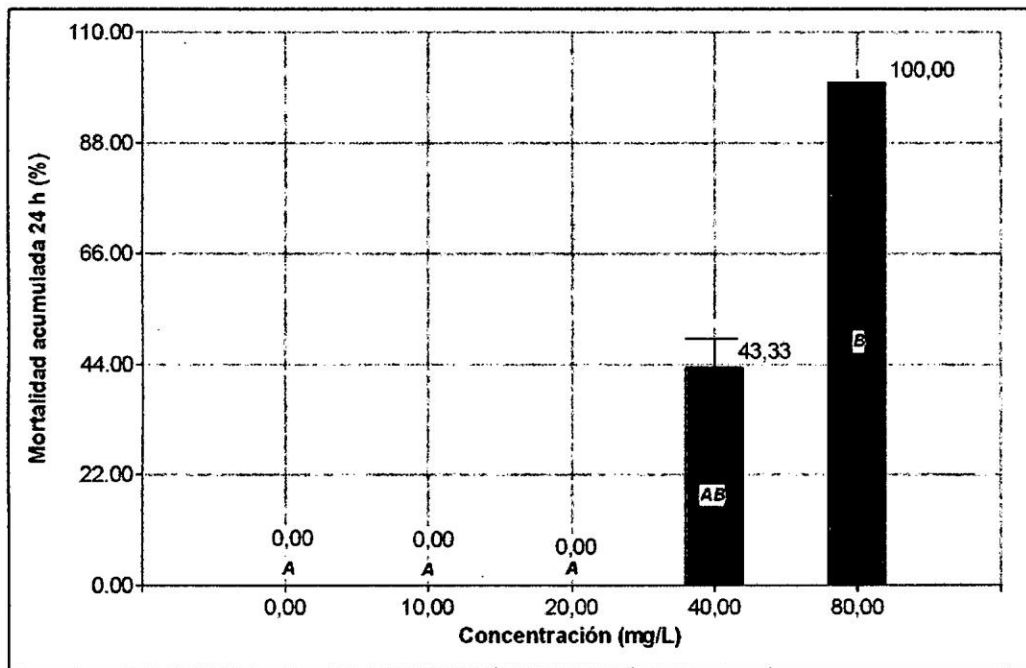
3.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron utilizados para la construcción de una matriz de datos en el software Excel, para luego ser exportados a InfoStat y MINITAB 16, a partir de los cuales se crearon tablas y figuras en los que se presentan estadísticos de tendencia central y de dispersión.

Con la finalidad de comparar las mortalidades registradas de los individuos en los doce tratamientos (tres fármacos probados en cuatro concentraciones crecientes) más un testigo, se empleó el análisis de Kruskal-Wallis, debido a que los datos no mostraron distribución normal.

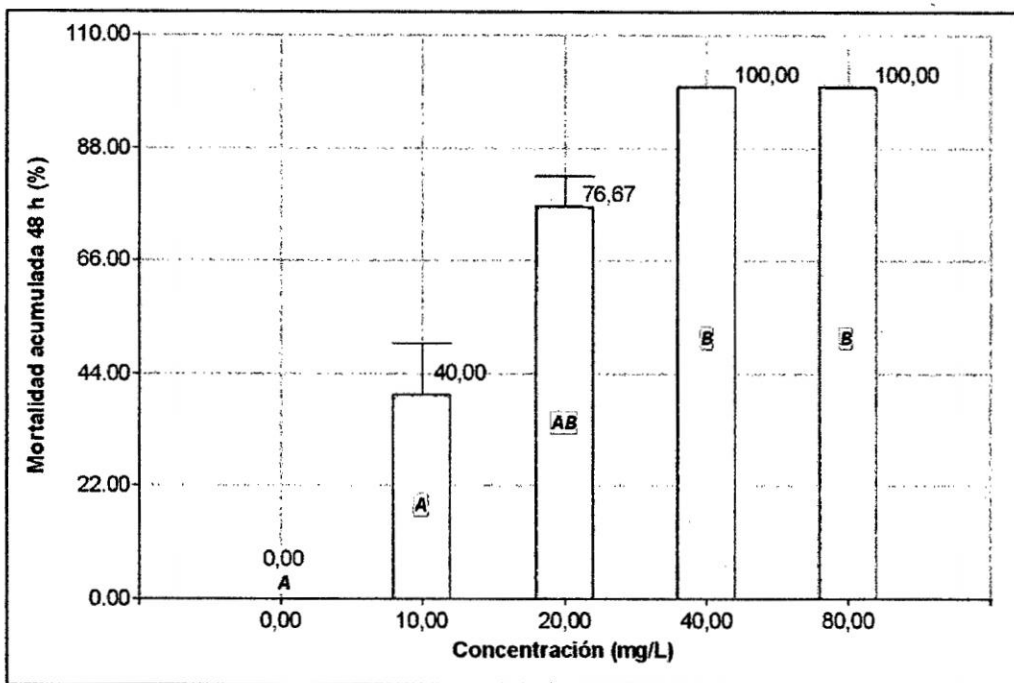
Para la estimación de la Concentración Letal Media (CL_{50}), se empleó la metodología de Probit.³⁴ Para el cual se empleó el software MINITAB 16 para realizar los análisis estadísticos señalados.

IV. RESULTADOS



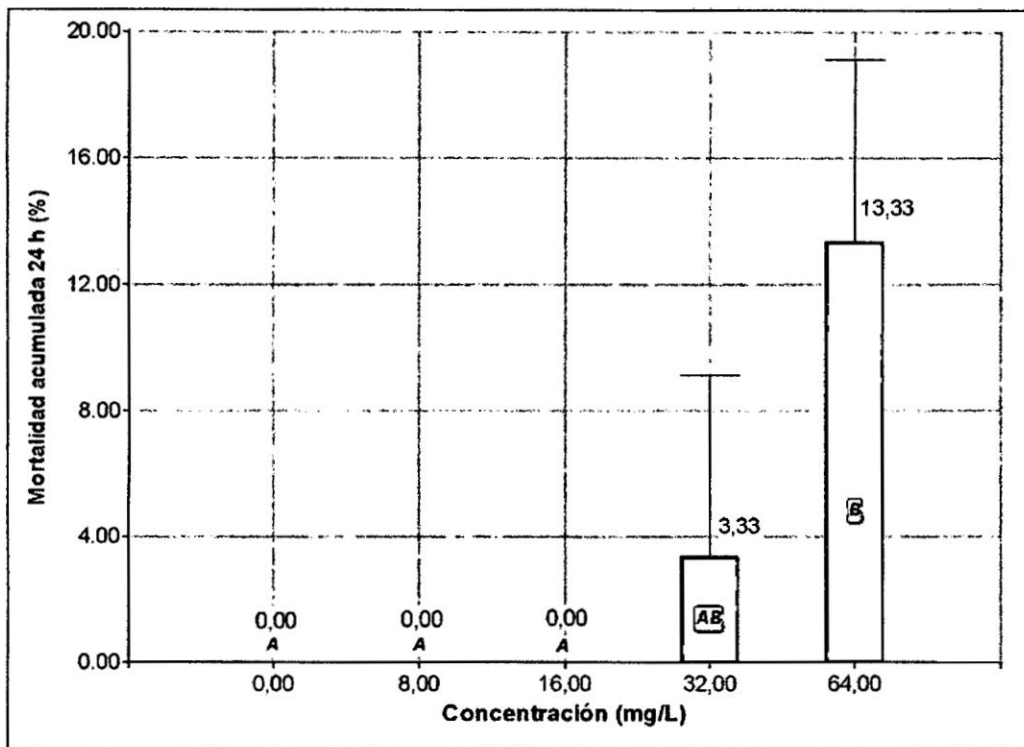
A, AB y B: Categorías asignadas por la prueba estadística

Figura 6. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco ibuprofeno. Ayacucho, 2014.



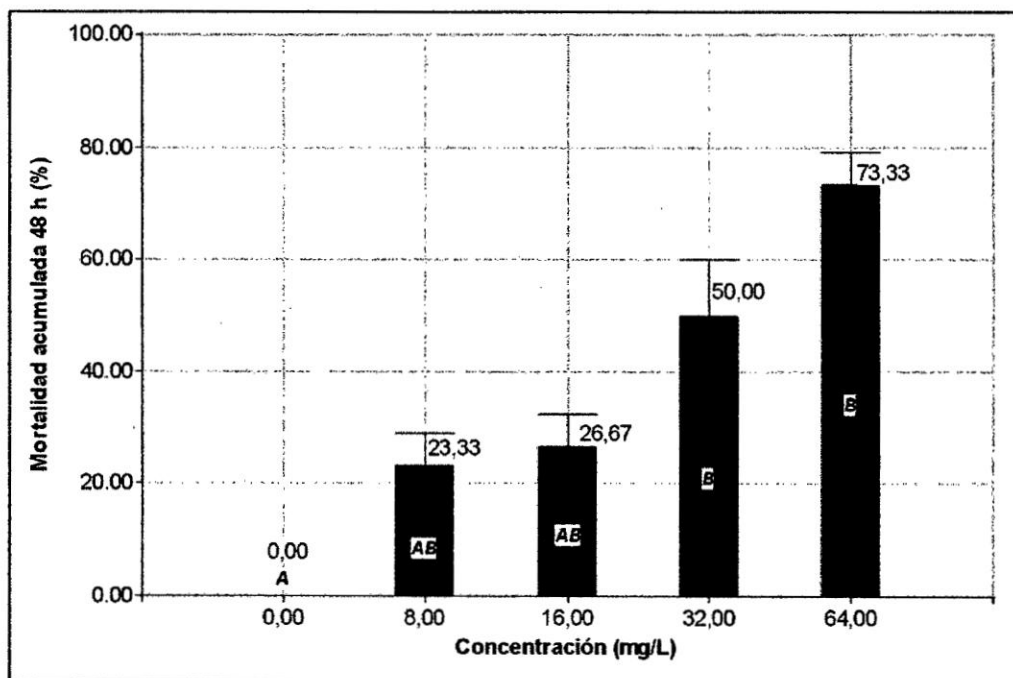
A, AB y B: Categorías asignadas por la prueba estadística

Figura 7. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco ibuprofeno. Ayacucho, 2014.



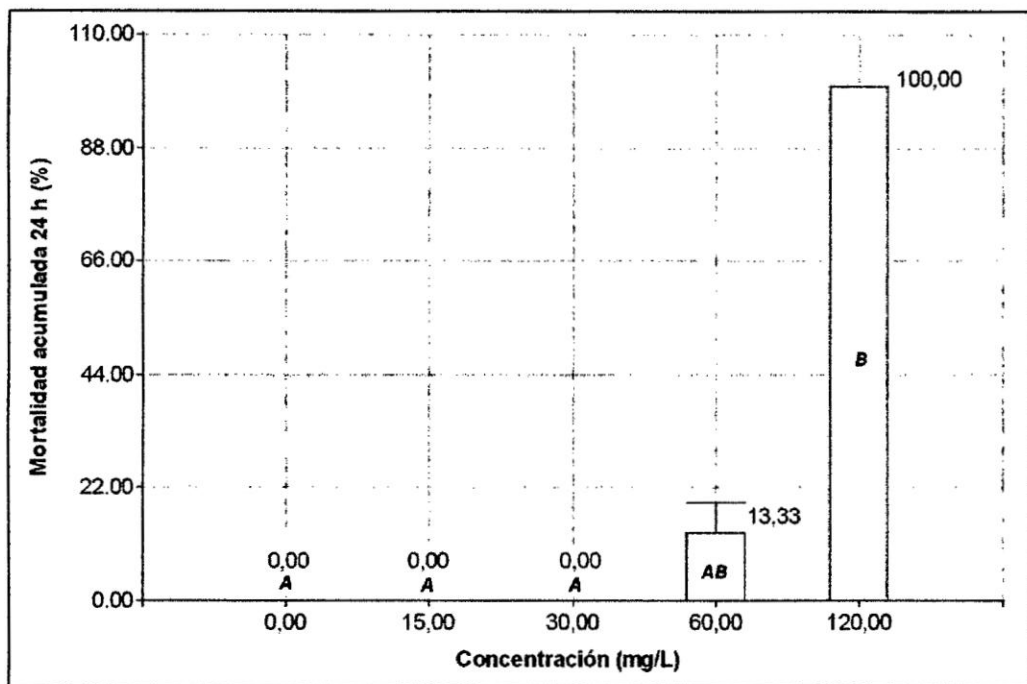
A, AB y B: Categorías asignadas por la prueba estadística

Figura 8. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco naproxeno. Ayacucho, 2014.



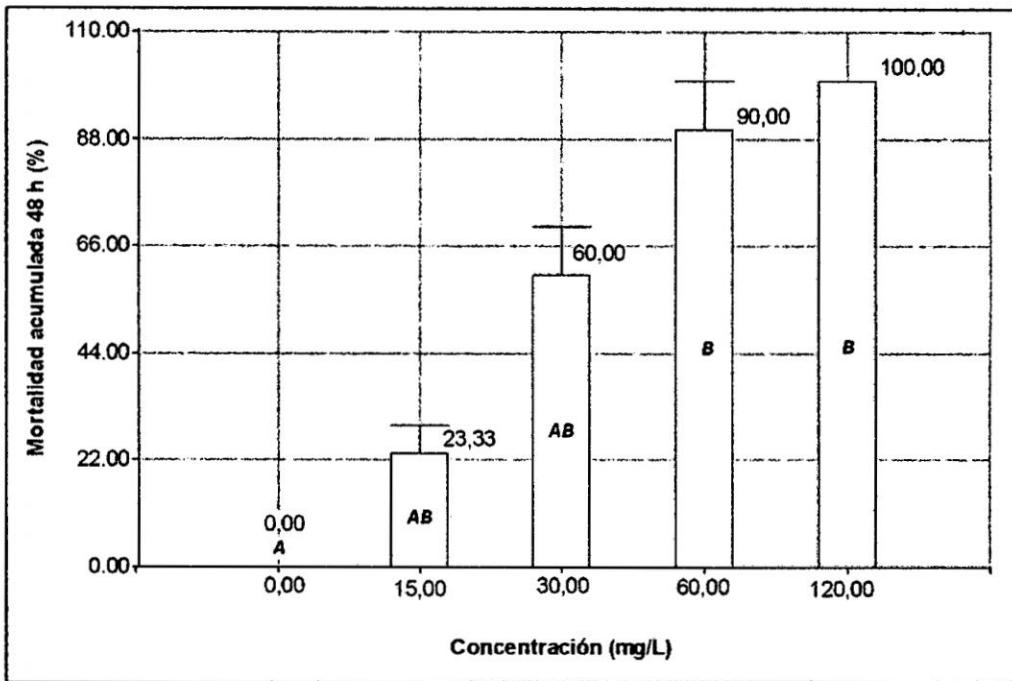
A, AB y B: Categorías asignadas por la prueba estadística

Figura 9. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco naproxeno. Ayacucho, 2014.



A, AB y B: Categorías asignadas por la prueba estadística

Figura 10. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco diclofenaco. Ayacucho, 2014.



A, AB y B: Categorías asignadas por la prueba estadística

Figura 11. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco diclofenaco. Ayacucho, 2014.

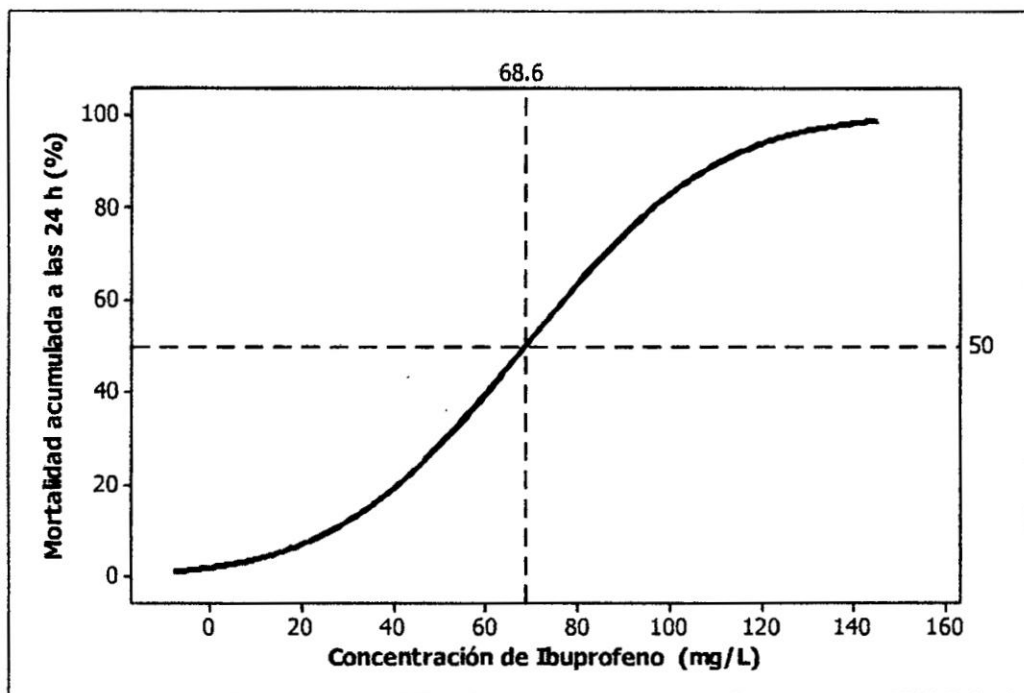


Figura 12. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco ibuprofeno y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 24 horas de exposición. Ayacucho, 2014.

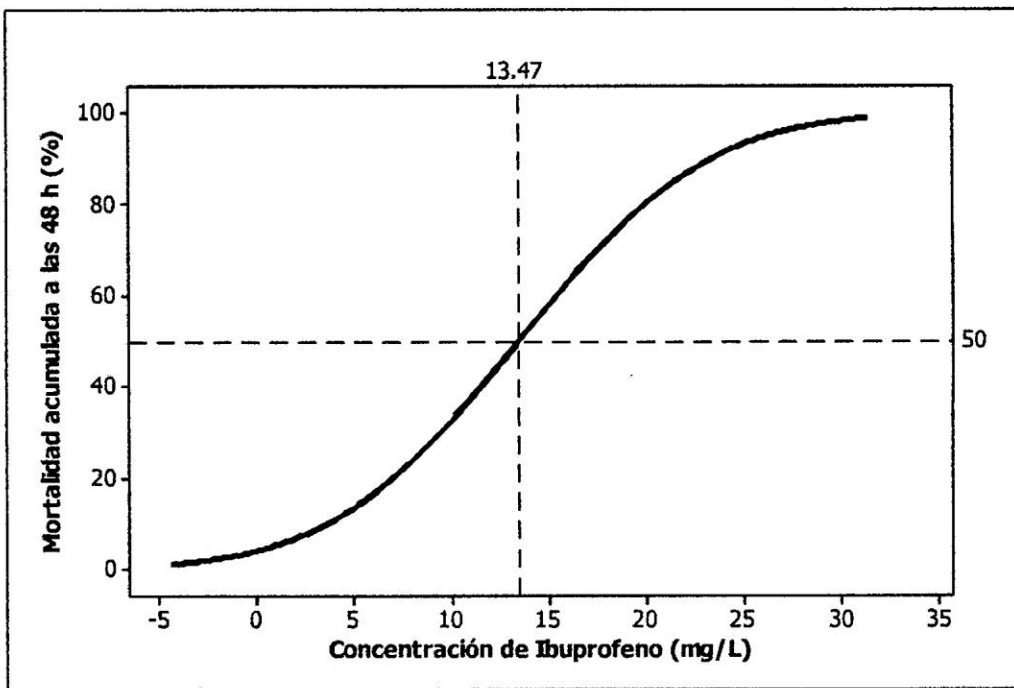


Figura 13. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco ibuprofeno y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 48 horas de exposición. Ayacucho, 2014.

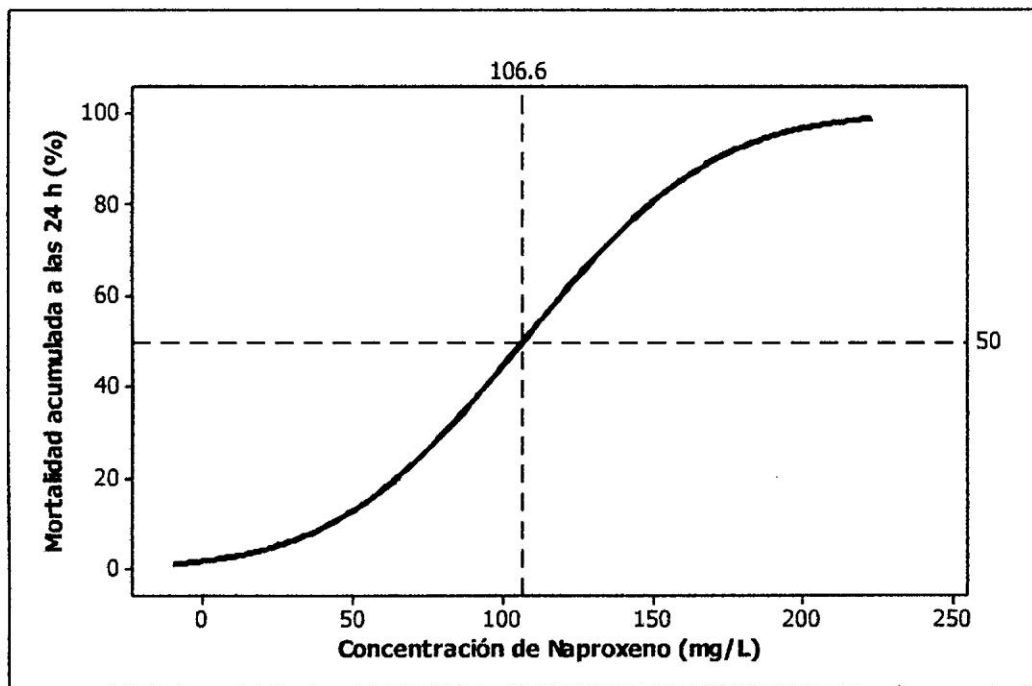


Figura 14. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco naproxeno y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 24 horas de exposición. Ayacucho, 2014.

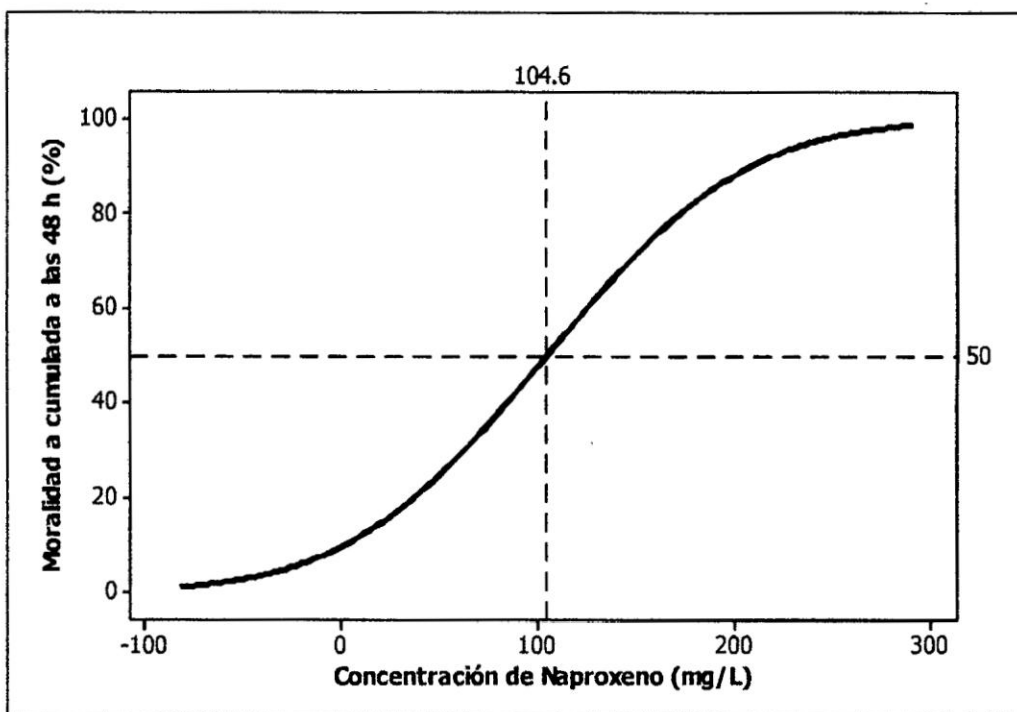


Figura 15. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco naproxeno y el valor de la concentración letal media (CL_{50}) a las 48 horas de exposición. Ayacucho, 2014.

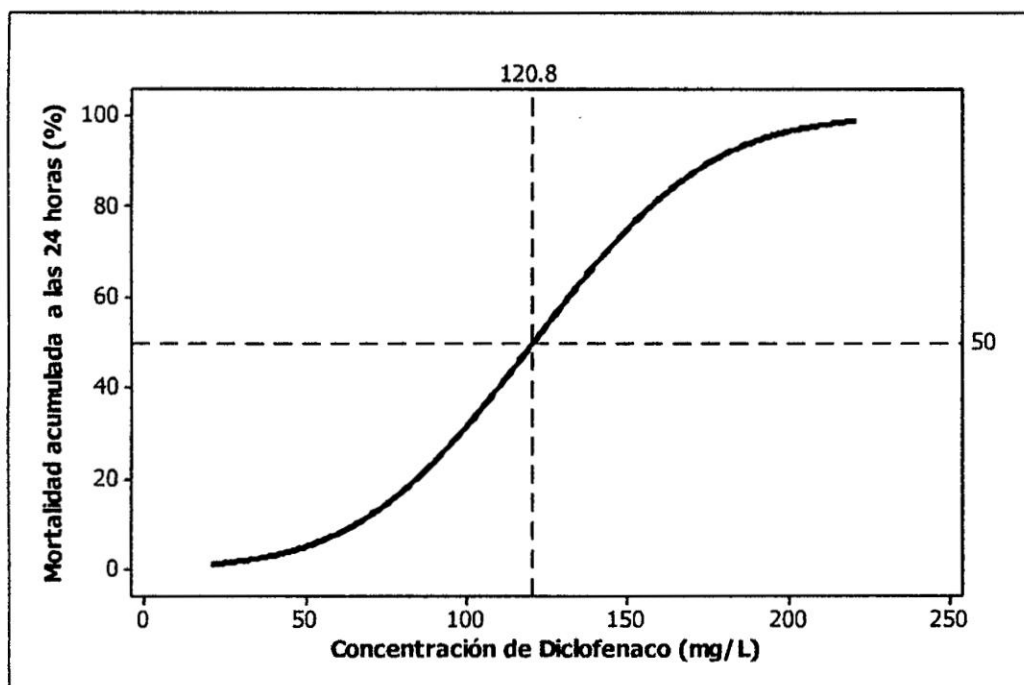


Figura 16. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco diclofenaco y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 24 horas de exposición. Ayacucho, 2014.

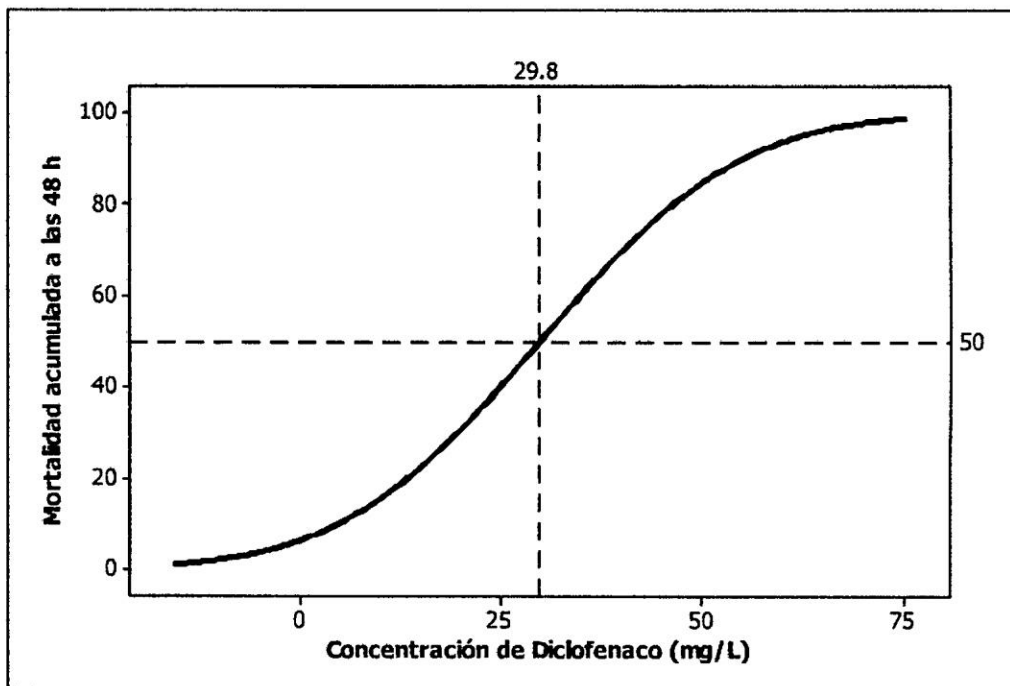


Figura 17. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco diclofenaco y el valor de la concentración letal media (CL_{50}) a las 48 horas de exposición. Ayacucho, 2014.

Tabla 6. Valores de la Concentración Letal Media (CL₅₀) y los intervalos de confianza a las 24 y 48 horas de exposición para los fármacos ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco. Ayacucho, 2014.

Tratamientos (detergentes)	Tiempo de exposición (h)	CL ₅₀ (mg/L)	Intervalo de Confianza (95%)	
			Inferior	Superior
Ibuprofeno	24	68,60	58,7566	83,6727
	48	13,47	10,7968	16,1952
Naproxeno	24	106,6	75,0996	297,636
	48	104,6	67,1679	533,18
Diclofenaco	24	120,8	104,966	147,734
	48	29,8	24,1588	35,9928

CL₅₀: Concentración Letal Media

V. DISCUSIÓN

En la Figura 6, se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, registrados a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes del fármaco ibuprofeno. Se observa que la mortalidad se incrementa a medida que las concentraciones del fármaco también se incrementan, es así que a una concentración de 10,00 y 20,00 mg/L no se registra ninguna mortalidad, mientras que para las concentraciones de 40,00 y 80,00 mg/L se registra mortalidades de 43,33% y 100,00% respectivamente; es de notar que en el testigo no se registró mortalidad, lo que indica que la mortalidad está dado por la presencia del fármaco. Al aplicar la prueba estadística de Kruskal Wallis (se realizó esta prueba debido a que los datos no mostraron distribución normal) para comparar la mortalidad acumulada registrada en las diferentes concentraciones, se halló significancia estadística ($p < 0,05$) la misma que se puede observar en la Tabla del Anexo 1, esto nos permite afirmar que los porcentajes de mortalidad registrados son diferentes en las soluciones con diferente concentración del fármaco ibuprofeno. Al realizar la categorización en función a la mortalidad registrada, se observa que las concentraciones de 10,00 y 20,00 mg/L originaron menores mortalidades, mientras que en las concentraciones de 40,00 y 80,00 mg/L generaron mayor mortalidad, siendo a la vez estos similares entre sí. Lo hallado se debe a la presencia de los metabolitos en el fármaco, estos metabolitos son poco degradables en el ambiente ocasionando una mayor capacidad de toxicidad en un sistema de un animal.^{35 36} De acuerdo a un trabajo de investigación de Davila,³⁷ realizado en organismos acuáticos, señala que el efecto de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, dañan las enzimas que protegen a las células, lo cual ocasiona que se oxiden las membranas celulares, lesionando directa o indirectamente a los lípidos de la membrana celular, destruyendo la integridad de la permeabilidad de la membrana.

En la Figura 7, se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, registrados a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes del fármaco ibuprofeno. Tal como se había señalado anteriormente se observa que la mortalidad se aumenta a medida que la concentración del fármaco aumenta, es así en el caso de la concentración de 10,00 y 20,00 mg/L se registraron mortalidades de 40,00 y 76,67% respectivamente mientras que para las concentraciones de 40,00 y 80,00 mg/L se registra mortalidades del 100%. Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis para comprar las mortalidades acumuladas de las diferentes concentraciones del Ibuprofeno, el que se muestra en el Anexo 2, se halló significancia estadística ($p < 0,05$). Lo que se interpreta que los porcentajes de mortalidad registrados son diferentes en los medios probados con diferente concentración. Al realizar la categorización en función de los valores promedios de mortalidad registrada, las concentraciones de 10,00 y 20,00 mg/L originaron menor mortalidad, mientras en mayores concentraciones del fármaco como 40,00 y 80,00 mg/L originaron mayor mortalidad, siendo a la vez similares entre sí, en este caso el porcentaje de mortalidad aumenta a menores concentraciones ya que el tiempo de exposición al que fue sometido es mayor que el anterior. También es importante resaltar que debido a la acumulación de los metabolitos en el individuo produce mayor daño, cuando mayor tiempo es expuesto. Por otro lado, la acumulación de estos metabolitos ocasionan alteraciones en el comportamiento de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, disminuyendo su movilidad y finalmente separando la epidermis de los músculos.³⁷

En la Figura 8, se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, registrados a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes del fármaco naproxeno. Se observa que la mortalidad se aumenta a medida que las concentraciones también se incrementan, así a una concentración de 8,00 y 16,00 mg/L no se registra ninguna mortalidad, mientras que para las concentraciones de 32,00 y 64,00 mg/L se registra mortalidades de 3,33% y 13,00% respectivamente; considerándose que en el testigo no se registró mortalidad alguna, lo que indica que la mortalidad está dado por la presencia del fármaco. Al aplicar la prueba estadística de Kruskal Wallis para comparar la mortalidad acumulada registrada en las diferentes concentraciones, se halló significancia estadística ($p < 0,05$) la misma que se puede observar en la Tabla del Anexo 3, nos permite afirmar que

los porcentajes de mortalidad registrados difieren según la concentración del fármaco naproxeno en las unidades experimentales. Al realizar la categorización en función de la mortalidad generada, las concentraciones de 8,00 y 16,00 mg/L originaron menores mortalidades, mientras que las concentraciones de 32,00 y 64,00 mg/L generaron mayores mortalidades, pero a la vez similares entre ellas. El resultado se debe a la presencia de los metabolitos del fármaco ya que al estar presente en el medio donde se hallan los estados inmaduros del *Rhinella spinulosa*, existe una mayor posibilidad de que sean ingeridos por éstas. Por otro lado Jiménez,⁴ menciona que los metabolitos de los fármacos no son transformados en su totalidad por lo que son eliminados a las aguas residuales y otros casos a los cuerpos de agua directamente, provocando alteraciones ambientales o bioacumulación en algunos de los niveles de la cadena trófica.

En la Figura 9, se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, registrados a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes del fármaco naproxeno. Tal como se había señalado anteriormente se observa que la mortalidad se incrementa a medida que la concentración del fármaco aumenta, es así en el caso de la concentración de 8,00 y 16,00 mg/L se registraron mortalidades de 23,33 y 26,67%, mientras que para las concentraciones de 32,00 y 64,00 mg/L se registra mortalidades de 50,0% y 73,33% respectivamente. Al realizar la prueba de Kruskal Wallis (Anexo 4), se halló significancia estadística ($p < 0,05$), lo que nos permite afirmar que los porcentajes de mortalidad registrados son diferentes en los tratamientos con diferente concentración del fármaco naproxeno. Al realizar la categorización de las concentraciones en función a la mortalidad originada, las concentraciones de 8,00 y 16,00 mg/L originaron menor mortalidad, mientras a mayores concentraciones del fármaco como 32,00 y 64,00 mg/L originaron mayores mortalidades, pero a la vez similares entre ellas. El resultado se debe a la acumulación de los metabolitos del fármaco, provocando alteraciones en el comportamiento y la fisiología de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, disminuyendo la respiración, inhibiendo los procesos asociados a la membrana celular facilitando la producción del estrés oxidativo.³⁴

En la Figura 10, se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, registrados a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes del diclofenaco. Se observa que la mortalidad aumenta a medida que las concentraciones del fármaco también se

incrementan, es así que a una concentración de 15,00 y 30,00 mg/L no se registra ninguna mortalidad, mientras que para las concentraciones de 60,00 y 120,00 mg/L se registra una mortalidad de 13,33% y 100,00% respectivamente; considerándose que en el testigo no se registró mortalidad, lo que indica que la mortalidad está dado por la presencia del fármaco. Al aplicar la prueba estadística de Kruskal Wallis para comparar la mortalidad acumulada registrada en las diferentes concentraciones, se halló significancia estadística ($p < 0,05$), la que se puede observar en la tabla del Anexo 5, esto nos permite afirmar que los porcentajes de mortalidad registrados son diferentes en las unidades experimentales, con diferente concentración del fármaco diclofenaco. Al realizar la categorización de las concentraciones en función a la mortalidad registrada, las concentraciones de 15,00 y 30,00 mg/L no originó ninguna mortalidad, mientras a concentraciones de 60,00 y 120,00 mg/L mostraron mayores mortalidades, pero a la vez similares entre ellas. El resultado descrito se debe al efecto tóxico de los metabolitos del diclofenaco ya que no son transformados en su totalidad al ser consumidos por el hombre y los animales, afectando directamente a los organismos acuáticos al ser acumulado en el medio donde habitan. Por otro lado Valdes,¹ concluye que los metabolitos posibilita la producción del estrés oxidativo (incremento del grado de lipoperoxidación y proteínas oxidadas, así como alteración de la actividad de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), como consecuencia daño a diversas biomoléculas, ocasionando finalmente la muerte.

En la Figura 11, se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, registrados a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes del fármaco diclofenaco. Tal como se había señalado anteriormente se observa que la mortalidad se incrementa a medida que la concentración del fármaco aumenta, así en las concentración de 15,00 y 30,00 mg/L se registraron mortalidades de 23,33 y 60,00%, mientras para las concentraciones de 60,00 y 120,00 mg/L se registra mortalidades de 90,00% y 100,00% respectivamente. Al realizar la prueba de Kruskal Wallis para comprar las mortalidades acumuladas de las diferentes concentraciones del fármaco diclofenaco, se halló significancia estadística ($p < 0,05$), la misma que se puede observar en la tabla del Anexo 6. Esto nos permite afirmar que los porcentajes de mortalidad registrados son diferentes en las unidades experimentales, del mismo modo se puede observar la

categorización de las concentraciones en función a la mortalidad originada, donde la concentración de 15,00 y 30,00 mg/L originaron menor mortalidad y a concentraciones de 60,00 y 120,00 mg/L mostraron mayores mortalidades, pero a la vez similares entre ellas. Como ya se mencionó anteriormente los resultados hallados se debe a la presencia de metabolitos del fármaco, en este caso se observa que el porcentaje de mortalidad aumenta a menores concentraciones mientras más transcurre el tiempo, esto se debe a la acumulación de los metabolitos en el individuo, por lo que produce más daño cuando a mayor tiempo es expuesto, Por otro lado de acuerdo a la clasificación de peligro ambiental y valoración de riesgo de ingredientes farmacéuticos en Suecia, el diclofenaco está clasificado como peligroso para el ambiente y se considera además potencialmente bioacumulable.^{38 39}

En la Figura 12, se muestra la tendencia de mortalidad acumulada teórica de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco ibuprofeno y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 24 horas de exposición. Se observa que la mortalidad se incrementa a medida que la concentración del fármaco también se incrementa. También se observa que a una concentración de 68,6 mg/L del fármaco, teóricamente el 50% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a la acción de ibuprofeno, mueren a las 24 horas de exposición. Por otro lado, en el Anexo 7, se muestra los valores de las concentraciones letales medias, que causan mortalidades que van desde el 1% al 99% calculados según la técnica estadística de Probit.³⁴ En las tablas señaladas también se puede apreciar que para poder generar una mortalidad de 99% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, sería necesario someterla a soluciones con concentraciones de 145,061 mg/L durante 24 horas.

En la Figura 13, se muestra la tendencia de mortalidad acumulada teórica de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco ibuprofeno y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 48 horas de exposición. Al igual como en el caso anterior, se observa que son mínimas las mortalidades a menores concentraciones del fármaco, hasta llegar a valores entre 5 y 10 mg/L donde se incrementa notablemente. También se observa que a una concentración de 13,47 mg/L del fármaco, teóricamente el 50% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a la acción de ibuprofeno, mueren a las 48 horas de exposición. Como también, en el Anexo 8,

se muestra los valores de las concentraciones letales medias, que causan mortalidades que van desde el 1% al 99% calculados según la técnica estadística de Probit.³⁴

En la Figura 14, se muestra la tendencia de mortalidad acumulada teórica de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco Naproxeno y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 24 horas de exposición. Se observa que la mortalidad aumenta a medida que la concentración del fármaco también se incrementa. Se observa también que a una concentración de 106,6 mg/L del fármaco, teóricamente el 50% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a la acción de ibuprofeno, mueren a las 24 horas de exposición. Por otro lado, en el Anexo 9, se muestra los valores de las concentraciones letales medias, que causan mortalidades que van desde el 1% al 99% calculados según la técnica estadística de Probit.³⁴ En las tablas señaladas también se puede apreciar que para poder generar una mortalidad de 99% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, sería necesario someterla a soluciones con concentraciones de 222,687 mg/L durante 24 horas.

En la Figura 15, se muestra la tendencia de mortalidad acumulada teórica de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco Naproxeno y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 48 horas de exposición. Se observa que la mortalidad va incrementando notablemente, de acuerdo al incremento de las concentraciones. También se observa que a una concentración de 104,6 mg/L del fármaco, teóricamente el 50% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a la acción de Ibuprofeno, mueren a las 48 horas de exposición. Por otro lado, en el Anexo 10, se muestra los valores de las concentraciones letales medias, que causan mortalidades que van desde el 1% al 99% calculados según la técnica estadística de Probit.³⁴ En la tabla señalada se puede apreciar que para poder generar una mortalidad de 99% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, es necesario someterla a soluciones con concentraciones de 290,858 mg/L durante 48 horas.

En la Figura 16, se muestra la tendencia de mortalidad acumulada teórica de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco diclofenaco y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 24 horas de exposición. Se observa que la mortalidad se incrementa a medida que

La concentración del fármaco aumenta. También se observa que a una concentración de 120,8 mg/L del fármaco, teóricamente el 50% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a la acción de naproxeno, mueren a las 24 horas de exposición. Por otro lado, en el Anexo 11, se muestra los valores de las concentraciones letales medias, que causan mortalidades que van desde el 1% al 99% calculados según la técnica estadística de Probit.³⁴ En las tablas señaladas también se puede apreciar que para poder generar una mortalidad de 99% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, sería necesario someterla a soluciones con concentraciones de 220,846 mg/L durante 24 horas.

En la Figura 17, se muestra la tendencia de mortalidad acumulada teórica de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco naproxeno y el valor de la concentración letal media (CL_{50}) a las 48 horas de exposición. Se observa que la mortalidad se aumenta a medida que la concentración del fármaco también se incrementa. También se observa que a una concentración de 29,8 mg/L del fármaco, teóricamente el 50% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a la acción de naproxeno, mueren a las 48 horas de exposición. Por otro lado, en el Anexo 12, se muestra los valores de las concentraciones letales medias, que causan mortalidades que van desde el 1% al 99% calculados según la técnica estadística de Probit.³⁴ En la tabla mencionada también se puede apreciar que para poder generar una mortalidad de 99% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, es necesario someterla a soluciones con concentraciones de 75,3401 mg/L durante 48 horas.

En la Tabla 6, se muestra los valores de las concentraciones letales medias (CL_{50}) con sus intervalos de confianza a las 24 y 48 horas de exposición para los fármacos ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco. De acuerdo a los valores hallados se puede apreciar que a mayor horas de exposición, la concentración letal media (CL_{50}) disminuye en los tres fármacos, así para ibuprofeno a las 24 y 48 horas, el CL_{50} es de 68,60 mg/L y 13,47 mg/L respectivamente; para naproxeno se registró valores de 106,6 y de 104,6 mg/L para las 24 y 48 horas de exposición y finalmente para el diclofenaco se registró valores de 120,8 y 29,8 mg/L para las 24 y 48 horas de exposición. Los resultados hallados son congruentes con lo manifestados anteriormente, esto se justifica por el hecho de que cuando menor sea el valor de la CL_{50} , mayor toxicidad origina; también es de resaltar que, a medida que el tiempo de exposición se incrementa, los valores de la CL_{50} disminuyen (esta tendencia se observa en los tres fármacos), lo que

se interpreta que, cuanto más es el tiempo de exposición a una sustancia tóxica, mayor efecto tóxico causará.

VI. CONCLUSIONES

1. Los porcentajes de mortalidad registrados para cada fármaco fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$), según la concentración de los fármacos en las unidades experimentales, los porcentajes de mortalidad registrados fue aumentando a medida que la concentración y el tiempo de exposición se incrementa, tal es el caso para el fármaco ibuprofeno donde se registró mortalidades de 40,00%; 76,67% y 100,00%, para el naproxeno se registró 23,33%; 26,67%; 50,00% y 73,33% y finalmente para el diclofenaco se registró 23,33%; 60,00%; 90,00% y 100,00% % a las 48 horas de exposición.
2. La concentración letal media hallada para el fármaco ibuprofeno fueron de 68,60 mg/L y 13,47 mg/L, para naproxeno de 106,6 mg/L y 104,6 mg/L, y finalmente para diclofenaco de 120,8 mg/L y 29,8 mg/L a las 24 y 48 horas de exposición respectivamente.
3. La mortalidad generada fue menor a las 24 horas, mientras a las 48 horas fue incrementándose en los tres fármacos estudiados, al hacer la comparación en las concentraciones se halló que la concentración letal (CL_{50}) media tienden a disminuir a medida que el tiempo de exposición al tóxico se incrementa.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar trabajos de investigación en el cual se determine los efectos crónicos o subletales en los organismos acuáticos, ya que por lo general las concentraciones de los fármacos en un medio no alcanzan grandes concentraciones, sin embargo son persistentes en el tiempo.
2. Evaluar los efectos agudos de los medicamentos para ser calificado como tóxico y ser incorporados a la normativa ambiental.
3. Realizar estudios abarcando otros componentes de la fauna acuática presente en los ríos, incidiendo en comunidades y poblaciones que podrían servir como indicadores de la calidad de agua.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valdes Alanis A. Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco sobre *Daphnia magna*. [Internet]. Mexico. Junio 2009. [acceso 4 de setiembre 2014]. Disponible en: <http://tesis.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/8067/1/EVALTOX.pdf>.
2. Filho R.W.R., Barreiro J.C., Vieira E.M., Cass Q.B. Fármacos, ETEs e corpos hídricos. *Ambi-Agua, Taubate* [revista en internet]. 2007 [acceso 10 de setiembre de 2014]; 2(3): [54-61]. Disponible en: <http://www.ambi-agua.net/seer/index.php/ambi-agua/article/viewFile/68/268>.
3. Iannacone J, Alvaríño L. Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*. *Ecología Aplicada* [revista en internet]. 2009 [acceso 25 de setiembre de 2014]; 8(1-2) [71-80]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v8n1-2/a09v8n1-2.pdf>.
4. Jiménez Cartagena C. Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmaceuticos. *Revista Lasallista de Investigacion*. [revista en internet]. 2011 julio-diciembre; [acceso 10 de setiembre de 2014]; 8(2). [143-153]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69522607016>.
5. Borgmann U, Bennie DT, Ball AL, Palabrica V. Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations. *Chemosphere*. [revista en internet]. 2007 jan [acceso 12 de setiembre de 2014]; 66(7): [1278-83]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16942787>.
6. Heckmann L-H, Callaghan A, Hooper HL, Connon R, Hutchinson TH, Maund SJ, Sibly RM. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters*. [revista en internet]. 2007 Agosto; [acceso 12 de setiembre de 2014]; 172(3): [137-145]. Disponible en: http://www.researchgate.net/publication/6181198_Chronic_toxicity_of_ibuprofen_to_Daphnia_magna_effects_on_life_history_traits_and_population_dynamics_Toxicol_Lett.
7. Elorriaga Y, Marino DJ, Carriquiriborde P, Ronco AE. Contaminantes emergentes: productos farmacéuticos en el medio ambiente. [Internet]. Argentina: Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM; 22 al 24 de mayo de 2012 [acceso 22 de setiembre de 2014]. Disponible en: Available from: <http://www.congresos.unlp.edu.ar/index.php/CCMA/7CCMA/paper/viewFile/932/216>.
8. Gómez OM, Razo Estrada Amparo C, Neri Cruz N, García Medina S. Evaluación de la lipoperoxidación producida por el paracetamol adicionado a sedimentos artificiales sobre *Hyalella azteca*. [Internet]. Mexico. Congreso Internacional de QFB 18-19 de setiembre 2009. [acceso 15 de setiembre de 2014]. Disponible en: [file:///C:/Users/Marisol/Downloads/TL31%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/Marisol/Downloads/TL31%20(4).pdf).
9. García Salazar B, Hernández Moreno D, Soler Rodríguez F, Pérez López M. Empleo de ivermectina como parasiticida en ovino: posibles efectos tóxicos y repercusiones ambientales. *AN. VET. (MURCIA)*. [revista en internet]. 2011 [acceso 18 de agosto de 2014]; 27: [23-32]. Disponible en: <http://revistas.um.es/analesvet/article/view/160111/139771>.
10. Oviedo-Gómez DG, Galar-Martínez M, García-Medina S, Razo-Estrada C, Gómez-Oliván LM. Diclofenac-enriched sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environ Toxicol Pharmacol*. [revista en internet]. 2010 jan;

- [acceso 30 de setiembre de 2014]; 29(1): [39-43]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21787580>.
11. Flórez Beledo J, Armijo Simón JA, Mediavilla Martínez A, Farmacología humana. 5ª ed. Barcelona. M.a.s.s.o.n 2008.
 12. Hall Ramírez V, Murillo Porras N, Rocha Palma M, Rodríguez Vega E. Antiinflamatorios no esteroidales (AINE'S). [Internet]. Costa Rica. Centro de información de medicamentos 2001; [acceso 28 de setiembre de 2014]; Disponible en: <http://sibdi.ucr.ac.cr/boletinespdf/cimed18.pdf>.
 13. Gutiérrez JB, Salsamendi AL de C. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. [Internet]. Madrid (España). Ediciones Díaz de Santos; 2001. [acceso 22 de setiembre de 2014]; Disponible en: <http://www.editdiazdesantos.com/wwwdat/pdf/9788479784720.pdf>.
 14. Mencías Rodríguez E, Mayero Franco L. M., Manual de toxicología básica. [Internet]. Madrid. Ediciones Díaz de Santos; 2000. [acceso 10 de setiembre de 2014]; Disponible en: <http://www.editdiazdesantos.com/libros/mencias-rodriguez-emilio-manual-de-toxicologia-basica-L03004360101.html>.
 15. Benavides A, Veloso A, Mendez M. Assimilation efficiency in *Bufo spinulosustadpoles* (Anura: Bufonidae): effects of temperature, diet quality and y geográfic origin . Rev Chil Hist Nat. [revista en internet]. 2005; [acceso 29 de setiembre de 2014]; 78 (2): [295-302]. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=s0716-078x2005000200013&script=sci_arttext.
 16. P. Fraile, J. A. Pérez de Ciriza, I. Sáiz Martín, M. Izu, E. González Peñas, J. L. Rodrigo Inchusta. Organic pollutant residues of different origins in Navarra An. Sist. Sanit. Navar. [revista en internet] 2005 mayo-agosto; [acceso 12 de setiembre de 2014]; 28(2): [247-256]. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v28n2/salud2.pdf>.
 17. Fent K, Weston AA, Caminada D. THE EMBRYOTOXIC EFFECTS OF BETA BLOCKER ATENOLOL ON SEA URCHIN *Arbacia lixula* EMBRYOS. Fresenius Environmental Bulletin [revista en internet] 2012. [acceso 11 de setiembre de 2014]; 21(11b). Disponible en: http://www.academia.edu/5297452/THE_EMBRYOTOXIC_EFFECTS_OF_BETA_BLOCKER_ATENOLOL_ON_SEA_URCHIN_Arbacia_lixula_EMBRYO_S.
 18. Jones OH, Voulvoulis N, Lester JN. Potential Ecological and Human Health Risks Associated With the Presence of Pharmaceutically Active Compounds in the Aquatic Environment. Critical Reviews in Toxicology. [revista en internet]. 2004. [acceso 11 de agosto de 2014]; 34(4): [335-350]. Disponible en: http://www.tandfonline.com/toc/itxc20/28/4#.Ve8HYBF_Oko.
 19. Gurr C.J, and Reinhard M. Harnessing natural attenuation of pharmaceuticals and hormones in rivers, Environmental Science & Technology. [revista en internet]. 2006 May. [acceso 23 de setiembre de 2014]. 40(9): [2872-6]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/genesygentes/de-dar-de-beber-y-tomar-las-aguas-a-evitar-algunas-aguas>.
 20. Manahan SE. Introducción a la química ambiental. [Internet]. Universidad Nacional Autonoma de Mexico. Ing. María del Carmen Duran Dominguez de Bazúa. Reverte ediciomes, 2006. [acceso 30 de setiembre de 2014] Disponible en: http://www.researchgate.net/publication/31774235_Introduccion_a_la_quimica_ambiental__S.E._Manahan__prl._de_M.C._Durn_Domnguez_de_Baza__tr._por_lvette_Mora_Leyva.

21. Nentwig G. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: the antidepressant drug fluoxetine. Arch Environ Contam Toxicol. [revista en internet]. 2007 Feb. [acceso 3 de agosto de 2014]. 52(2): [163-70]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160491>.
22. Bejarano PF. Ibuprofeno y analgesia. [internet]. Volumen 5. Ed. Esp; 2006 Enero-Febrero. [acceso 05 de setiembre de 2014]; Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/reumatologia/propiedades_del_ibuprofen.pdf.
23. Dagnino Sepúlveda J, Gonzales Arellano A. Analgesicos Narcoticos. Esc. de Medicina, P. Universidad Católica de Chile. [revista en internet]. 1994; [acceso 11 de setiembre de 2014]; 23(3): [159-163]. Disponible en: http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/boletin/html/dolor/3_5.html.
24. Consejo de salubridad. Cuadro basico y catálogo de Medicamentos. [Internet] Mexico. 2009. [acceso 19 de setiembre de 2014; Available from: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/138.HTM. Disponible en: http://www.who.int/selection_medicines/country_lists/Mexico_medicamentos_2009.pdf.
25. Ministerio de Salud. Formulario nacional de medicamentos esenciales [internet]; Direccion General de Medicamentos, Insumos y drogas-DIGEMID. 2011. [acceso 21 de setiembre de 2014]; Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s20159es/s20159es.pdf>.
26. Jiménez López G, Debesa García F, Bastanzuri Villares T, Julián Pérez Peña J, y Ávila Pérez J. Comportamiento de las reacciones adversas a los analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos notificadas por el Sistema Cubano de Farmacovigilancia. Rev Cubana Farm. [revista en internet]. 2003 sep-dic. [acceso 01 de setiembre de 2014]; 37(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152003000300005.
27. Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Jover R. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. Biochem Pharmacol. [revista en internet] 2003 Dec. [acceso 01 de agosto de 2014]; 1;66(11): [1255-67] Disponible <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609740>.
28. González González ED "Evaluación de la toxicidad inducida por antiinflamatorios no esteroideos presentes en agua de la presa madín sobre *Cyprinus carpio*" [Internet]. Mexico 2013. [acceso 29 de setiembre de 2014]; Disponible en: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/123456789/13918/1/419543.pdf>.
29. Galar-Martínez M., Gómez-Oliván L, Amaya-Chávez, Razo-Estrada A.C, GarcíaMedina S. Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco adicionado al agua sobre *Daphnia magna* [Internet]. Mexico: 2004, [acceso 21 de agosto de 2014]. Disponible en: http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos_anexo/20080580_5968.pdf.
30. Gerald Durrell, Lee Durrell La guía del naturalista. [Internet]. Londres: Stephe Panrker; 1982, [acceso 21 de setiembre de 2014]. Disponible en : 20 Catálogo Universal de Servicios De Salud.14]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=_cdhOvswkI8C&pg=PA4&lpg=PA4&q=La+gu%C3%ADa+del+naturalista.+Fotocomposici%C3%B3n+Fernandez+Ciudad&source=bl&ots=sn3Mh0A.
31. Länge R, Dietrich D. Environmental risk assessment of pharmaceutical drug susstances-conceptual considerations. Toxicol Lett. [revista en internet] 2002

- May [acceso 05 de setiembre de 2014]; 10;131(1-2): [97-104].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988362>.
32. Isariebel Quesada Peñate, Ulises Javier Jauregui Haza, Anne- Marie Wilhem y Henri Delmas. Contaminacion de las aguas con productos farmaceuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. CENIC Ciencias Biologicas. [revista en internet]. 2009 mayo; [acceso 05 de setiembre de 2014]; 40(3). Disponible en:
<http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/Articulo%20No%205%20B36%20-%2008%20pp173-179.pdf>.
 33. Garcia Galan MJ. Estudio de la presencia y comportamiento de las sulfamidias en el medio ambiente. [Internet]. Barcelona 2012 diciembre. [acceso 10 de agosto de 2014]. Disponible en:
[file:///C:/Users/Marisol/Downloads/MJGG_TESIS%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Marisol/Downloads/MJGG_TESIS%20(2).pdf).
 34. Martel PJ, Vegas FJD. Probabilidad y estadística matemática: aplicaciones en la práctica clínica y en la gestión sanitaria. [Internet] Díaz de Santos, S.A. España: 1997. [acceso 29 de setiembre de 2014]; Disponible en:
https://scholar.google.es/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=r89niD4AAAAJ&citation_for_view=r89niD4AAAAJ:35N4QoGY0k4C.
 35. Halling-Sørensen B¹, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC, Jørgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment--a review. Chemosphere. [revista en internet]. 1998 Enero; [acceso 11 de setiembre de 2014]; 36(2): [357-93]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9569937>.
 36. Yanira Henriquez V. PRESENCIA DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS Y SU IMPACTO EN EL ECOSISTEMA. ESTUDIO DE CASO: PRODUCTOS FARMACÉUTICOS EN LA CUENCA DEL RIO BIOBÍO, REGION DEL BIOBÍO, CHILE. [Internet]. Santiago de Chile. 2002 Enero; [acceso 10 de setiembre de 2014]. Disponible en http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2012/cf-henriquez_dv/pdfAmont/cf-henriquez_dv.pdf.
 37. Dávila R. Fármacos antiinflamatorios provocan efectos tóxicos en organismos acuáticos. [Internet]. México. 2010 junio. [acceso 20 de agosto 2014]. Disponible en:
<https://journalmex.wordpress.com/2010/06/11/farmacos-antiinflamatorios-provocan-efectos-toxicos-en-organismos-acuaticos/>
<https://jantiinflamatorprovocan-efectos-toxicos-en-organismos-acuaticos/>.
 38. Carlsson C, Johansson AK, Alvan G, Bergman K, Kühler T. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. Sci Total Environ. [revista en internet]* 2006 Jul; [acceso 23 de setiembre de 2014]; 1;364(1-3): [67-87]. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257037>.
 39. Escher BI, Pronk W, Suter MJ, Maurer M. Monitoring the removal efficiency of pharmaceuticals and hormones in different treatment processes of source-separated urine with bioassays. Environ Sci Technol. [revista en internet] 2006 Aug.; [acceso 10 de setiembre de 2014]; 15;40(16): [5051-101]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16955913>.

ANEXOS

Anexo 1

Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a cuatro concentraciones crecientes del fármaco ibuprofeno registrados a las 24 horas de exposición.

Variable	Concentración (mg/L)	N	Medias	D.E.	H	p
Mortalidad acumulada 24 h.	0,00	2	0	0	10,37	0,0118
Mortalidad acumulada 24 h.	10,00	3	0	0		
Mortalidad acumulada 24 h.	20,00	3	0	0		
Mortalidad acumulada 24 h.	40,00	3	43,33	5,77		
Mortalidad acumulada 24 h.	80,00	3	100,00	0		

Trat.	Ranks		
0,00	4,5	A	
10,00	4,5	A	
20,00	4,5	A	
40,00	10,0	A	B
80,00	13,0		B

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

Anexo 2

Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a cuatro concentraciones crecientes del fármaco ibuprofeno registrados a las 48 horas de exposición.

Variable	Concentración (mg/L)	N	Medias	D.E.	H	p
Mortalidad acumulada 48 h.	0,00	2	0	0	11,74	0,0124
Mortalidad acumulada 48 h.	10,00	3	40,00	10,00		
Mortalidad acumulada 48 h.	20,00	3	76,67	5,77		
Mortalidad acumulada 48 h.	40,00	3	100,00	0		
Mortalidad acumulada 48 h.	80,00	3	100,00	0		

Trat.	Ranks		
0,00	1,5	A	
10,00	4,0	A	
20,00	7,0	A	B
40,00	11,5		B
80,00	11,5		B

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

Anexo 3

Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a cuatro concentraciones crecientes del fármaco naproxeno registrados a las 24 horas de exposición.

Variable	Concentración (mg/L)	N	Medias	D.E.	H	p
Mortalidad acumulada 24 h.	0,00	2	0	0	6,41	0,0372
Mortalidad acumulada 24 h.	8,00	3	0	0		
Mortalidad acumulada 24 h.	16,00	3	0	0		
Mortalidad acumulada 24 h.	32,00	3	3,33	5,77		
Mortalidad acumulada 24 h.	64,00	3	13,33	5,77		

Trat.	Ranks		
0,00	5,50	A	
8,00	5,50	A	
16,00	5,50	A	
32,00	7,67	A	B
64,00	12,67		B

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

Anexo 4

Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a cuatro concentraciones crecientes del fármaco naproxeno registrados a las 48 horas de exposición.

Variable	Concentración (mg/L)	N	Medias	D.E.	H	p
Mortalidad acumulada 48 h.	0,00	2	0	0	11,83	0,0167
Mortalidad acumulada 48 h.	8,00	3	23,33	5,77		
Mortalidad acumulada 48 h.	16,00	3	26,67	5,77		
Mortalidad acumulada 48 h.	32,00	3	50,00	10,00		
Mortalidad acumulada 48 h.	64,00	3	73,33	5,77		

Trat.	Ranks		
0,00	1,5	A	
8,00	5,0	A	B
16,00	6,0	A	B
32,00	10,0		B
64,00	13,0		B

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

Anexo 5

Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a cuatro concentraciones crecientes del fármaco diclofenaco registrados a las 24 horas de exposición.

Variable	Concentración (mg/L)	N	Medias	D.E.	H	p
Mortalidad acumulada 24 h.	0,00	2	0	0	10,37	0,0118
Mortalidad acumulada 24 h.	15,00	3	0	0		
Mortalidad acumulada 24 h.	30,00	3	0	0		
Mortalidad acumulada 24 h.	60,00	3	13,33	5,77		
Mortalidad acumulada 24 h.	120,00	3	100,00	0		

Trat.	Ranks		
0,00	4,5	A	
15,00	4,5	A	
30,00	4,5	A	
60,00	10,0	A	B
120,00	13,0		B

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

Anexo 6

Prueba de Kruskal-Wallis para comparar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a cuatro concentraciones crecientes del fármaco diclofenaco registrados a las 48 horas de exposición.

Variable	Concentración (mg/L)	N	Medias	D.E.	H	p
Mortalidad acumulada 48 h.	0,00	2	0	0	12,09	0,0145
Mortalidad acumulada 48 h.	15,00	3	23,33	5,77		
Mortalidad acumulada 48 h.	30,00	3	60,00	10,00		
Mortalidad acumulada 48 h.	60,00	3	90,00	10,00		
Mortalidad acumulada 48 h.	120,00	3	100,00	0		

Trat.	Ranks		
0,00	1,5	A	
15,00	4,0	A	B
30,00	7,0	A	B
60,00	10,5		B
120,00	12,5		B

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

- Anexo 7

Percentiles (concentración letal media en mg/L) de fármaco ibuprofeno sometidas a las 24 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.

Porcentaje	Percentil	Error estándar	95,0% Fiducial CI	
			Inferior	Superior
1	-7,85279	10,585	-37,9612	8,24065
2	1,10633	9,23812	-24,8655	15,3173
3	6,7906	8,41574	-16,6224	19,8729
4	11,0667	7,81934	-10,4674	23,3459
5	14,5449	7,35191	-5,49765	26,2077
6	17,5054	6,96915	-1,29932	28,6753
7	20,1012	6,64699	2,35335	30,8674
8	22,4255	6,37082	5,59764	32,8563
9	24,5393	6,13112	8,52355	34,6898
10	26,485	5,92132	11,1934	36,4011
20	40,9436	4,81363	30,0266	50,1227
30	51,3692	4,70567	42,0159	61,6077
40	60,2775	5,12594	51,0669	72,6147
50	68,6039	5,8576	58,7566	83,6727
60	76,9303	6,81037	65,9609	95,2162
70	85,8386	7,98501	73,338	107,897
80	96,2643	9,48488	81,7111	122,998
90	110,723	11,6948	93,058	144,206
91	112,669	11,9998	94,5696	147,076
92	114,782	12,3327	96,2086	150,196
93	117,107	12,7005	98,0072	153,631
94	119,702	13,1133	100,012	157,471
95	122,663	13,5863	102,294	161,855
96	126,141	14,1449	104,969	167,011
97	130,417	14,8353	108,251	173,357
98	136,102	15,7585	112,603	181,804
99	145,061	17,2239	119,441	195,138

Anexo 8

Percentiles (concentración letal media en mg/L) de fármaco ibuprofeno sometidas a las 48 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.

Porcentaje	Percentil	Error estándar	95,0% Fiducial CI	
			Inferior	Superior
1	-4,41029	3,70126	-15,9313	0,952181
2	-2,31565	3,31786	-12,5813	2,52033
3	-0,986657	3,07835	-10,4634	3,52286
4	0,0130883	2,90063	-8,87523	4,28201
5	0,826304	2,75793	-7,58717	4,90334
6	1,51848	2,63801	-6,49399	5,43535
7	2,12538	2,53419	-5,53824	5,90457
8	2,66879	2,44243	-4,68495	6,32717
9	3,1630	2,36007	-3,9112	6,71379
10	3,61792	2,28527	-3,20109	7,07181
20	6,99834	1,77225	1,98438	9,82338
30	9,43586	1,47885	5,5542	11,9767
40	11,5186	1,31723	8,39637	14,0248
50	13,4654	1,27096	10,7968	16,1952
60	15,4121	1,33715	12,9178	18,6449
70	17,4948	1,5154	14,9262	21,5267
80	19,9324	1,82114	17,0517	25,1245
90	23,3128	2,34306	19,7841	30,3291
91	23,7677	2,41862	20,1405	31,0408
92	24,2619	250174	20,5256	31,8161
93	24,8053	2,59425	20,9466	32,671
94	25,4122	2,69881	21,4143	33,6283
95	26,1044	2,81948	21,9448	34,723
96	26,9176	2,96294	22,5645	36,0126
97	27,9174	3,14146	23,322	37,6024
98	29,2463	3,38184	24,3228	39,722
99	31,341	3,76628	25,8889	43,0741

Anexo 9

Percentiles (concentración letal media en mg/L) de fármaco naproxeno sometidas a las 24 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.

Porcentaje	Percentil	Error estándar	95,0% Fiducial CI	
			Inferior	Superior
1	-9,41664	19,9439	-146,53	14,8039
2	4,18221	15,4879	-96,6567	24,0431
3	12,8103	12,9095	-65,6525	30,5438
4	19,3008	11,1967	-42,9974	36,1021
5	24,5803	10,0256	-25,3377	41,3918
6	29,0741	9,24836	-11,2124	46,8001
7	33,0142	8,7788	0,132284	52,5826
8	36,5421	8,55517	9,17721	58,8729
9	39,7506	8,52662	16,3294	65,6676
10	42,704	8,6494	21,9846	72,8505
20	64,6503	12,9338	46,8996	143,333
30	80,4752	17,8317	58,3822	200,639
40	93,997	22,4164	67,2056	250,593
50	106,635	26,8596	75,0996	297,636
60	119,274	31,3891	82,8088	344,864
70	132,796	36,2942	90,9336	395,517
80	148,62	42,0842	100,341	454,898
90	170,567	50,1691	113,275	537,361
91	173,52	51,2606	115,009	548,466
92	176,729	52,4471	116,891	560,53
93	180,257	53,7525	118,958	573,798
94	184,197	55,2115	121,266	588,618
95	188,691	56,8766	123,895	605,523
96	193,97	58,8343	126,981	625,386
97	200,461	61,2429	130,771	649,809
98	209,089	64,4477	135,803	682,282
99	222,687	69,5043	143,724	733,473

Anexo 10

Percentiles (concentración letal media en mg/L) de fármaco naproxeno sometidas a las 48 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.

Porcentaje	Percentil	Error estándar	95,0% Fiducial CI	
			Inferior	Superior
1	-81,6852	49,5729	-721,446	-28,2132
2	-59,8581	40,3482	-575,554	-15,9129
3	-46,0095	34,5661	-483,138	-7,96023
4	-35,5917	30,2755	-413,746	-1,84975
5	-27,1177	26,8418	-357,426	3,2464
6	-19,905	23,9766	-309,622	7,71712
7	-13,5808	21,5254	-267,856	11,7854
8	-7,91826	19,3978	-230,632	15,6004
9	-2,76842	17,538	-196,985	19,2775
10	1,97202	15,9118	-166,272	22,9206
20	37,1974	10,6927	11,8808	100,065
30	62,5974	17,4485	40,6175	255,415
40	84,3007	25,6823	55,0567	398,271
50	104,586	33,942	67,1679	533,18
60	124,872	42,4224	78,7948	668,574
70	146,575	51,6167	90,9798	813,684
80	171,975	62,4634	105,063	983,688
90	207,201	77,5902	124,424	1219,62
91	211,941	79,6307	127,02	1251,38
92	217,091	81,8484	129,838	1285,89
93	222,753	84,2881	132,934	1323,83
94	229,078	87,014	136,39	1366,21
95	236,29	90,1244	140,328	1414,55
96	244,764	93,7805	144,951	1471,34
97	255,182	98,2776	150,631	1541,16
98	269,031	104,259	158,173	1633,99
99	290,858	113,693	170,049	1780,31

- Anexo 11 -

Percentiles (concentración letal media en mg/L) de fármaco diclofenaco sometidas a las 24 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.

Porcentaje	Percentil	Error estándar	95,0% Fiducial CI	
			Inferior	Superior
1	20,7016	15,2823	-25,6897	43,407
2	32,4279	13,3144	-7,30036	52,5526
3	39,8679	12,1273	4,23792	58,4844
4	45,4647	11,2768	12,8269	63,0374
5	50,0173	10,6188	19,7402	66,8141
6	53,8922	10,0875	25,5617	70,0916
7	57,2898	9,64697	30,6096	73,0217
8	60,332	9,27558	35,0776	75,697
9	63,0986	8,95908	39,0926	78,1784
10	65,6454	8,68764	42,7428	80,5084
20	84,5698	7,45403	67,9973	99,6908
30	98,2156	7,63919	83,5581	116,172
40	109,876	8,49311	95,1463	131,963
50	120,774	9,72093	104,966	147,734
60	131,672	11,2262	114,16	164,13
70	143,332	13,0351	123,566	182,103
80	156,978	15,3167	134,226	203,484
90	175,902	18,6575	148,645	233,502
91	178,449	19,1177	150,564	237,564
92	181,215	19,6199	152,644	241,98
93	184,258	20,1745	154,926	246,841
94	187,655	20,7968	157,469	252,276
95	191,53	21,5098	160,363	258,482
96	196,083	22,3516	163,754	265,78
97	201,68	23,3918	167,913	274,764
98	209,12	24,7825	173,425	286,722
99	220,846	26,9896	182,082	305,599

Anexo 12

Percentiles (concentración letal media en mg/L) de fármaco diclofenaco sometidas a las 48 horas de exposición, obtenidos mediante el análisis probit.

Porcentaje	Percentil	Error estándar	95,0% Fiducial CI	
			Inferior	Superior
1	-15,6793	7,52341	-36,7207	-4,20396
2	-10,3465	6,73645	-29,0722	-0,0085097
3	-6,96304	6,24689	-24,239	2,67297
4	-4,41778	5,88499	-20,6161	4,70302
5	-2,34741	5,59546	-17,679	6,36417
6	-0,585199	5,35303	-15,1872	7,78623
7	0,959915	5,14394	-13,0095	9,04018
8	2,34338	4,95982	-11,0659	10,1693
9	3,60159	4,7952	-9,30423	11,2021
10	4,75977	4,64633	-7,68804	12,1582
20	13,366	3,64964	4,09169	19,4928
30	19,5717	3,12066	12,1773	25,1899
40	24,8742	2,87384	18,6287	30,5154
50	29,8304	2,86233	24,1588	35,9928
60	34,7866	3,06584	29,1979	41,9613
70	40,0891	3,47837	34,1526	48,7834
80	46,2948	4,13623	39,5705	57,1483
90	54,901	5,23041	46,7006	69,1324
91	56,0592	5,38789	47,6391	70,7663
92	57,3174	5,56099	48,6544	72,5455
93	58,7009	5,75354	49,7662	74,5063
94	60,246	5,97107	51,003	76,7012
95	62,0082	6,22201	52,4078	79,2103
96	64,0786	6,52025	54,0512	82,1651
97	66,6239	6,89129	56,0628	85,8064
98	70,0073	7,39084	58,7242	90,6597
99	75,3401	8,18985	62,8955	98,3324

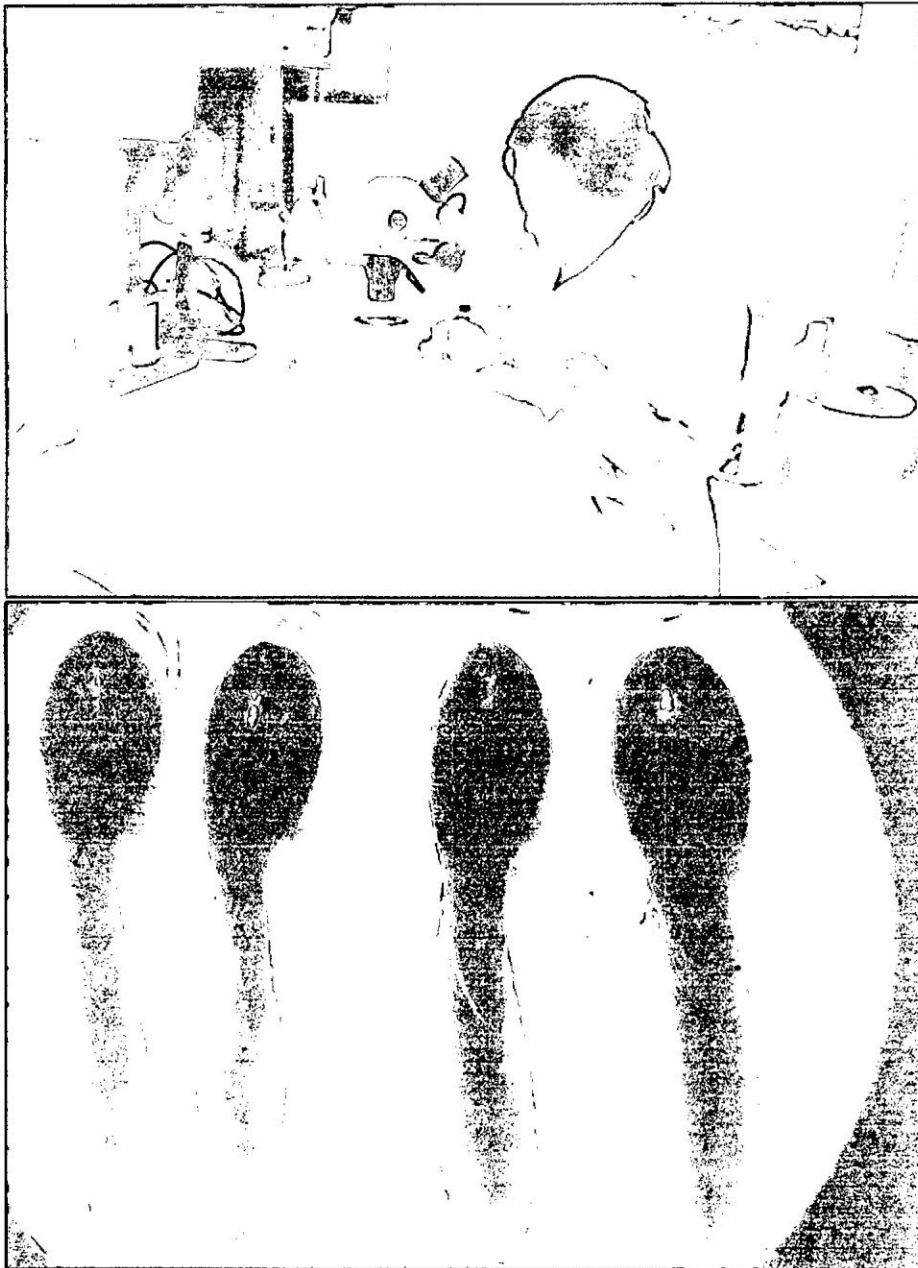
Anexo 13

Bandejas con estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* listas para el experimento.



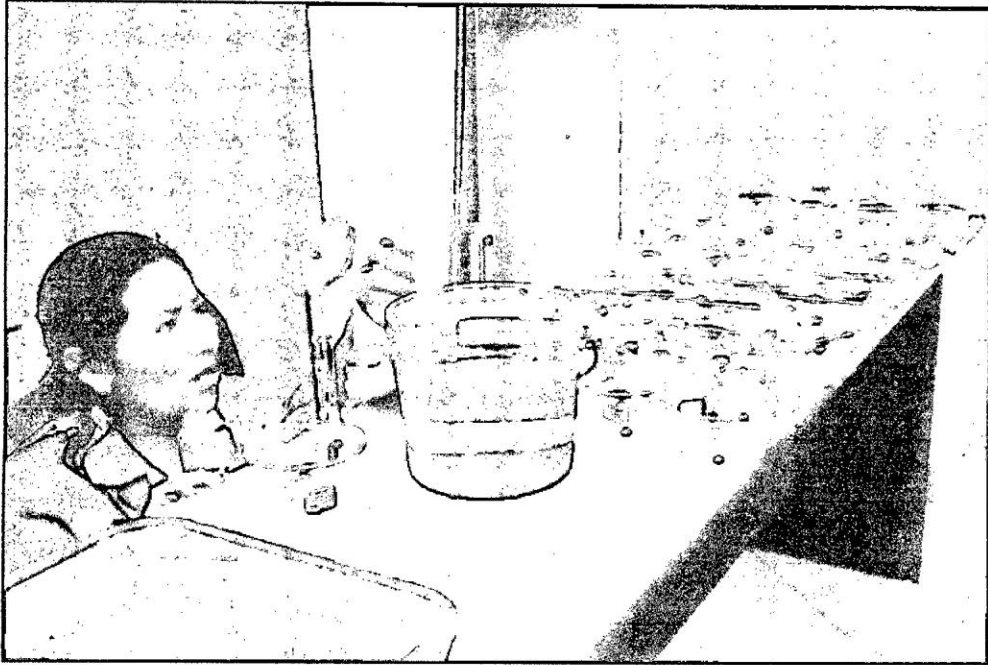
Anexo 14

Realizando la medida del tamaño de los estadios inmaduros *Rhinella spinulosa* utilizados para el experimento.



Anexo 15

Disposición y preparación de los recipientes con soluciones de los fármacos ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco.



Anexo 16

Separando los estados inmaduros del *Rhinella spinulosa* para cada envase con la solución respectiva del medicamento.



Anexo 17

Matriz de consistencia.

TÍTULO: Toxicidad aguda de tres fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) sobre estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> . Ayacucho 2014.					
AUTOR: Rayme Chalco, Marisol		ASESOR: Tenorio Bautista, Saturnino Martín			
PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p>¿Cuál es la toxicidad generada por tres fármacos AINEs (i buprofeno, naproxeno y diclofenaco), en tres diferentes concentraciones, en dos tiempos de exposición (24 y 48 horas) sobre estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> en la ciudad de Ayacucho durante el año 2014?</p>	<p>Objetivo general Evaluar la toxicidad de tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno, y diclofenaco), con diferentes concentraciones en dos tiempos de exposición (24 y 48 horas) sobre los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i>. En la ciudad de Ayacucho durante el año 2014.</p> <p>Objetivo específico 1. Determinar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i>, sometidas a tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco), en dos tiempos de exposición. 2. Calcular la concentración letal media (CL₅₀) de tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y Diclofenaco), en dos tiempos de exposición sobre los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i>. 3. Comparar la mortalidad y la concentración letal media (CL₅₀) generado por tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y niclofenaco), en dos tiempos de exposición los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i>.</p>	<p>Productos farmacéuticos en el agua. Metabolismo de fármacos. Propiedades fisicoquímicas de los fármacos y su distribución en el ambiente. Efectos tóxicos de los fármacos en el ambiente Toxicidad. Dosis letal media (DL₅₀) y concentración letal media (CL₅₀) Antiinflamatorios ibuprofeno naproxeno diclofenaco Orden anura: familia Bufonidae</p>	<p>Hipótesis general A mayor concentración de los tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco), y mayor el tiempo de exposición, mayor es la mortalidad aguda medido como tasa de mortalidad y menor la concentración letal media (CL₅₀) probada sobre los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i> en la ciudad de Ayacucho durante el año 2014.</p> <p>Hipótesis específico 1. El porcentaje de mortalidad se incrementa a medida que la concentración de los fármacos AINEs ilbuprofeno, naproxeno y diclofenaco), también se incrementan. 2. La concentración letal media (CL₅₀) de tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco), disminuye a mayor tiempo de exposición. 3. La mortalidad generada por tres fármacos AINEs ilbuprofeno, naproxeno y diclofenaco), es diferente.</p>	<p>Variable independiente a. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) Indicador: ibuprofeno con concentración 10,00; 20,00; 40,00 y 80,00 mg/L. diclofenaco con concentración de 16,00; 30,00; 60,00 y 120,00 mg/L. naproxeno con concentración de 120,00; 240,00; 480,00 y 960,00 mg/L. b. Tiempo de exposición al fármaco Indicador: 2 tiempos (24 y 48 horas)</p> <p>Variable dependiente a. Toxicidad sobre los estados inmaduros de <i>Rhinella spinulosa</i>. Indicadores: Mortalidad (%). Concentración letal media (m/L).</p>	<p>Tipo de Investigación Básica</p> <p>Nivel de investigación Experimental</p> <p>Diseño Experimental</p> <p>Muestreo Aleatorio</p> <p>Técnicas: Observación Determinación</p> <p>Instrumentos: Observación</p>

Toxicidad de tres fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) sobre estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*. Ayacucho. 2014.

Marisol Rayme Chalco¹, Saturnino Martin Tenorio Bautista
Escuela de formación Profesional de Farmacia y Bioquímica¹: UNSCH

RESUMEN

El agua es un líquido vital para la existencia de todos los organismos vivos. Sin embargo este recurso se encuentra amenazado por el rápido crecimiento de la población y la contaminación. La toxicidad producida por metales pesados, hidrocarburos y plaguicidas en ambientes acuáticos han sido ampliamente evaluada, pero pocos son los estudios sobre el efecto de los productos farmacéuticos, es por ello que, este trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la toxicidad de tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) con diferentes concentraciones en dos tiempos de exposición (24 y 48 horas) sobre estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*. El experimento se realizó en el laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica de la Facultad de Ciencias Biológicas, para lo cual se construyeron 40 unidades experimentales constituidas por envases de plástico de 1 litro de capacidad, con la respectiva concentración de cada fármaco además de contar con unidades de control sin presencia de fármaco. En cada unidad experimental se colocó 10 unidades de estadios inmaduros de *Rhinella spinulosa*. De los resultados se observó que los porcentajes de mortalidad para cada fármaco fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$), 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.

Palabras clave: Toxicidad, AINEs, *Rhinella spinulosa*.

SUMMARY

Water is vital for the existence of all living organisms liquid. However it is threatened by rapid population growth. The toxicity caused by heavy metals, hydrocarbons and pesticides in aquatic environments have been extensively tested, but there are few studies on the effect of pharmaceutical products, which is why this research aimed determine the toxicity of three drugs NSAIDs (ibuprofen, naproxen and diclofenac) with different concentrations of two exposure times (24 and 48 hours) on the immature *Rhinella spinulosa*. The experiment was conducted in the laboratory of Biodiversity and Geographical Information System of the School of Biological Sciences, For which 40 experimental units consisting of plastic containers of 1 liter, with the respective concentration of each drug in addition to control units without the presence of drug were constructed. In each experimental unit 10 units of immature stages of *Rhinella spinulosa* were placed. From the results observed that the mortality percentages for each drug were statistically different ($p < 0,05$), demonstrating for the three drugs tested, that as the concentration increases, the percentage of mortality increases. The median lethal concentration for ibuprofen, naproxen and diclofenac drugs were 68,6 mg/L, 106,6 mg/L and 120 mg/L respectively at 24 hours exposure and 13,47 mg/L, 104,6 mg/L and 29,8 mg/L at 48 hours respectively, thus showing that the median lethal concentration decreases as the exposure time increases.

Key words: Toxicity, NSAIDs, *Rhinella spinulosa*

INTRODUCCIÓN

El agua es un líquido vital para la existencia de todos los organismos vivos. Sin embargo, este recurso se encuentra amenazado por el rápido crecimiento de la población, la contaminación producida por contaminantes como metales pesados, hidrocarburos y plaguicidas en ambientes acuáticos ha sido ampliamente evaluada, pero pocos son los estudios sobre el efecto de los productos farmacéuticos.

Los productos farmacéuticos son sustancias que intentan curar, mitigar o prevenir en su aplicación en el cuerpo humano o animal, de enfermedades, sufrimiento, daño corporal y problemas patológicos. Los productos de cuidado personal y cosméticos como las fragancias, champús y cosméticos en conjunto con los fármacos activos o emergentes debido a su uso intenso y extensivo ingresan al ambiente cada año, y estiman que su cantidad es similar al total de plaguicidas utilizados durante el mismo periodo. Estos productos farmacéuticos, tales como analgésicos, antiinflamatorios, antibióticos, anticonvulsivantes, psiquiátricos, hormonas y otros, se han encontrado en cuerpos de agua alrededor de todo el mundo, siendo introducidos al ambiente después del uso en pacientes y animales, ya que son excretados de forma inalterada o como metabolitos a través de la orina o las heces en las descargas de agua doméstica hacia los ríos.

Una cantidad desconocida de estos componentes son evacuados al ambiente vía las aguas residuales o cuando las heces son usadas con residuos farmacéuticos para la fertilización de tierras agrícolas.

Una de las formas más comunes para detectar las alteraciones, es mediante estudios ecotoxicológicos que determina los efectos de las concentraciones crecientes de los compuestos de los fármacos generando información de la concentración máxima permisible en los cuerpos de agua, sin que cause daño significativo a los organismos acuáticos.

Se empleó los estadios inmaduros del *Rhinella spinulosa* como organismo de prueba, para el estudio del efecto de los fármacos, se fundamenta en que estos seres vivos son resistentes a las aguas contaminadas, ya que su hábitat es por lo general en aguas estancadas, además de la disponibilidad de individuos en grandes cantidades en las estaciones de verano. Por lo mismo, se utilizó tres fármacos, en cuatro concentraciones crecientes y en dos tiempos de exposición como agentes de toxicidad sobre los estadios inmaduros del *Rhinella spinulosa*, bioensayos que se realizó en los ambientes de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, teniendo los siguientes objetivos:

Objetivos generales

Evaluar la toxicidad de tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) con diferentes concentraciones en dos tiempos de exposición (24 y 48 horas) sobre estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*.

Objetivos específicos

1. Determinar el porcentaje de mortalidad de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, sometidas a tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) en dos tiempos de exposición.
2. Calcular la concentración letal media (CL_{50}) de tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco), en dos tiempos de exposición sobre los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*.
3. Comparar la mortalidad y la concentración letal media (CL_{50}) generado por tres fármacos AINEs (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) en dos tiempos de exposición los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

Tres fármacos (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) expendidos en la ciudad Ayacucho.

Muestra

- 3 gr. de ibuprofeno
Composición de cada tableta: Ibuprofeno 400 mg
Excipiente c.s.p.
Lote: 1051275
Laboratorio: Portugal genéricos
- 3 gr. de Naproxeno
Composición de cada tableta: Naproxeno 550 mg
Excipiente c.s.p.
Lote: 1090294
Laboratorio: Portugal genéricos
- 3 gr. de Diclofenaco
Composición de cada tableta: Diclofenaco 50 mg
Excipiente c.s.p.
Lote: 3139055
Laboratorio: La sante

Unidad experimental

Diez unidades de estadios inmaduros de *Rhinella spinulosa*, en envases de 1 litro de capacidad, conteniendo cada solución.

Sistema de muestreo

El sistema de muestreo a través del que se seleccionó la cantidad de fármaco a emplear fue aleatorio, para el cual se tomó 3 gr. aproximadamente de cada fármaco, las que fueron trituradas y molidas.

Por otro lado, con la finalidad de también darle aleatoriedad a la disposición de las unidades experimentales, se sorteó la posición en la fila y la columna en el conjunto de los envases que tenían como contenido las diferentes concentraciones más los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*.

Metodología y recolección de datos

El instrumento empleado para la recolección de datos fue la observación, a través del cual se pudo determinar el número de individuos muertos (sin movimiento al toque con una brocheta) a las 24 y 48 horas de exposición de las diferentes concentraciones de los tres fármacos.

Obtención de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*.

Los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* fueron obtenidos del río Huatatas cerca de la ciudad de Ayacucho. Las cuales fueron transportadas en baldes al laboratorio de Biodiversidad y Sistema de Información Geográfica de la Facultad de Ciencias Biológicas, las que fueron colocadas en bandejas con agua dechlorada, 24 horas antes de la prueba de toxicidad, para evitar que las excretas y restos orgánicos interfiera en los resultados del experimento. Dichos individuos fueron seleccionados de un tamaño homogéneo de aproximadamente 2 a 2,5 cm.

Preparación de las soluciones de fármacos comerciales (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco)

Para la preparación se utilizó tabletas de cada medicamento, las que fueron trituradas hasta ser pulverizadas, para su fácil solubilidad en el agua dechlorada. Por otro lado se tuvo que probar diferentes concentraciones antes del experimento, ya que no se contaban con concentraciones recomendadas por el producto. Para ello se realizó pruebas piloto, a partir de los cuales se determinó las concentraciones. Por otro lado se consideró que los tratamientos estuvieran constituidos por recipientes conteniendo cuatro concentraciones crecientes de cada fármaco comercial (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) más un testigo, para obtener resultados que represente mejor los hallazgos.

Se consideró cuatro grupos similares de unidades experimentales, siendo constituido un grupo de recipientes conteniendo soluciones del fármaco ibuprofeno, otro grupo de recipientes conteniendo soluciones con fármaco naproxeno, otro grupo de recipientes conteniendo soluciones con fármaco diclofenaco y finalmente un grupo de testigo las cuales no contenían ningún fármaco.

Las soluciones de los fármacos fueron preparados en las concentraciones señaladas una hora antes de iniciar el bioensayo.

Preparación de las unidades experimentales

Se consideró 40 unidades experimentales constituida por envases de plásticos de 1 litro de capacidad, en los cuales se colocaron 1 litro de agua con la respectiva concentración del fármaco y 10 estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* (número recomendado para estudios de toxicidad en la que se emplea como modelos a organismos como insectos, anfibios y peces). Con la finalidad de minimizar el efecto de factores no considerados (luz, ruido, etc) en el estudio, las unidades experimentales fueron ubicadas en un ambiente aislado.

Una vez colocado los individuos de *Rhinella spinulosa* en los envases conteniendo las concentraciones respectivas de los fármacos, se realizaron las inspecciones cada 24 horas con la finalidad de determinar el número de individuos muertos en cada envase, para el cual con la ayuda de unas brochetas se tocaron aquellos individuos

inmóviles, en el caso de seguir inmóvil, fueron considerados como muertos y extraídos de las unidades experimentales, este mismo procedimiento se realizó a las 24 y 48 horas.

Tipo de investigación

El tipo de investigación realizado fue básica - experimental.

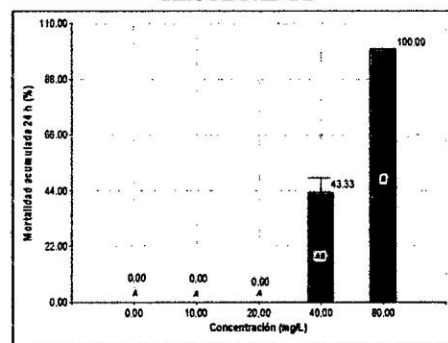
Análisis estadístico

Se construyó una matriz de datos en el software Excel, para luego ser exportados a InfoStat y MINITAB 16, a partir de los cuales se crearon tablas y figuras en los que se presentan estadísticos de tendencia central y de dispersión.

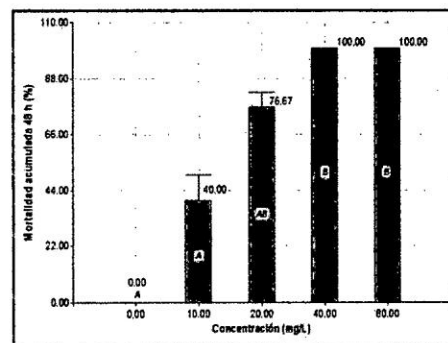
Con la finalidad de comparar las mortalidades registradas de los individuos en los doce tratamientos (tres fármacos probados en cuatro concentraciones crecientes) más un testigo, se empleó el análisis de Kruskal-Wallis.

Para la estimación de la Concentración Letal Media (CL₅₀), se empleó la metodología de Probit para el cual se empleó el software MINITAB 16.

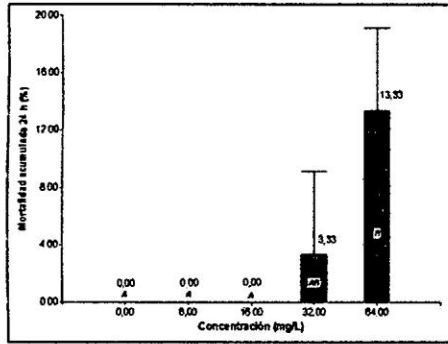
RESULTADOS



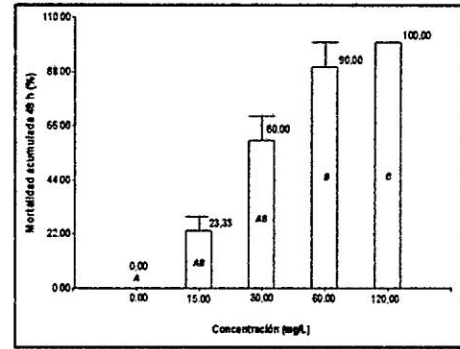
A, AB y B: Categorías asignadas por la prueba estadística
Figura 1. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco ibuprofeno. Ayacucho, 2014.



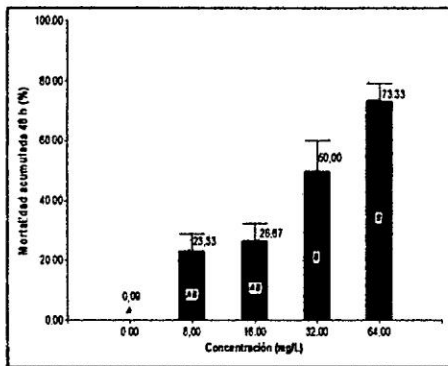
A, AB y B: Categorías asignadas por la prueba estadística
Figura 2. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco ibuprofeno. Ayacucho, 2014.



A, AB y B: Categorías asignadas por la prueba estadística
 Figura 3. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco naproxeno. Ayacucho, 2014.



A, AB y B: Categorías asignadas por la prueba estadística
 Figura 6. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco diclofenaco. Ayacucho, 2014.



A, AB y B: Categorías asignadas por la prueba estadística
 Figura 4. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco naproxeno. Ayacucho, 2014.

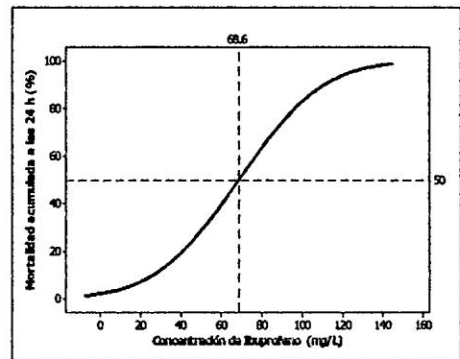
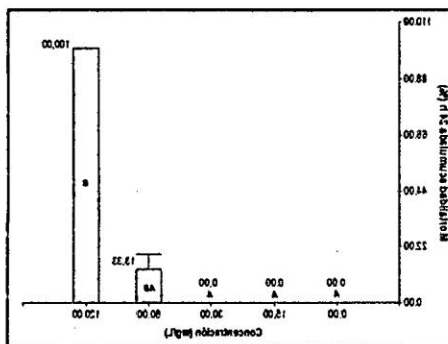


Figura 7. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco ibuprofeno y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 24 horas de exposición. Ayacucho, 2014.



A, AB y B: Categorías asignadas por la prueba estadística
 Figura 5. Porcentaje de mortalidad acumulada de estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes de las soluciones del fármaco diclofenaco. Ayacucho, 2014.

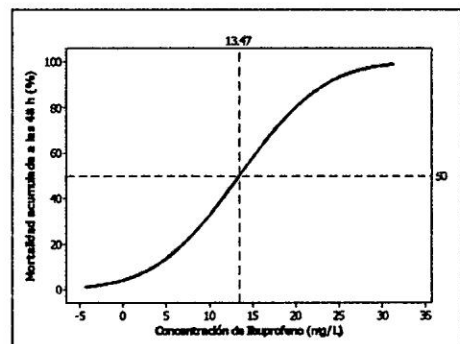


Figura 8. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco ibuprofeno y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 48 horas de exposición. Ayacucho, 2014.

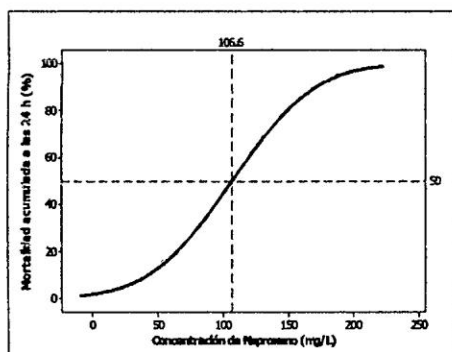


Figura 9. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco naproxeno y el valor de la concentración letal media (CL_{50}) a las 24 horas de exposición. Ayacucho, 2014.

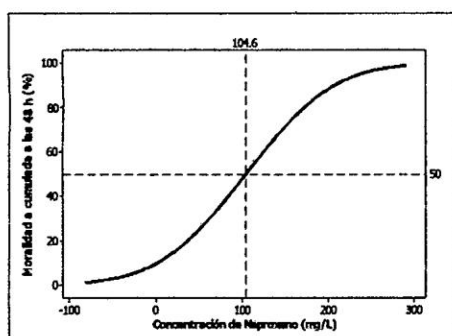


Figura 10. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco naproxeno y el valor de la concentración letal media (CL_{50}) a las 48 horas de exposición. Ayacucho, 2014.

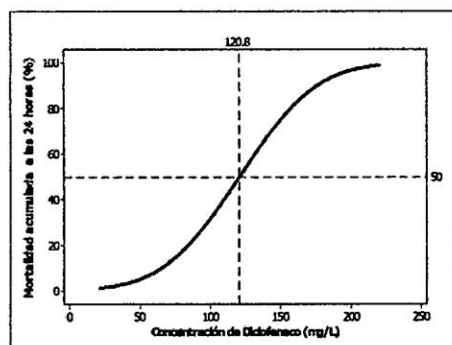


Figura 11. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco diclofenaco y el valor de la concentración letal media (CL_{50}) a las 24 horas de exposición. Ayacucho, 2014.

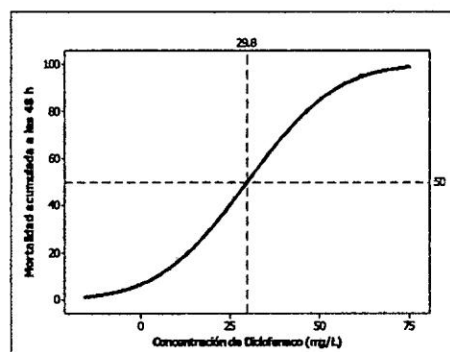


Figura 12. Tendencia de mortalidad acumulada teórica (probit) de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco diclofenaco y el valor de la concentración letal media (CL_{50}) a las 48 horas de exposición. Ayacucho, 2014.

Tabla 1. Valores de la Concentración Letal Media (CL_{50}) y los intervalos de confianza a las 24 y 48 horas de exposición para los fármacos ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco. Ayacucho, 2014.

Tratamientos (detergentes)	Tiempo (horas)	CL_{50} (mg/L)	Intervalo de Confianza (95%)	
			Inf.	Sup.
Ibuprofeno	24	68,6	58,756	83,672
	48	13,4	10,796	16,195
Naproxeno	24	106,6	75,099	297,636
	48	104,6	67,167	533,180
Diclofenaco	24	120,8	104,966	147,734
	48	29,8	24,158	35,992

CL_{50} : Concentración Letal Media

DISCUSIÓN

En la Figura 1, se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, registrados a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes del fármaco ibuprofeno. Se observa que la mortalidad se incrementa a medida que las concentraciones del fármaco también se incrementan, es así que a una concentración de 10,00 y 20,00 mg/L no se registra ninguna mortalidad, mientras que para las concentraciones de 40,00 y 80,00 mg/L se registra mortalidades de 43,33% y 100,00% respectivamente; es de notar que en el testigo no se registró mortalidad, lo que indica que la mortalidad está dado por la presencia del fármaco. Al aplicar la prueba estadística de Kruskal Wallis (se realizó esta prueba debido a que los datos no mostraron distribución normal) para comparar la mortalidad acumulada registrada en las diferentes concentraciones, se halló significancia estadística ($p < 0,05$), esto nos permite afirmar que los porcentajes de mortalidad registrados son diferentes en las soluciones con diferente concentración del fármaco ibuprofeno.

Al realizar la categorización en función a la mortalidad registrada, se observa que las concentraciones de 10,00 y 20,00 mg/L originaron menores mortalidades, mientras que en las concentraciones de 40,00 y 80,00 mg/L generaron mayor mortalidad, siendo a la vez estos similares entre sí. Lo hallado se debe a la presencia de los metabolitos en el fármaco, estos metabolitos son poco degradables en el ambiente ocasionando una mayor capacidad de toxicidad en un sistema de un animal.¹² De acuerdo a un trabajo de investigación de Davila,³ realizado en organismos acuáticos, señala que el efecto de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, dañan las enzimas que protegen a las células, lo cual ocasiona que se oxiden las membranas celulares, lesionando directa o indirectamente a los lípidos de la membrana celular, destruyendo la integridad de la permeabilidad de la membrana.

En la Figura 2, se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, registrados a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes del fármaco ibuprofeno. Tal como se había señalado anteriormente se observa que la mortalidad se aumenta a medida que la concentración del fármaco aumenta, es así en el caso de la concentración de 10,00 y 20,00 mg/L se registraron mortalidades de 40,00 y 76,67% respectivamente mientras que para las concentraciones de 40,00 y 80,00 mg/L se registra mortalidades del 100%. Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis para comprar las mortalidades acumuladas de las diferentes concentraciones del Ibuprofeno, se halló significancia estadística ($p < 0,05$). Lo que se interpreta que los porcentajes de mortalidad registrados son diferentes en los medios probados con diferente concentración. Al realizar la categorización en función de los valores promedios de mortalidad registrada, las concentraciones de 10,00 y 20,00 mg/L originaron menor mortalidad, mientras en mayores concentraciones del fármaco como 40,00 y 80,00 mg/L originaron mayor mortalidad, siendo a la vez similares entre sí, en este caso el porcentaje de mortalidad aumenta a menores concentraciones ya que el tiempo de exposición al que fue sometido es mayor que el anterior. También es importante resaltar que debido a la acumulación de los metabolitos en el individuo produce mayor daño, cuando mayor tiempo es expuesto. Por otro lado, la acumulación de estos metabolitos ocasionan alteraciones en el comportamiento de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, disminuyendo su movilidad y finalmente separando la epidermis de los músculos.³

En la Figura 3, se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, registrados a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes del fármaco naproxeno. Se observa que la mortalidad se aumenta a medida que las concentraciones también se incrementan, así a una concentración de 8,00 y 16,00 mg/L no se registra ninguna mortalidad, mientras que para las concentraciones de 32,00 y 64,00 mg/L se registra mortalidades de 3,33% y 13,00% respectivamente; considerándose que en el testigo no se registró mortalidad alguna, lo que indica que la mortalidad está dado por la presencia del fármaco. Al aplicar la prueba estadística de Kruskal Wallis para comparar la mortalidad acumulada registrada en las diferentes concentraciones, se halló significancia estadística ($p < 0,05$), nos permite afirmar que los porcentajes de mortalidad registrados difieren según la concentración del fármaco naproxeno en las unidades experimentales. Al realizar la categorización en función de la mortalidad generada, las concentraciones de 8,00 y 16,00 mg/L originaron menores mortalidades, mientras que las concentraciones de 32,00 y 64,00 mg/L generaron mayores mortalidades, pero a la vez similares entre ellas. El resultado se debe a la presencia de los metabolitos del fármaco ya que al estar presente en el medio donde se hallan los estados inmaduros del *Rhinella spinulosa*, existe una mayor posibilidad de que sean ingeridos por éstas. Por otro lado Jiménez,⁴ menciona que los metabolitos de los fármacos no son transformados en su totalidad por lo que son eliminados a las aguas residuales y otros casos a los cuerpos de agua directamente, provocando alteraciones ambientales o bioacumulación en algunos de los niveles de la cadena trófica.

En la Figura 4, se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, registrados a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes del fármaco naproxeno. Tal como se había señalado anteriormente se observa que la mortalidad se incrementa a medida que la concentración del fármaco aumenta, es así en el caso de la concentración de 8,00 y 16,00 mg/L se registraron mortalidades de 23,33 y 26,67%, mientras que para las concentraciones de 32,00 y 64,00 mg/L se registra mortalidades de 50,0% y 73,33% respectivamente. Al realizar la prueba de Kruskal Wallis, se halló significancia estadística ($p < 0,05$), lo que nos permite afirma que los porcentajes de mortalidad registrados son diferentes en los tratamientos con diferente

concentración del fármaco naproxeno. Al realizar la categorización de las concentraciones en función a la mortalidad originada, las concentraciones de 8,00 y 16,00 mg/L originaron menor mortalidad, mientras a mayores concentraciones del fármaco como 32,00 y 64,00 mg/L originaron mayores mortalidades, pero a la vez similares entre ellas. El resultado se debe a la acumulación de los metabolitos del fármaco, provocando alteraciones en el comportamiento y la fisiología de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, disminuyendo la respiración, inhibiendo los procesos asociados a la membrana celular facilitando la producción del estrés oxidativo.⁵

En la Figura 5, se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, registrados a las 24 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes del diclofenaco. Se observa que la mortalidad aumenta a medida que las concentraciones del fármaco también se incrementan, es así que a una concentración de 15,00 y 30,00 mg/L no se registra ninguna mortalidad, mientras que para las concentraciones de 60,00 y 120,00 mg/L se registra una mortalidad de 13,33% y 100,00% respectivamente; considerándose que en el testigo no se registró mortalidad, lo que indica que la mortalidad está dado por la presencia del fármaco. Al aplicar la prueba estadística de Kruskal Wallis para comparar la mortalidad acumulada registrada en las diferentes concentraciones, se halló significancia estadística ($p < 0,05$), esto nos permite afirmar que los porcentajes de mortalidad registrados son diferentes en las unidades experimentales, con diferente concentración del fármaco diclofenaco. Al realizar la categorización de las concentraciones en función a la mortalidad registrada, las concentraciones de 15,00 y 30,00 mg/L no originó ninguna mortalidad, mientras a concentraciones de 60,00 y 120,00 mg/L mostraron mayores mortalidades, pero a la vez similares entre ellas. El resultado descrito se debe al efecto tóxico de los metabolitos del diclofenaco ya que no son transformados en su totalidad al ser consumidos por el hombre y los animales, afectando directamente a los organismos acuáticos al ser acumulado en el medio donde habitan. Por otro lado Valdes,⁶ concluye que los metabolitos posibilita la producción del estrés oxidativo (incremento del grado de lipoperoxidación y proteínas oxidadas, así como alteración de la actividad de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), como consecuencia daño a diversas biomoléculas, ocasionando finalmente la muerte.

En la Figura 6, se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa*, registrados a las 48 horas de exposición en cuatro concentraciones crecientes del fármaco diclofenaco. Tal como se había señalado anteriormente se observa que la mortalidad se incrementa a medida que la concentración del fármaco aumenta, así en las concentraciones de 15,00 y 30,00 mg/L se registraron mortalidades de 23,33 y 60,00%, mientras para las concentraciones de 60,00 y 120,00 mg/L se registra mortalidades de 90,00% y 100,00% respectivamente. Al realizar la prueba de Kruskal Wallis para comprar las mortalidades acumuladas de las diferentes concentraciones del fármaco diclofenaco, se halló significancia estadística ($p < 0,05$). Esto nos permite afirmar que los porcentajes de mortalidad registrados son diferentes en las unidades experimentales, del mismo modo se puede observar la categorización de las concentraciones en función a la mortalidad originada, donde la concentración de 15,00 y 30,00 mg/L originaron menor mortalidad y a concentraciones de 60,00 y 120,00 mg/L mostraron mayores mortalidades, pero a la vez similares entre ellas. Como ya se mencionó anteriormente los resultados hallados se debe a la presencia de metabolitos del fármaco, en este caso se observa que el porcentaje de mortalidad aumenta a menores concentraciones mientras más transcurre el tiempo, esto se debe a la acumulación de los metabolitos en el individuo, por lo que produce más daño cuando a mayor tiempo es expuesto. Por otro lado de acuerdo a la clasificación de peligro ambiental y valoración de riesgo de ingredientes farmacéuticos en Suecia, el diclofenaco está clasificado como peligroso para el ambiente y se considera además potencialmente bioacumulable.^{7,8}

En la Figura 7, se muestra la tendencia de mortalidad acumulada teórica de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco ibuprofeno y el valor de la concentración letal media (CL_{50}) a las 24 horas de exposición. Se observa que la mortalidad se incrementa a medida que la concentración del fármaco también se incrementa. También se observa que a una concentración de 68,6 mg/L del fármaco, teóricamente el 50% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a la acción de ibuprofeno, mueren a las 24 horas de exposición¹.

En la Figura 8, se muestra la tendencia de mortalidad acumulada teórica de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco ibuprofeno y el valor

de la concentración letal media (CL₅₀) a las 48 horas de exposición. Al igual como en el caso anterior, se observa que son mínimas las mortalidades a menores concentraciones del fármaco, hasta llegar a valores entre 5 y 10 mg/L donde se incrementa notablemente. También se observa que a una concentración de 13,47 mg/L del fármaco, teóricamente el 50% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a la acción de ibuprofeno, mueren a las 48 horas de exposición.¹

En la Figura 9, se muestra la tendencia de mortalidad acumulada teórica de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco Naproxeno y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 24 horas de exposición. Se observa que la mortalidad aumenta a medida que la concentración del fármaco también se incrementa. Se observa también que a una concentración de 106,6 mg/L del fármaco, teóricamente el 50% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a la acción de ibuprofeno, mueren a las 24 horas de exposición.¹

En la Figura 10, se muestra la tendencia de mortalidad acumulada teórica de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco Naproxeno y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 48 horas de exposición. Se observa que la mortalidad va incrementando notablemente, de acuerdo al incremento de las concentraciones. También se observa que a una concentración de 104,6 mg/L del fármaco, teóricamente el 50% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a la acción de Ibuprofeno, mueren a las 48 horas de exposición.¹

En la Figura 11, se muestra la tendencia de mortalidad acumulada teórica de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco diclofenaco y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 24 horas de exposición. Se observa que la mortalidad se incrementa a medida que la concentración del fármaco aumenta. También se observa que a una concentración de 120,8 mg/L del fármaco, teóricamente el 50% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a la acción de naproxeno, mueren a las 24 horas de exposición.

En la Figura 12, se muestra la tendencia de mortalidad acumulada teórica de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* en función de las concentraciones del fármaco naproxeno y el valor de la concentración letal media (CL₅₀) a las 48 horas de exposición. Se observa que la mortalidad se aumenta a medida que la concentración del

fármaco también se incrementa. También se observa que a una concentración de 29,8 mg/L del fármaco, teóricamente el 50% de los estados inmaduros de *Rhinella spinulosa* sometidos a la acción de naproxeno, mueren a las 48 horas de exposición.

En la Tabla 1, se muestra los valores de las concentraciones letales medias (CL₅₀) con sus intervalos de confianza a las 24 y 48 horas de exposición para los fármacos ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco. De acuerdo a los valores hallados se puede apreciar que a mayor horas de exposición, la concentración letal media (CL₅₀) disminuye en los tres fármacos, así para ibuprofeno a las 24 y 48 horas, el CL₅₀ es de 68,60 mg/L y 13,47 mg/L respectivamente; para naproxeno se registró valores de 106,6 y de 104,6 mg/L para las 24 y 48 horas de exposición y finalmente para el diclofenaco se registró valores de 120,8 y 29,8 mg/L para las 24 y 48 horas de exposición. Los resultados hallados son congruentes con lo manifestados anteriormente, esto se justifica por el hecho de que cuando menor sea el valor de la CL₅₀, mayor toxicidad origina; también es de resaltar que, a medida que el tiempo de exposición se incrementa, los valores de la CL₅₀ disminuyen (esta tendencia se observa en los tres fármacos), lo que se interpreta que, cuanto más es el tiempo de exposición a una sustancia tóxica, mayor efecto tóxico causará.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Halling-Sørensen B¹, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC, Jørgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment--a review. *Chemosphere*. [revista en internet]. 1998 Enero; [acceso 11 de setiembre de 2014]; 36(2): [357-93]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9569937>.
2. Yanira Henríquez V. presencia de contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema. estudio de caso: productos farmacéuticos en la cuenca del río biobío, región del biobío, Chile. [Internet]. Santiago de Chile. 2002 Enero; [acceso 10 de setiembre de 2014]. Disponible en http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2012/cf-henriquez_dv/pdfAmont/cf-henriquez_dv.pdf.
3. Dávila R. Fármacos antiinflamatorios provocan efectos tóxicos en organismos acuáticos. [Internet]. México. 2010 junio. [acceso 20 de agosto 2014]. Disponible en: <https://journalmex.wordpress.com/2010/06/11/farmacos-antiinflamatorios-provocan-efectos-toxicos-en-organismos-acuaticos/>

<https://jantiinflamatorprovocan-efectos-toxicos-en-organismos-acuaticos/>.

4. Jiménez Cartagena C. Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos. *Revista Lasallista de Investigación*. [revista en internet]. 2011 julio-diciembre; [acceso 10 de setiembre de 2014]; 8(2). [143-153]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69522607016>.
5. Martel PJ, Vegas FJD. Probabilidad y estadística matemática: aplicaciones en la práctica clínica y en la gestión sanitaria. [Internet] Díaz de Santos, S.A. España: 1997. [acceso 29 de setiembre de 2014]; Disponible en: https://scholar.google.es/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=r89niD4AAAAJ&citation_for_view=r89niD4AAAAJ:35N4QoGY0k4C.
6. Valdes Alanis A. Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco sobre *Daphnia magna*. [Internet]. Mexico. Junio 2009. [acceso 4 de setiembre 2014]. Disponible en: <http://tcis.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/8067/1/EVALTOX.pdf>.
7. Carlsson C, Johansson AK, Alvan G, Bergman K, Kühler T. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci Total Environ*. [revista en internet] 2006 Jul; [acceso 23 de setiembre de 2014]; 1;364(1-3): [67-87]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257037>.
8. Escher BI, Pronk W, Suter MJ, Maurer M. Monitoring the removal efficiency of pharmaceuticals and hormones in different treatment processes of source-separated urine with bioassays. *Environ Sci Technol*. [revista en internet] 2006 Aug; [acceso 10 de setiembre de 2014]; 15;40(16): [5051-101]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16955913>.