

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**EFFECTO DE ANALGÉSICOS SELECCIONADOS (PARACETAMOL Y DICLOFENACO)  
SOBRE EL CRECIMIENTO POBLACIONAL DEL ROTIFERO *Platonus patulus*  
(ROTIFERA: BRACHIONIDAE)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**BIOLOGO**

**PRESENTA:**

**BRENDA KAREN GONZÁLEZ PÉREZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. SINGARAJU SRI SUBRAHMANYA SARMA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a las dos personas más importantes en mi vida, a mi madre y padre.

*Leticia Pérez Corona y Jorge Luis González Andraca*

Gracias por comprenderme, apoyarme y guiarme en cada paso que doy.

A mi madre por enseñarme a ser fuerte y como diría ella “a agarrar al toro por los cuernos” claro, sin perder la ternura y a mi padre por brindarme el apoyo incondicional, por enseñarme la perseverancia y a ser como lo dice mi nombre “fuerte como una espada.”

“No es el más fuerte de las especies el que sobrevive, tampoco es el más inteligente el que sobrevive. Es aquel que es más adaptable al cambio.”

**Charles Darwin**

## **Agradecimientos**

Con mucho cariño a mi hermana que sin saberlo siempre me estuvo ayudando a estudiar con el solo hecho de escucharme mientras leía. Por enseñarme tantas cosas de la vida y por haber compartido tantas experiencias juntas. Te quiero mucho Cinthia.

Alicia Corona: A mi abuelita que para mí es como una segunda madre. Gracias por aguantarme, brindarme tu apoyo incondicional y por siempre estar ahí cuando te necesito.

A mi tío Alejandro que siempre estuvo al pendiente de mis estudios. Gracias por tus consejos, por tus enseñanzas y por el apoyo tanto económico como moral que me has brindado.

Carlos, Mauro, Gerardo, Elizabeth, Araceli, Jannette y Virginia: A cada uno de mis tíos que siempre estuvieron apoyándome moral y económicamente a lo largo de mi carrera. Gracias por compartir conmigo tantas experiencias y consejos.

A cada uno de mis primos con quienes he compartido tantas experiencias tan bonitas y divertidas.

Roció, Diego, Rosa, Gisela, Rosaura, Mich, Aaron, Cesar, Esme, Adry, Auro, Meetz, Cristian, Jorge, Gerardo y Jesús: A mis amigos y compañeros del laboratorio quienes han estado conmigo en las buenas y malas experiencias. Por hacer que esas largas horas de trabajo se convirtieran en momentos divertidos. Pero sobre todo gracias a Roció, Diego, Rosa y Gisela que son una parte muy

importante en mi vida. Gracias por ser mi fortaleza y por esos consejos que me brindaron.

Agradezco a esa personita que está a mi lado, me apoya, me brinda su amistad y cariño. Por hacerme crecer como persona y por compartir tiempo juntos, gracias Ernesto.

Después de cuatro años, con esta tesis finalizo una gran etapa de mi vida. La cual fue increíble, llena de tantos buenos momentos, experiencias y ni se diga de las enseñanzas. Muchas gracias por todo, profesores de la carrera de Biología y generación 2008-2011.

**Al Dr. Sarma** por aceptar dirigir mi proyecto de Tesis, por su comprensión, paciencia, consejos y apoyarme en esta última etapa de la carrera. Por brindarme todo ese conocimiento y ayudarme a desarrollarme cada vez más.

**A la Dra. Nandini** por el apoyo que me brindo durante esta última etapa de mi formación académica. Por todo el conocimiento que me brindo, consejos y por ayudarme a formar una piel de rinoceronte.

Al Dr. Alfonso Lugo Vázquez, Dra. Elvia Lucía Pavón Meza y el M. en C. Mario Modesto Chávez Arteaga: por su apoyo, tiempo y cada una de sus observaciones que realizaron en este trabajo, las cuales ayudaron a que el trabajo fuera mejor.

Agradezco enormemente a la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente al Campus Iztacala y a la carrera de Biología por brindarme apoyo y la oportunidad de formar parte de ella.

Al apoyo económico brindado por CoNAcyt (6176)

## INDICE

<b>1. Resumen .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Abstract.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Introducción.....</b>	<b>11</b>
Fármacos (Generalidades).....	12
Fármacos en el ambiente.....	15
Trayecto de fármacos al ambiente.....	17
Importancia ecológica.....	18
<b>4. Antecedentes.....</b>	<b>21</b>
<b>5. Justificación.....</b>	<b>23</b>
<b>6. Hipótesis.....</b>	<b>24</b>
<b>7. Objetivos.....</b>	<b>25</b>
<b>8. Materiales y Métodos.....</b>	<b>26</b>
Diagrama de flujo.....	29
<b>9. Resultados.....</b>	<b>30</b>
Gráficas y Tablas.....	32
<b>10. Discusión.....</b>	<b>36</b>
<b>11. Conclusiones.....</b>	<b>43</b>

<b>12. Bibliografía.....</b>	<b>45</b>
<b>13. Anexo.....</b>	<b>53</b>

## Resumen

En los últimos años han aumentado los niveles y tipos de sustancias xenobióticas en los ecosistemas de agua dulce. El control ecológico que suele usarse para estas sustancias, no es tan riguroso. Entre los antiinflamatorios no esteroides (AINE's) de uso común, los más importantes en México son paracetamol y diclofenaco. Estos entran de manera natural a los cuerpos de agua por medio de transporte hidrológico por efluentes de plantas de tratamiento y pueden afectar al plancton, como es el caso de los rotíferos. Los rotíferos son ampliamente utilizados como organismos de bioensayo para evaluar los efectos de tóxicos en efluentes. En el presente trabajo, se cuantificaron los efectos crónicos de paracetamol y diclofenaco sobre la dinámica poblacional del rotífero *Platyonus patulus*, utilizando cinco concentraciones nominales (2, 4, 8, 16 y 32 mg L<sup>-1</sup>) (y testigo) de paracetamol y de igual manera para (1.5, 3.12, 6.25, 12.5, 25 mg L<sup>-1</sup>) diclofenaco. El crecimiento poblacional y la densidad poblacional máxima de *P. patulus*, disminuyó al aumentar la concentración de paracetamol o diclofenaco. En la concentración de 16 mg L<sup>-1</sup> de paracetamol y 6.25 mg L<sup>-1</sup> o más de diclofenaco se produjo una reducción significativa en las abundancias poblacionales de los rotíferos. La tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) también mostró tendencias similares a la densidad poblacional máxima en donde  $r$  disminuyó con el incremento de paracetamol o diclofenaco. El intervalo del valor de  $r$  fue de -0.15 a 0.18 por día, en donde resultó negativa cuando la concentración de paracetamol fue de 32 mg L<sup>-1</sup> o 25 mg L<sup>-1</sup> de diclofenaco. El estudio mostro que tanto el paracetamol como el diclofenaco mostraron tener un

efecto negativo sobre la dinámica poblacional del rotífero *Platyonus patulus*, especialmente cuando estos organismos son expuestos a ambos analgésicos durante su ciclo de vida.

## Abstract

In the last few years the levels and types of xenobiotics substances have increased significantly in freshwater systems. The environmental control of these substances is often not rigorous. Among the nonsteroidal anti-inflammatory (NSAID) commonly used, the most important in Mexico are paracetamol and diclofenac. These are found naturally in transport to waterbodies through the hydrological areas of agriculture and effluent treatment plants and can affect planktonic organisms. Of these, the rotifers are widely used as bioassay species to evaluate the effects of toxic effluents. In this study the chronic effects of paracetamol and diclofenac on the population dynamics of the rotifer *Platyonus patulus* were quantified. Five nominal concentrations were used (2-32 mg L<sup>-1</sup>) (and control) of paracetamol (1.5 to 25 mg L<sup>-1</sup>) and equally for diclofenac. Population growth of *P. patulus* generally decreased as the concentrations of paracetamol or diclofenac increased in the medium. The maximum population density decreased with the increase paracetamol or diclofenac. At the concentration of 16 mg L<sup>-1</sup> paracetamol and 6.25 mg L<sup>-1</sup> or more of diclofenac there was a significant reduction in population abundances of rotifers. The rate of population increase ( $r$ ) also showed trends similar to the maximum population density where  $r$  decreased with increasing paracetamol or diclofenac. The range of the value of  $r$  was - 0.15 to 0.18 per day, where it was negative when the concentration of paracetamol was 32 mg L<sup>-1</sup> or L<sup>-1</sup> 25 mg of diclofenac. Thus, though both paracetamol and diclofenac are commonly used pain relievers, they do have a negative effect on the rotifer population dynamics especially when exposed to a long period.

## Introducción

Actualmente ha aumentado el interés a nivel mundial acerca de la detección de los residuos de fármacos en los ambientes acuáticos (Fent *et al.*, 2006); hoy en día los fármacos han obtenido gran atención como sustancias verdaderamente tóxicas en los ecosistemas (Touliabah *et al.*, 2008).

Debido a su aporte continuo, el uso excesivo y persistente de los medicamentos ha ocasionado muchos efectos no deseados en los ambientes acuáticos, como la emergencia y transmisión de genes de resistencia a los antibióticos, daños a las comunidades microbianas por los desinfectantes, variaciones en el ritmo de vida y en las relaciones tróficas por los anestésicos, reducción en la fertilidad y el cambio de la condición sexual por hormonas, así como efectos tóxicos-reproductivos por drogas citostáticas. Estos efectos no deseados cada vez van en aumento, aún a pesar de la cantidad de productos de degradación que existen para este tipo de sustancias (Bila y Dezotti, 2003).

Por lo antes ya mencionado es de suma importancia detectar y conocer los efectos de los medicamentos en sistemas acuáticos. A pesar de que la detección de los efectos negativos en el ambiente acuático es sumamente difícil; existen pruebas de laboratorio in vivo e in vitro, que muestran generalmente los efectos tóxicos de estos compuestos aunque no sean los niveles o concentraciones presentes en el ambiente ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Además la posibilidad de variaciones en la sensibilidad, exposición crónica y los efectos de compuestos en forma de mezcla, tales como una adición en la concentración y el sinergismo no pueden ser descartados (Altenburger *et al.*, 2004; Cleuvers, 2004).

A pesar de la dificultad para detectar los efectos, existe evidencia que muchos de estos productos farmacéuticos son persistentes en el ambiente y pueden llegar a las aguas superficiales y subterráneas, produciendo impactos en los organismos acuáticos primarios en la cadena trófica, en diversas formas como la mortalidad, errores en la muda o eclosión y deformidades anatómicas (Bila y Dezotti, 2003).

Estos riesgos potenciales asociados al desecho de medicamentos en el ambiente, han provocado inquietudes tanto para los reguladores ambientales como para las industrias farmacéuticas (Crane *et al.*, 2006). Una de las principales problemáticas de contaminación de cuerpos de agua es debido a sustancias xenobióticas de uso común que reciben muy poca atención. Estas sustancias comprenden a los fármacos y los ingredientes en los productos de cuidado personal (PCP). Estos son producidos y utilizados en grandes cantidades (Daughton y Ternes, 1999) además de que la utilización de estos mismos ha incrementado con los años (Ternes, 1998).

### **Fármacos (Generalidades)**

Dentro de los fármacos más comúnmente utilizados se encuentran los AINEs (Antiinflamatorios no esteroides), de los cuales en México los de mayor consumo corresponden al ácido acetilsalisílico, paracetamol, ibuprofeno, diclofenaco y naproxeno (OMS, 2004). De estos el paracetamol y el diclofenaco son analgésicos ampliamente utilizados en la medicina humana y veterinaria debido a que tienen un efecto biológico planeado (Haap *et al.*, 2008; Touliabah *et al.*, 2008). Estos

analgésicos son muy comunes para el tratamiento de dolor de grado leve a moderado.

La fenacetina que contiene el paracetamol (Ver figura 1), es el fármaco que se metaboliza a acetaminofén el cual es más tóxico que su metabolito activo. Este es un inhibidor débil de las prostaglandinas en los tejidos periféricos, y no posee efectos antiinflamatorios importantes. El acetaminofén es un analgésico antipirético ampliamente producido, distribuido y consumido mundialmente (Yin *et al.*, 2001). Debido a sus propiedades, es comúnmente utilizado para aliviar la fiebre, dolores de cabeza y otros malestares menores (Dart *et al.*, 2006). Debido a su degradación incompleta (50-75%), el acetaminofén puede entrar en el medio acuático, encontrándose en agua superficial, subsuelo o inclusive en agua potable (Buser *et al.*, 1998).

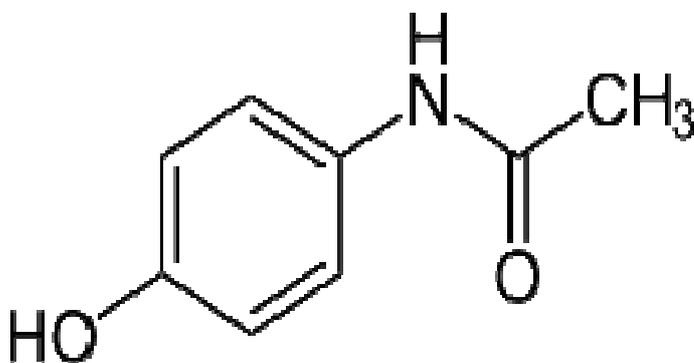


Figura 1. Estructura química del paracetamol

Fórmula química:  $C_8H_9NO_2$

Uso común: analgésico

Peso molecular: 151.2

Solubilidad en agua (g/L): 100

El diclofenaco (ver figura 2) que es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) derivado del ácido benzoacético, funciona como inhibidor potente de la ciclooxigenasa, con propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Es utilizado ampliamente para el alivio del dolor de inflamaciones agudas y crónicas, síndromes reumáticos, procesos degenerativos, dolor inflamatorio, postoperatorio, tendinitis, cirugía dental, dismenorrea y cefalea (Gómez-Oliván *et al.*, 2009). El fármaco se absorbe con rapidez después de su administración oral, y tiene una vida media breve (Katzung, 1995). Sin embargo, al final, solamente es parcialmente eliminado en el tratamiento de aguas residuales (Fent *et al.*, 2006).

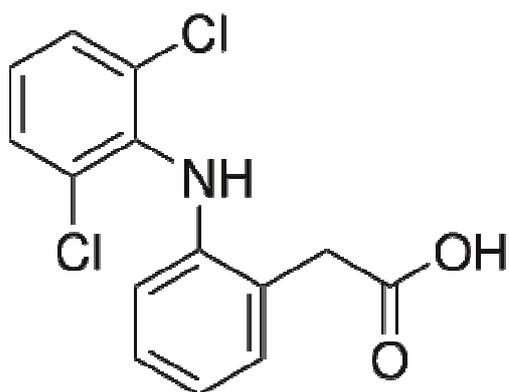


Figura 2. Estructura química del diclofenaco

Fórmula química:  $C_{14}H_{11}C_{12}NO_2$

Uso común: antiinflamatorio, antirreumático

Solubilidad en agua (g/L): 21.3

En México su venta no requiere receta médica y son de los medicamentos más utilizados por la población (OMS, 2004; Gómez-Oliván *et al.*, 2009). Sin embargo, hoy en día no se cuenta con alguna legislación en el país que contemple la presencia de productos farmacéuticos o de cuidado personal en el agua, mucho menos límites permisibles de éstas sustancias (Valdés-Alanís, 2009).

Debido a estos factores cruciales, las inquietudes han aumentado debido a que no se conocen con exactitud los impactos que pueda tener el activo natural fisiológico de estos fármacos sobre diversas especies acuáticas, principalmente cuando estos fármacos son desechados al ambiente (Fent *et al.*, 2006).

### **Fármacos en el ambiente**

Los fármacos pueden ser introducidos al ambiente (ver figura 3) después de su 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 ríos y lagos (Jemba, 2006). Estos, entran de manera natural a los cuerpos de agua por medio de transporte hidrológico debido a efluentes de plantas de tratamiento y una gran variedad de trayectorias (Araujo y McNair, 2007). 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 (Jones *et al.*, 2004; Semarnat, 2007). Considerando estos factores, la evaluación de riesgo en el ambiente acuático debido a la exposición de organismos del zooplancton a estas sustancias es de suma importancia (Cleuvers, 2004).

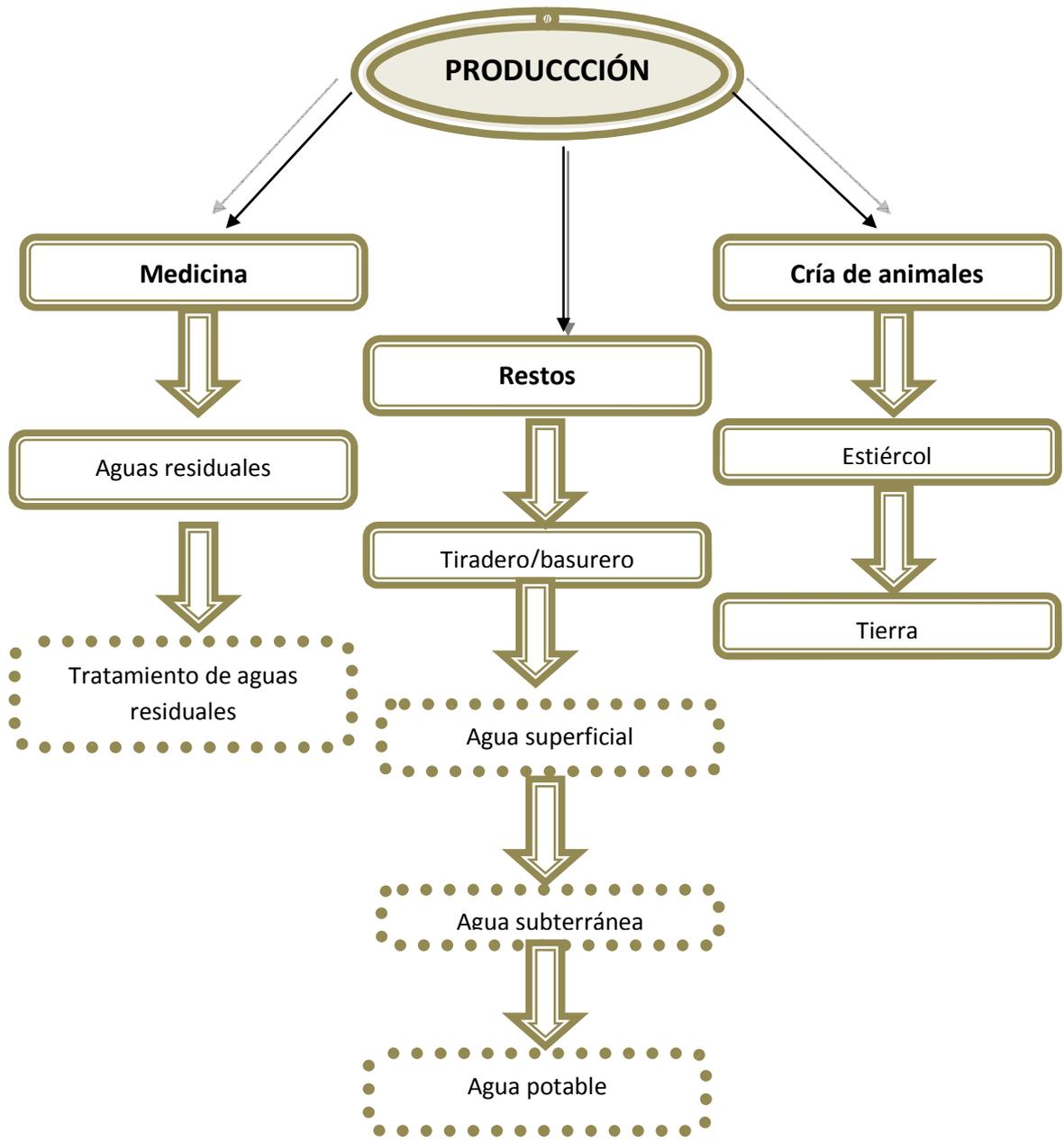


Figura 3. Trayecto de los fármacos hacia el ambiente, tomado de Kümmerer, 2007.

## **Importancia ecológica de los efectos de medicamentos sobre el zooplancton**

Los organismos del zooplancton pueden ser utilizados como indicadores de cambios en ambientes acuáticos, como los que ocasionan los fármacos, ya que presentan características intrínsecas que permiten su fácil manejo como ciclos de vida cortos (ver figura 4) y altas tasas reproductivas. De estos, los rotíferos, por sus características han permitido la formulación, a partir de hipótesis experimentales basadas en interacciones biológicas y/o físicas, de modelos sobre la estructura de comunidades más fácilmente que en sistemas terrestres (Porcuna *et al.*, 2004). En el caso de evaluaciones toxicológicas, los rotíferos son expuestos a compuestos de acuerdo a protocolos ya estandarizados, dando como resultado valores de CL<sub>50s</sub> (Concentración letal 50), CE<sub>50s</sub> (Concentración efectiva media), o CENOs (concentración de efectos no observados) para los puntos finales reproductivos y/o de comportamiento (Wallace, 2002). Las pruebas ecotoxicológicas con estos organismos pueden ser clasificadas en tres tipos principalmente: pruebas de toxicidad aguda, midiendo los puntos finales de mortalidad en el ciclo de vida, también pruebas multigeneracionales, monitoreando los efectos en la población (Preston *et al.*, 1999c) y por último pruebas de toxicidad de corto plazo, que estudian los efectos en rotíferos bdelloideos (Ricci y Boschetti, 2003). Los rotíferos pueden utilizarse en evaluaciones de riesgo de fármacos y sus metabolitos ya que tienen mayor sensibilidad a bajas concentraciones de estas sustancias que otros organismos acuáticos como cladóceros y algas (Snell y Joaquim-Justo, 2007).

Especies del género *Brachionus* (por ejemplo: *Brachionus calyciflorus*, *Brachionus plicatilis*) han sido utilizados como organismos de bioensayo de tipo ecotoxicológico tanto agudos como crónicos, debido a que son altamente sensibles a la contaminación y son consideradas fundamentales para realizar monitoreos selectivos de contaminación en cuerpos de agua (Sarma *et al.*, 2009).

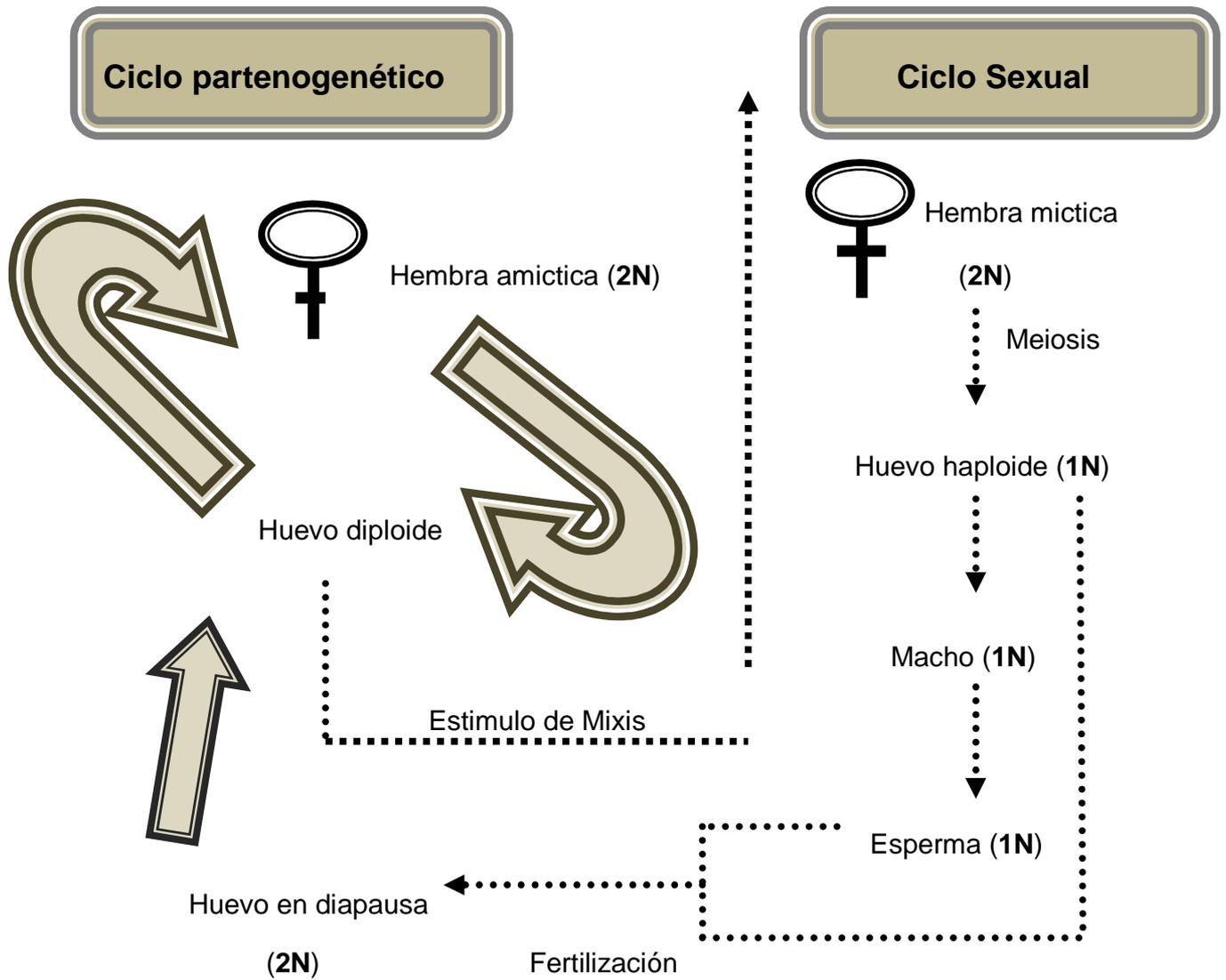


Figura 4. Ciclo de vida de rotíferos (Monogononta) tomado y modificado de Dahms *et al.*, 2010. En donde se muestra como se alterna la reproducción asexual o partenogenética (amíctica) y sexual (míctica).

## Antecedentes

Gibson *et al.* (2010) determinaron la acumulación y toxicidad de carbamazepina grupo de fármacos (ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) y disruptores endocrinos (4-nonylphenol, triclosan, and bisphenol-A) en suelos irrigados por aguas residuales en el Valle de Tula, México. Estableciendo que el triclosan mostró evidencia de acumulación sin embargo, carbamazepina fue más persistente.

Haap *et al.* (2008) observaron el efecto del diclofenaco y DMSO (dimetil sulfóxido) en *Daphnia magna* determinando los niveles de Hsp70 (proteínas de choque térmico) obteniendo como resultado que los niveles expuestos con diclofenaco y DMSO no tuvieron una diferencia significativa de aquellos expuestos a las concentraciones de diclofenaco únicamente. Por otra parte también realizaron pruebas agudas de inmovilización, en donde el diclofenaco (utilizando concentraciones nominales) resulto más tóxico como sustancia única.

Cleuvers (2004) evaluó la toxicidad de la mezcla de los antiinflamatorios diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalisílico. La toxicidad fue relativamente baja, obteniendo para *Daphnia* valores de la concentración media efectiva (CE<sub>50</sub>) en un intervalo de 68 a 166 mg L<sup>-1</sup>. Concluyó que debido a la presencia frecuente de fármacos en forma de mezcla en el ambiente acuático, es indispensable la evaluación de riesgo ambiental.

En el 2002 Ferrari *et al.* determinaron el impacto de fármacos encontrados en aguas residuales tratadas, principalmente de tres medicamentos: carbamazepina, ácido clofibrico y diclofenaco. Carbamazepina se presentaba en todas las plantas de tratamiento y concluyeron que este fármaco es más nocivo comparado con el ácido clofibrico y el diclofenaco, para las bacterias, algas microcrustaceos y peces. Por otra parte también realizaron bioensayos de tipo agudos y crónicos para medir la inhibición de la movilidad utilizando cladóceros (*Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*) y para medir la toxicidad en la reproducción se ocupó una especie de rotífero (*Brachionus calyciflorus*). La concentración utilizada de diclofenaco fue de 150 mg L<sup>-1</sup>, obteniendo un valor de CENO para la prueba crónica de *B. calyciflorus* de 12.5 mg L<sup>-1</sup>. Alcanzando la siguiente jerarquía, en orden descendente de toxicidad: diclofenaco > carbamazepina > Acido clofibrico.

Araujo y McNair en el 2007 evaluaron los efectos de 3 antibióticos (sulfato de estreptomicina, hidrocloreuro de tetraciclina y tilosina tartrato) a nivel individual y poblacional de *B. calyciflorus* y *B. plicatilis*. Determinando que *B. calyciflorus* tuvo mayor sensibilidad a la exposición de los antibióticos seleccionados.

Valdés (2009) evaluó el efecto de la toxicidad producida por el diclofenaco sobre *Daphnia magna*, mediante ensayos de toxicidad aguda y subletal, valorando para esta especie biomarcadores de estrés oxidativo, así como biomarcadores de daño al material genético. Obteniendo como resultados en el caso del ensayo agudo una CL<sub>50</sub> a 48 horas que fue de 116.6 y 96.6 mg L<sup>-1</sup> para neonatos y adultos a 14 días respectivamente, concluyendo que estos últimos fueron más sensibles al

fármaco. Por otra parte, el ensayo subletal, demostró que la exposición de esta especie al fármaco produce estrés oxidativo, así como daño al ADN.

Touliabah *et al.* (2008), diagnosticaron el estrés oxidativo de la comunidad planctónica y algunas especies aisladas durante una prueba de toxicidad de paracetamol. Se realizaron bioensayos en donde las pruebas estaban basadas en el crecimiento y la inhibición de la comunidad fitoplanctónica, zooplanctónica (compuesta por rotíferos y protozoos), *Chlorella ellipsoidea* (Greneck), *Osicillatoria* sp. (Vaucher) y *Vorticella convallaria*. Para el caso de la comunidad zooplanctónica se utilizaron cinco concentraciones (2, 4, 8, 12, 15 mg L<sup>-1</sup>), en donde la CL<sub>50</sub> para los rotíferos fue observada a 8 mg L<sup>-1</sup> después de una exposición a 48 hrs. Concluyeron que el paracetamol tiene efecto drástico en la reproducción de los organismos planctónicos, especialmente después de una larga exposición.

## **Justificación**

Se encontró que los organismos del plancton son más sensibles a distintos fármacos y son considerados excelentes indicadores en pruebas de toxicidad. De estos los rotíferos son utilizados ampliamente como organismos de bioensayo para evaluar tóxicos que se encuentran en efluentes, los cuales contienen diferentes sustancias, entre ellas los analgésicos. Ciertas especies de la familia Brachionidae han sido utilizadas como organismos de bioensayo, debido a que son especies altamente sensibles y son consideradas fundamentales para realizar

monitoreos de contaminación en cuerpos de agua (Snell y Joaquim, 2007). A pesar de que las pruebas de toxicidad en rotíferos han sido ampliamente utilizadas, solamente en pocos casos se han evaluado simultáneamente efectos crónicos y agudos de los contaminantes (Sarma, 2000). Además es de suma importancia mencionar que la presencia de AINE´s (Antiinflamatorio no esteroideo) en el ambiente puede generar una fuerte amenaza a la salud humana y a la vida silvestre considerando que estos medicamentos son persistentes y no responden a métodos de tratamiento convencionales o biológicos. Comparados con las pruebas de toxicidad aguda, los estudios sobre el crecimiento poblacional y tabla de vida demográfica son relativamente limitados o poco aplicados, por esta razón, son indispensables estas evaluaciones para comprender mejor los efectos de tóxicos en rotíferos. A pesar de que se han utilizado diferentes especies de la familia Brachionidae, no se han realizado pruebas de toxicidad crónicas ni agudas utilizando AINE´S con la especie *Platonus patulus*.

### **Hipótesis**

*Platonus patulus* es un organismo sensible a sustancias xenobioticas, por lo que su exposición crónica a bajas concentraciones de analgésicos seleccionados (paracetamol y diclofenaco) tendrá un efecto adverso sobre su crecimiento poblacional.

## **Objetivo General**

Evaluar el efecto de dos analgésicos comúnmente utilizados (paracetamol y diclofenaco sódico) sobre el crecimiento poblacional del rotífero (*Plationus patulus*).

## **Objetivos particulares**

Comparar las tasas de crecimiento poblacional de *P. patulus* bajo cinco diferentes concentraciones nominales de paracetamol y diclofenaco sódico.

Describir las tendencias del crecimiento poblacional de *P. patulus* cultivados por separados, bajos diferentes concentraciones de paracetamol y diclofenaco sódico.

Evaluar y comparar las abundancias máximas de *P. patulus* bajo diferentes concentraciones de paracetamol y diclofenaco sódico.

## Material y Métodos

Se utilizó el rotífero *Plationus patulus*, el cual se aisló previamente de los canales del Lago de Xochimilco, ubicado en el sur del Distrito Federal, México. Posteriormente, esta especie se mantuvo en el laboratorio en condiciones controladas, utilizando como medio EPA, el cual tuvo una dureza moderada y se preparó disolviendo 96 mg NaHCO<sub>3</sub>, 60 mg de CaSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> 60 mg y 0.4 mg de KCl por litro de agua destilada (Anónimo, 1985).

Como alimento se utilizó la microalga *Chlorella vulgaris* la cual se cultivó con el medio basal Bold (Borowitzka y Borowitzka, 1998) y se cosechó cuando alcanzó un crecimiento máximo en sus células (Anexo 1). La densidad de las microalgas fue contada utilizando una cámara de Neubauer. *C. vulgaris*, se administró como alimento para los rotíferos durante su cultivo en laboratorio y en la fase experimental.

El paracetamol *N*-(4-hidroxifenil)etanamida y el diclofenaco 2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acético fueron obtenidos en forma de tabletas comerciales (medicamentos genéricos): el paracetamol en comprimidos (de 500 mg) y el diclofenaco sódico en pastillas (de 100 mg).

El Paracetamol se preparó en una primera concentración de 500 mg L<sup>-1</sup> disolviendo la tableta primero en metanol (10 ml) y posteriormente fue aforado a un litro de agua destilada. Esta solución fue agitada vigorosamente para posteriormente realizar diluciones. Se tomó como concentración de referencia la

reportada por Touliabah (2008), la cual fue de  $8 \text{ mg L}^{-1}$  y a partir de esta concentración se eligieron dos valores superiores y dos inferiores utilizando concentraciones nominales. Por lo que de esta concentración madre se obtuvieron las siguientes concentraciones: 2, 4, 8, 16 y  $32 \text{ mg L}^{-1}$  además del control ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Para preparar las concentraciones de diclofenaco sódico se realizó una primera concentración de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  disolviendo de la misma manera que con el paracetamol. Sin embargo se utilizó como referencia una concentración reportada por Ferrari *et al.*, (2003), la cual fue de  $12.5 \text{ mg L}^{-1}$  obtenida durante una prueba crónica. De esta manera a partir de la primera concentración, mediante diluciones, se llegaron a las concentraciones nominales siguientes: 1.56, 3.125, 6.25, 12.5 y  $25 \text{ mg L}^{-1}$  y el control ( $0 \text{ mg L}^{-1}$ )

El diseño experimental (Fig. 5) consistió en un total de 24 contenedores transparentes (con una capacidad de 50 ml). Para cada una de las concentraciones se realizaron cuatro repeticiones, con una densidad inicial de 1 ind.  $\text{ml}^{-1}$ . La solución final tuvo una concentración de alimento (*Chlorella vulgaris*) de  $1 \times 10^6 \text{ cél ml}^{-1}$ ) con medio EPA. Las condiciones bajo las cuales se realizó el experimento fueron: Temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , pH de 7.5 y con luz continua y difusa.

Posteriormente se realizó diariamente el conteo de organismos y el cambio del medio durante 25 días, en ambos casos hasta observar el decremento de la población.

La tasa de crecimiento se calculó a partir de la siguiente fórmula (Krebs, 1985):

$$r = (\ln N_t - \ln N_0)/t$$

Donde:

r = tasa de crecimiento poblacional;

$N_0$  = densidad inicial;

$N_t$  = densidad final (ind. ml<sup>-1</sup>) (en relación con t);

t = tiempo en días.

Los cambios significativos en el crecimiento poblacional de los organismos (abundancias máximas y tasas de crecimiento poblacional) fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) utilizando el programa Sigma Plot versión 11. Por último se realizó la prueba post- hoc de Tukey para verificar entre cuales de los tratamientos existieron diferencias significativas.

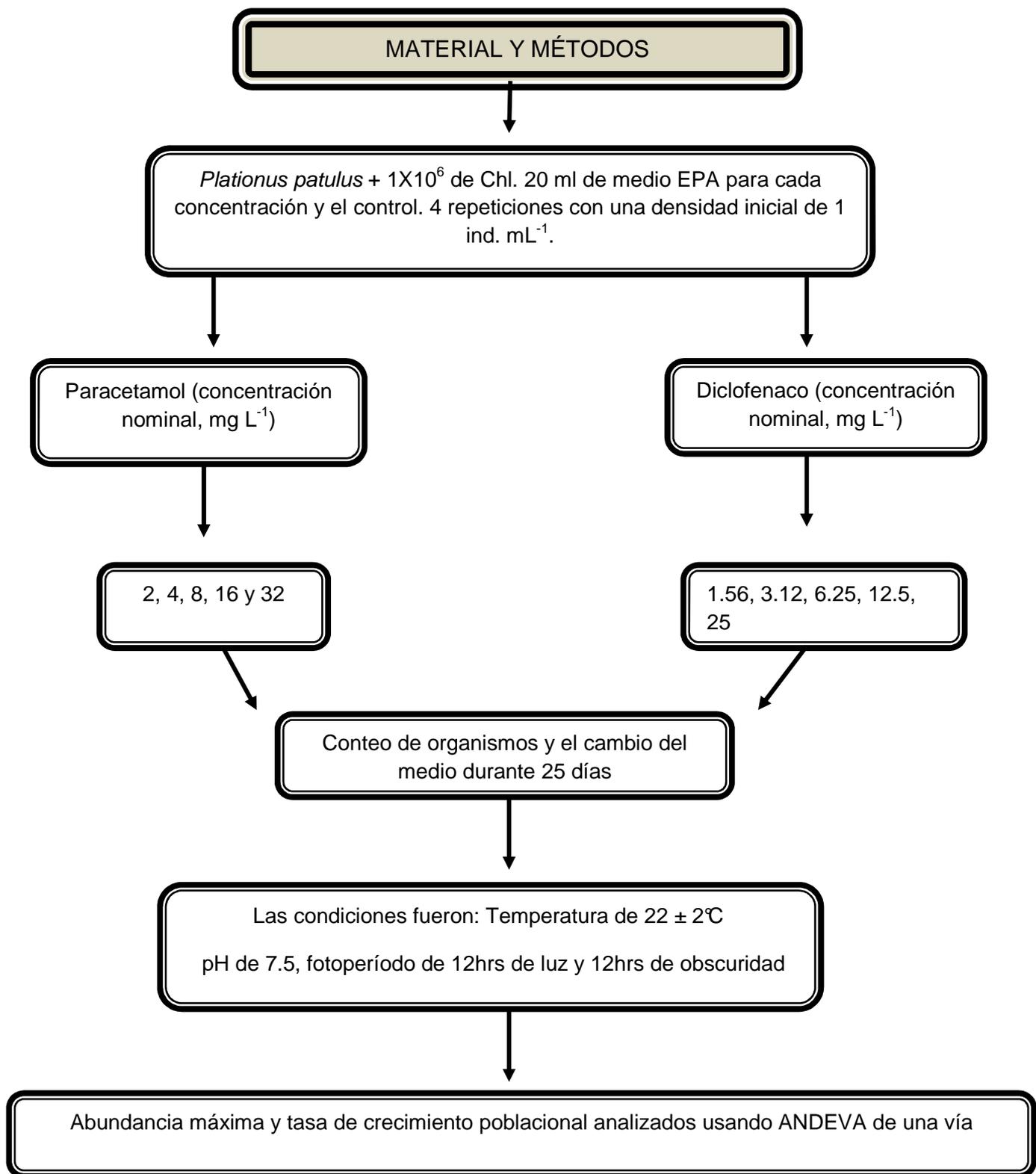


Figura 5. Diagrama de Flujo

## Resultados

Se observó una disminución en el crecimiento poblacional de la especie del rotífero al aumentar las concentraciones de paracetamol y diclofenaco para todos los tratamientos. Los datos sobre el crecimiento poblacional revelaron un efecto significativo ( $P < 0.001$ , ANDEVA), en las concentraciones de ambos analgésicos (paracetamol y diclofenaco) de acuerdo a la abundancia máxima y el día en el que se alcanzó la abundancia máxima (Tabla 1). Se observaron diferencias significativas de acuerdo a la abundancia máxima (ver figura 7) a partir de las concentraciones de 16 y 6.25 mg L<sup>-1</sup> y en el caso de la tasa de crecimiento se muestran diferencias significativas solamente a partir de las concentraciones de 16 y 12.5 mg L<sup>-1</sup> de paracetamol y diclofenaco respectivamente (ver figura 8).

Los datos muestran que el diclofenaco tiene un efecto negativo mayor sobre el crecimiento de los organismos que el paracetamol (ver figura 6). En ambos analgésicos las concentraciones más bajas muestran un mayor crecimiento poblacional a diferencia del control, sin embargo no muestran una diferencia significativa ( $P < 0.001$ ) de acuerdo a  $r$  (Tabla 1) o a la abundancia máxima (ver figura 7).

En el control, la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) se incrementó por día, alcanzando una densidad de 23 ind. mL<sup>-1</sup> mientras que para los tratamientos de paracetamol y diclofenaco se obtuvieron las mayores densidades, las cuales fueron 28 y 24 ind. mL<sup>-1</sup> respectivamente (Fig. 7). A una concentración de 32 mg L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> de paracetamol y 25 mg L<sup>-1</sup> de diclofenaco, no hubo crecimiento y por ende los valores de  $r$  fueron negativos (Fig. 8).

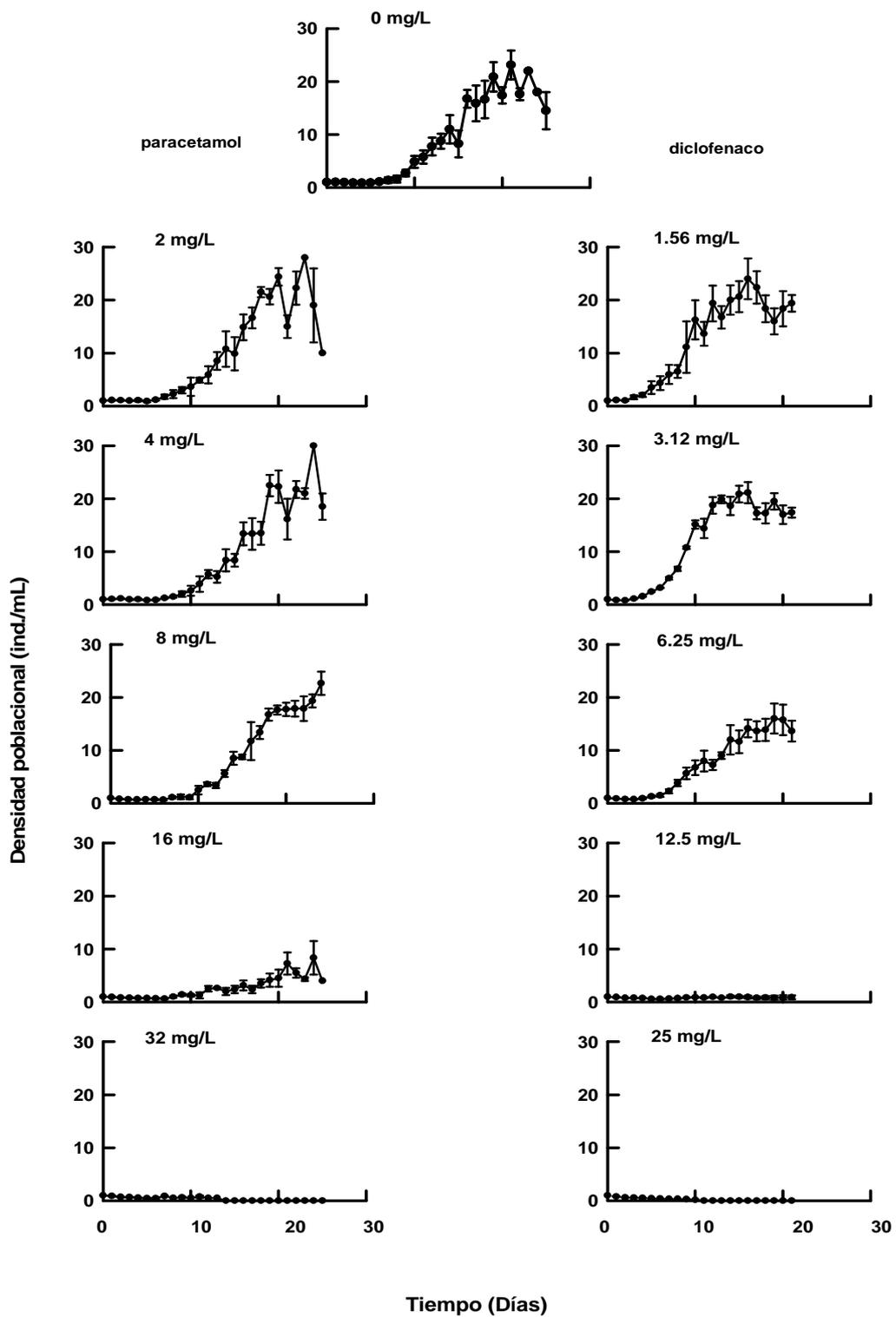


Fig. 6. Curvas de crecimiento poblacional de *Plationus patulus* expuestos a diferentes concentraciones nominales de paracetamol y diclofenaco. Los valores representan el promedio  $\pm$ , el error estándar basados en cuatro repeticiones

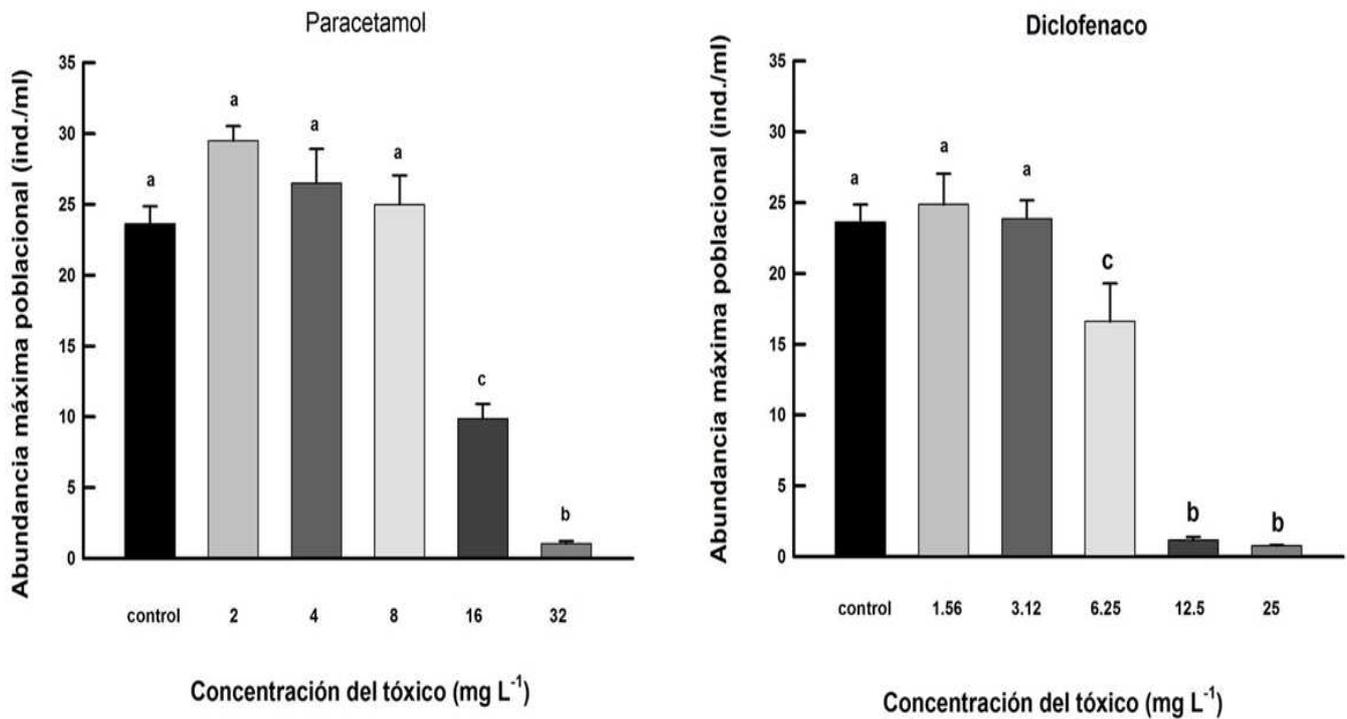


Fig. 7. Densidad máxima poblacional (individuos mL<sup>-1</sup>) de *P. patulus* con relación diferentes concentraciones de paracetamol y diclofenaco. Los valores representan el promedio  $\pm$ , el error estándar basados en cuatro repeticiones. Los datos de las barras con letras idénticas no poseen diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ , -Prueba F).

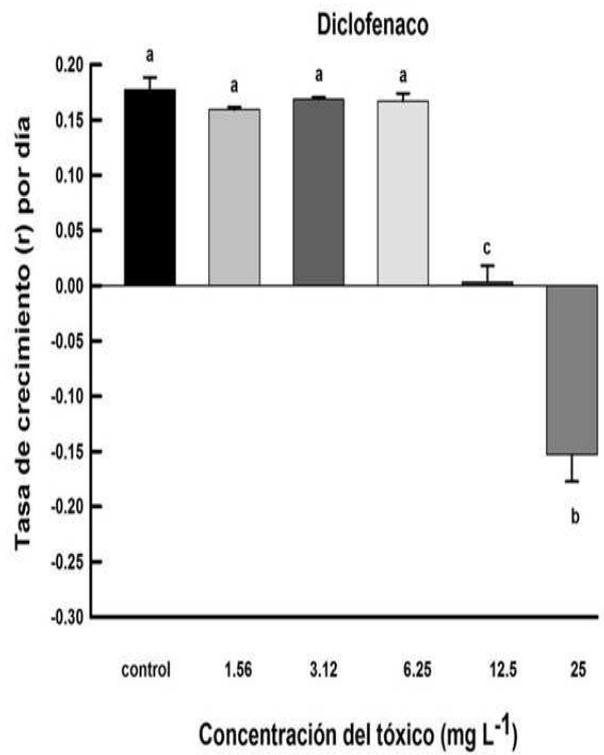
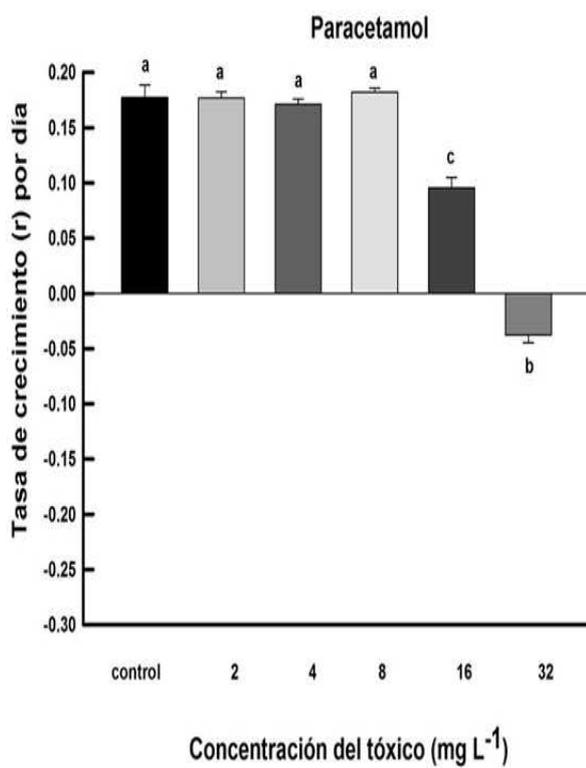


Fig. 8. Tasa de crecimiento poblacional por día ( $r$ ) de *P. patulus* con relación a diferentes concentraciones de paracetamol y diclofenaco. Los valores representan el promedio  $\pm$ , el error estándar basados en cuatro repeticiones

Tabla1.  
 Resultados del análisis de varianza (ANDEVA) basado en la exposición de *P. patulus* a diferentes concentraciones nominales de paracetamol y diclofenaco (GL- grados de libertad, SC- suma de cuadrados, MS-media cuadrática F-prueba de Fisher y P-valor ).

<b>Fuente de variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Abundancia máxima</b>					
<b>Paracetamol</b>					
Entre grupos	5	2515.83	503.16	55.32	<0.001
Error	18	163.7	9.09		
<b>Diclofenaco</b>					
Entre grupos	5	2589.41	517.88	51.83	<0.001
Error	18	179.84	9.99		
<b>Tasa de crecimiento</b>					
<b>Paracetamol</b>					
Entre grupos	5	0.15	0.03	141.91	<0.001
Error	18	0.003	0.0002		
<b>Diclofenaco</b>					
Entre grupos	5	0.36	0.07	110.25	<0.001
Error	18	0.0119	0.0006		

## Discusión

La mayoría de los fármacos tienen un efecto específico en rutas metabólicas tanto de humanos como de animales domésticos. Se sabe que sustancias xenobióticas pueden tener efectos adversos sobre el sistema metabólico de otros organismos, tal es el caso de los invertebrados (Daughton y Ternes, 1999). Se ha detectado en muchos bioensayos la sensibilidad de rotíferos a estas sustancias (Snell y Carmona, 1995; Preston et al., 2000; Araujo y McNair, 2007), sin embargo existen muy pocas publicaciones con respecto a los efectos de los AINE's.

Los rotíferos forman parte importante del zooplancton, en términos de diversidad las especies de México conforman hasta un 15% de las especies conocidas a nivel mundial, es decir, más de 300 especies han sido reportadas en diferentes estados de México, sin embargo menos del 10% de estas especies han sido reportados como especies cultivadas a largo plazo (Sarma, 1997).

Por otra parte, diversas especies de la familia Brachionidae ya han sido utilizadas ampliamente en estudios ecotoxicológicos debido a sus características intrínsecas tales como ciclo de vida corto, fácil manejo y sensibles a cambios en el ambiente (Gama-Flores et al., 1999; Preston et al., 2000; Azuara-García et al., 2006; Araujo y McNair, 2007). La especie *Plationus patulus* es una especie muy popular en ecotoxicología y ha sido incluida como organismo de bioensayo en la ASTM (American Society for Testing Materials) (ASTM, 1991). Aunque *P. patulus* es tratada como una especie del ticoplancton, esta vive como plancton en la mayoría de los cuerpos de agua someros (Ruttner-Kolisko, 1974).

En este ensayo el rotífero mostró tener diferente sensibilidad para ambos analgésicos, sin embargo fue más sensible a las concentraciones de diclofenaco que aquellas utilizadas para el paracetamol. Sin embargo, ya ha sido reportado que la toxicidad y capacidad de bioacumularse que tiene el diclofenaco, en el ambiente ha provocado efectos adversos tanto en especies de invertebrados como para otros organismos (Oaks et al., 2004; Haap et al., 2008).

A pesar de que el diclofenaco tuvo un efecto potencialmente mayor que el paracetamol, este último también tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento poblacional del rotífero a concentraciones altas, especialmente mientras se incrementó el tiempo de exposición al analgésico. Esto concuerda con lo ya sugerido por Daughton y Ternes (1999) y Pascoe *et al.* (2003) quienes mencionan la posibilidad de que los fármacos solamente a concentraciones altas llegan a ser letales y a concentraciones encontradas en el ambiente ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y con tiempos de exposición largos afectan de forma negativa a los organismos. También mencionan que tanto los invertebrados como los peces están en peligro debido a la exposición prolongada a bajas concentraciones de estas sustancias (Pascoe *et al.*, 2003), por lo cual es considerado de suma importancia realizar estudios sobre el crecimiento poblacional que incluyan la tasa de crecimiento y la abundancia de las especies con respecto al tóxico (Gama-Flores *et al.*, 1999).

La  $\text{CL}_{50}$  ya ha sido registrada para diversas especies de rotíferos utilizando paracetamol ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Touliabah *et al.*, 2008), sin embargo con este tipo de

pruebas agudas no es posible determinar el efecto total sobre el desarrollo y reproducción de los organismos.

En trabajos similares Henschel *et al.* (1997) y Cleuvers (2004) concluyeron que tanto el paracetamol como el diclofenaco tienen efectos negativos sobre *Daphnia* sp. con valores de EC<sub>50</sub> entre 19 - 50 mg L<sup>-1</sup> y 65.5 - 79.1 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Se mostró en ambos estudios un decremento significativo conforme aumentó el tiempo de exposición a los analgésicos. Aunque la mayoría de los trabajos realizados han utilizado cladóceros (Marques *et al.*, 2004 a,b; Heckmann *et al.*, 2007; Haap *et al.*, 2008), los rotíferos son considerados como organismos con mayor sensibilidad a este tipo de sustancias (Snell y Joaquim-Justo, 2007).

Por otra parte, el crecimiento poblacional de diversas especies de rotíferos muestra una tendencia de corta duración en cuanto a la fase de adaptación (una semana aproximadamente) y presenta una fase exponencial de dos a tres semanas. Posteriormente se observa notoriamente una fase estacionaria, en la cual se mantiene el crecimiento, sin embargo esta tendencia cambia de acuerdo a las especies seleccionadas (Krebs, 1985). Por ejemplo especies de la familia Lecanidae tienen una tendencia de fase de adaptación de más de dos semanas, sin embargo, *Brachionus calyciflorus* no cuenta con una fase de adaptación tan prolongada, por lo que, desde el inicio del experimento comienza a crecer (Pavón-Reyes *et al.*, 2001; Serranía-Soto *et al.*, 2011).

También se ha observado que las curvas de crecimiento poblacional de una especie pueden variar de acuerdo a las condiciones del cultivo. Se ha

determinado que la misma especie en ausencia de toxinas o estrés presenta pocos días de adaptación y puede alcanzar rápidamente un pico de abundancia máxima y posteriormente cuando existe carencia en cuanto a recursos, comienza a disminuir su crecimiento. Por otra parte, cuando se encuentran bajo condiciones no óptimas, es decir, bajo estrés se observa que la fase adaptación de los organismos duran un periodo más largo (tres semanas) y presenta una fase exponencial corta. Sin embargo también se ha visto que en casos extremos, la población no muestra estas tendencias de crecimiento (Ramírez-Pérez *et al.*, 2004; Ramírez-Pérez y Sarma, 2008; Gama-Flores *et al.*, 2009)

En este experimento, las tres fases de crecimiento se pueden observar claramente en el testigo, así como, en la concentración más baja de diclofenaco y paracetamol. Por ejemplo, en el testigo *P. patulus* demostró una tendencia de fase de adaptación de menos de una semana y una fase exponencial de dos semanas aproximadamente. Sin embargo, cuando *P. patulus* fue expuesto a 16 mg L<sup>-1</sup> de paracetamol o 12.5 mg L<sup>-1</sup> de diclofenaco no tuvo una fase exponencial clara. Además, en concentraciones extremas, tanto de paracetamol como de diclofenaco (32 o 25 mg L<sup>-1</sup>) respectivamente, *P. patulus* no sobrevivió a un periodo mayor de dos semanas.

Por otro lado, se ha determinado que especies zooplanctónicas demuestran una tendencia en donde su abundancia poblacional esta inversamente relacionada con el tamaño, es decir especies pequeñas alcanzan una mayor abundancia que especies de tamaño grande bajo condiciones similares. Por ejemplo Nandini *et al.*

(2007) cultivaron cinco especies de rotíferos en donde, el tamaño varió entre 100 y 200  $\mu\text{m}$ . Reportaron que una especie más pequeña (*Lepadella patella*) alcanzó cinco veces más abundancia que una especie grande (*Brachionus calyciflorus*). Utilizaron diferentes concentraciones de alga ( $0.01 \times 10^6$  hasta  $1.6 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ). Por ejemplo, *Lepadella patella*, que es considerada una especie de pequeño tamaño, alcanzó un valor mayor a 700 ind.  $\text{mL}^{-1}$  sin embargo una especie de mayor tamaño (*B. calyciflorus*) llegó a un valor de tan solo 10 ind.  $\text{mL}^{-1}$ . Por otra parte, en este trabajo *P. patulus* alcanzó una densidad de aproximadamente 25 ind.  $\text{mL}^{-1}$ , lo cual se encuentra en el intervalo ya reportado para las especies de rotíferos de tamaño pequeño (Nandini *et al.*, op.cit.).

Otra variable que es considerada de alta sensibilidad a los cambios en el ambiente es el caso de la densidad máxima. Ya ha sido reportado en diversos trabajos (Gama-Flores *et al.*, 1999; Azuara-García *et al.*, 2006) que bajo condiciones de estrés, la abundancia máxima de cualquier especie de rotíferos es menor en comparación a la misma especie cuando no se encuentra sometida a estrés. Esta tendencia se observa claramente en este trabajo, ya que en los resultados se muestra una disminución en la abundancia máxima de *P. patulus* cuando se incrementan las concentraciones de ambos analgésicos (paracetamol y diclofenaco).

Tomando en cuenta los datos de vida demográfica y/o crecimiento poblacional, se puede derivar el valor de tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ). Generalmente el valor de la tasa de crecimiento poblacional, que se calcula de datos de tabla de

vida demográfica es mayor que los valores obtenidos mediante el método de crecimiento poblacional. Esto se debe a que en el crecimiento poblacional, los individuos expuestos a la sustancia, se quedan en la misma concentración del toxico durante todo el experimento hasta que este culmina, lo cual causa una competencia intraespecifica por el alimento, causando una disminución en el valor de  $r$ . Por otra parte, en los experimentos diseñados para tabla de vida demográfica, los neonatos que nacen durante el experimento se van eliminando, de esta manera no se confunden con la población original. Por lo que, la competencia intraespecifica por los recursos se reduce o es mínima, y por esta razón se observa el incremento de  $r$  (Pavón-Reyes, 2001; Azuara-Garcia, 2006).

Se puede observar claramente en los resultados, que la ausencia de diclofenaco o paracetamol *P. patulus* tuvo un valor de  $r$  de 0.18 por día. Sarma *et al.* (2001) revisaron el intervalo de tasa de crecimiento poblacional de diversas especies de rotíferos, de los cuales, el valor de  $r$  vario entre 0.2 -2 por día, dependiendo de las especies, así como de la densidad de alimento que les fue suministrado. Entre estas especies de rotíferos *B. calyciflorus* y *B. plicatilis* tuvieron una alta tasa de crecimiento (mayor a 1.5 por día) y la especie *Anureaopsis* sp tuvo una tasa muy baja (>1 por día). Por otra parte, *Platonus patulus* obtuvo un valor de tasa de crecimiento que varió entre 0.2 y 1.0 por día dependiendo de la concentración de alimento. Generalmente cuando fueron alimentados con  $2 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> de alimento, la tasa de crecimiento poblacional fue de 1.0 por día. En este trabajo se utilizo  $1 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>, lo cual resulto en un valor de  $r$  de una quinta parte del valor máximo reportada para *P. patulus* según la literatura (Sarma *et al.*, 2001 *op.cit.*).

La tasa de crecimiento poblacional, también es considerada una variable muy sensible en relación a cambios en el ambiente. Existen diversas revisiones en las cuales se muestran los valores de tasa de crecimiento para varios estudios de ecotoxicología, tal es el caso de Forbes y Calow (1999) quienes revisaron los valores de  $r$  para diversas especies zooplanctónicas que fueron expuestas a diferentes tipos de tóxicos. Por otra parte, también mencionaron que la tasa de crecimiento es una de las variables consideradas más sensibles en relación al estrés. Tomando esto en cuenta, en este trabajo se puede observar claramente como el valor de  $r$  disminuyó cuando se incrementaron las concentraciones de ambos analgésicos, además de que el valor de  $r$  resultó negativo cuando *P. patulus* fue expuesto a las concentraciones más altas (paracetamol 32 mg L<sup>-1</sup> y diclofenaco 25 mg L<sup>-1</sup>).

## Conclusión

- Tanto el paracetamol como el diclofenaco son analgésicos de uso común en México, sin embargo muestran un efecto negativo sobre la dinámica poblacional del rotífero *Plationus patulus*.
- Los datos reflejan que existen efectos negativos sobre todo cuando estos organismos son expuestos a ambos analgésicos (paracetamol y diclofenaco sódico) durante su ciclo de vida.
- De acuerdo a los datos se observa claramente que hubo un efecto negativo tanto en la tasa de crecimiento como en la abundancia máxima de la especie del rotífero, producidos por las concentraciones más altas de los analgésicos seleccionados.
- Debido a que se observaron efectos negativos en la población de rotíferos durante la exposición a paracetamol y diclofenaco sódico, estos fármacos pueden ser considerados peligrosos para el ambiente y dañinos para los organismos acuáticos. Por lo cual, se considera de suma importancia observar y monitorear los efectos que tienen este tipo de sustancias (AINE's) sobre los organismos acuáticos.

- Considerando que no existe un control riguroso en México sobre la presencia, el desecho y límites permisibles de productos farmacéuticos en el ambiente, es de suma importancia que las autoridades correspondientes lleven a cabo el monitoreo los efectos de estos fármacos en el ambiente.

## Bibliografía

- Altenburger, R., Walter, H., Grote, M. 2004. What contributes to the combined effect of a complex mixture? *Environmental Science and Technology*. 38:6353-6362.
- Azuara-Garcia, R., S.S.S. Sarma y S. Nandini. 2006. The combined effects of zinc and alga on the life table demography of *Anuraeopsis fissa* and *Brachionus Rubens* (Rotifera). *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 41:559–572.
- Anonimo. 1985. Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. US Environment Protection Agency EPA/600/485/013, Washington.
- Araujo , A., McNair, J. N. 2007. Individual and population level effects of antibiotics on the rotifers, *Brachionus calyciflorus* and *B. plicatilis*. *Hydrobiologia* 593:185–199.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). Standard guide for acute toxicity with the rotifer *Brachionus* 1991; E 1440 Philadelphia PA, USA.
- Bila D.M. & Dezotti M. 2003. Fármacos no medio ambiente. *Química Nova*. 26: 523-530.
- Borowitzka, M.,A. y Borowitzka L.,J. 1988. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University, London. 480 p.
- Buser, H.R., Muller, M.D. y Theobald. 1998. Occurrence of the pharmaceutical drug clofibric acid and the herbicide mecoprop in various Swiss lakes and in the North Sea. *Environmental Science and Technology*. 32: 188-192.

- Carlsson C., Johansson, A., Alvan G., Bergman, Kuhler, T. 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of the Total Environment*, 364: 67-87.
- Crane, M., Watts, C.H. y Boucard, T. 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals *Science of the Total Environment* 367, 23–41.
- Cleuvers, M. 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 309–315.
- Conde-Porcuna, J.M., Ramos-Rodríguez, E., Morales-Baquero, R. 2004. El zooplankton como integrante de la estructura trófica de los ecosistemas lénticos. *Ecosistemas*. 13:23-29.
- Dart, R.C., Erdman, A.R., Olson, K.R., Christianson, G., Manoguerra, A.S., Chyka, P.A., Caravati, E.M., Wax, P.M., Keyes, D.C., Woolf, A.D., Scharman, E.J., Booze, L.L., Troutman, W.G. 2006. Acetaminophen poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clinical toxicology*. 44 (1): 1–18.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environmental Health Perspective*, 107; 907–942.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. 76, 122–159.

- Ferrari, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., & Garric, J. 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceutical found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55:359-370.
- Forbes VE, Calow P 1999. Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? *Environ Toxicol Chem* 18(7): 1544-1556.
- Gama-Flores J. L., S.S.S. Sarma, M. A. Fernández Araiza. 1999. Combined effects of *Chlorella* density and methyl parathion concentration on the population growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 62: 769- 775.
- Gama-Flores, J. L., S. S. S. Sarma y S. Nandini. Combined effects of exposure time and copper toxicity on the demography of *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera). 44, 1–8.
- Gómez-Oliván, L., Carmona-Zepeda, F., Galar-Martínez, M., Téllez-López, A., Amaya-Chavez, A. 2009. Estudio de automedicación en una farmacia comunitaria de la ciudad de Toluca. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 40 (1): 5-11.
- Gibson, R., Durán-Álvarez, J. C., León Estrada, K., Chávez, A., Jiménez Cisneros, B. 2010. Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere*. 81, 1437–1445.

- Haap, T., Triebkorn, R., Köhler H., 2008. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: Immobilisation and hsp70-induction. *Chemosphere* 73: 353–359.
- Hans-U, D., Atsushi, H., Jae-Seong, L. 2010. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. *Aquatic toxicology*. 101; 1–12.
- Henschel, K., Wenzel, S. E. and Diedrich, M. 1997. Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Reg. Toxicology Pharmacology*, 25: 220-225.
- Heckmann, H.L., Callaghan A., Hooper , H., L., Connon, R., 1., Hutchinson, T., H., Maund, S., J., Sibly, R. M. 2007. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics *Toxicology Letters*, 172: 137-145.
- Jemba, P. 2006. Excretion and ecotoxicology of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 63: 113-130.
- Jones, O., Vouloulis, N., Lester, J. 2004. Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment. *Critical reviews in Toxicology*, 34 (4): 335-350.
- Katzun, B. 1995. *Farmacología básica y clínica*. Editorial El manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F. pp. 651- 662.
- Krebs, C. J. 1985. *Ecology; Population biology; Biogeography; Methodology*. Harper & Row (New York). 800 p.
- Kümmerer, K. 2007. Pharmaceuticals in water supplies. *Encyclopedia of water science*.

- Marques, C.R., Abrantes, N., Goncalves, F., 2004a. Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans: I. acute and chronic effects of acetylsalicylic acid. *Environmental Toxicology*, 19: 518-526.
- Marques, C.R., Abrantes, N., Goncalves, F., 2004b. Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans: II. acute and chronic effects of acetylsalicylic acid metabolites. *Environmental Toxicology*, 19: 527-540.
- OMS (organización Mundial de la Salud) Formulario Modelo de la OMS,[en línea].  
Web: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js5422s/14.2.html>
- Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Chaudry, M.J.I., Arshad, M., Mahmood, N.S., Ali, A., Khan, A.A., 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 427: 630-633.
- Pascoe, D., Kamtanut, W. and Muller, C. 2003. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrate? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, 51: 521- 528.
- Pavón-Lucía, E., Sarma, S. S. S., Nandini, S. 2001. Effect of different densities of live and dead *Chlorella vulgaris* on the population growth of rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). *Revista Biologica Tropical*. 49, 895–902.
- Preston, B.L., Snell, T.W., Kneisel, R., 1999c. UV-B exposure increases acute toxicity of pentachlorophenol and mercury to the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Environmental Pollution*, 106; 23–31.
- Preston, B. L., Snell, T. W., Robinson T. L. & Dingmann, B. J. 2000. Use of the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* in a screening assay for potential

- endocrine disruptors. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 2923-2928.
- Ramírez-Pérez, T., S.S.S. Sarma., S. Nandini. Effects of Mercury on the Life Table Demography of the Rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera). *Ecotoxicology*, 13, 535–544.
- Ramírez-Pérez, T. Y S.S.S. Sarma. 2008. Combined effects of heavy metal (Hg) concentration and algal (*Chlorella vulgaris*) food density on the population growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera: Brachionidae). 29(2), 139-142.
- Ricci, C., Boschetti, C., 2003. Bdelloid rotifers as model systems to study developmental biology in space. *Advance Space Biology Medicine*, 9; 25–39.
- Ruttner-Kolisko, A. 1974. Plankton rotifers. Biology and taxonomy. English translation of *Die Binnengewässer* v. 26, part 1. 146
- S. Nandini, Sarma, S.S.S., Amador-López, R. J., Muñoz Bolaños, S. 2007 Population growth and body size in five rotifer species response to variable food concentration. *Journal of Freshwater Ecology*, 22.
- Sarma, S.S.S. y Elías-Gutiérrez, M. 1997. Taxonomic studies of freshwater rotifers (Rotifera) from Mexico. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 44:341-357.
- Sarma S.S.S., 2000. The use of rotifers for ecotoxicological studies in Mexico. P. 8-11. En: *Estudios sobre plankton en México y el Caribe*. E. Ríos-Jara, Juárez-Carrillo, M. Pérez-Peña, E. López-Uriarte, E.G., Robles-Jarero, D.U. Hernández-Becerril y M. Silva-Briano (eds.). *Sociedad Mexicana de Planctología y Universidad de Guadalajara*. 147p.

- Sarma S.S.S., Larios-Jurado, P.S. y Nandini, S. 2001 Effect of three food types on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Rev. Biol. Trop.* 49(1): 75-82
- Sarma S.S.S., Serranía-Soto, C. & Nandini S. 2009. Rotíferos. En: Ceballos G. List R, Gorduño G, López-Cano R, Muñozcano-Quintanar MJ, Collado E & San-Ramón JE (Editores). *La Diversidad Biológica del Estado de México. Estudio del Estado. Biblioteca Mexiquense del Bicentenario. Colección Mayor, Gobierno del Estado de México.* Pp. 113-117; Apéndice VII pp. 411-416.
- SEMARNAT (secretaria de medio ambiente y recursos naturales).2007. Página de la Semarnat, Comisión del agua (CNA). Disponible en: <http://www.infoagua.org/cuanta-agua-tiene-mexico.html>
- Serranía-Soto, C.R., S.S.S. Sarma y S. Nandini. 2011. Studies on comparative population growth of some species of the rotifer *Lecane* (Rotifera). *Journal of Environmental Biology.* 32, 523-527.
- Snell, T. W. y Carmona, M. J. 1995. Comparative toxicant sensitivity of sexual and asexual reproduction in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Environmental Toxicology*, 14: 415-420.
- Snell, T. W. & Joaquim-Justo, C. 2007. Workshop on rotifers in ecotoxicology. *Hidrobiologia.* 593; 227-232.
- Ternes, T. A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32:3245-3257.
- Touliabah H.E., El-Bassat R.A., El-Shimy A. & Harisa G.I. 2008. Oxidative stress of plankton community and some isolated species during paracetamol toxicity test. *Journal of Biological Sciences.* 8: 13-23.

- Valdés-Alanís, A. 2009. Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco sobre *Daphnia magna*. (Grado de maestro en ciencias Quimiobiológicas- Instituto Politecnico Nacional), {En línea} [http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/params/title/evaluacion-toxicidad-producida-diclofenaco-daphnia-magna/id/52610206.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/evaluacion-toxicidad-producida-diclofenaco-daphnia-magna/id/52610206.html).
- Wallace, R.L., 2002. Rotifers: exquisite metazoans. Integrative and Comparative Biology 42, 660–667.
- Yin, Q.P.O., Tomlinson, B., Chow, A.H.L., Chow, M.S.S. 2001. Pharmacokinetics of acetaminophen in Hong Kong Chinese subjects. International journal of Pharmaceutics, 22: 305-308.

## ANEXO . Medio Bold Basal

Preparación de agua reconstituida con dureza moderada, empleado como medio de cultivo, además utilizado como medio de dilución para pruebas ecotoxicológicas.

La preparación del medio se baso en la propuesta de

1.- NaNO <sub>3</sub>	250gr L <sup>-1</sup>
2.- MgSO <sub>4</sub>	75gr L <sup>-1</sup>
3.- K <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub>	75gr L <sup>-1</sup>
4.- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	75gr L <sup>-1</sup>
5.- NaCl	75gr L <sup>-1</sup>
6.- EDTA	50gr + 31 gr de KOH L <sup>-1</sup>
7.- FeSO <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> )	4.98gr L <sup>-1</sup> + (1ml 31 gr de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
8.- H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.42gr L <sup>-1</sup>
9.- CaCl <sub>2</sub>	25gr L <sup>-1</sup>
10.-Elementos traza:	
a) ZnSO <sub>4</sub>	8.82gr L <sup>-1</sup>
b) MnCl <sub>2</sub>	1.44gr L <sup>-1</sup>
c) MoO <sub>3</sub>	0.71gr L <sup>-1</sup>
d) CuSO <sub>4</sub>	1.75gr L <sup>-1</sup>
e) Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	0.49gr L <sup>-1</sup>

Para el cultivo de microalgas se realizo en recipientes con una capacidad de 2 L, en donde las tapas de cada recipiente deben de tener dos perforaciones. Para comenzar, se realiza una solución en la cual se tomaran 30 mL de cada uno de los nutrientes (1-10). Posteriormente se toman 30 mL y se transfieren a cada uno de los recipientes.

A cada botella (recipiente) se le agregaran 1.8 L de agua destilada y posteriormente se le serán adicionados de 5 a 10 mL de cultivo puro de alga (*Chlorella vulgaris*). Sin embargo, se revisara previamente la muestra del cultivo de *C. vulgaris* para verificar que no exista la presencia de algún contaminante. Posteriormente a cada botella se aplicara cada tercer día, 0.5 mL de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y finalmente se coloca un dispositivo de aireación (tubo de vidrio y manguera) y se mantiene en condiciones de luz constante.