

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO DE ANALGÉSICOS SELECCIONADOS
(PARACETAMOL Y DICLOFENACO) SOBRE EL
CRECIMIENTO POBLACIONAL DE *Moina*
macrocopa (Crustacea: Cladocera).**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

BIOLOGO

PRESENTA:

ROSA MARTHA MORENO GUTIÉRREZ

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 se la dedico para quien la principal satisfacción ha sido verme convertido en un profesionalista y a quien nunca podre defraudar, mis padres.

Rosa Martha Gutiérrez Nava y Magdaleno Moreno Mira

Que han sabido guiar mis pasos hacia el conocimiento y han sembrado en mí la vocación de servir y ser cada día mejor, gracias por brindarme su apoyo, consejo y por alentarme en los momentos más difíciles, anhelando que siempre me preparara para enfrentarme a la vida.

**“Cree a aquellos que buscan la
verdad. Duda de los que la
encuentran”**

André Gide

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis compañeros de laboratorio y amigos Roció, Brenda, Diego, César, Gisela, Rosaura, Aaron, y Esme, que me apoyaron y estuvieron conmigo en todo momento, aunque sea solo para molestar.

Al Dr. Sarma, por haber confiado en mi persona, por la paciencia, por la dirección de este trabajo, por los consejos, el apoyo.

A la Dra. Nandini, Dr. Alfonso Lugo Vázquez, Dr. José Luis Gamma Flores y el M. en C. Mario Modesto Chávez Arteaga: por el apoyo, experiencia y orientación que me brindaron para culminar este último paso en mi carrera profesional.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente al Campus Iztacala y a la carrera de Biología.

Al apoyo económico brindado por CoNAcyt (6177)

INDICE

Contenido	Página
1. Resumen.....	6
2. Abstract.....	8
3. Introducción.....	10
4. Antecedentes.....	19
5. Justificación.....	22
6. Hipótesis.....	24
7. Objetivos.....	25
8. Materiales y Métodos.....	26
Diagrama de flujo.....	29
9. Resultados.....	30
Graficas y Tablas.....	32
10. Discusión.....	36
11. Conclusiones.....	41
12. Bibliografía.....	42
13. Anexo.....	52

RESUMEN

En los últimos años han aumentado los niveles y los tipos de sustancias xenobióticas en los ecosistemas de agua dulce. El control ecológico de muchas de estas sustancias que suelen verterse en cuerpos de agua no es tan riguroso, o incluso no existen normas que lo regulen en especial para los fármacos. En México los analgésicos más comunes son el paracetamol y el diclofenaco ya que su venta no requiere receta médica. Estas sustancias finalmente son liberadas en cuerpos de agua a través de la excreción de humanos, mascotas, riego de cultivos agrícolas con aguas residuales, descargas domésticas, y la eliminación inapropiada de los seres humanos, afectando a organismos como el zooplancton. Entre los grupos más importantes del zooplancton se encuentran los rotíferos y los cladóceros. Los cladóceros son ampliamente utilizados como organismos de bioensayo para evaluar los efectos tóxicos de efluentes que contienen diversas sustancias incluyendo los analgésicos. En este trabajo se cuantificaron los efectos crónicos de paracetamol y diclofenaco sobre la dinámica poblacional del cladóceros *Moina macrocopa*. Se utilizaron cinco concentraciones nominales de ambos analgésicos (2, 4, 8, 16, y 32 mg/L para paracetamol y 1.5, 3.12, 6.25, 12.5 a 25 mg/L de diclofenaco además del control) y fueron alimentados con *Chlorella vulgaris* (1×10^6 cel./mL). Los resultados obtenidos fueron: el crecimiento poblacional y la densidad máxima poblacional de *M. macrocopa* fueron disminuyendo conforme aumentaba la concentración de ambos analgésicos.

En cuanto a la tasa de crecimiento hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) para el paracetamol y ($p < 0.01$) para el diclofenaco. En conclusión, el diclofenaco fue más tóxico que el paracetamol.

A pesar de que el paracetamol y el diclofenaco son comúnmente utilizados para aliviar el dolor, tienen un efecto negativo sobre la dinámica poblacional de *M. macrocopa* principalmente el diclofenaco a altas concentraciones.

Palabras clave: AINE'S, cladóceros, toxicidad, exposición crónica, crecimiento poblacional.

ABSTRACT

In recent years there has been an increase in the levels and types of xenobiotics substances within freshwater ecosystems. The environmental control of many of these substances are discharged into water bodies and it is not as rigorous as it should be. There are no standards that regulate their limits, specifically for drugs. In Mexico the most common painkillers known are paracetamol and diclofenac, their sale do not require a medical prescription. These substances are eventually released into diverse waterways whether it's through human excretion, pets, farm crop irrigation with wastewater, domestic discharges and improper human disposal, affecting organisms such as zooplankton. Among the major groups of zooplankton are rotifers and cladocerans. Cladocerans are widely used as bioassay organisms to evaluate the toxic effects of effluents that contain various substances including analgesics. In this paper we quantified the chronic effects of paracetamol and diclofenac on the population dynamics of the cladoceran *Moina macrocopa*. We used five nominal concentrations for both analgesics (2, 4, 8, 16, and 32 mg / L for paracetamol and 1.5, 3.12, 6.25, 12.5 to 25 mg / L for diclofenac and control) and cladocerans were fed with *Chlorella vulgaris* (1×10^6 cells / mL). The results show a tendency of population growth and high population density of *M. macrocopa* and a decrease with increasing concentrations of both analgesics. The growth rate showed a significant difference ($p < 0.05$) for paracetamol and ($p < 0.01$) for diclofenac.

Even though, both paracetamol and diclofenac are commonly used pain relievers, they do have a negative effect on the *M. macrocopa* population dynamics especially when are under high concentrations of diclofenac.

Keywords: AINE'S, cladocerans, toxicity, chronic exposure of population growth.

INTRODUCCIÓN

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 (SAGAN, 2007). El agua es la sustancia más abundante en la Tierra, cubre aproximadamente 360, 650,000 Km² de su superficie, es decir, casi tres cuartas partes de la corteza terrestre. El 97.5% de agua que existe en la Tierra corresponde al agua salada que se encuentra presente en los mares y océanos, mientras que el 2.5% restante (aproximadamente de 39 millones de Km³) es agua dulce. Sin embargo, cerca del 68.9% de toda el agua dulce (24 millones de Km³) no se halla disponible, ya que se encuentra distribuida en forma de nieve y hielo perpetuos, cubriendo las regiones montañosas, los casquetes y glaciares situados en zonas polares; 0.001% en la atmósfera del planeta; 30.8 % (8 millones de Km³) en las aguas subterráneas; y 0.3% en los lagos, ríos y a poca profundidad en el suelo. Solamente esta última porción es el agua que se renueva habitualmente con la lluvia y las nevadas y es, por tanto, un recurso sostenible (Toledo, 2002).

La mayoría de los recursos de agua dulce del planeta se concentran en solo 6 países: Brasil, Rusia, Canadá, Estados Unidos, China e India. En México en el 20% del territorio sur del país donde se produce el 80% del escurrimiento, habita el 24% de la población y se genera el 23% del Producto Interno Bruto (PIB), mientras que en el centro y el norte del país (80% del territorio) el escurrimiento es únicamente del 20%, pero allí habita el 76% de la población y se genera el 77% del PIB.

Es decir, en donde se concentran la población y la actividad económica, el agua escasea fuertemente, mientras que en donde abunda el agua, la población y el desarrollo no constituyen una presión (Carabias, 2004).

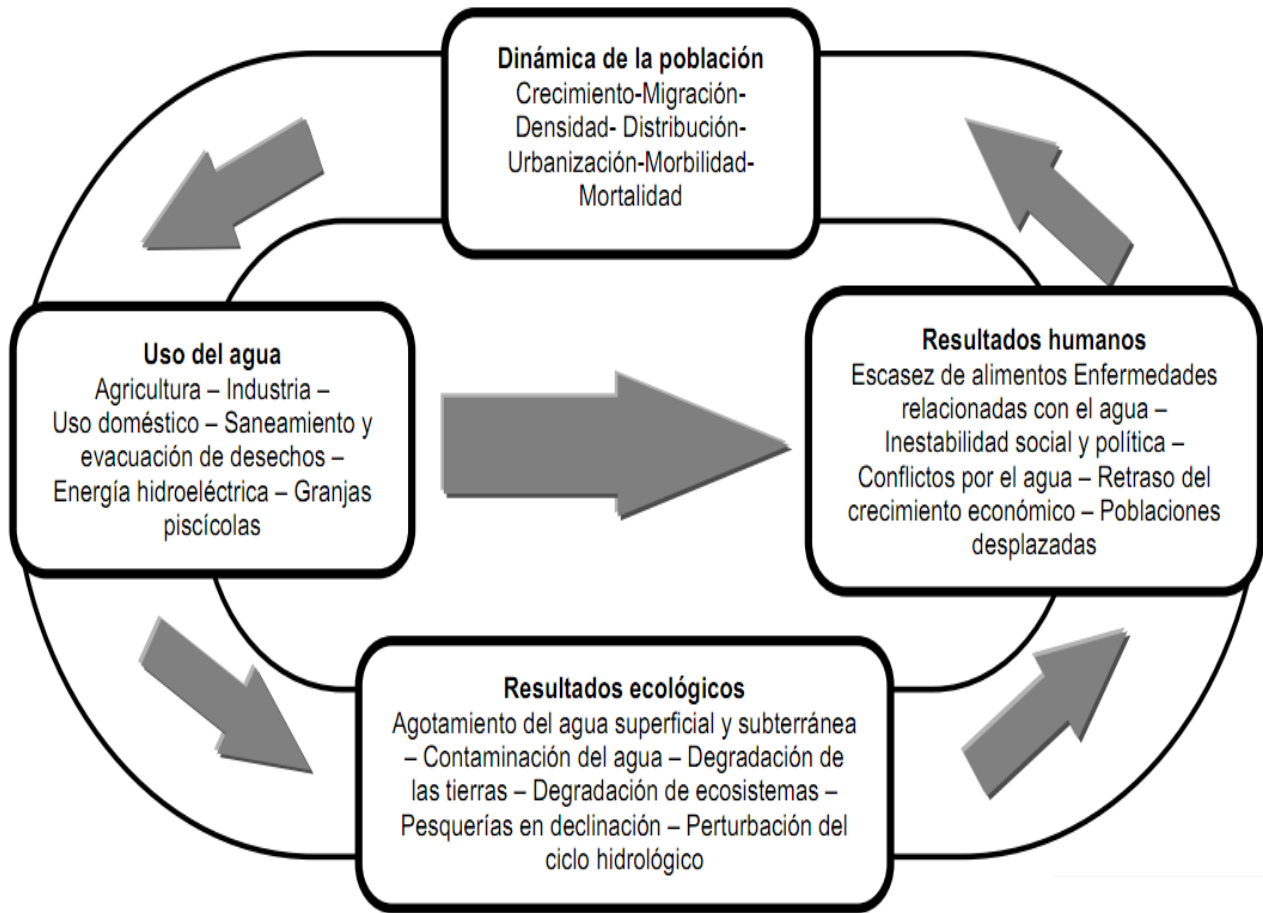


Figura 1. Vínculos entre la población y el agua dulce (World Conservation Union (IUCN), (1996), PRB and USAI).

La extracción del agua 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 (Figura 1) (SAGAN, 2007).

La industria farmacéutica no es la excepción: en los últimos años ha habido un aumento en la producción y el consumo de fármacos en el mundo causando que estos representen una nueva clase de contaminantes para el ambiente (Araujo y McNair, 2007). 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 muchas moléculas similares, que se han conservado a través de la evolución. Sin embargo, pueden producir respuestas inesperadas en organismos menores debido a diferencias fisiológicas (Fent et al., 2006).

Los fármacos más consumidos en el mundo son los antibióticos y AINE's (analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos). En México los AINE's son consumidos de forma irracional ya que se venden sin receta médica, en especial el paracetamol y el diclofenaco (OMS, 2004).

El paracetamol (Figura 2) es un antiinflamatorio no esteroide (AINE) que posee propiedades analgésicas y antipiréticas, indicado para aliviar dolores ligeros o moderados, reducir la fiebre y para resfriados (Iannacone y Alvariño, 2009).

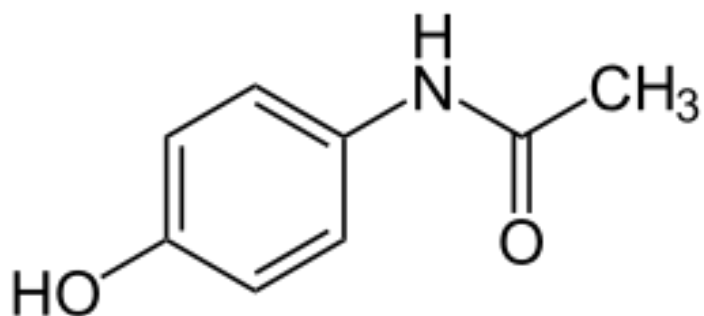


Figura 2: fórmula química del paracetamol

El diclofenaco (Figura 3) es un antiinflamatorio no esteroide (AINE) derivado del ácido benzoacético, que posee propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Es utilizado ampliamente para el alivio del dolor en inflamaciones agudas y crónicas, síndromes reumáticos, procesos degenerativos y cirugía dental (Ferrari, 2003).

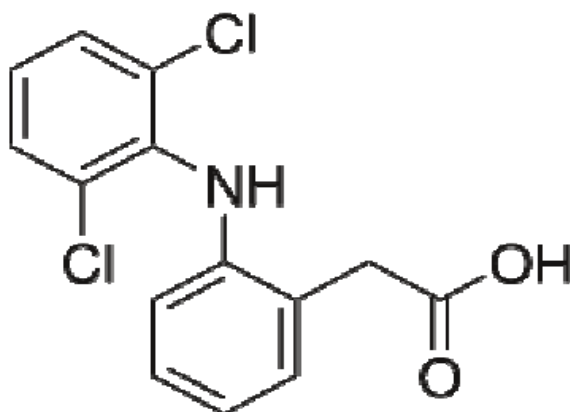


Figura 3: fórmula química del diclofenaco

Estos fármacos son incorporados al ambiente y a cuerpos de agua por múltiples fuentes entre ellas la excreción de humanos, mascotas y animales de granja así como el riego de cultivos agrícolas con aguas residuales, descargas domésticas y la eliminación inapropiada de los seres humanos.

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 (Figura 4) (Araujo y McNair, 2007).

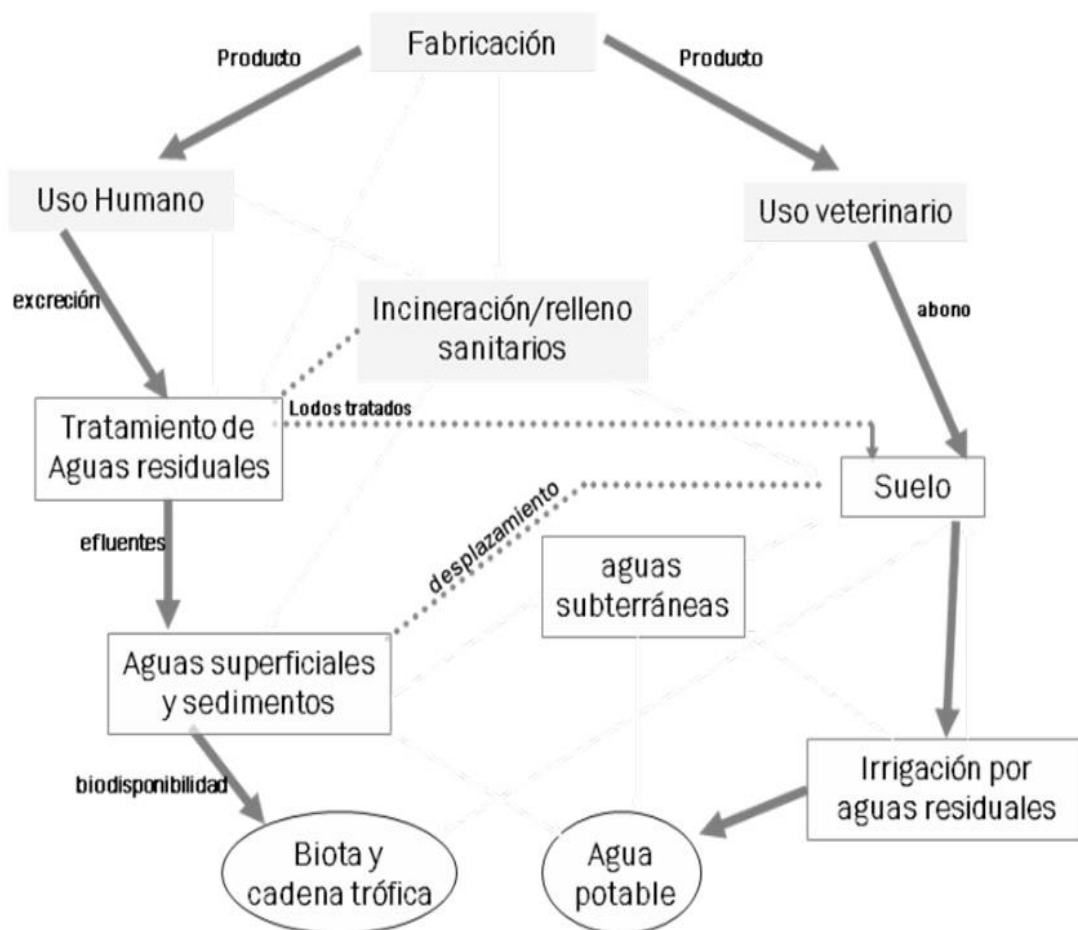


Figura 4. Trayecto de los productos farmacéuticos al ambiente, (tomado y modificado de Jones et al., 2004.)

Una vez descargados al agua, la concentración de los fármacos en la fase acuosa puede disminuir por su adsorción a la fase sólida, esto es debido a los sólidos en suspensión, sedimentos o biota. Sin embargo, muchos medicamentos son componentes hidrofílicos y es poco probable que a su absorción sea un factor significativo en la reducción de la concentración en la fase acuosa (Jones et al., 2004).

Aunque estos fármacos se encuentran en bajas concentraciones en el agua, se han detectado concentraciones superiores a 1750 ng/L de diclofenaco, paracetamol e ibuprofeno (Fent et al., 2006).

La biodegradación puede ser la principal ruta de eliminación de algunos componentes de los medicamentos. Sin embargo este proceso depende no solo del tiempo de vida media, inherente a las características fisicoquímicas de éstos, sino también de las condiciones ambientales, el flujo del cuerpo de agua, las características bióticas y abióticas, entre otras (Jones et al., 2004).

Existe evidencia que muchos de estos productos son persistentes en el ambiente y pueden llegar a las aguas superficiales y subterráneas, produciendo de muchas formas impactos en los organismos acuáticos no destinatarios, como pueden ser la mortalidad, errores en la muda o eclosión, deformidades anatómicas, cambios subletales en el crecimiento de las plantas, cambios en la proporción sexual de los organismos superiores, modificaciones en los ciclos biogeoquímicos, etc. (Iannacone y Alvaríño, 2009).

Sin embargo ha sido hasta los últimos años que han llamado la atención estos fármacos en los ecosistemas acuáticos y los efectos que tienen sobre los organismos (Halling-Sorensen et al., 1998; Happ et al., 2008).

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* spp. y peces) o en 3 niveles de la cadena trófica (planctónica, bentónica y perifítica) para valorar su comportamiento en el ambiente (Lange y Dietrich, 2002). Sin embargo por el momento en México no se cuenta con ninguna legislación para fármacos aunque hay un reglamento muy riguroso para los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales como metales pesados y pesticidas (NOM-001-ECOL-1996).

El impacto de estas sustancias en los ecosistemas acuáticos puede ser analizado en base a organismos como el zooplancton midiendo algunos parámetros como: tasas de crecimiento, tasas de filtración, crecimiento somático, sobrevivencia, reproducción y parámetros relacionados (Timotius y Goltenboth, 1995).

El zooplancton es uno de los componentes principales de las comunidades biológicas de los sistemas acuáticos. Las comunidades zooplanctónicas están constituidas esencialmente por rotíferos y microcrustáceos (Hutchinson, 1967).

Los microcrutaceos plantónicos de agua dulce son principalmente copépodos y cladóceros, en comparación con los cladóceros la mayoría de los copépodos son marinos, tienen distintas etapas larvales y pre-adultos, sus hábitos alimenticios son distintos y también hay diferencia de tolerancia entre machos y hembras, lo que complica escoger varios individuos en la misma etapa de desarrollo para uso en experimentos (Suárez-Morales, 2000).

Los microcrustáceos más conocidos y estudiados son los cladóceros, siendo un grupo dominante que funciona como el enlace principal entre los productores primarios y los consumidores de niveles tróficos superiores (Dodson y Frey, 2001).

Los cladóceros son fácilmente manipulables para bioensayos de toxicidad por su ciclo de vida corto, alta tasa de crecimiento y por su fácil cultivo y tienen una fase partenogenética (Conde-Porcuna et al., 2004).

En este caso *Moina macrocopa* (Straus, 1820) (Figura 5) presenta una serie de características que la hacen idónea para estudios de toxicidad como lo son: distribución cosmopolita, posee huevos de resistencia llamados efipios, se desarrolla en un amplio intervalo de temperatura desde 5°C a 30°C y se considera de 24°C – 26°C como su temperatura óptima, talla relativamente grande, y protocolos estandarizados de pruebas toxicológicas (Mac-Quhae et al., 2007).



Figura 5: *Moina macrocopa*

Esta especie se ha empleado en numerosas pruebas toxicológicas de metales pesados: Martínez-Tabche *et al.*, (2000), Gama-Flores *et al.*, (2006), Ruangsomboon y Wongrat (2006); e insecticidas: Iannacone y Alvariño (2000), Iannacone y Alvariño (2002), Wiwattanapatapee *et al.*, (2002).

ANTECEDENTES

Araujo y McNair (2007) evaluaron el efecto de tres antibióticos (sulfato de estreptomicina, tetraciclina, y tilosina tartrato) en el rotífero de agua dulce *Brachionus calyciflorus* y en el de agua salobre *Brachionus plicatilis*. Se encontró que en general la reproducción fue el punto final más sensible y el crecimiento poblacional fue el menos sensible.

Iannacone et al. (2009) realizaron un estudio en Perú donde determinaron el efecto agudo de 7 fármacos (amoxicilina, ciprofloxacino, trimetoprima + sulfametoxazo, ibuprofeno, paracetamol y diazepam) usando diferentes concentraciones sobre *D. magna*; encontraron que el paracetamol ocasiono el mayor riesgo en el ambiente acuático.

Haap et al. (2008) observaron el efecto de diclofenaco y DMSO (dimetil sulfóxido) para *D. 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 (CE₅₀) en un intervalo de 68 a 166 mg/L. Concluyó que debido a la presencia frecuente de fármacos en forma de mezcla en el ambiente acuático, es indispensable la evaluación de riesgo ambiental.

Ferrari et al. (2002) determinaron el impacto de fármacos encontrados en aguas residuales tratadas (carbamazepina, ácido clofibrico y diclofenaco). La carbamazepina fue encontrada en todas las plantas de tratamiento a las mayores concentraciones y concluyeron que es el compuesto más peligroso.

Hussein et al. (2008) evaluaron el estrés oxidativo en el fitoplancton y zooplancton con diferentes concentraciones de paracetamol. Llegaron a la conclusión que el paracetamol es uno de los antiinflamatorios más utilizados y que además tiene un efecto drástico sobre los organismos planctónicos, especialmente cuando la exposición es larga.

Gibson et al. (2010) analizaron muestras de suelos agrícolas regados con aguas residuales en el valle de Tula Hidalgo, México. Determinaron la acumulación y toxicidad de carbamazepina, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y disruptores endocrinos (4-nonylphenol, triclosan, and bisphenol-A). Estableciendo que el

triclosan mostró evidencia de acumulación sin embargo, carbamazepina fue más persistente.

Martínez–Jerónimo et al. (2008) desarrollaron un método para la producción controlada de neonatos de *Daphnia exilis* y evaluaron su sensibilidad mediante bioensayos de toxicidad aguda a dos temperaturas usando cromo hexavalente (Cr (VI)). La concentración letal media (CL₅₀) determinada a 48 h fue de 0.1170 ± 0.0068 y 0.0802 ± 0.0057 mg/L, respectivamente a 20 y 25 °C, que son valores menores a los reportados para *D. magna* (0.2076 ± 0.0164 y 0.1544 ± 0.0175 4 mg/L, a 20 y 25 °C respectivamente), lo que indica una mayor sensibilidad. Debido a sus tallas, facilidad de manejo y cultivo, así como por sus sensibilidades, se sugiere a los cladóceros como organismos de prueba en los estudios toxicológicos.

JUSTIFICACIÓN

En México el paracetamol y diclofenaco son utilizados de forma no adecuada. Se ha demostrado que la toxicidad de estos AINE'S puede producir efectos adversos a algunas especies (Fent et al., 2006). Sin embargo en nuestro país no se cuenta con ninguna legislación al respecto y pocos son los estudios sobre el efecto de los fármacos en *M. macrocopa*.

En la mayoría de los trabajos realizados con *Moina macrocopa* (Gama-Flores, 2006; Nandini 2007) se emplean métodos de toxicidad aguda en donde el 50% de mortandad de las poblaciones expuestas a ciertas concentraciones de diversas sustancias corresponde a cierto nivel de toxina que se considera como CL₅₀, sin embargo aunque estas evaluaciones son necesarias no ayudan a cuantificar los efectos sobre las poblaciones de *M. macrocopa* cuando están expuestos a niveles subletales. Hay muchos estudios ecotoxicológicos donde usan *M. macrocopa* para bioensayo considerando variables como tasa de filtración, crecimiento somático entre otros, sin embargo estas variables no son tan sensibles como las variables demográficas como crecimiento poblacional, tasa de crecimiento, densidad máxima entre otras (Sarma y Nandini, 2007).

La respuesta demográfica de *M. macrocopa* expuesta a diferentes concentraciones de ciertas sustancias puede ser evaluada mediante la variable de

crecimiento poblacional o tabla de vida demográfica, en comparación, el crecimiento poblacional va a proporcionar mayor información sobre la posibilidad de adaptación de los individuos recién nacidos en las condiciones experimentales y de igual manera nos permite derivar otras variables demográficas como tasa de crecimiento poblacional lo cual también se deriva mediante tabla de vida demográfica, por lo tanto la variable demográfica de crecimiento poblacional es frecuentemente empleada en la literatura para evaluar el efecto de varias sustancias farmacéuticas (Nandini et al., 2004).

Por estas razones es necesario realizar estudios de toxicidad y sobre todo de toxicidad crónica para evaluar y conocer el impacto del paracetamol y el diclofenaco sobre una especie como *M. macrocopa* que por su ciclo de vida corto, alta tasa de crecimiento, fácil cultivo y manipulación, con frecuencia es utilizada para bioensayos de toxicidad y también es una especie que se encuentra fácilmente en los cuerpos de agua de México (Gama-Flores et al., 1999).

HIPÓTESIS

La exposición crónica a diferentes concentraciones de AINE's tales como paracetamol y diclofenaco pueden ser adversos para los organismos expuestos; por lo que se espera que el cladóceros *Moina macrocopa* refleje una disminución dependiendo de la concentración en sus parámetros demográficos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de concentraciones subletales de diclofenaco y paracetamol sobre el crecimiento poblacional de los cladóceros.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar los cambios en las poblaciones de *Moina macrocopa* a diferentes concentraciones de paracetamol y diclofenaco.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de paracetamol y diclofenaco sobre la abundancia máxima de *Moina macrocopa*.
- Calcular la tasa de crecimiento poblacional de *Moina macrocopa* expuesto a diferentes concentraciones de paracetamol y diclofenaco.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se utilizó la especie de zooplancton *Moina macrocopa* (Cladocera) la cual fue obtenida y aislada de los canales de Xochimilco Distrito Federal (cultivada durante 10 años en el laboratorio de Zoología acuática de la UMF en la FES Iztacala). Se establecieron cultivos usando hembras partenogénéticas, fueron mantenidos con medio EPA moderadamente duro y alimentados con el alga *Chlorella vulgaris* (Beyerinck). El medio EPA fue preparado con 96 mg de NaHCO_3 , 60 mg de CaSO_4 , 60 mg MgSO_4 y 4 mg de KCl por litro de agua destilada (Anónimo, 1985).

El alga *Chlorella vulgaris* se cultivó con Medio Bold (Borowitzka y Borowitzka 1988) (Anexo 1), con un pH de 7.5, el cual fue enriquecido con bicarbonato de sodio cada tercer día en botellas plásticas de dos litros. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, con aireación constante y luz difusa en forma continua.

Para su cosecha, los cultivos se dejaron crecer desde una concentración inicial entre 0.5×10^6 y 1.0×10^6 céls./mL hasta su fase exponencial (aproximadamente 25×10^6 céls./mL), lo cual dura entre 7 y 10 días, con el fin de garantizar una gran cantidad de células y su buen estado nutricional, cuando se tuvo la concentración adecuada, se retiró la aireación de las botellas y se mantuvieron en el refrigerador aproximadamente durante cuatro días para permitir la sedimentación de las células y posteriormente hacer la decantación de las botellas. Su densidad fue establecida por conteo con cámara de Neubauer.

Los analgésicos seleccionados, diclofenaco sódico (100mg) y paracetamol (500mg) fueron obtenidos de manera comercial en forma de pastillas (genéricos Docril).

Para el diclofenaco se hizo una concentración inicial de 100 mg/L diluyendo la pastilla en 10 ml de etanol, para posteriormente ser aforada a un litro de agua destilada y agitada hasta obtener una mezcla homogénea. A partir de la concentración inicial se hicieron diluciones. Se tomo de referencia la concentración de 12.5 mg/L (Ferrari, 2002) y se hicieron concentraciones nominales un valor superior y tres inferiores obteniendo las siguientes concentraciones: 25 mg/L, 12.5 mg/L, 6.25 mg/L, 3.125 mg/L, 1.56 mg/L y el testigo (0 mg/L).

Para el paracetamol se realizó el mismo procedimiento de dilución de la pastilla pero con una concentración inicial de 500mg/L. Se tomó como concentración de referencia la reportada por Hussein (2008) la cual fue de 8 mg/L y se hicieron concentraciones nominales dos valores superiores y dos inferiores. Las concentraciones nominales: 32 mg/L, 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L, y el testigo fueron obtenidas a partir de la concentración inicial.

Para cada concentración de cada medicamento y para el testigo se realizaron 3 repeticiones teniendo un total de 18 transparentes (capacidad de 50ml) con una

densidad inicial de 0.2 ind./mL de *Moina macrocopa* (se utilizó una población mixta), 25ml de cada concentración y 25 ml de alimento con EPA (*Chlorella vulgaris* 1×10^6 céls./mL). El testigo contenía 25ml de EPA y 25 ml de alimento con EPA (*Chlorella vulgaris* 1×10^6 céls./mL).

El medio de cultivo y el alimento fueron renovados en su totalidad y contados diariamente donde solo se contó a los sobrevivientes de cada tratamiento con sus repeticiones durante 10 días. Las condiciones fueron una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, un pH de 7.5, fotoperiodo de 12 hrs de luz y 12 hrs de oscuridad.

La tasa de crecimiento poblacional se estimó a partir de la fórmula (Krebs, 1985):

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

Donde:

r = tasa de crecimiento poblacional;

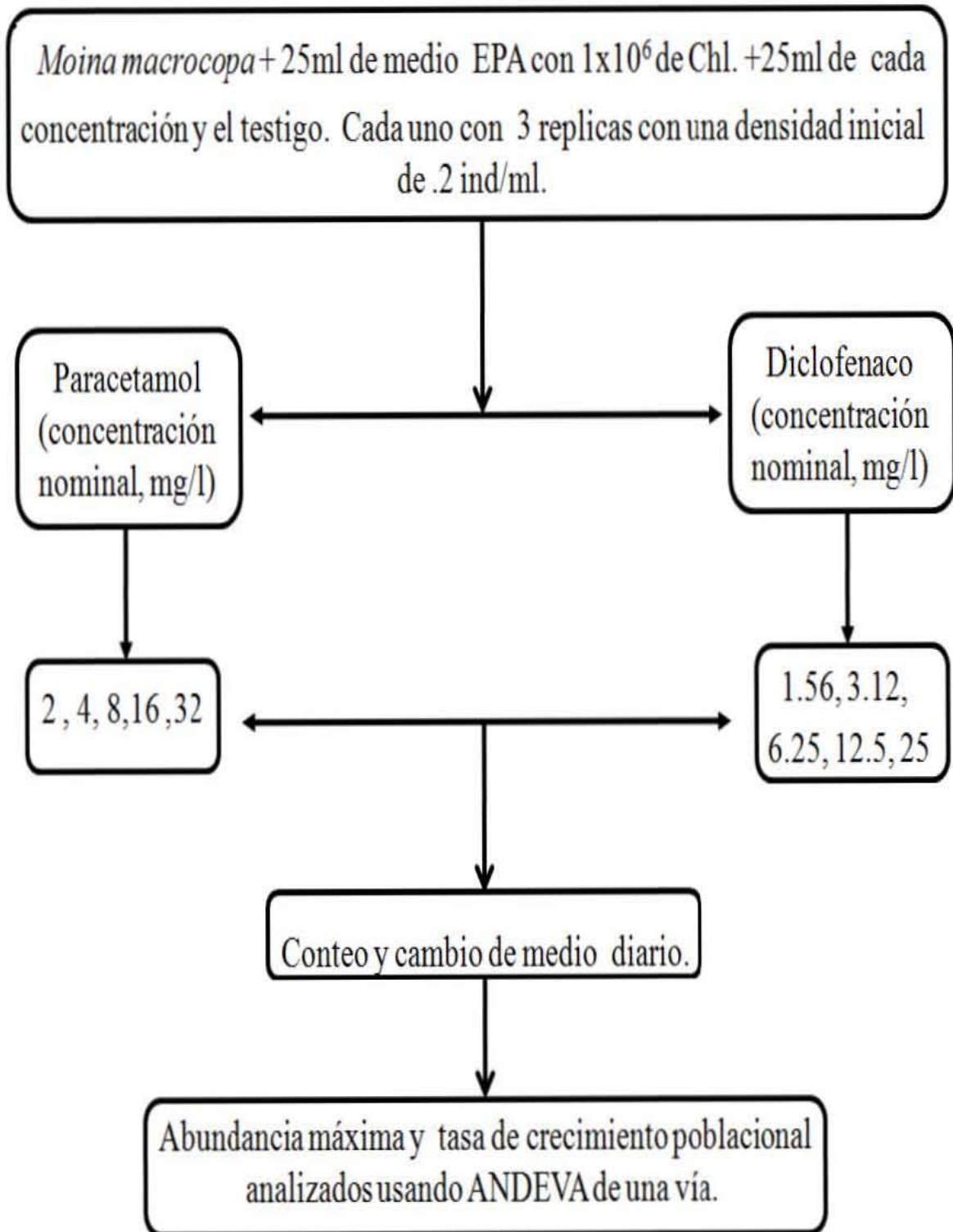
N_o = densidad inicial;

N_t = densidad final (ind./mL) (en relación con t);

t = tiempo en días.

Con los resultados se obtuvo la abundancia máxima y la tasa de crecimiento poblacional, los valores fueron comparados usando ANDEVA de una vía. Por último se realizó la prueba *post-hoc* Tukey para ver las diferencias significativas entre cada tratamiento.

DISEÑO EXPERIMENTAL



RESULTADOS

Crecimiento poblacional

El crecimiento poblacional de *M. macrocopa* en el testigo presento un crecimiento exponencial desde el inicio, alcanzo rápidamente su pico de abundancia máxima en 4 días y empezó a disminuir después de una semana. En presencia de los dos fármacos hubo una disminución en las densidades del cladóceros pero fueron más bajas que el testigo.

Según los resultados para diclofenaco *Moina macrocopa* empezó su reproducción a los 3 días de haber eclosionado exceptuando la concentración más alta (25 mg/L) y la población del control. En el caso de paracetamol empezó a reproducirse a partir del día 4 exceptuando la concentración más alta (32 mg/L).

Los resultados muestran que a mayor concentración de paracetamol y diclofenaco el crecimiento poblacional de *Moina macrocopa* disminuyó. En las concentraciones de 2 mg/L para paracetamol, 1.5 mg/L para diclofenaco y el control los resultados fueron alrededor de 1 ind./mL, a partir de las concentraciones de 12 mg/L para paracetamol, y en la de 16 mg/L para diclofenaco los valores máximos fueron de 0.5 a 0.3 ind./mL (Figura 6).

Densidad máxima

La densidad de población máxima de *M. macrocopa* se comporto inversa a la concentración de paracetamol y diclofenaco obteniendo resultados desde 0.2 hasta 0.9 ind/mL .

Concretamente en las concentraciones de diclofenaco se observó que la densidad poblacional máxima disminuyó, hubo una diferencia significativa con respecto al testigo y también se observaron diferencias en las concentraciones altas (6.25, 12.5, 25 mg/L) con respecto a las concentraciones bajas (1.5, 3.12 mg/L) (Fig 7).

En el caso del paracetamol no hubo una diferencia significativa en este parámetro para ninguna de las concentraciones.

La tasa de crecimiento poblacional (r)

La tasa de crecimiento poblacional (r) también mostró tendencias similares a la densidad máxima poblacional en la que " r " disminuyó con el incremento de paracetamol o diclofenaco(Fig.8).Hubo una diferencia estadísticamente significativa ($P<0.01$) para el paracetamol y de ($P<0.01$) para el diclofenaco (Tabla 1).

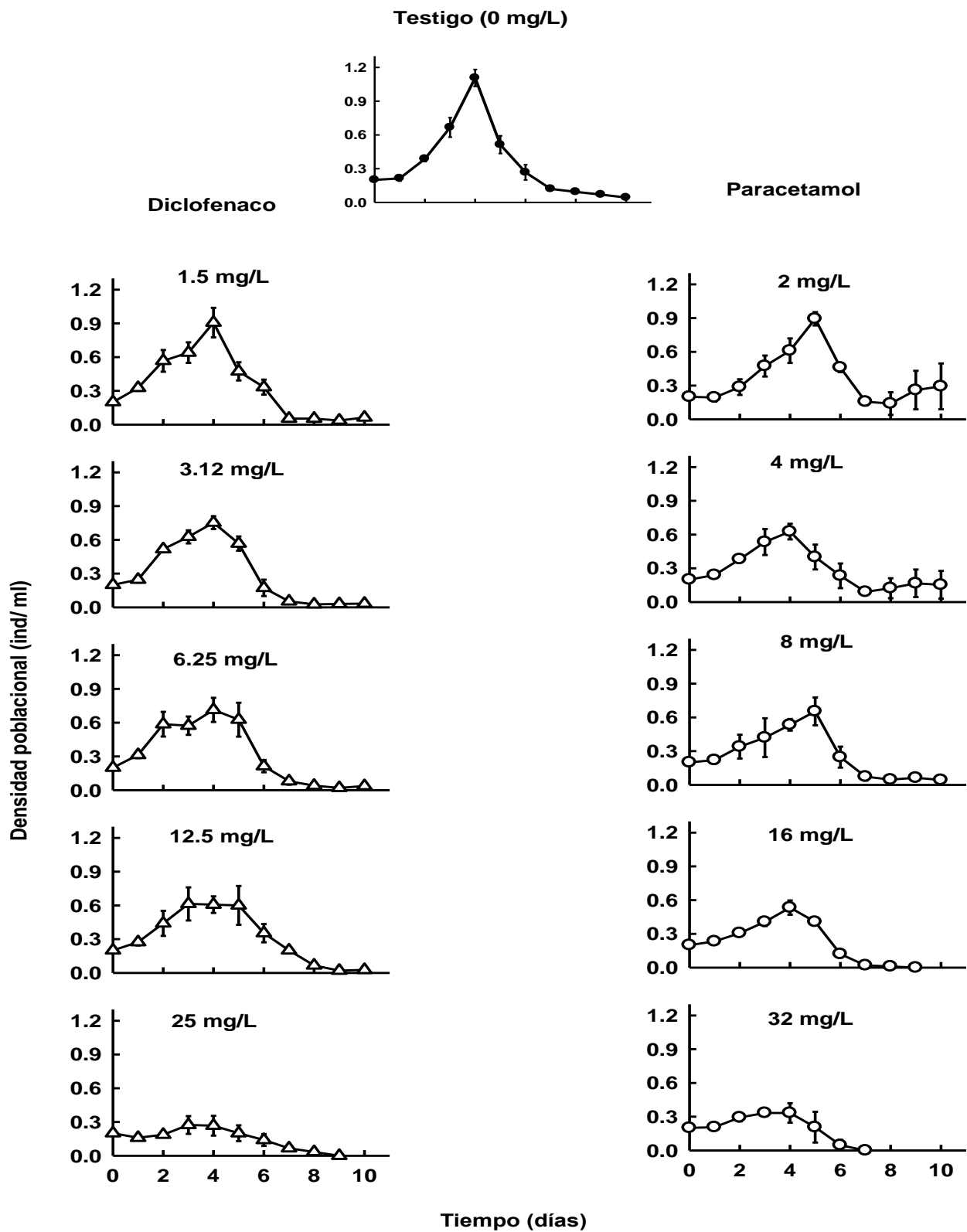


Figura 6. Curvas de crecimiento poblacional de *Moina macrocopa* expuestos a diferentes concentraciones de paracetamol (círculo, abierto) y diclofenaco (Triángulo, abierta). Los valores representan el promedio \pm el error estándar basados en tres repeticiones.

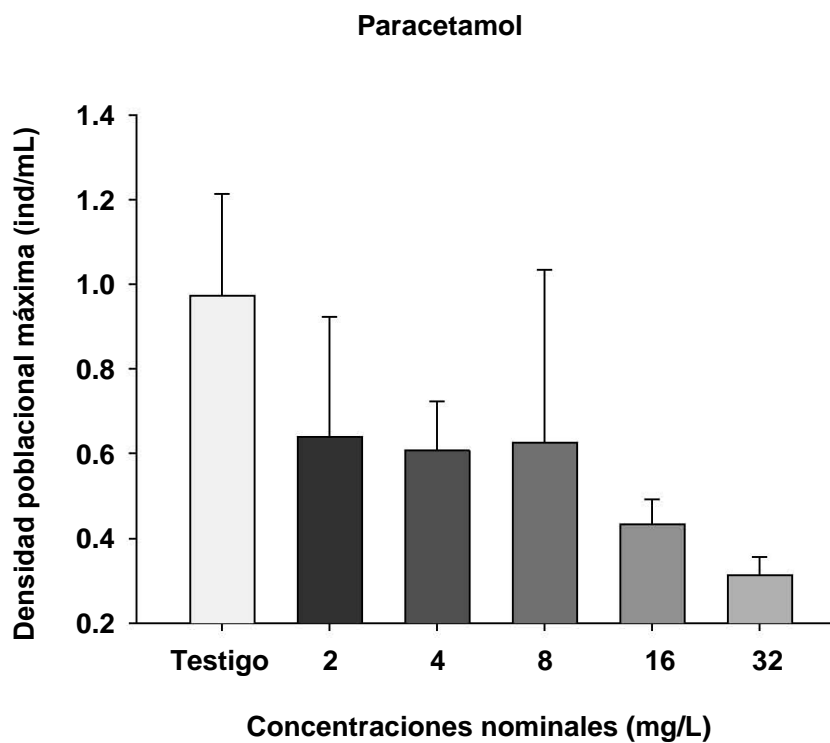
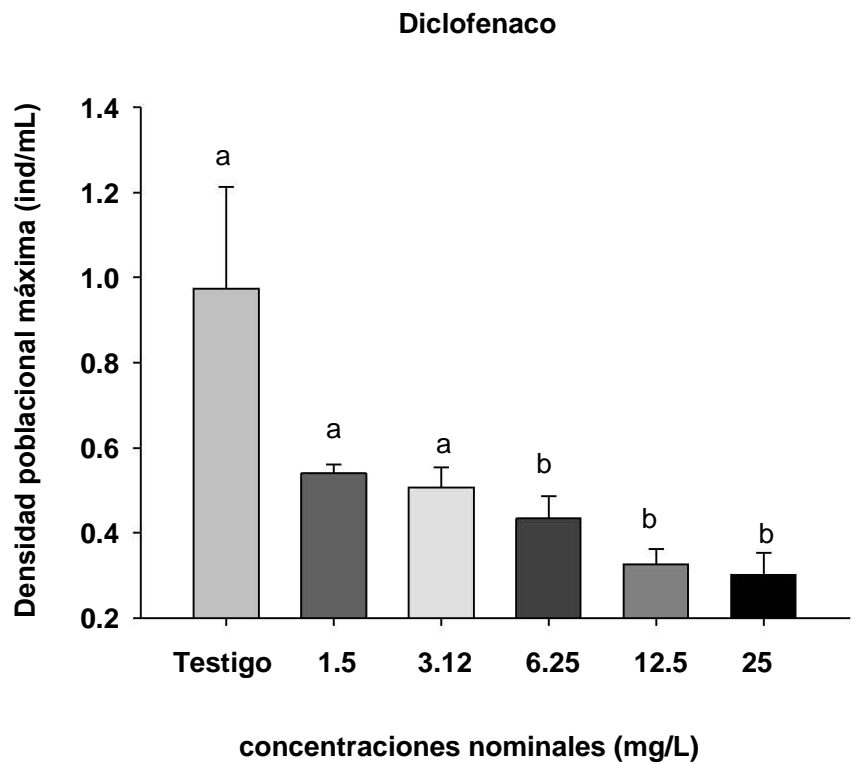


Figura 7. Densidad poblacional máxima de *Moina macrocopa* a diferentes concentraciones de paracetamol y diclofenaco. Las letras representan si hay una diferencia significativa entre las concentraciones.

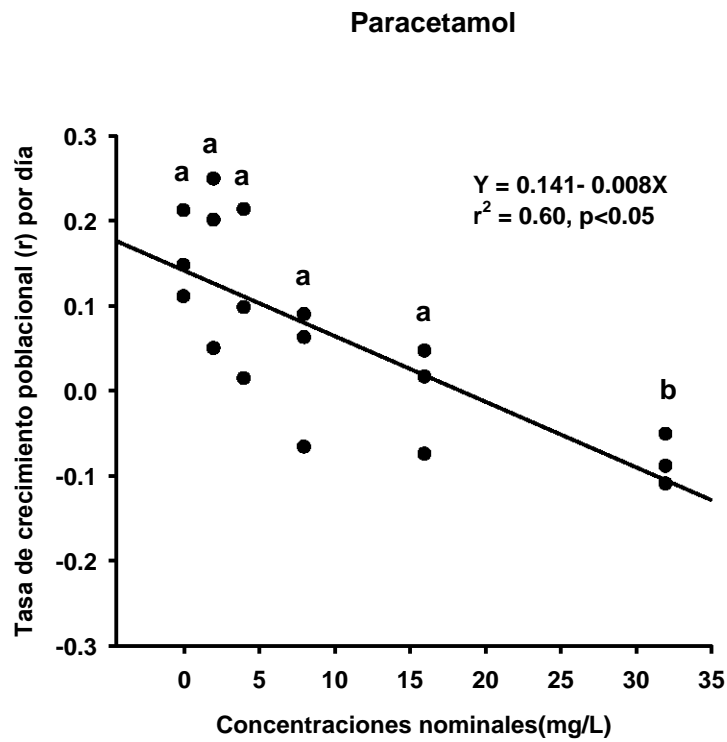
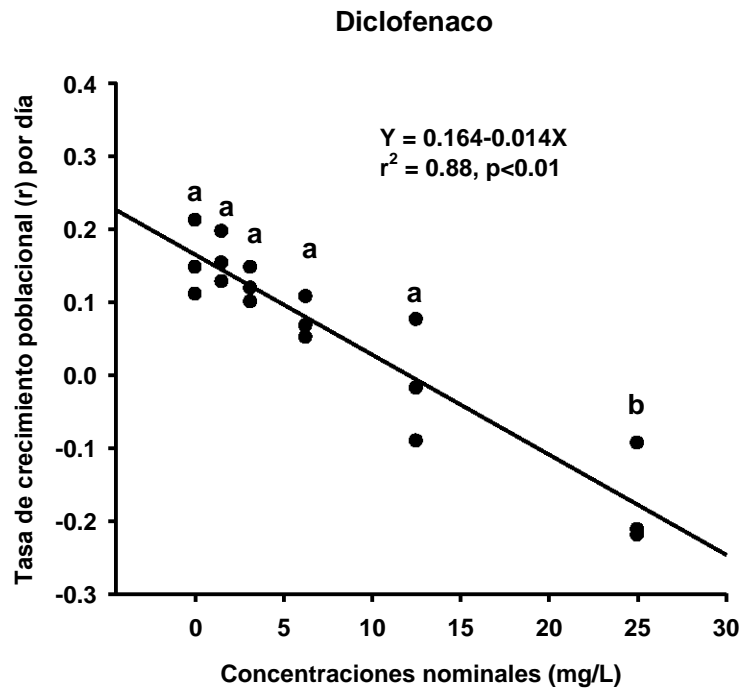


Figura 8. Regresión de la tasa de crecimiento poblacional de *Moina macrocopa* vs concentraciones nominales de paracetamol y diclofenaco. Las

letras representan si hay una diferencia significativa entre el resultado de la regresión de las tasas vs las concentraciones.

Tabla. 1. Resultados del Análisis de varianza para la abundancia máxima y la tasa de crecimiento poblacional de *Moina macrocopa* expuestos a diferentes concentraciones de paracetamol o diclofenaco.

FUENTE DE VARIACION	GL	SC	PSC	F	P
TASA DE CRECIMIENTO					
DICLOFENACO					
ENTRE GRUPOS	5	0.146	0.0291	4.966	0.011
ERROR	12	0.0703	0.00586		
PARACETAMOL					
ENTRE GRUPOS	5	0.167	0.0333	5.019	0.010
ERROR	12	0.0796	0.00664		
DENSIDAD MAXIMA					
DICLOFENACO					
ENTRE GRUPOS	5	0.897	0.179	5.424	0.008
ERROR	12	0.397	0.0331		

DISCUSIÓN

Los cladóceros han sido ampliamente utilizados como organismos de bioensayo para evaluar el impacto de diferentes sustancias tóxicas. Por ejemplo Sarma y Nandini (2006) hicieron una revisión sobre que organismos son utilizados en bioensayos ecotoxicológicos y concluyeron que más del 80% utilizan al género *Daphnia* y el 10% al género *Ceriodaphnia*, sin embargo hay pocos trabajos sobre otros géneros de cladóceros como es el caso de *Moina*.

Por otro lado en México se han registrado varias especies del género *Moina* por ejemplo: *Moina micrura*, *Moina affinis*, *Moina macrocopa* (Elías-Gutiérrez, 1995). *Moina* es mayormente empleado como alimento vivo en acuacultura que como organismo de bioensayo (Prieto., 2006; López., 2009). En los trabajos relacionados con el uso de *Moina* como alimento los investigadores no consideran los parámetros demográficos utilizados en el presente estudio, y sólo consideran los aspectos nutricionales.

El cladócero *M. macrocopa* tiene una distribución amplia dentro del territorio nacional así como alta tasa de crecimiento que va desde 0.2 ± 0.01 a 0.4 ± 0.01 más que otra especie del mismo género como *C. dubia* que va desde 0.10 ± 0.01 a 0.15 ± 0.02 por día (Sarma y Nandini, 2004). Dependiendo las condiciones en el

ambiente, *M. macrocopa* empieza su reproducción antes del quinto día después de su nacimiento (Gama-Flores, 2006; Nandini, 2007).

Dumont y Negrea (2002) mencionan que en general los organismos de reproducción temprana (antes 10 días) son estrategias oportunistas por alcanzar densas poblaciones en un corto periodo, además Roff., 2001 señala que entre más temprana sea la reproducción los organismos podrían reproducirse un mayor número de veces en su ciclo de vida reflejándose en un mayor incremento poblacional. Esto se observa en este trabajo ya que el testigo presentó un crecimiento exponencial desde el primer día y alcanzó una abundancia máxima a los 4 días.

Sarma y Nandini.,(2006) también mencionan que los estudios de ecotoxicología con cladóceros están concentrados con metales pesados y cianotoxinas, el porcentaje de estos trabajos corresponde a más del 85%. Por otra parte, basándose en varios trabajos publicados, en la literatura donde se usan diversas sustancias xenobióticas, *Moina* en general es más resistente que otros géneros como *Ceriodaphnia* o *Daphnia* por ejemplo la CL₅₀ de cadmio sobre *Moina macrocopa* es 0.68 mg/L (García et al., 2004) y para *Daphnia magna* es 1/3 del valor 0.12 mg/L. El hecho que *Moina macrocopa* tiene alta tolerancia a varias sustancias toxicas no necesariamente garantiza su resistencia a todas estas sustancias por ejemplo: Gama Flores et al. (2007) mencionaron que *M. macrocopa*

es comparablemente sensible al cobre con relación a *Ceriodaphnia* (Gama Flores et al., 2009), sin embargo la mayoría de los trabajos hechos con *Daphnia* y *Ceriodaphnia* es debido a la gran disponibilidad de información básica sobre la biología de estos géneros (Sarma et al., 2006).

Por otra parte muchas sustancias xenobióticas se encuentran en el ambiente acuático en concentraciones que corresponden a ng y μg (Altenburger et al., 2004), por ejemplo la concentración encontrada en aguas residuales del Valle de Tula, Hidalgo para diclofenaco es de 2.052-4.824 $\mu\text{g/L}$ (Gibson et al., 2010). En el presente trabajo se propusieron las concentraciones 2, 4, 8, 16 y 32 mg/L para paracetamol y 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 y 25 mg/L para diclofenaco sódico, lo que concuerda con el trabajo realizado por Husein et al., 2008 donde que utilizó 2,4,8,12 y 15 mg/L de paracetamol en pruebas de LC_{50} . Estas concentraciones son utilizadas en ecotoxicología para obtener un efecto letal sobre los organismos, ya que se considera a los analgésicos como muy poco tóxicos a diferencia de metales pesados o pesticidas.

Según los resultados *M. macrcopa* empezó su reproducción a los 2 días posteriores a su eclosión expuestos a diclofenaco exceptuando la concentración 25 mg/L y el control, obteniendo una densidad máxima alrededor del cuarto día del experimento y en el control hasta el séptimo día. Se observaron datos con una

tendencia similar con el paracetamol. Esto concuerda con lo obtenido por Nandini et al., 2007 en donde utilizó *M. macrocopa* expuesta a zinc y cobre.

La población de *M. macrocopa* en el testigo mostró una tendencia de corta fase de adaptación y corta fase exponencial lo cual resulta en una alta tasa de crecimiento en este trabajo la tasa de crecimiento poblacional de *M. macrocopa* fue de 0.18 por día.

En varios trabajos realizados sobre crecimiento poblacional de *M. macrocopa* la tasa de crecimiento reportada fue de 0.12 hasta 1.0 por día dependiendo de la concentración de alimento (Mangas-Ramírez et al., 2002; Nandini et al., 2007; Alva-Martínez et al., 2007; Gama-Flores et al., 2009). En este trabajo el valor de r fue negativo bajo condiciones de estrés principalmente en la presencia de altas concentraciones de paracetamol.

En la literatura, la tasa de crecimiento poblacional del zooplancton es considerada una variable muy sensible a los cambios en el ambiente, por ejemplo Mangas-Ramírez et al. (2002) reportaron que el valor de r para *M. macrocopa* fue de 0.21 por día en el testigo sin embargo fue negativo (-0.04/día) cuando fue expuesto a 120 μg /L de amonio.

En este trabajo para paracetamol (2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L, 16 mg/L, 32 mg/L) se reportó una tasa de crecimiento de aproximadamente 0.25 a -0.1 dependiendo de la concentración y para diclofenaco (1.56 mg/L, 3.12 mg/L, 6.25 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L) 0.2 a -0.2 dependiendo de la concentración esto concuerda con Alva-Martínez et al. (2001) donde utilizaron *Moina macrocopa* expuesta a 0.75×10^6 céls./mL de *Microcystis* obteniendo una *r* de -0.18.

La abundancia máxima de una población de cladóceros está relacionada con su tamaño. Es decir, bajo condiciones similares las especies más grandes como *Daphnia pullex* tiene una abundancia máxima de 6-10 ind/mL y una especie pequeña como *Alona pulchella* tiene una abundancia máxima de 55 ind/mL, a diferencia de *Moina macrocopa* que tiene un tamaño relativamente más grande que *Ceriodaphnia* y más pequeño que *Daphnia* por lo tanto esta especie raramente alcanza un valor arriba de 2 ind/mL por ejemplo Alva-Martínez et al. (2007) cultivaron *Moina macrocopa* a diferentes concentraciones de *Chlorella* y reportaron un valor de abundancia máxima de 3 ind./mL, Sarma et al. (2005) reportaron hasta 5 ind./mL de la misma especie. En este trabajo la abundancia máxima de *Moina* fue de alrededor de 1.2 ind/mL lo cual está dentro del intervalo 0.2-2.0 ind./mL reportados para varias especies de cladóceros (Sarma et al., 2005).

CONCLUSIONES

- Este estudio demostró que el paracetamol y diclofenaco tienen un efecto adverso sobre la población de *Moina macrocopa* cuando es expuesta a altas concentraciones y a una larga exposición.
- El método de crecimiento poblacional empleado en este trabajo mostró que con una concentración de 4 mg/L para paracetamol y 3.25 mg/L para diclofenaco se tiene un efecto adverso en comparación del testigo.
- El diclofenaco mostró un efecto más adverso para *Moina macrocopa* en comparación con el paracetamol en los diferentes parámetros.
- El hecho de que ambos fármacos se vendan libremente en el mercado hace necesario tener un reglamento gubernamental para controlar su descarga en cuerpos de agua.

REFERENCIAS

- Altenburger, R., Walter, H., Grote, M. 2004. What contributes to the combined effect of a complex mixture? *Environmental Scientific Technology*. 38:6353-6362.
- Alva-Martínez , A.F., S.S.S. Sarma., S. Nandini. 2001. Comparative population dynamics of three cladoceran species (Cladocera) in relation to different levels of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana* 74(4): 749-764
- Alva-Martínez, A.F., S.S.S. Sarma., S. Nandini.2007 Effect of mixed diets (cyanobacteria and green algae) on the population growth of the cladocerans *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa*. *Aquatic Ecology* 41(4):579-585.
- Anonymous.1985. Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. U.S. Environment Protection Agency EPA/600/485/013, Washington DC.
- 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.
- Bila, D.M., y Dezotti , M. 2003. Fármacos no medio ambiente. *Química Nova*. 26: 523-530.

- Bound, J.P., Voulvoulis, N.2006.Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. *Water Research* 40. 2885-2892.
- Brain, R.A., Hanson, M.L., Solomon, K.R.,Brooks, B.W.2008.Aquatic plants exposed to pharmaceuticals: effects and risks. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 192: 67-115.
- Carabias, J.2004.El agua y México.[En línea].<http://depa.pquim.unam.mx/cienciasysociedadhsf/pdfs/aguaymexxico.pdf>.
- Conde, P. J. M., Ramos, R. E. R., Morales, B.2004. El Zooplancton como integrante de la estructura trófica de los ecosistemas. *Ecosistemas* 13(2): 23-29.
- Dodson, S. I. y Frey, D. G.2001. Cladocera and other branchiopoda. Ecology and classification of North American Freshwater Invertebrates. Academic Press, London: 850-914.
- Dumont, H. J. & S. V. Negrea, 2002. Introduction to the class Branchiopoda. In: Dumont H. J. (ed.), *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World* 19. Backhuys Publishers, Leiden.

Elias-Gutierrez, M. 1995. Notas sobre los Cladóceros de embalses a gran altitud en el Estado de México, México. Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Vol 40:197-214

Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology. 76, 122–159.

Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R., Pollio, A., Garric, J. 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceutical found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. Ecotoxicology and Environmental Safety. 55:359-370.

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.

Gamma-Flores J.L., S.S.S. Sarma., S. Nandini. 2006. Effect of cadmium level and exposure time on the competition between zooplankton species *Moina macrocopa* (Cladocera) and *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). Journal of Environmental Science and Health, Part A 41: 1057-1070

- Gama-Flores, J. L., S. S. S. Sarma., S. Nandini. 2009. Combined effects of exposure time and copper toxicity on the demography of *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera). *Journal of Environmental Science and Health A* 44, 1–8.
- Gibson, R., Durán ,A. J. C., León ,E. K., Chávez, A., Jiménez ,C., 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.
- Halling-Sorensen, B., S. Nors Nielsen, P.F. Lansky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lutzhoft, and S.E. Jorgensen. 1998. Occurrence, Fate, and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment- a Review. *Chemosphere* 36(2): 357-393.
- Hutchinson, G.E. 1967. A treatise on limnology. 2. Introduction to lake biology and limnoplankton. John Wiley, New York.

Hussein, E., Touliabah , R. A., Bassat, A., Shimy, G. I., Harisa. 2008. Oxidative Stress of Plankton Community and Some Isolated Species During Paracetamol Toxicity Test. Journal of Biological Sciences Vol: 8 (1)13-23.

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.

Junco, D.R., Rodríguez, S. D. 2000. Desechos Hospitalarios: Aspectos Metodológicos de su manejo .Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Rev Cubana Hig Epidemiology ;38(2):122-6.

Iannacone, J. y L. Alvaríño. 2000. Chironomus calligraphus Goeldi y Moina macrocopa (Sars) como herramientas ecotoxicológicas para la evaluación del lindano y clorpirifos. Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción 71: 33-39.

Iannacone, J. y L. Alvaríño. 2002. Evaluación del riesgo ambiental del insecticida Cartap en bioensayos con tres invertebrados. Agricultura Técnica 62(3): 366-374.

Iannacone, J. y L. Alvaríño. 2009. Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*. Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú. Ecología Aplicada.

Lange, R., Dietrich, D. 2002. Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances —conceptual considerations. *Toxicology Letters* 131 (2002) 1-2, pp 97-104

Lars, H. H., Amanda, C., Helen, L. H. , Richard, C., Thomas, H. H., Steve J. M., Richard M. S.2007. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters* 172 (2007) 137–145.

Laws, E.A.1993.Sewage Treatment In Aquatic pollution: An introductory text. John Wiley and Sons, New York. pp: 125-156.

Mangas-Ramírez, E., S. S. S. Sarma., S. Nandini .2002 Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) density and ammonia concentration on the population dynamics of *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa* (Cladocera). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51: 216-222.

Mac-Quhae, C. A., Romero C., Morales D,A.2007. Toxicidad aguda del hidróxido de sodio sobre moina macrocopa (crustácea, branchiopoda),*Ecotropicos,sociedad venezolana de ecología*, 20(1):24-30 2007.

Martínez - Tabche , L . , L .Gómez -Oliván, M. Galar, C. Romero y A. Montero. 2000.Toxicity of nickel in artificial sedimenton acetylcholinesterase activity and

hemoglobin concentration of the aquatic flea, *Moina macrocopa*. Environmental Hydrology 8(4): 1-10.

Martínez, J. F., Rodríguez, E. J., Laura, M.J. 2008. *Daphnia exilis* (Crustacea: Cladocera). Una especie zooplanctónica potencialmente utilizable como organismo de prueba en bioensayos de toxicidad aguda en ambientes tropicales y subtropicales. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 24(4):153-159

Nandini, S., Picazo-Paez, E.A., S.S.S, Sarma.2007. The combined effects of heavy metals(copper and zinc), temperature and food(*Chlorella vulgaris*) level on the demographic characters of *Moina macrocopa*(Crustacea: Cladocera). Journal of Environmental Science and Health Part A 42(10): 1433-1442.

OMS (organización Mundial de la Salud). 2004. Formulario Modelo de la OMS. [En línea].
Web: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js5422s/14.2.html>

Prieto, M., De la Cruz L., Morales, M. 2006. Cultivo experimental del cladóceros *Moina* sp alimentado con *Ankistrodesmus* sp y *Saccharomyces cerevisiae*. Revista MVZ Córdoba.11:Pp 705-714.

Roff, D. A. 2001. Life History Evolution Sinauer. Evolutionary Ecology. 84: 135-142.

Romero, L.T.J.2009.Desarrollo de *Moina sp* en condiciones de laboratorio alimentada con microalgas cultivadas en residuales pesqueros. Revista electrónica de Veterinaria. Vol. 10, Nº 4

Ruangsomboon, S. y L. wongrat. 2006.Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus x c. gariepinus*. Aquatic Toxicology 78(1): 15-20.

SAGAN.2007.Contaminación del agua. [En línea].Web:http://www.sagan.gea.org/hojared_AGUA/paginas/17agua.html.

Sarma S.S.S., 2000.The use of rotifers for ecotoxicological studies in México. 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.

S. S. S. Sarma., S. Nandini.2004 Competition between *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa*: a population growth study. In: B.L. Kaul (ed.). Advances in fish and wildlife ecology and biology. Vol. 3: 90-101.

Sarma, S.S.S., Nandini S., Gulati R.D. 2005.Life history strategies of cladocerans:

comparisons of tropical and temperate taxa. *Hydrobiologia* 542: 315-333.

Sarma, S.S.S., *Nandini*, S. 2006. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 41: 1417-1430.

Snell, T. W. & Joaquim, J.C., 2007. Workshop on rotifers in ecotoxicology. *Hidrobiologia*. 593; 227-232.

Suárez-Morales, E., 2000. Copépodos, seres ubicuos y poco conocidos. *CONABIO biodiversidad*, 29:7-11.

Timotius, K.H. F. Goltenboth., 1995. *Tropical limnology*. Salatiga. Indonesia.

Toledo, A., 2002. El agua en México y el Mundo. *Gaceta Ecológica*. Instituto Nacional de Ecología. D.F México. Pp.9-18.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Fanelli, R., Reitano, G., Bagnati, R., Chiabrando C., Pomati F., Rossetti C. & Calamari D. 2006. Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control. *Environmental science and pollution research internacional*. 13: 15-21.

Wiwattanapatapee, R., N. Padoongsombat, T. Choochom, S. Tanq y A. Chaimongkol.2002. Water flea *Moina macrocopa* as a novel biocarrier of norfloxacin in aquaculture. *Journal of Control Release* 83(1): 23-28.

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