



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR
ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS PRESENTES EN
AGUA DE LA PRESA MADÍN SOBRE *Cyprinus carpio*”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA

Q.F.B. EDGAR DAVID GONZÁLEZ GONZÁLEZ

DIRIGIDO POR

DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN

DRA. MARCELA GALAR MARTÍNEZ

DRA. PATRICIA VIEYRA REYES



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

DICIEMBRE 2013



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

3° (EV. DE GRADO)
OFICIO NO 497/2013

Toluca, México, 06 de noviembre de 2013

P. DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
EDGAR DAVID GONZALEZ GONZALEZ
FACULTAD DE QUIMICA
P R E S E N T E

La que suscribe Directora de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván
PRESIDENTE

Dra. Hariz Islas Flores
SECRETARIO


Dr. Enrique Morales Ávila
PRIMER VOCAL

Dra. Edith Erielia Gutiérrez Segura
SEGUNDO VOCAL

Dra. Marcela Galar Martínez
TERCER VOCAL

Dr. Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez
SUPLENTE

Dra. María Dolores Hernández Navarro
SUPLENTE

FIRMA


ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2013, 50 Aniversario Luctuoso del Poeta Heriberto Enriquez"


M. en A.P. **GUADALUPE OFELIA SANTAMARIA GONZALEZ**
DIRECTORA



c.c.p. Archivo

www.uaemex.mx

Facultad de Química • Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan • Toluca Estado de México
Tel. y Fax: 217-5109 y 217-3890 • fquim@uaemex.mx

El presente trabajo fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto 151665) y desarrollado en el Laboratorio de Toxicología Ambiental de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx).

DEDICADO A:

Dios

Por el camino recorrido...

Mi madre

Por su amor y apoyo...

Mi hermano

Por ser mi fuerza...

Mi familia

Por sus consejos...

AGRADECIMIENTOS

A Dios, quien me ha dado la fortaleza necesaria para salir siempre adelante, por colocarme en el mejor camino, iluminando cada paso de mi vida.

Deseo mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas sin las cuales este trabajo no habría sido posible.

En primer lugar, a mi director de tesis, Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica y por la paciencia y confianza, fundamentales para la concreción de este proyecto.

Gracias también a mis amigos del Laboratorio de Toxicología Ambiental y del Campus Universitario Siglo XXI por su compañerismo al compartir inquietudes, éxitos y fracasos durante la realización de los experimentos.

A mi madre por su comprensión, por su fuerza, por su amor. Mamá, gracias por enseñarme que todo esfuerzo es al final recompensado. Tu esfuerzo se convirtió en tu triunfo y en el mío.

A mi hermano que me acompañó en esta etapa de mi vida y que, de forma incondicional, entendió mis ausencias y mis malos momentos.

A mi padre que no alcanzó a ver este trabajo, pues partió tempranamente de esta vida y aunque ya no esté conmigo, sigue vivo en mi pensamiento.

A mis tíos (Raquel, Irma, Rogelio y José Luis) y abuelitos por el cariño y confianza que me brindan en todo momento, pero sobre todo por estar, cada uno a su manera, respaldándome para alcanzar mis objetivos.

ÍNDICE

Contenido	Página
RELACIÓN DE TABLAS	iii
RELACIÓN DE FIGURAS	iv
CAPÍTULO I. PROTOCOLO DE TESIS	
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
2. JUSTIFICACIÓN	12
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS	15
4.1. Objetivo general	15
4.2. Objetivos específicos	15
5. METODOLOGÍA	16
5.1. Diseño metodológico	16
5.1.1. Organismo de prueba	17
5.1.2. Preparación del medio sintético	17
5.1.3. Caracterización fisicoquímica del medio sintético	17
5.1.4. Caracterización geoclimática, selección de sitios de muestreo y colecta de agua	18
5.1.5. Determinación de la concentración de los antiinflamatorios no esteroideos	19
5.1.6. Determinación de la toxicidad a través de la evaluación del estrés oxidativo	19
5.1.6.1. Determinación del grado de lipoperoxidación	20

5.1.6.2. Determinación del contenido de hidroperóxidos	20
5.1.6.3. Determinación del contenido de proteínas carboniladas	20
5.1.6.4. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa	21
5.1.6.5. Determinación de la actividad de la catalasa	21
5.1.6.7. Determinación del contenido de proteínas	21
5.2. Análisis estadístico	22

CAPÍTULO II. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN	23
7. CONCLUSIONES	58
8. PERSPECTIVAS	59
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RELACIÓN DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno	3
Tabla 2. Curva tipo para la determinación de proteínas	22

RELACIÓN DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Enzimas antioxidantes intracelulares	8
Figura 2. Presa Madín (puntos críticos y sitios de muestreo)	18

Capítulo I

Protocolo de tesis

RESUMEN

La toxicidad producida por contaminantes como metales pesados, hidrocarburos y plaguicidas en ambientes acuáticos ha sido ampliamente evaluada, pero pocos son los estudios sobre el efecto de los productos farmacéuticos. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), son uno de los grupos de medicamentos de venta libre más utilizados en México. Los AINEs ingresan a los cuerpos de agua mediante descargas municipales e industriales, representando un riesgo para estos y para los hidrobiontes. La presa Madín (PM), ubicada en el Estado de México, se alimenta principalmente por el río Tlalnepantla. La PM abastece de agua potable a los municipios de Naucalpan y Atizapán, y diversas actividades recreativas tienen lugar en sus alrededores, como la vela y la pesca de diversas especies como la carpa común (*Cyprinus carpio*). La carpa es un pez comúnmente empleado en cultivos comerciales y se ha propuesto como un organismo de prueba para ensayos toxicológicos por su importancia económica y amplia distribución geográfica. Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad inducida por los AINEs presentes en agua de la PM sobre *Cyprinus carpio*, a través de biomarcadores de estrés oxidativo. Para esto se determinó la concentración de diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno en aguas provenientes de la presa Madín a través de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y se evaluaron los siguientes biomarcadores de estrés oxidativo en branquias, sangre y músculo: grado de lipoperoxidación (método de Buege y Aust, 1978), contenido de hidroperóxidos (método de Jiang et al. 1992), contenido de proteínas carboniladas (método de Levine et al., 1990; Parvez y Raisuddin, 2005; Burcham, 2007), y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (método de Misra y Fridovich, 1972) y catalasa (método de Radi et al., 1991). La información obtenida permitió la caracterización del daño a biomoléculas, como lípidos y proteínas, en branquias, sangre y músculo producido por los AINEs presentes en agua de la presa Madín sobre una especie de interés comercial como la carpa común.

ABSTRACT

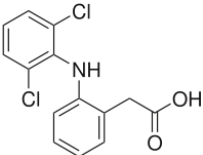
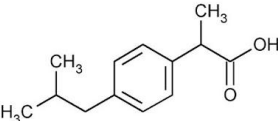
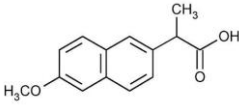
The toxicity caused by pollutants such as heavy metals, hydrocarbons and pesticides in aquatic environments has been extensively evaluated, but there are few studies on the effect of pharmaceuticals. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are one of the groups counter drugs most used in Mexico. NSAIDs entering water bodies through municipal and industrial discharges, representing a risk for these and for hydrobionts. Madín Reservoir (MR), located in the State of Mexico, is fed mainly by the Río Tlalnepantla. MR provides drinking water to municipalities of Naucalpan and Atizapán, and various recreational activities taking place in their surroundings, such as sailing and fishing for various species such as common carp (*Cyprinus carpio*). The carp is a fish commonly used in commercial crops and has been proposed as a test organism for toxicological testing for its economic importance and wide geographic distribution. Therefore the aim of this study was to evaluate the toxicity induced by NSAID present in MR water on *Cyprinus carpio*, using biomarkers of oxidative stress. For this, the concentration of diclofenac, ibuprofen and naproxen in water from Madín Reservoir through liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and the following biomarkers of oxidative stress were evaluated in gill, blood and muscle: lipid peroxidation (Buege and Aust, 1978), hydroperoxide content (Jiang et al. 1992), protein carbonyl content (Levine et al., 1990; Parvez and Raisuddin, 2005; Burcham, 2007), and the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (Misra and Fridovich, 1972) and catalase (Radi et al., 1991). The information obtained allowed the characterization of damage to lipids and proteins in gill, blood and muscle produced by NSAIDs present in Madín Reservoir water on a fish of commercial interest such as common carp.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En México, uno de los grupos de medicamentos más vendidos y consumidos por la población son los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Gómez-Oliván et al., 2009). Estos son encontrados en una gran variedad de formas farmacéuticas y su venta no requiere receta médica. Los AINEs son un grupo de agentes distintos desde el punto de vista químico que difieren en sus actividades antipirética, analgésica y antiinflamatoria. Actúan primordialmente al inhibir las enzimas del grupo de la ciclooxigenasa, pero no a las del grupo de la lipooxigenasa (Mycek et al., 2004).

Algunas de sus propiedades físicas y químicas se muestran en la siguiente tabla (Daughton y Ternes, 1999; Jones et al., 2002; Beausse, 2004; Scheytt et al., 2005):

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno

	Diclofenaco	Ibuprofeno	Naproxeno
Fórmula química	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	$C_{13}H_{18}O_2$	$C_{14}H_{14}O_3$
Estructura química			
Peso molecular (g/mol)	296.14864	206.28082	230.25916
pKa	4.15	5.2 4.91	4.15
log Kow	4.51	3.97	3.18
Solubilidad en agua a 25 °C (mg/L)	2.37	21	15.9

En los últimos años, los investigadores dirigen sus esfuerzos a realizar una evaluación más completa sobre el efecto que los productos farmacéuticos pueden provocar al medio acuático. La evaluación tiene en cuenta los volúmenes de venta, la concentración, el metabolismo, la biodegradabilidad y la toxicidad de los fármacos (Stuer-Lauridsen et al., 2000; Jones et al., 2002).

Los fármacos no son ambientalmente diferentes de otros productos químicos. De hecho, cantidades elevadas de los productos farmacéuticos son descargadas en plantas de tratamiento de aguas residuales cuando se usan con fines terapéuticos y directamente en las aguas superficiales o en el suelo cuando se utilizan con fines veterinarios (Isidori et al., 2005). Se trata de compuestos biológicamente activos que pueden interferir con sistemas biológicos específicos (por ejemplo, enzimas) o genéricamente actuar en función de sus propiedades (Wiegel et al., 2004). Los compuestos hidrosolubles pueden contaminar las aguas subterráneas debido a su movilidad, mientras que los compuestos lipofílicos pueden acumularse en los sedimentos o suelos (Fent et al., 2006). Debido a sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, existe preocupación acerca del impacto potencial sobre las especies no objetivo (Park, 2005).

Los datos publicados rara vez proporcionan información cualitativa y cuantitativa sobre los procesos que determinan el destino y los efectos de estas sustancias activas (Halling-Sorensen et al., 1998; Ternes, 1998) y sus derivados de transformaciones bióticas y abióticas, que pueden hacer a los subproductos más dañinos que los compuestos originales (DellaGreca et al., 2003; Andreozzi et al., 2003). Algunos autores reportan información sobre la incidencia ambiental de los fármacos, señalando que aquellas cantidades significativas de varios productos farmacéuticos descargados en el medio ambiente y no completamente eliminadas por las plantas de tratamiento de aguas residuales (DellaGreca et al., 2007) se han detectado en aguas superficiales y,

ocasionalmente, en aguas subterráneas (Ternes, 1998; Heberer et al., 2002; Zuccato et al., 2006).

El primer estudio sobre la contaminación de agua por productos farmacéuticos tuvo lugar en una planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Kansas, Estados Unidos en 1976. Los resultados fueron publicados en la literatura científica y luego ignorados por 15 años (Hignite y Azarnoff, 1977).

En 1992, investigadores alemanes que trabajaban en la búsqueda de herbicidas en agua, encontraron al ácido clofíbrico. En el mismo año, en Alemania, Dinamarca y Suecia se encuentra este fármaco en ríos, lagos y en el Mar del Norte. A partir de los resultados de este trabajo, algunos investigadores norteamericanos comienzan a prestar atención al tema de los medicamentos en el medio ambiente (Heberer y Stan, 1997; Raloff, 1998). En 1996, Stumpf et al. reportaron diclofenaco ($\leq 1.59 \mu\text{g/L}$), ibuprofeno ($\leq 3.35 \mu\text{g/L}$) y ácido acetilsalicílico ($\leq 1.51 \mu\text{g/L}$) en aguas residuales y concentraciones más bajas (0.1-0.5 $\mu\text{g/L}$) en agua de río. Además, en dosis muy bajas (1-6 ng/L), el diclofenaco y el ibuprofeno se pudieron detectar incluso en agua potable. En un estudio realizado por Buser et al. (1998) se determinaron las concentraciones de carbamazepina, ácido clofíbrico, naproxeno, ibuprofeno, ketoprofeno y diclofenaco en los efluentes de tres plantas tratadoras de agua, en dos ríos y en columnas de agua del lago Greifensee (Suiza), encontrándose 0.95, 0.06, 2.6, 1.13, 0.18 y 0.99 mg/L, respectivamente. En el mismo año Heberer et al. determinaron que los fármacos más frecuentemente detectados en la superficie del agua incluyen el ácido clofíbrico, el diclofenaco, el ibuprofeno y la propifenazona en concentraciones aún más bajas, en el orden de $\mu\text{g/L}$. Varios medicamentos fueron detectados en los efluentes de diversas plantas de tratamiento de aguas residuales de Canadá (en concentraciones de $\mu\text{g/L}$), incluyendo agentes analgésicos o antiinflamatorios (como el ibuprofeno, naproxeno y ácido salicílico), reguladores de lípidos, y un fármaco antiepiléptico, la carbamazepina (Metcalf et al., 2003). La presencia de ibuprofeno, ácido salicílico, gemfibrozil,

naproxeno, indometacina y bezafibrato fue detectada en efluentes de fosas sépticas ubicadas en Ontario, Canadá, en concentraciones de 2150, 480, 430, 300, 4 y 12 ng/L, respectivamente (Carrara et al., 2008). En un estudio reciente realizado en México, se determinó la presencia de naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco y diferentes compuestos farmacéuticos, dando como resultado la existencia de los mismos a concentraciones en el rango de hasta 0.6 µg/L en muestras de aguas residuales y lodos en el área metropolitana de la ciudad de México, las cuales comparadas con las reportadas para los mismos fármacos en Europa y Estados Unidos son mucho más bajas (Siemens et al., 2008).

Esto se complica cuando se piensa en el impacto de estos fármacos en el medio ambiente. Según estudios realizados en Dinamarca e Inglaterra el ácido acetilsalicílico, paracetamol, ibuprofeno, amoxicilina, oxitetraciclina y ácido mefenámico representan un riesgo ambiental (Stuer-Lauridsen et al., 2000; Jones et al., 2002). Por otra parte, un informe de las autoridades suizas coincide en afirmar el riesgo que el paracetamol y la oxitetraciclina representan para el medio ambiente e incluye en la lista el diclofenaco, el etinilestradiol, el ibuprofeno, el metropolol, la noretisterona y la tilosina (Medical Products Agency, 2004).

El uso de biomarcadores de contaminación ha sido sujeto de diversos estudios, Martí, 2003; Newman y Unger, 2003 y van der Oost et al., 2003 los definen como toda respuesta a nivel suborganismo en sus características bioquímicas, fisiológicas, anatómicas, histológicas y de comportamiento que son usadas para señalar la exposición a tóxicos ya sean de naturaleza química, física o de radiaciones; estos indican si un tóxico estuvo disponible por suficiente tiempo para producir una respuesta o efecto. Los biomarcadores se pueden subdividir en tres clases (van der Oost et al., 2003):

- Biomarcadores de exposición: comprenden la detección y medición de una sustancia exógena, su metabolito o el producto de una interacción entre un agente xenobiótico y alguna molécula o célula diana que se mide en un compartimiento dentro de un organismo.
- Biomarcadores de efecto: incluyen la medición de las alteraciones bioquímicas, fisiológicas o de otro tipo dentro de los tejidos o fluidos corporales de un organismo que puede ser reconocido y asociado con un deterioro de la salud o posible enfermedad.
- Biomarcadores de susceptibilidad: indican la capacidad inherente o adquirida de un organismo para responder a los cambios producidos por la exposición a una sustancia xenobiótica específica, incluyendo factores genéticos y cambios en los receptores que alteran la susceptibilidad del organismo expuesto.

Específicamente, los cambios bioquímicos son detectables antes de que se manifiesten efectos visibles a niveles superiores, por ejemplo reducción en el crecimiento y cambios en la reproducción. Por lo que el deterioro de las funciones fisiológicas y bioquímicas en un organismo es el primer indicador de perturbación ambiental y podría utilizarse para desarrollar indicadores bioquímicos rápidos y sensibles al estrés tóxico (Villaroel, 2004). Se entiende por estrés oxidativo una alteración generada por un desequilibrio entre la producción de radicales libres y los mecanismos de defensa antioxidante de un organismo. Esto puede conducir a daño de componentes celulares y tejidos. Dichos mecanismos de defensa incluyen sistemas enzimáticos y no enzimáticos los cuales se encargan de evitar la formación de radicales libres, capturar los que ya se han formado y remover o reparar las biomoléculas ya dañadas (Storey, 1996; Ferreira et al., 2005; Valavanidis et al., 2006).

Tres de las principales enzimas antioxidantes son la superóxido dismutasa (SOD), una metaloproteína que se encuentra en la matriz mitocondrial, su función consiste en dismutar el $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 ; catalasa (CAT), asociada primariamente con los

peroxisomas, en donde se detoxifica el H_2O_2 llevándolo a dos moléculas de H_2O y O_2 ; y glutatión peroxidasa (GPx), una enzima citosólica que reacciona con el H_2O_2 para reducirlo a H_2O y alcohol usando el glutatión (GSH) como agente reductor (Pedrajas et al., 1995; Fraga et al., 1996; Hai et al., 1997; Kelly et al., 1998; Ahmad et al., 2000). Estas enzimas antioxidantes han sido propuestas como biomarcadores de contaminación mediada por estrés oxidativo y su inducción como una respuesta ante la exposición a contaminantes (van der Oost et al., 2003).

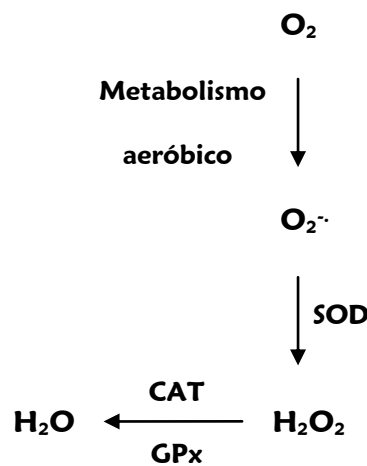


Fig. 1. Enzimas antioxidantes intracelulares

El monitoreo de la calidad del ambiente acuático se puede realizar a través del empleo de organismos de prueba, conocidos como bioindicadores. En una evaluación toxicológica, el organismo debe presentar múltiples ventajas como bioindicador: sencillo mantenimiento y cultivo en condiciones de laboratorio, amplio rango de sensibilidad a diversos xenobióticos, además de alta disponibilidad y abundancia (amplia distribución geográfica). Diversos estudios sugieren que las sustancias terapéuticas en concentraciones que se encuentran en el medio ambiente pueden tener efectos sobre los organismos acuáticos (Storey, 1996; Daughton y Ternes, 1999; Ferrari et al., 2003).

Ensayos de toxicidad crónica realizados en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) evidenciaron cambios citológicos en el hígado, riñones y branquias después de 28 días de exposición a tan sólo 1 µg/L de diclofenaco; para una concentración de 5 µg/L se hicieron evidentes lesiones renales, así como la bioacumulación del fármaco en el hígado, riñones, branquias y músculo (Schwaiger et al., 2004; Triebkorn et al., 2004). El ibuprofeno es otro AINE con toxicidad crónica documentada. En un estudio realizado por Flippin et al. (2007), hembras del pez medaka japonés (*Oryzias latipes*) expuestas a diferentes concentraciones del fármaco durante seis semanas, mostraron un fuerte aumento en el peso del hígado junto con un aumento en la producción de huevos, pero con una reducción en el número de eventos de desove semanales. La ecotoxicidad del naproxeno y sus fotodederivados también se ha previsto. Ensayos de toxicidad aguda realizados en el rotífero *Brachionus calyciflorus*, la pulga de agua *Ceriodaphnia dubia* y el camarón hada *Thamnocephalus platyurus*, mostraron que el naproxeno tuvo valores de CL₅₀ y CE₅₀ dentro del rango de 1 a 100 mg/L, con los productos de fotólisis es significativamente más tóxico (Isidori et al., 2005).

Fent, et al. (2006) reportaron la toxicidad crónica de AINEs sobre organismos acuáticos (algas, invertebrados y peces), describiendo afectaciones en la reproducción, efectos histopatológicos, lesiones renales, alteraciones de las branquias y retraso en la eclosión. En 2010, Oviedo-Gómez et al. evaluaron la toxicidad del diclofenaco sobre la especie centinela *Hyalella azteca*, utilizando biomarcadores de estrés oxidativo, obteniendo como resultados un valor de 0.467 mg de diclofenaco/kg de sedimento para la CL₅₀ a las 72 horas de exposición a este fármaco y la inducción de estrés oxidativo (al observar un incremento de la lipoperoxidación, catalasa, glutatión peroxidasa, contenido de proteínas carboniladas y un decremento de la superóxido dismutasa). En el mismo año Galar-Martínez et al. determinaron los efectos tóxico de los contaminantes presentes en agua y sedimentos de la presa Madín en hígado y cerebro de *Cyprinus carpio* a través de ensayos de toxicidad aguda (letalidad) y subaguda (los biomarcadores utilizados fueron lipoperoxidación y actividad de las

enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa); los resultados demostraron que los contaminantes presentes en el agua y los sedimentos de la presa Madín inducen estrés oxidativo. Saravanan et al. (2011) determinaron los efectos tóxicos producidos por el ácido clofibrico y diclofenaco en carpa común (*Cyprinus carpio*) a concentraciones de 1, 10 y 100 µg/L por un periodo de 96 horas bajo condiciones estáticas de bioensayo, encontrando alteraciones hematológicas, bioquímicas, ionoreguladoras y enzimáticas. En 2012 Gómez-Oliván et al. evaluaron la toxicidad provocada por los sedimentos enriquecidos con paracetamol en la especie centinela *Hyalella azteca* mediante pruebas de estrés oxidativo: lipoperoxidación, contenido de proteínas carboniladas y actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa; los resultados mostraron que la lioperoxidación y el contenido de proteínas carboniladas se incrementaron significativamente, mientras que la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa disminuyeron significativamente con respecto a los controles. Islas-Flores et al. (2013) evaluaron el potencial estrés oxidativo (a través de biomarcadores como lipoperoxidación y actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) inducido por el diclofenaco en cerebro, hígado, branquias y sangre de *Cyprinus carpio*; los resultados evidenciaron un aumento estadísticamente significativo de la lipoperoxidación en hígado y branquias principalmente, así como cambios significativos en la actividad de las enzimas antioxidantes evaluadas en estos órganos, con respecto a los controles.

Por otro lado, en la literatura, son verdaderamente escasos los trabajos que evalúen los efectos negativos de las mezclas de fármacos sobre el medio ambiente. Un ejemplo es el estudio realizado por Cleuvers (2003 y 2004), quien evaluó el efecto ecotóxico de una mezcla de productos antiinflamatorios (diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico) con otros medicamentos (ácido clofibrico, carbamazepina, captopril, metformina, propranolol y metropolol), utilizando para ello ensayos con *Daphnia magna* y algas. Sus resultados demuestran que el efecto de la mezcla aparece

a concentraciones en las cuales los productos solos poseen muy poca o ninguna toxicidad.

Aunque existen algunos reportes sobre la toxicidad aguda de los medicamentos, estos datos no son suficientes para determinar el impacto de los fármacos sobre el medio ambiente. Se necesita dirigir las investigaciones al estudio de la toxicidad crónica y al desarrollo de metodologías de cálculo general que permitan estimar la ecotoxicidad y el daño real que representan los medicamentos para el medio ambiente teniendo en cuenta, los volúmenes de venta, el metabolismo, la toxicidad, las concentraciones, la biodegradabilidad y la capacidad de algunos fármacos de adsorberse sobre los lodos.

2. JUSTIFICACIÓN

Existe un creciente interés en los estudios de toxicidad producida por diversos contaminantes (tales como metales pesados, hidrocarburos y plaguicidas) a los ambientes acuáticos. Sin embargo, son pocos los estudios relativos a los productos farmacéuticos a nivel mundial y en nuestro país son insuficientes.

La presencia de medicamentos en el agua se ha convertido en un problema ambiental de importancia. Estos pueden ingresar al medio ambiente a través de las descargas municipales e industriales, produciendo impactos en los organismos acuáticos. Se conoce que algunos medicamentos también pueden producir especies reactivas de oxígeno, entre los que se incluyen fármacos anticancerígenos, analgésicos y antiinflamatorios (Basaga, 1990; Borel et al., 1996).

En México los medicamentos son empleados de forma irracional y uno de los grupos de fármacos más vendidos son los AINEs, ya que su venta no requiere receta médica. La contaminación proviene no solo de las excreciones, donde una parte del fármaco es eliminado del cuerpo sin metabolizarse, sino que proviene también de la fabricación y disposición inadecuada de los desechos de estos productos (Boxal, 2004). Los fármacos han sido encontrados en aguas superficiales, subterráneas e incluso en el agua potable (Montague, 1998). Esta investigación se concentra en el agua de la presa Madín.

La presa Madín está ubicada sobre el río Tlalnepantla y el pueblo de Madín, y los municipios de Naucalpan de Juárez, Atizapán de Zaragoza y Tlalnepantla de Baz, Estado de México. Este embalse tiene usos múltiples, abastece de agua potable a los municipios de Naucalpan y Atizapán, y en ella se realizan diversas actividades recreativas como el veleo y la pesca. Este cuerpo de agua recibe las descargas domésticas directas de los pobladores de Nuevo y Viejo Madín, así como los desechos arrastrados por el río Tlalnepantla a lo largo de su cauce. Además en sus orillas se

encuentran tiraderos de basura, por lo que su degradación es evidente. La investigación del efecto ecotoxicológico proporcionará más solidez a la evaluación de la calidad de agua. Por este motivo el uso de los bioensayos es extremadamente importante para determinar los efectos de los fármacos. Estos se consideran como un complemento a la caracterización fisicoquímica convencional y para ello se utilizan especies de diferentes niveles tróficos (Wong y Pak, 2004; Park y Choi, 2008).

Los organismos acuáticos están siendo expuestos a diversos contaminantes con diferentes mecanismos de toxicidad, contribuyendo cada uno a un efecto adverso total. En consecuencia, en los programas de monitoreo de la calidad ecológica, la integración de datos químicos con respuestas biológicas (biomarcadores) es ampliamente recomendable para caracterizar los efectos de los contaminantes en los organismos. A nivel bioquímico, entre los biomarcadores se incluyen estudios de aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, como ruta general de toxicidad (Barata et al., 2005). La carpa es un pez de importancia comercial, por lo que si este organismo es capaz de bioconcentrar contaminantes, puede ser una fuente de exposición importante para las poblaciones que lo ingieren.

Los medicamentos constituyen una amenaza para la mayoría de los niveles tróficos, debido a que estos compuestos presentan una alta persistencia en el ambiente, se bioacumulan y biomagnifican en la cadena alimentaria, pudiendo afectar como consumidor final, al hombre. Por todo lo anterior, es de gran importancia realizar estudios toxicológicos que permitan conocer el impacto que los AINEs pueden producir al medio acuático y a los hidrobiontes. Esto permitirá contar con pruebas confiables para valorar la toxicidad de estos medicamentos presentes en cuerpos de agua en México.

3. HIPÓTESIS

Los antiinflamatorios no esteroideos presentes en agua de la presa Madín inducen estrés oxidativo y como consecuencia, daño a algunas biomoléculas, sobre *Cyprinus carpio*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

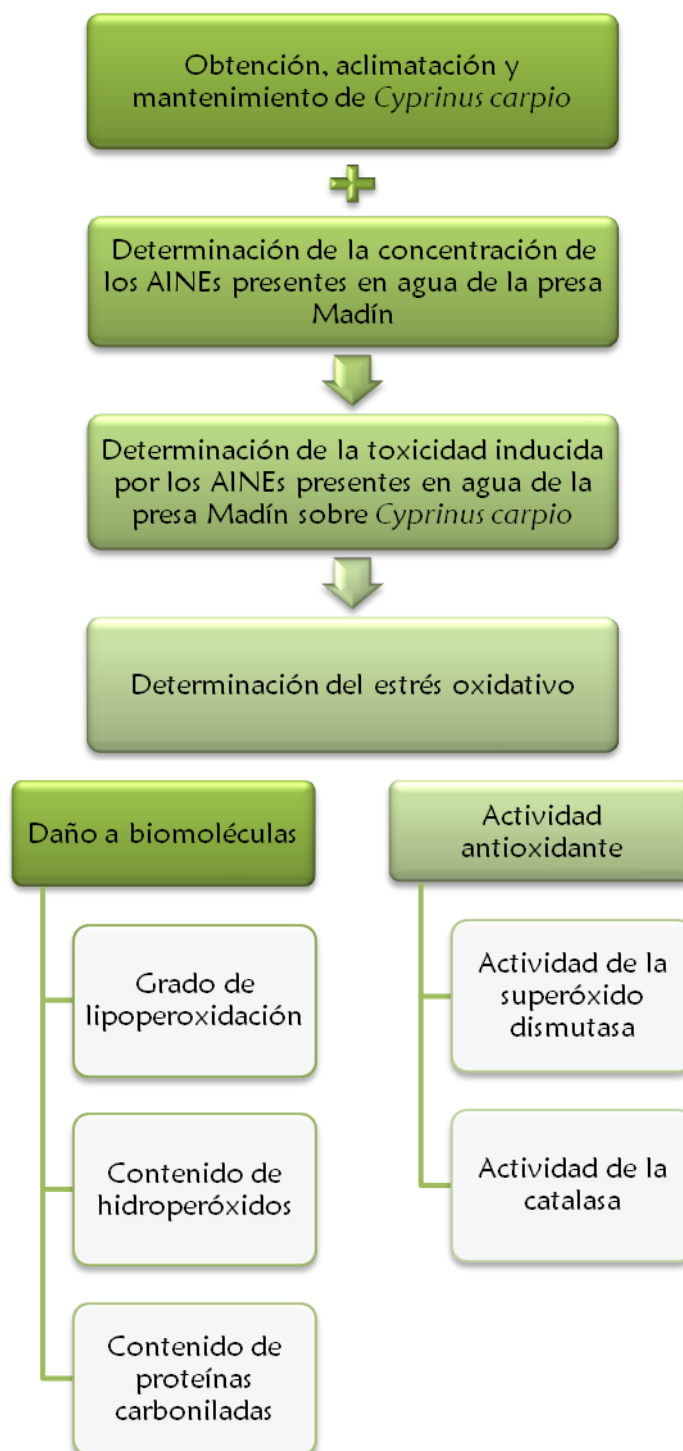
Evaluar la toxicidad inducida por los antiinflamatorios no esteroideos presentes en agua de la presa Madín sobre carpa común (*Cyprinus carpio*).

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la concentración de los antiinflamatorios no esteroideos presentes en agua de la presa Madín mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).
2. Evaluar el daño producido por los antiinflamatorios no esteroideos presentes en agua de la presa Madín sobre *Cyprinus carpio*, mediante los siguientes biomarcadores: grado de lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos, contenido de proteínas carboniladas, actividad de la superóxido dismutasa y catalasa.

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño metodológico



5.1.1. Organismo de prueba (*Cyprinus carpio*)

Los organismos de prueba se obtuvieron del centro carpícola de Tiacaque, Estado de México y se trasladaron al Laboratorio de Toxicología Ambiental de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México. Para la aclimatación y mantenimiento del organismo de prueba se distribuyeron en peceras de vidrio de 120 L de capacidad en un medio sintético (174 mg/L de NaHCO_3 , 120 mg/L de MgSO_4 , 8 mg/L de KCl y 120 mg/L $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) de pH 7.5-8.5, a temperatura ambiente, con aireación constante, fotoperiodos de luz y oscuridad natural y alimentados cada tercer día con Purina^{MR} para peces (Domitrovic, 1997).

5.1.2. Preparación del medio sintético

Se disolvieron en 2.85 L de agua destilada (o desionizada) 120 mg/L de MgSO_4 , 174 mg/L de NaHCO_3 , 8 mg/L de KCl en el orden descrito. Por otra parte se agregaron 120 mg/L de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 150 mL de agua destilada (o desionizada) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se colocó la solución a agitación hasta que el CaSO_4 estuvo completamente disuelto; se adicionó a los 2.85 L de solución preparados con anterioridad y se mezclaron perfectamente. Para valorar la calidad del agua reconstituida, se colocaron 10 carpas juveniles en una muestra durante 24 h; al término de este tiempo no se registraron muertes, por lo tanto, el agua pudo ser utilizada.

5.1.3. Caracterización fisicoquímica del medio sintético

El medio sintético se caracterizó a través de la determinación del pH que se midió utilizando un potenciómetro de electrodo de vidrio, del oxígeno disuelto (medido a través de un oxímetro), y de la conductividad.

5.1.4. Caracterización geoclimática, selección de sitios de muestreo y colecta de agua

Para la caracterización geoclimática y la selección de los sitios de muestreo, en un estudio previo, se revisó la información contenida en el Plan de Desarrollo Urbano del Municipio de Atizapán de Zaragoza (2006-2012), así como la Carta Urbana, y mapas hidrológicos de la zona. Así mismo, se realizaron dos visitas al lugar y se recorrió el embalse a fin de observar físicamente los sitios con mayor problemática. Dentro de estos últimos, se identificaron a los poblados de Nuevo y Viejo Madín, dado que sus descargas son vertidas directamente a la presa, la planta potabilizadora y la entrada del río Tlalnepantla, ya que es el afluente principal y arrastra desechos desde la Zona Esmeralda. Los sitios seleccionados fueron: 1) descarga del poblado de Viejo Madín, 2) descarga del poblado de Nuevo Madín, 3) brazo lateral del embalse, 4) cortina (sitio cercano a la planta potabilizadora) y 5) afluente o entrada al embalse del río Tlalnepantla. El agua fue colectada mediante botellas de cierre automático y colocada en frascos de plástico previamente lavados con ácido nítrico, con el fin de evitar contaminación cruzada y trasladarla al laboratorio para su tratamiento. Las muestras se sometieron a una extracción líquido/líquido con 5 mL (1+1) (v/v) hexano/acetato de etilo para su posterior análisis cromatográfico.

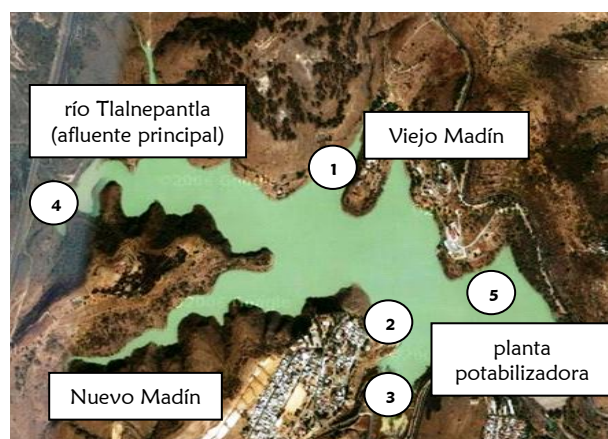


Figura 2. Presa Madín (puntos críticos y sitios de muestreo)

5.1.5. Determinación de la concentración de los antiinflamatorios no esteroideos

Se determinó la concentración de diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno en muestras de agua provenientes de la presa Madín a través de un método validado de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), usando una columna RRHD Eclipse Plus C18 (2.1x50 mm, 1.8 μ m) y bajo las siguientes condiciones cromatográficas: fase móvil de 60:40 v/v de acetonitrilo/formiato de amonio (10 mM) y flujo de 0.3 mL/min. Los AINEs se identificaron y cuantificaron utilizando un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo, equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI).

5.1.6. Determinación de la toxicidad a través de la evaluación del estrés oxidativo

Para el estudio de la toxicidad subletal se emplearon peceras de vidrio de 40 L de capacidad, que contenían agua proveniente de la presa Madín; en cada sistema de prueba (incluyendo al testigo) se colocaron seis organismos. El tiempo de exposición fue de 96 h; después del cual, se anestesió a las carpas utilizando 50 mg de aceite de clavo por cada L de agua, posteriormente, se tomó muestra sanguínea de la vena caudal; por cada 100 μ L de sangre se adicionaron 400 μ L de buffer salino de fosfatos (PBS). Posterior a esto, las carpas fueron sacrificadas y se realizó la disección en un baño de hielo para obtener branquias y músculo, los cuales se pesaron, se homogenizaron en 2 mL de PBS (pH 7.3) y se centrifugaron a 12500 rpm y 4°C durante 15 min para la obtención del sobrenadante. Las pruebas bioquímicas se realizaron con el sobrenadante, excepto al evaluar el grado de lipoperoxidación, donde se usó el homogenizado. El ensayo se realizó por triplicado.

5.1.6.1. Determinación del grado de lipoperoxidación (Método de Buege y Aust, 1978)

A 100 μL de la muestra (sin centrifugar) se le añadió solución reguladora tris-HCl 150 mM (pH 7.4) hasta completar 1 mL y se le adicionaron 2 mL de TCA-TBA (ácido tiobarbitúrico al 0.375% en ácido tricloroacético al 15%), después se indujo un choque térmico (con ayuda de un baño maria) en agua a ebullición. Se incubó a 37°C por 30 min. Concluido este tiempo, se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min y se determinó la absorbancia a 535 nm. Los resultados se expresaron en mmol de malondialdehído/mg de proteínas/g de tejido, usando el coeficiente de extinción molar (CEM) de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.1.6.2. Determinación del contenido de hidroperóxidos (Método de Jiang et al. 1992)

A 100 μL de la muestra (previamente desproteinizada con ácido tricloroacético al 10%) se le agregaron 900 μL de mezcla de reacción (FeSO_4 0.25 mM, H_2SO_4 25 mM, naranja de xilenol 0.1 mM e hidroxitolueno butilado 4 mM en metanol al 90%). Se incubó a temperatura ambiente durante 60 min. La absorbancia se determinó a 560 nm. Los resultados se expresaron en nmol de hidroperóxido de cumeno (CHP)/mg de proteínas/g de tejido, usando el CEM de $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.1.6.3. Determinación del contenido de proteínas carboniladas (Método de Levine et al, 1990; Parvez y Raisuddin, 2005; Burcham, 2007)

A 100 μL del sobrenadante se le adicionaron 150 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM en HCl 2 M. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 h en oscuridad. Después de la incubación se le adicionaron 500 μL de ácido tricloroacético al 20% y se dejó reposar durante 15 min a 4°C. El precipitado se centrifugó a 11000

rpm durante 5 min. El botón se lavó varias veces con etanol-acetato de etilo 1:1 y posteriormente se disolvió en 1 mL de una solución 6 M de guanidina (pH 2.3) y se incubó a 37°C durante 30 min. La absorbancia se determinó a 366 nm. Los resultados se expresaron en mmol de carbonilos reactivos (C=O)/mg de proteínas/g de tejido, utilizando el CEM de 21000 M⁻¹ cm⁻¹.

5.1.6.4. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (Método de Misra y Fridovich, 1972)

Se colocaron 40 µL del homogenizado en una celda de cuarzo y se adicionaron 260 µL de solución amortiguadora de carbonatos (carbonato de sodio 50 mM y EDTA 0.1 mM) a pH 10.2. Posteriormente se agregaron 200 µL de adrenalina 30 mM y se determinó la absorbancia a 480 nm a los 30 s y 5 min. Los resultados se expresaron en mmol de SOD/mg de proteínas/g de tejido, usando el CEM de 21 M⁻¹ cm⁻¹.

5.1.6.5. Determinación de la actividad de la catalasa (Método de Radi et al, 1991)

20 µL del sobrenadante fueron colocados en una celda de cuarzo, se le agregaron 280 µL de solución amortiguadora de aislamiento (sucrosa 0.3 M, EDTA 1 mM, HEPES 5 mM y KH₂PO₄ 5 mM) y 200 µL de una solución de H₂O₂ 20 mM. Posteriormente se realizaron las lecturas de absorbancia a 240 nm, a los 0 y 60 s. Los resultados se expresaron en mmol de H₂O₂/mg de proteínas/g de tejido, usando el CEM de 0.043 mM⁻¹ cm⁻¹.

5.1.6.6. Determinación del contenido de proteínas (Método de Bradford, 1976)

A 25 µL del sobrenadante se le agregaron 75 µL de agua desionizada y 2.5 mL del reactivo de Bradford (0.05 g de azul de Cummassi, 25 mL de etanol al 96% y 50 mL de H₃PO₄ en 500 mL de agua desionizada). Se agitaron los tubos, se dejaron reposar

por 5 min y a continuación se determinó la absorbancia a 595 nm. Los resultados se extrapolaron en una curva estándar de albúmina (ver Tabla 2).

Tabla 2. Curva tipo para la determinación de proteínas

Tubo	Albúmina (μL) *	Agua desionizada (μL)
1	10	90
2	25	75
3	50	50
4	75	25
5	100	0
Blanco	0	100

* de una solución de 1 g/mL

5.2 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las determinaciones fueron sometidos a un análisis de varianza unifactorial (ANOVA) y las diferencias de las medias de cada grupo fueron comparadas contra el testigo correspondiente, utilizando el método de Bonferroni para comparaciones múltiples contra un testigo, con una $p < 0.05$.

Capítulo II

Discusión de resultados

6. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

RV: Environmental Research: Submission Confirmation

De: **Leobardo Manuel Gomez Olivan** (lmgomezo@uaemex.mx) Este remitente está en tu lista de contactos.

Enviado: lunes, 28 de octubre de 2013 08:37:11 p.m.

Para: cd.gonzalezg@hotmail.com (cd.gonzalezg@hotmail.com)

De: ees.er.0.24elbe.e59f5637@eesmail.elsevier.com
[ees.er.0.24elbe.e59f5637@eesmail.elsevier.com] En nombre de ER (ELS)
[er@elsevier.com]

Enviado el: lunes, 28 de octubre de 2013 08:30 p.m.

Para: Leobardo Manuel Gomez Olivan; lgolivan74@gmail.com

Asunto: Environmental Research: Submission Confirmation

Title: Metals and nonsteroidal anti-inflammatory drugs present in water from Madín Reservoir (Mexico) induce oxidative stress on gill, blood and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*)

Corresponding Author: Dr. Leobardo Manuel Gómez-Oliván

Authors: Edgar D González-González, MSci; Marcela Galar-Martínez, PhD; Patricia Vieyra-Reyes, PhD; Hariz Islas-Flores, PhD; Sandra García-Medina, PhD; Juan M Jiménez-Vargas, Chemistry; Celene Razo-Estrada, PhD; Ricardo Pérez-Pastén, PhD

Dear Dr. Gómez-Oliván,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Environmental Research.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Environmental Research as an author:

<http://ees.elsevier.com/er/>

Your username is: lmgomezo@uaemex.mx

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/er/automail_query.asp.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Environmental Research. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Environmental Research, Editorial Office
Elsevier
E-mail: er@elsevier.com

Metals and nonsteroidal anti-inflammatory drugs present in water from Madín Reservoir (Mexico) induce oxidative stress on gill, blood and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*)

Edgar David González-González^a, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a,*}, Marcela Galar-Martínez^b, Patricia Vieyra-Reyes^c, Hariz Islas-Flores^a, Sandra García-Medina^b, Juan Manuel Jiménez-Vargas^d, Celene Razo-Estrada^b, Ricardo Pérez-Pastén^b

^a Laboratorio de Toxicología Ambiental, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, México

^b Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México

^c Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, México

^d Unidad de Farmacología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México

* Corresponding author:

Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, México. Tel.: (52) 7222173890; fax: (52) 7222173890; e-mail: imgomezo@uaemex.mx
leobardo_gomez_olivan@yahoo.com.mx

Abstract

Many of the toxic xenobiotics that enter the aquatic environment exert their effects through redox cycling. Oxidative stress, which incorporates both oxidative damage and antioxidant defenses, is a common effect induced in organisms exposed to xenobiotics in their environment. The present study aimed to determine the oxidative stress induced on the common carp *Cyprinus carpio* by contaminants (metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals) present in Madín Reservoir. Five sampling stations, considered to have the most problems due to discharges, were selected. Carp were exposed to water from each sampling station for 96 h and the following biomarkers were evaluated in gill, blood and muscle: hydroperoxide content, lipid peroxidation, protein carbonyl content, and activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase. Results show that contaminants (metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals) present in water from the different sampling stations induce oxidative stress. Thus, water in this reservoir is contaminated with xenobiotics that are hazardous to *Cyprinus carpio*, a species consumed by the local human population.

Keywords

Oxidative stress; metals; nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals; Madín Reservoir; *Cyprinus carpio*

1. Introduction

Madín Reservoir is located on the Río Tlalnepantla in Mexico, its dam having been built downstream from the town of Madín at the point where the municipalities of Naucalpan de Juárez, Atizapán de Zaragoza and Tlalnepantla de Baz (State of Mexico) meet. This reservoir is used for multiple purposes: it supplies potable water to the municipalities of Naucalpan and Atizapán and is the site of diverse recreation activities including sailing and fishing of diverse species such as the common carp *Cyprinus carpio*.

One of the main sources of water contamination is the high acidity of local rainfall, which ranges in pH from 5 to 5.4. This phenomenon is due mainly to the high emissions of contaminants (SO_x , NO_x and Cl_2) generated by both fixed and mobile sources (industry and motor vehicles). Also, these municipalities do not have the equipment required for adequate treatment of local wastewater. Thus, Madín Reservoir, a water body destined for domestic use, is contaminated with direct sanitary discharges from human settlements in the area. Wastewater, particularly industrial wastewater, contains hazardous elements such as diverse chemicals, heavy metals, pharmaceuticals, solvents, acids, grease and oils, among others. Also, households make extensive use of detergents rather than soap, and motor vehicle repair shops commonly throw used oil into the sewer.

Preliminary studies conducted to identify contaminants at this site show that water in Madín Reservoir contain a considerable metal load, including particularly nickel, cadmium, iron, mercury and aluminum, all of which exceed the permissible levels for aquatic life protection, while NSAIDs such as DCF, IBP and NPX are present at levels of ng L^{-1} . Pesticides, hydrocarbons and surfactants originating in anthropogenic activities have also been qualitatively detected.

Diverse studies have shown that heavy metals in general can bind to sulfhydryl groups, consequently damaging the diverse structures that contain these groups. Aluminum can indirectly produce ROS and as a result oxidative stress (Yokel, 2000).

Iron sustains redox cycling during which there is production of ROS (Stohs and Bagchi, 1995) which exogenously contribute to oxidative stress. Because of its high affinity for GSH, mercury may deplete GSH levels and directly or indirectly induce oxidative stress (Lushchak, 2011). Cadmium does not directly produce ROS but can alter GSH levels and influence cellular thiol status, inducing metallothionein expression in the liver (Ercal et al., 2001). Nickel toxicity is associated with depletion of GSH as well as binding to protein sulfhydryl groups, negatively affecting protein structure and function (Valko et al., 2005).

Several studies have reported NSAID-induced toxicity in aquatic organisms, since these organisms are more susceptible to toxic effects due to continued exposure to wastewater discharges throughout their life cycle (Fent et al., 2006). NSAIDs have been shown to affect fish reproduction and growth, and to induce gill alterations as well as hepatotoxicity and nephrotoxicity (Schwaiger et al., 2004; Hoeger et al., 2005; Mehinto et al., 2010). Other authors have stated that paracetamol and DCF induce oxidative stress on *Hyaella azteca* and *Cyprinus carpio*, damaging biomolecules such as lipids, proteins and DNA (Oviedo-Gómez et al., 2010; Gómez-Oliván et al., 2012; Islas-Flores et al., 2013).

Many chemical products induce oxidative stress. These contaminants can stimulate ROS production and induce changes in antioxidant systems (Monteiro et al., 2006; Uner et al., 2006; Slaninova et al., 2009).

Cleaning products and their ingredients (anionic surfactants and bleaching agents) are toxic to aquatic life (Ankley and Burkhard, 1992). The metabolism of surfactants by aquatic animals can induce ROS formation and oxidative stress on these organisms (Hofer et al., 1995; Livingstone, 2003; Jifa et al., 2005; Li, 2008).

Oxidative stress occurs through alteration of the balance between ROS and antioxidant systems in the body. ROS, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and the hydroxyl radical (HO^{\cdot}), are formed in cells as a result of metabolic processes (Valavanidis et al., 2006). Aerobic organisms produce ROS due to their oxidative metabolism. Hydroxyl radicals may initiate LPX in body tissues. To

mitigate the negative effects of ROS, fish and other vertebrates possess an antioxidant defense system that uses enzymatic and non-enzymatic mechanisms. The most important antioxidant enzymes are SOD, CAT, GPx and GST. The enzymatic defense system includes vitamins E, C and A, carotenes, and ubiquinol-10 (Wilhelm Filho, 1996). Antioxidants protect the body against oxyradical-induced damage such as breaks in the DNA chain, protein oxidation and LPX induction (Winzer et al., 2000). An increase in the active form of molecular oxygen species due to overproduction and/or inability to destroy them can lead to damage of DNA structure and may therefore induce mutations, chromosomal aberrations and carcinogenesis. A change towards increased oxidant status or any imbalance between ROS production and degradation in animal tissues may induce LPX, plasma membrane alterations, or enzyme deactivation (Anand et al., 2000).

Cyprinus carpio, a fish commonly used in commercial aquaculture, has been proposed as a test organism in toxicological assays due to its economic importance and wide geographic distribution. Also, it shows adaptive response in contaminated aquatic environments (Oruç and Uner, 2002).

The present study aimed to evaluate oxidative stress induced by contaminants (metals and NSAIDs) present in water from Madín Reservoir, on gill, blood and muscle of *Cyprinus carpio*.

2. Materials and methods

2.1 Study area

Madín Reservoir is located at 19° 31' 37"N and 99° 15' 33"W on the Río Tlalnepantla, its dam being downstream from the town of Madín, in the municipalities of Naucalpan de Juárez, Atizapán de Zaragoza and Tlalnepantla de Baz (State of Mexico) (Figure 1). It has a full capacity of 25 million m³, but normally stores no more than 13 million m³ as a precaution against larger flows.

2.2. Collection of water samples in the reservoir

Water samples were collected during the cold dry season (February 2013) using the procedure stipulated in the official Mexican norm for wastewater sampling (NMX-AA-003-1980). Sampling was done at surface level at five stations corresponding to: (1) discharge from the town of Viejo Madín, (2) discharge from the town of Nuevo Madín, (3) lateral branch, (4) entry point of Río Tlalnepantla tributary, and (5) dam (Figure 1). Plastic bottles were used to collect water. Samples were placed in plastic flasks previously rinsed with 10% nitric acid, and transported to the laboratory.

2.3. Metal quantification in water

Metals (Ni, Cd, Fe, Hg and Al) were quantified according to the method proposed by Eaton et al. (1995). Concentrated nitric acid (2 mL) was added to 0.5 mL of sample (water). After digestion for 1 h in an autoclave at 120 °C and 15-lb pressure, samples were filtered and diluted with deionized water, then read on a Varian AA1475 atomic absorption spectrophotometer (Melbourne, Australia) and results were interpolated on a metal-type curve, a metal atomic absorption standard solution (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) was used for each one (1 mg mL⁻¹).

2.4. Diclofenac, ibuprofen and naproxen quantification in water by LC-MS/MS

DCF, IBP and NPX concentrations were determined with an Agilent 1290 Infinity HPLC unit (Santa Clara CA). The RRHD Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 1.8 μm) chromatography column was maintained at 40 °C. The mobile phase was a 60:40 v/v mixture of acetonitrile and ammonium formate (10 mM). Flow rate was 0.3 mL min⁻¹, run time 1.8 min, and injection volume 2 μL. DCF, IBP and NPX were identified and quantified using a 6430 Triple Quadrupole mass spectrometer (Beckman Coulter, Fullerton CA) fitted with ESI. The ESI positive mode was used throughout. Electrospray

voltage operated at 4000 V as the unit collected data in the negative ion mode. Mass spectrometer optimization was conducted by direct infusion of a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ standard solution of DCF, IBP and NPX, thereafter the ionization mode and precursor ion mode were selected.

2.4.1 Water

Water samples (5 mL) from exposure tanks were collected in glass vials and refrigerated at 4 °C for subsequent test concentration measurements. Results were expressed as time-weighted average concentrations of DCF, IBP and NPX. A liquid/liquid extraction with 5 mL (1+1) (v/v) hexane/ethyl acetate was conducted to extract DCF, IBP and NPX from 1-mL water samples. The extraction was repeated, and organic layers were combined and evaporated to dryness.

2.5. Specimen collection and maintenance

Three-month-old common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles 18.39 ± 0.31 cm in length and weighing 50.71 ± 7.8 g were obtained from the aquaculture facility in Tiacaque, State of Mexico. Fish were safely transported to the laboratory in well-sealed polyethylene bags containing oxygenated water, then stocked in a large tank with dechlorinated tap water (previously reconstituted with salts) and acclimated to test conditions for 30 days prior to beginning of the experiment. During acclimation, carp were fed Pedregal Silver™ fish food, and three-fourths of the tank water was replaced every 24 h to maintain a healthy environment. The physicochemical characteristics of tap water reconstituted with salts were maintained, i.e. temperature 20 ± 2 °C, oxygen concentration 80-90%, pH 7.5-8.0, total alkalinity 17.8 ± 7.3 mg L⁻¹, total hardness 18.7 ± 0.6 mg L⁻¹. A natural light/dark photoperiod (12:12) was maintained.

During the aquaculture period fish were not exposed to any metals or pharmaceuticals. Ni, Cd, Fe, Hg and Al concentrations were determined by atomic

absorption spectrophotometry and DCF, IBP and NPX concentrations by LC-MS/MS in pond water from the aquaculture facility. Neither metals (Ni, Cd, Fe, Hg and Al) nor pharmaceuticals (DCF, IBP and NPX) were detected in these samples.

2.6. Oxidative stress determination

Test systems consisting in 120 x 80 x 40-cm glass tanks filled with water reconstituted from the following salts: NaHCO₃ (174 mg L⁻¹; Sigma-Aldrich, Toluca, Mexico), MgSO₄ (120 mg L⁻¹; Sigma-Aldrich, St. Louis), KCl (8 mg L⁻¹; Vetec-Sigma-Aldrich, St. Louis) and CaSO₄.2H₂O (120 mg L⁻¹; Sigma-Aldrich, St. Louis) were maintained at room temperature with constant aeration and a natural light/dark photoperiod (12:12). Static systems were used and no food was provided to specimens during the exposure period.

Sublethal toxicity assays involved adding Madín Reservoir water to five test systems with six carp each. One system was used for each sampling station. A reservoir water-free control system with six carp was set up for each sampling station, and sublethal assays were performed in triplicate. A total of 180 fish were used. At the end of the exposure period (96 h), fish were removed from the systems and placed in a tank containing 50 mg L⁻¹ of clove oil as an anesthetic (Yamanaka et al., 2011). Anesthetized specimens were placed in a lateral position and blood was removed with a heparinized 1-mL hypodermic syringe by puncture of the caudal vessel performed laterally near the base of the caudal peduncle, at mid-height of the anal fin and ventral to the lateral line.

After puncture, specimens were placed in an ice bath and sacrificed. Gill and muscle were removed, placed in phosphate buffer solution [NaCl (Sigma-Aldrich, Toluca) 0.138 M; KCl (Vetec-Sigma-Aldrich, Toluca) 0.0027 M] pH 7.4 and homogenized. The supernatant was centrifuged at 12,500 rpm and -4 °C for 15 min. Tissue samples were stored at -70 °C prior to analysis.

Blood samples were collected in heparinized tubes and placed in phosphate buffer solution as above and ultrasonicated, then stored at -70 °C prior to analysis.

The following biomarkers were then evaluated: HPC, LPX, PCC, and activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT. All bioassays were performed on the supernatant.

2.6.1. Determination of HPC

HPC was determined by the ferrous oxidation-xylenol orange method (Jiang et al., 1992). To 100 μ L of supernatant (previously deproteinized with 10% trichloroacetic acid) was added 900 μ L of the reaction mixture [0.25 mM FeSO₄, 25 mM H₂SO₄, 0.1 mM xylenol orange and 4 mM butyl hydroxytoluene in 90% (v/v) methanol]; all reagents were obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis. The mixture was incubated for 60 min at room temperature and absorbance was read at 560 nm against a blank containing only reaction mixture. Results were interpolated on a type curve and expressed as nM cumene hydroperoxide mg⁻¹ protein.

2.6.2. Determination of LPX

LPX was determined using the thiobarbituric acid-reactive substances method (Büege and Aust, 1978). To 100 mL of supernatant was added Tris-HCl buffer solution pH 7.4 (Sigma-Aldrich, St. Louis) until a 1-mL volume was attained. Samples were incubated at 37 °C for 30 min; 2 mL TBA-TCA reagent [0.375% thiobarbituric acid (Fluka-Sigma-Aldrich, Toluca) in 15% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis)] was added and samples were shaken in a vortex. They were then heated to boiling for 45 min, allowed to cool, and the precipitate removed by centrifugation at 3,000 rpm for 10 min. Absorbance was read at 535 nm against a reaction blank. MDA content was calculated using the MEC of MDA (1.56×10^5 M cm⁻¹). Results were expressed as mM MDA mg⁻¹ protein.

2.6.3. Determination of PCC

PCC was determined using the method of Levine et al. (1994) as modified by Parvez and Raisuddin (2005) and Burcham (2007). To 100 μL of supernatant was added 150 μL of 10 mM DNPH in 2 M HCl and the resulting solution was incubated at room temperature for 1 h in the dark. Next, 500 μL of 20% trichloroacetic acid was added and the solution was allowed to rest for 15 min at 4 °C. The precipitate was centrifuged at 11,000 rpm for 5 min. The bud was washed several times with 1:1 ethanol:ethyl acetate, then dissolved in 1 mL of 6 M guanidine solution (pH 2.3) and incubated at 37 °C for 30 min. All reagents were obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis. Absorbance was read at 366 nm. Results were expressed as nM reactive carbonyls formed (C=O) mg^{-1} protein, using the MEC of 21,000 M cm^{-1} .

2.6.4. Determination of SOD activity

SOD activity was determined by the Misra and Fridovich (1972) method. To 40 μL of supernatant in a 1-cm cuvette was added 260 μL carbonate buffer solution (50 mM sodium carbonate and 0.1 mM EDTA) pH 10.2, plus 200 μL adrenaline (30 mM); all reagents from Sigma-Aldrich, St. Louis. Absorbance was read at 480 nm after 30 s and 5 min. Enzyme activity was determined using the MEC of SOD (21 M cm^{-1}). Results were expressed as IU mg^{-1} protein.

2.6.5. Determination of CAT activity

CAT activity was determined by the Radi et al. (1991) method. To 20 mL of supernatant was added 1 mL isolation buffer solution [0.3 M saccharose (Vetec-Sigma-Aldrich, St. Louis), 1 mL EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis), 5 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis) and 5 mM KH_2PO_4 (Vetec-Sigma-Aldrich, St. Louis)], plus 0.2 mL of a hydrogen peroxide solution (20 mM, Vetec-Sigma-Aldrich, St. Louis). Absorbance was

read at 240 nm after 0 and 60 s. Results were derived by substituting the absorbance value obtained for each of these times in the formula: CAT concentration = $(A_0 - A_{60})/MEC$ where the MEC of H_2O_2 is 0.043 mM cm^{-1} , and were expressed as $\mu\text{M } H_2O_2 \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$.

2.7. Statistical analyses

Results were expressed as the mean \pm SEM. After replication of the normality test, data differences were determined by one-way ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparison test with a 95% confidence limit whenever the data difference was significant. Statistical determinations were performed with SPSS v10 software (SPSS, Chicago IL).

3. Results

3.1. Quantification of metals

As regards the chemical characterization of metals at the different sampling stations, Ni, Cd, Fe, Hg and Al concentrations (Table 1) exceed the limits established in the official Mexican norms on permissible levels of heavy metals for aquatic life protection and human consumption (NOM-001-SEMARNAT-1996 and NOM-127-SSA1-1994, respectively).

3.2. DCF, IBP and NPX quantification in water

As regards the chemical characterization of NSAIDs in the various sampling stations, as can be seen in Table 1, DCF, IBP and NPX concentrations range from 0.18 to 4.51 ng L^{-1} .

3.3. Determination of HPC

HPC results are shown in Figure 2. Significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were observed in gill at SS1 (22.94%) and in blood at SS1 (101.61%), SS2 (54.43%), SS3 (132.55%) and SS4 (51.34%), while significant reductions occurred in gill at SS5 (29.90%), in blood at SS5 (27.62%) and in muscle at SS1 (42.97%), SS4 (30.96%) and SS5 (46.69%).

3.4. Determination of LPX

Figure 3 shows LPX results. Significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were found in gill at SS1 (87.22%) and SS4 (68.98%), in blood at SS1 (70.49%) and SS3 (66.27%), and in muscle at SS2 (18.76%), while significant reductions were seen in muscle at SS1 (19.58%) and SS5 (35.36%).

3.5. Determination of PCC

PCC results are shown in Figure 4. Significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were observed in blood at SS3 (79.67%) and in muscle at SS4 (66.28%), while a significant reduction was found in muscle at SS3 (33.36%).

3.6. Determination of SOD activity

Figure 5 shows SOD activity results. Significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were found in gill at SS2 (71.54%) and in blood at SS1 (92.84%), while significant reductions occurred in gill at SS1 (57.99%) and in muscle at SS1 (22.66%) and SS5 (45.77%).

3.7. Determination of CAT activity

CAT activity results are shown in Figure 6. Significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were observed in gill at SS1 (386.81%), SS2 (195.80%), SS4 (961.10%) and SS5 (287.55%), in blood at SS1 (198.69%), SS2 (148.67%) and SS5 (111.56%) and in muscle at SS3 (35.46%). Significant decreases in this activity occurred in muscle at SS1 (65.29%) and SS4 (61.16%).

4. Discussion and conclusions

Molecular biomarkers are used to test for oxidative damage induced on macromolecules by ROS and RNS (Valavanidis et al., 2006). These species are essential for cell function in body systems and are constantly produced in cells (Halliwell and Gutteridge, 1999). During LPX, polyunsaturated fatty acids with double bonds react with ROS, particularly the hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$) and the RNS peroxyxynitrite ($\text{ONOO}\cdot$), through a chain reaction mechanism. This permits the formation of hydroperoxides that are degraded to low-molecular-weight products, including MDA (Wilhelm Filho et al., 2005). As can be seen in Figure 2, an increase in HPC occurred in gill (SS1) as well as blood (SS1, SS2, SS3 and SS4), with blood displaying the highest value for this biomarker. Furthermore, the level of damage to lipids is shown in Figure 3, where increased LPX is evident in gill (SS1 and SS4), blood (SS1 and SS3) and muscle (SS2). These results may be explained by the presence of NSAIDs (DCF, IBP and NPX) and their degradation or biotransformation metabolites at all five sampling stations.

NSAIDs undergo both abiotic transformations by photodegradation and biotic transformations by CYP-mediated biotransformation, which in many cases result in the formation of metabolites that are more toxic than the original pharmaceutical agent (Lam et al., 2004).

The main products of the photodegradation of DCF include: 5,4-dihydroxy diclofenac, 3-hydroxy diclofenac, 4-hydroxymethyl diclofenac, 3-hydroxy 4-

hydroxymethyl diclofenac, 4-hydroxy diclofenac and 5-hydroxy diclofenac (Deng et al., 2003; Stülten et al., 2008), while those of IBP and NPX are: 4-isobutyl acetophenone, 1-(6-methoxy-2-naphthyl) ethanol, and 2-acetyl-6-methoxy naphthalene (Miranda et al., 1991).

The main metabolites of biotransformation in mammals and in some fishes are, in the case of NPX: 6-O-desmethyl naproxen, naproxen acyl glucuronide, and O-desmethylnaproxen acyl glucuronide (Vree et al., 1992); in that of DCF: diclofenac-1-O-acyl glucuronide, 4-hydroxydiclofenac, 5-hydroxydiclofenac, 5-hydroxydiclofenac p-benzoquinoneimine and 4-hydroxydiclofenac p-benzoquinoneimine (Grillo et al., 2003; Stülten et al., 2008; Islas-Flores et al., 2013); and in the case of IBP: carboxy-ibuprofen, 3-carboxy-ibuprofen, p-carboxy-2-propionate, hydroxy-ibuprofen, and carboxy hydratropic acid (Zwiener et al., 2002; Graham and Williams, 2004).

Benzoquinones formed in NSAID photodegradation and biotransformation are highly electrophilic molecules with a high affinity for binding to lipids, proteins and DNA (Baillie, 2006; Wilhelm et al., 2009) and altering the function of these macromolecules. They are also persistent in the aquatic environment and highly toxic to organisms living in it (Oviedo-Gómez et al., 2010).

NSAID toxicity is mediated by ROS formation as a result of biotransformation of these compounds through redox cycling (Ahmad et al., 2000; Abdollahi et al., 2004). CYP is known to produce an oxygenated intermediate — the oxy-cytochrome P450 complex [P450 (Fe³⁺) O₂^{·-}] — during the biotransformation of NSAIDs such as DCF, IBP and NPX, with subsequent release of the superoxide anion by reaction decoupling (Doi et al., 2002). In the present study, increased production of the superoxide anion radical is responsible for increases in LPX and HPC in carp exposed to water from the various sampling stations.

On the other hand, the increases in LPX and HPC observed in Figures 2 and 3 may be due to the fact that metal concentrations exceed those established by official Mexican norms on permissible levels of heavy metals for aquatic life protection and human consumption (NOM-001-SEMARNAT-1996 and NOM-127-SSA1-1994 respectively).

Iron catalyzes the reaction of the superoxide anion with hydrogen peroxide to produce hydroxyl radicals via the Fenton reaction (Winston and Di Giulio, 1991). Cd-induced signal transduction triggers ROS formation, which consequently indirectly promotes oxidative stress through diminished antioxidant cell capacity, leading to oxidative damage (DalCorso et al., 2010).

Different mechanisms have been proposed as the means through which Al induces ROS formation, for example, that Al displaces the iron present in various biomolecules, thereby increasing intracellular iron content and promoting the Fenton reaction (Amador et al., 2001; Dua and Gill, 2001; Yousef, 2004). This metal is also able to damage the mitochondrion directly and affect electron transport in the respiratory chain (García-Medina et al., 2010). In both cases ROS production is increased, which explains the increases in LPX and HPC in our study.

Formation of carbonyl groups results from the direct oxidation of amino acid side chains by metals or ROS as well as from protein modification by oxidation-derived secondary products such as LPX products (Pantke et al., 1999; Grune, 2000; Requena et al., 2003). As can be seen in Figure 4, PCC increased in blood (SS3) and muscle (SS4).

Asensio et al. (2007) say NSAID-induced inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase elicits damage through oxidation of protein thiols. This may not be the only process of protein carbonyl production: formation of free radicals during the biotransformation of these pharmaceuticals may be one of the sources of oxidation of this biomolecule.

Ingested NSAIDs (DCF, IBP and NPX) are known to enter in contact with the vasculature, where they acetylate the enzyme COX-2 present in endothelium or circulating leukocytes, to produce 15-epi-lipoxin A4 which promotes NO synthesis mediated by endothelial (eNOS) and inducible (iNOS) nitric oxide synthase (Paul-Clark et al., 2004). When the superoxide anion and NO bind they may form a RNS (peroxynitrite) through a diffusion-limited reaction (Huie and Padmaja, 1993). The oxidant peroxynitrite is known to induce protein oxidation and nitration in the

absence of GSH, eliciting mitochondrial dysfunction and eventually leading to irreversible damage and severe loss of cellular ATP (Jaeschke et al., 2003).

Levels of protein carbonylation were significantly higher in our study, indicating that fish sustained oxidative stress as a result of exposure to metals. Metals are known to directly induce the formation of protein carbonyls via metal-catalyzed oxidation reactions (Stadtman and Oliver, 1991).

ROS and RNS can remove protons from methylene groups in amino acids, leading to the formation of carbonyls that tend to ligate protein amines and also induce damage to nucleophilic centers, sulfhydryl group oxidation, disulfide reduction, peptide fragmentation, modification of prosthetic groups, and protein nitration. These modifications lead to loss of protein function (Cabiscol et al., 2000; van der Oost et al., 2003; Gluszczak et al., 2007) and therefore also of body integrity (Parvez and Raisuddin, 2005).

Blood is susceptible of oxidative damage since, in addition to fulfilling diverse functions such as the transport of proteins (mostly albumin and hemoglobin) and other biomolecules to all body tissues, it also transports xenobiotics throughout the body (Eaton, 2006; Halliwell, 2006). The gills are likewise known to effect the oxidative metabolism of many toxic agents, thereby promoting production of the ROS responsible for LPX in the present study (Islas-Flores et al., 2013).

Diverse environmental contaminants can induce antioxidant defenses (Vlahogianni et al., 2007). SOD is the first mechanism of antioxidant defense and the main enzyme responsible for offsetting the effects of ROS, particularly the superoxide ion (van der Oost et al., 2003) which is converted to hydrogen peroxide by SOD, H_2O_2 being subsequently sequestered and degraded to H_2O by CAT and GPx.

Increases in SOD activity in gill (SS2) and blood (SS1) (Figure 5) were induced by release of the superoxide anion radical (Livingstone, 2003).

Since NSAIDs (including DCF, IBP and NPX) affect the mitochondrion and consequently oxidative phosphorylation, increased ROS production, particularly of O_2^- ; may occur and as a result, an increase in SOD activity and hydrogen peroxide levels

(Asensio et al., 2007; Salgueiro-Pagadigorria et al., 2004), as seen in our study with exposure of *Cyprinus carpio* to these compounds.

Valko et al. (2005) mention that increased SOD activity may be a means to compensate the effect of some xenobiotics such as heavy metals, i.e. an adaptive response of the organism to induced stress. On the other hand, Guecheva et al. (2001) observed similar effects in planaria exposed to Cu, attributing this increase to *de novo* protein synthesis, as a potential adaptive mechanism.

As stated above, SOD activity increased in the present study in *Cyprinus carpio* exposed to metals and NSAIDs, the main contaminants in Madín Reservoir, leading to increased hydrogen peroxide formation that may act as a signal for CAT bioactivation in order to convert this highly toxic free radical to less toxic compounds. Similar responses have been found in different aquatic organisms exposed to other NSAIDs (Oviedo-Gómez et al., 2010, Gómez-Oliván et al., 2012, Islas-Flores et al., 2013).

Various authors state that enzymes such as CAT are activated in blood cells by *in vitro* exposure to Al (Kiss and Hollósi, 2001). Also, exposure of the freshwater fish matrinxã (*Brycon amazonicus*) to sublethal concentrations of HgCl₂ for 96 h in a static system resulted in increases in the activity of SOD, CAT, GPx, GST and glutathione reductase (Monteiro et al., 2010).

Figure 6 shows that CAT activity increased in gill (SS1, SS2, SS4 and SS5), blood (SS1, SS2 and SS5) and muscle (SS3). These increases can be attributed to the antioxidant capacity of organisms to offset H₂O₂-induced oxidative damage.

Bagnyukova et al. (2006) state that LPX products appear to be involved in the upregulation of several antioxidant enzymes such as SOD, CAT and GPx. Thus, LPX increases in the present study may also explain the observed increased activity of antioxidant enzymes.

In conclusion, all five sampling stations in Madín Reservoir are contaminated with metals and NSAIDs that induce oxidative stress on gill, blood and muscle of *Cyprinus carpio*. However, the changes found in the biomarkers used in the present

study exhibit differences among sampling stations and among tissues. This is probably due to differences in xenobiotic concentrations among the various sampling stations.

Acknowledgments

This study was made possible by support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-Mexico, Project 151665).

References

Abdollahi, M., Mostafalou, S., Pournourmohammadi, S., Shadnia, S., 2004. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 137, 29-34.

Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta* 1523, 37-48.

Amador, F.C., Santos, M.S., Oliveira, C.R., 2001. Lipid peroxidation and aluminium effects on the cholinergic system in nerve terminals. *Neurotox. Res.* 3, 223-233.

Anand, R.J.K., Arabi, M., Rana, K.S., Kanwar, U., 2000. Role of vitamin C and E with GSH in checking the peroxidative damage to human ejaculated spermatozoa. *Int. J. Urol.* 7, S1-S98.

Ankley, G.T., Burkhard, L.P., 1992. Identification of surfactants as toxicants in a primary effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1235-1248.

Asensio, C., Levoine, N., Guillaume, C., Guerquin, M.J., Rouguieg, K., Chrétien, F., Chapleur, Y., Netter, P., Minn, A., Lopicque, F., 2007. Irreversible inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by the coenzyme A conjugate of ketoprofen: a key to oxidative stress induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs? *Biochem. Pharmacol.* 73, 405-416.

Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325-331.

Baillie, T.A., 2006. Future of toxicology-metabolic activation and drug design: challenges and opportunities in chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 889-893.

Büege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-310.

Burcham, P.C., 2007. Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: A new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. *J. Pharmacol. Toxicol. Met.* 56, 18–22.

Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 3, 3-8.

DalCorso, G., Farinati, S., Furini, A., 2010. Regulatory networks of cadmium stress in plants. *Plant Signal. Behav.* 5, 663-667.

Deng, A., Himmelsbach, M., Zhu, Q.Z., Frey, S., Sengl, M., Buchberger, W., Niessner, R., Knopp, D., 2003. Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3422-3429.

Doi, H., Iwasaki, H., Masubuchi, Y., Nishigaki, R., Horie, T., 2002. Chemiluminescence associated with the oxidative metabolism of salicylic acid in rat liver microsomes. *Chem.-Biol. Interact.* 140, 109-119.

Dua, R., Gill, K.D., 2001. Aluminium phosphide exposure: implications on rat brain lipid peroxidation and antioxidant defence system. *Pharmacol. Toxicol.* 89, 315-319.

Eaton, D.A., Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. (Eds.), 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed. American Public Health Association, Washington DC, pp. 8-90.

Eaton, P., 2006. Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1889-1899.

Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 529-539.

Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122-159.

García-Medina, S., Razo-Estrada, A.C., Gómez-Oliván, L.M., Amaya-Chávez, A., Madrigal-Bujaidar, E., Galar-Martínez, M., 2010. Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiol. Biochem.* 36, 875-882.

Gluszczak, L., Miron D.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R., Morsch, V.M., Loro, V.L. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and

enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 519-524.

Gómez-Oliván, L.M., Neri-Cruz, N., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Dublán-García, O., Corral-Avitia, A.Y., 2012. Assessing the oxidative stress induced by paracetamol spiked in artificial sediment on *Hyalella azteca*. *Water Air Soil Pollut.* 223, 5097-5104.

Graham, G.G., Williams, K.M., 2004. Metabolism and pharmacokinetics of ibuprofen. In: Rainsford, K.D. (Ed.), *Aspirin and Related Drugs*. Taylor & Francis, London, pp. 157-180.

Grillo, M.P., Hua, F., Knutson, C.G., Ware, J.A., Li, C., 2003. Mechanistic studies on the bioactivation of diclofenac: identification of diclofenac-S-acyl-glutathione *in vitro* in incubations with rat and human hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 1410-1417.

Grune, T., 2000. Oxidative stress, aging and the proteasomal system. *Biogerontology* 1, 31-40.

Guecheva, T., Henriques, J.A., Erdtmann, B., 2001. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian *in vivo*, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutat. Res.* 497, 19-27.

Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *J. Neurochem.* 97, 1634-1658.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press, Oxford.

Hoeger, B., Köllner, B., Dietrich, D.R., Hitzfeld, B., 2005. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquat. Toxicol.* 5, 53-64.

Hofer, R., Jeney, Z., Bucher, F., 1995. Chronic effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and ammonia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry at water criteria limits. *Water Res.* 29, 2725-2729.

Huie, R.E., Padmaja, S., 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* 18, 195-199.

Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., Colín-Cruz, A., Neri-Cruz, N., García-Medina, S., 2013. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotox. Environ. Safe.* 92, 32-38. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.025

Jaeschke, H., Knight, T.R., Bajt, M.L., 2003. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 144, 279-288.

Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384-389.

Jifa, W., Zhiming, Y., Xiuxian, S., You, W., Xihua, C., 2005. Comparative researches on effects of sodium dodecylbenzene sulfonate and sodium dodecyl sulfate upon *Lateolabrax japonicus* biomarker system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 465-470.

Kiss, T., Hollósi, M., 2001. The interaction of aluminium with peptides and proteins. In: Exley, C. (Ed.), *Aluminium and Alzheimer's Disease: The Science that Describes the Link*. Elsevier, Amsterdam, pp. 361-392.

Lam, M.W., Young, C.J., Brain, R.A., Johnson, D.J., Hanson, M.A., Wilson, C.J., Richards, S.M., Solomon, K.R., Mabury, S.A., 2004. Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1431-1440.

Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233, 346-357.

Li, M.H., 2008. Effects of nonionic and ionic surfactants on survival, oxidative stress, and cholinesterase activity of planarian. *Chemosphere.* 70, 1796-1803.

Livingstone, D.R., 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev. Med. Vet.* 154, 427-430.

Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13-30.

Mehinto, A.C., Hill, E.M., Tyler, C.R., 2010. Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Technol.* 44, 2176-2182.

Miranda, M.A., Morera, I., Vargas, F., Gómez-Lechón, M.J., Castell, J.V., 1991. *In vitro* assessment of the phototoxicity of anti-inflammatory 2-arylpropionic acids. *Toxicol. Vitro* 5, 451-455.

Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.

Monteiro, D.A., de Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 143, 141-149.

Monteiro, D.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2010. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology*, 19, 105-123.

Oruç, E.O., Uner, N., 2002. Marker enzyme assessment in the liver of *Cyprinus carpio* (L.) exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16, 182-188.

Oviedo-Gómez, D.G., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Gómez-Oliván, L.M., 2010. Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29, 39-43.

Pantke, U., Volk, T., Schmutzler, M., Kox, W.J., Sitte, N., Grune, T., 1999. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1080-1086.

Parvez, S., Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 112-117.

Paul-Clark, M.J., Van Cao, T., Moradi-Bidhendi, N., Cooper, D., Gilroy, D.W., 2004. 15-epi-lipoxin A4-mediated induction of nitric oxide explains how aspirin inhibits acute inflammation. *J. Exp. Med.* 200, 69-78.

Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., Freeman, B.A., 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266, 22028-22034.

Requena, J.R., Levine, R.L., Stadtman, E.R., 2003. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids* 25, 221-226.

Salgueiro-Pagadigorria, C.L., Kelmer-Bracht, A.M., Bracht, A., Ishii-Iwamoto, E.L., 2004. Naproxen affects Ca(2+) fluxes in mitochondria, microsomes and plasma membrane vesicles. *Chem.-Biol. Interact.* 147, 49-63.

Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R.D., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 68, 141-150.

Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., Svobodova, Z., 2009. A review: oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinol. Lett.* 30, 2-12.

Stadtman, E.R., Oliver, C.N., 1991. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* 266, 2005-2008.

Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-336.

Stülten, D., Zühlke, S., Lamshöft, M., Spitteller, M., 2008. Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Sci. Total Environ.* 405, 310-316.

Uner, N., Oruç, E.Ö., Sevgiler, Y., Sahin, N., Durmaz, H., Usta, D., 2006. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 241-245.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotox. Environ. Safe.* 64, 178-189.

Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161-1208.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.

Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J., Valavanidis, A., 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1361-1371.

Vree, T.B., van den Biggelaar-Marteau, M., Verwey-van Wissen, C.P., 1992. Determination of naproxen and its metabolite O-desmethylnaproxen with their acyl glucuronides in human plasma and urine by means of direct gradient high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 578, 239-249.

Wilhelm, E.A., Jesse, C.R., Leite, M.R., Nogueira, C.W., 2009. Studies on preventive effects of diphenyl diselenide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Pathophysiology* 16, 31-37.

Wilhelm Filho, D., 1996. Fish antioxidant defenses — a comparative approach. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1735-1742.

Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Zaniboni-Filho, E., Pedrosa, R.C., 2005. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture* 244, 349-357.

Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.

Winzer, K., Becker, W., Van Noorden, C.J., Köhler, A., 2000. Short-time induction of oxidative stress in hepatocytes of the European flounder (*Platichthys flesus*). *Mar. Environ. Res.* 50, 495-501.

Yamanaka, H., Sogabe, A., Handoh, I.C., Kawabata, Z., 2011. The effectiveness of clove oil as an anaesthetic on adult common carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Anim. Vet. Adv.* 10, 210-213.

Yokel, R.A., 2000. The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology* 21, 813-828.

Yousef, M.I., 2004. Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology* 199, 47-57.

Zwiener, C., Seeger, S., Glauner, T., Frimmel, F.H., 2002. Metabolites from the biodegradation of pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 569-575.

Table 1 Metal and NSAID concentrations in water from Madín Reservoir (State of Mexico), Mexico. Values are the mean of three replicates. * and ** The official Mexican norms on permissible levels of heavy metals for aquatic life protection and human consumption (NOM-001-SEMARNAT-1996 and NOM-127-SSA1-1994, respectively). SS = sampling station. ND = not detected. NI= not included.

	NOM-001- SEMARNAT -1996*	NOM-127- SSA1- 1994**	SS1	SS2	SS3	SS4	SS5
Ni (mg L ⁻¹)	2.0	NI	2.30 ± 0.18	3.10 ± 0.03	2.70 ± 0.02	3.90 ± 0.04	1.80 ± 0.02
Cd (mg L ⁻¹)	0.2	0.005	0.80 ± 0.01	1.30 ± 0.92	1.10 ± 0.01	0.70 ± 0.01	0.90 ± 0.01
Fe (mg L ⁻¹)	0.3	0.3	0.70 ± 0.01	0.40 ± 0.01	1.50 ± 0.02	1.70 ± 0.02	2.10 ± 0.01
Hg (mg L ⁻¹)	0.01	0.001	1.10 ± 0.2	2.30 ± 0.02	1.70 ± 0.03	2.60 ± 0.03	1.90 ± 0.01
Al (mg L ⁻¹)	0.5	0.2	0.90 ± 0.08	1.50 ± 0.01	2.30 ± 0.02	3.10 ± 0.02	3.70 ± 0.04
DFC (ng L ⁻¹)	NI	NI	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.27 ± 0.03	0.31 ± 0.01
IBP (ng L ⁻¹)	NI	NI	4.51 ± 0.06	3.61 ± 0.04	3.87 ± 0.03	4.24 ± 0.02	3.73 ± 0.04
NPX (ng L ⁻¹)	NI	NI	0.21 ± 0.01	ND	ND	ND	0.18 ± 0.02



Fig. 1 Madín Reservoir. The location of sampling stations is shown: 1 = discharge from the town of Viejo Madín, 2 = discharge from the town of Nuevo Madín, 3 = lateral branch, 4 = entry point of Río Tlalnepantla, and 5 = dam

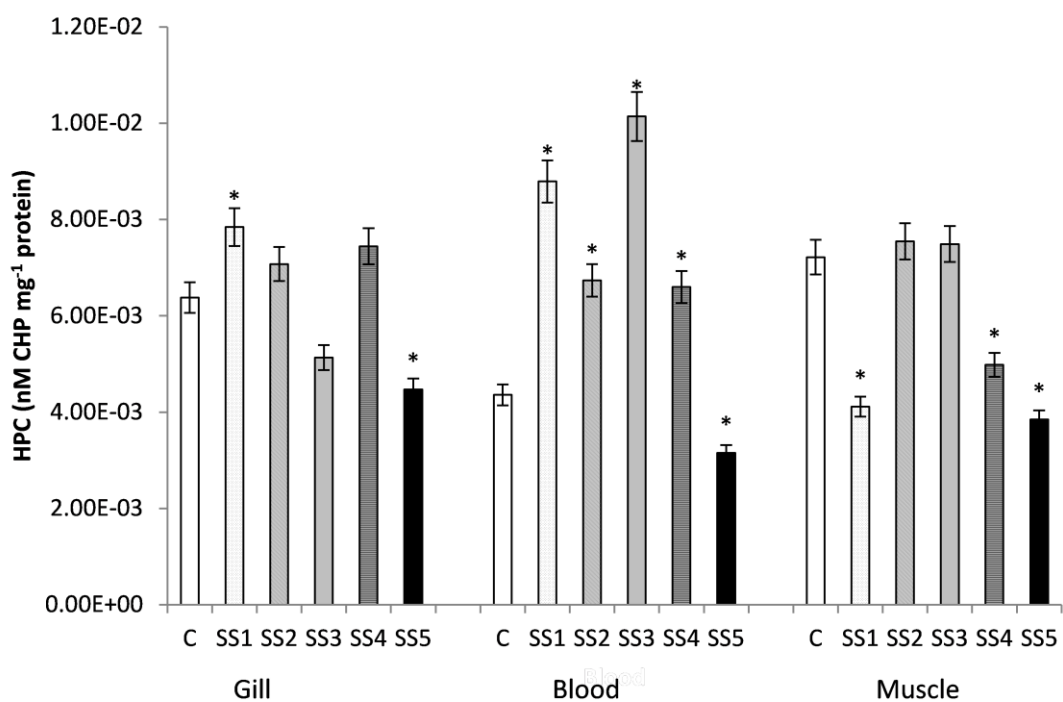


Fig. 2 Hydroperoxide content (HPC) in gill, blood and muscle of *Cyprinus carpio* exposed to Madín Reservoir water. Values are the mean of three replicates \pm SE. CHP = cumene hydroperoxide, SS = sampling station. *Significantly different from control values, ANOVA and Bonferroni's ($P < 0.05$)

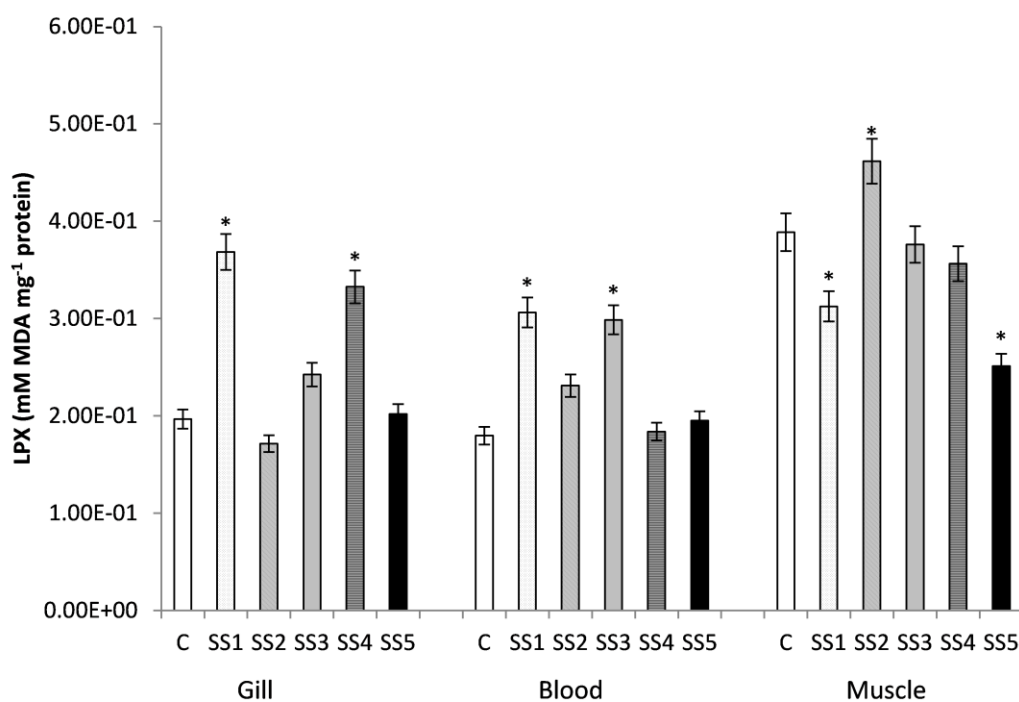


Fig. 3 Lipid peroxidation (LPX) in gill, blood and muscle of *Cyprinus carpio* exposed to Madín Reservoir water. Values are the mean of three replicates \pm SE. MDA = malondialdehyde, SS = sampling station. *Significantly different from control values, ANOVA and Bonferroni's ($P < 0.05$)

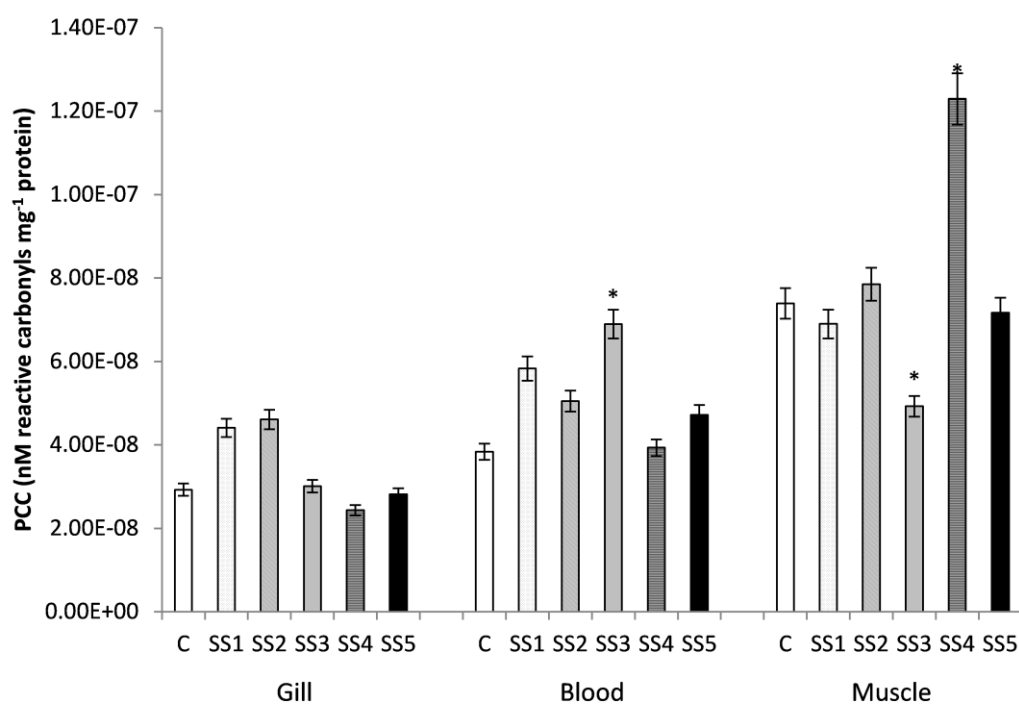


Fig. 4 Protein carbonyl content (PCC) in gill, blood and muscle of *Cyprinus carpio* exposed to Madín Reservoir water. Values are the mean of three replicates \pm SE. SS = sampling station. *Significantly different from control values, ANOVA and Bonferroni's ($P < 0.05$)

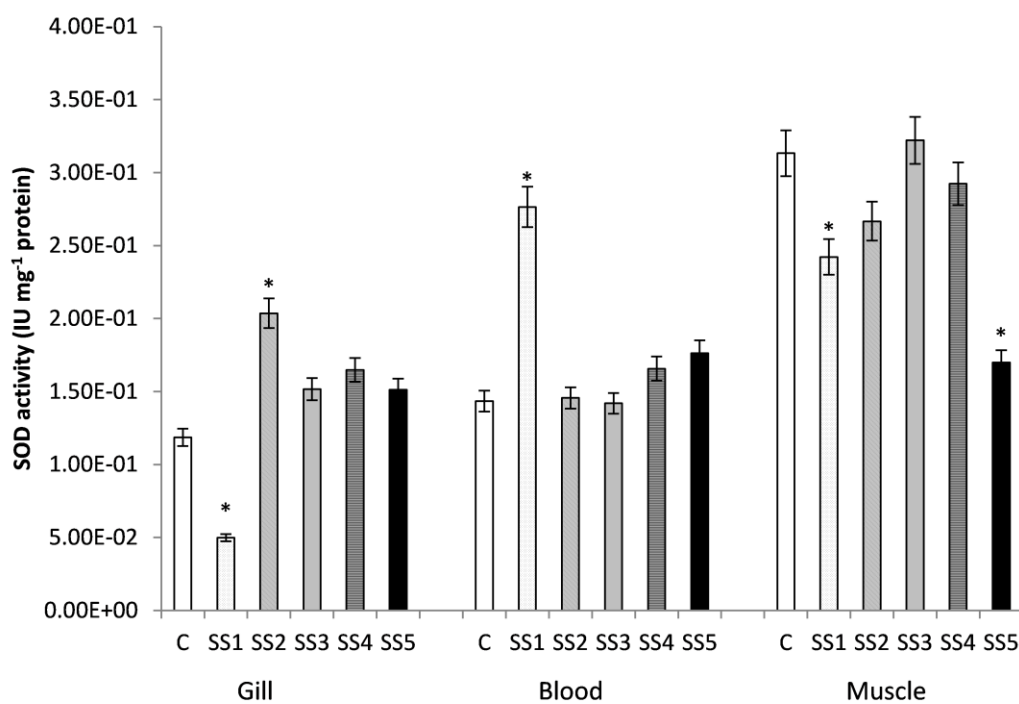


Fig. 5 Superoxide dismutase (SOD) activity in gill, blood and muscle of *Cyprinus carpio* exposed to Madín Reservoir water. Values are the mean of three replicates \pm SE. SS = sampling station. *Significantly different from control values, ANOVA and Bonferroni's ($P < 0.05$)

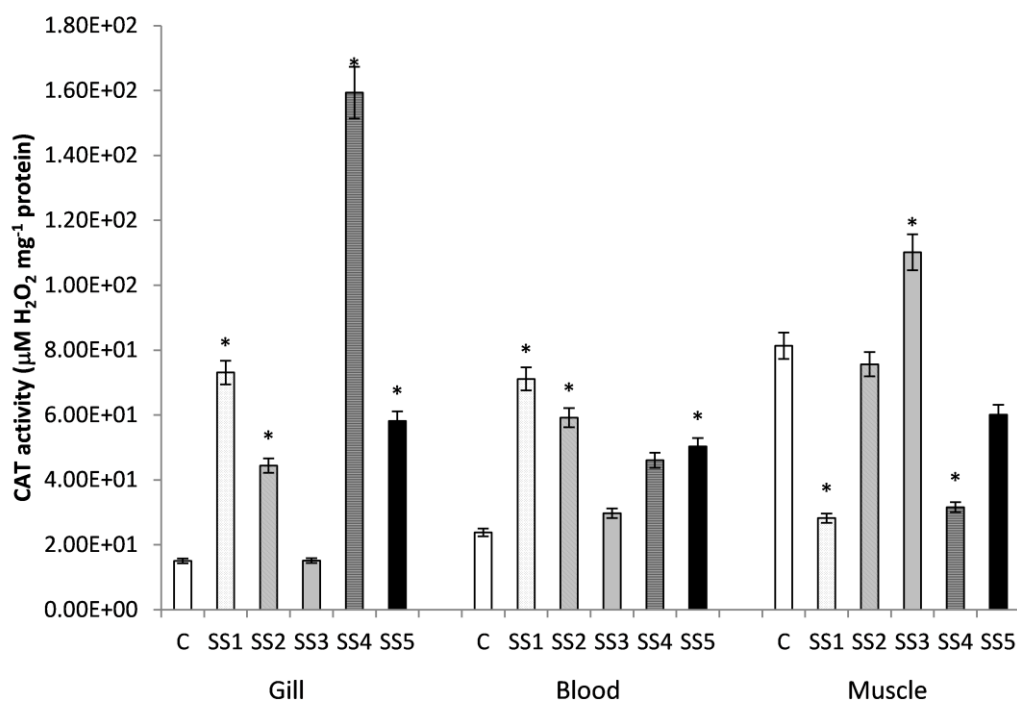


Fig. 6 Catalase (CAT) activity in gill, blood and muscle of *Cyprinus carpio* exposed to Madín Reservoir water. Values are the mean of three replicates \pm SE. SS = sampling station. *Significantly different from control values, ANOVA and Bonferroni's ($P < 0.05$)

7. CONCLUSIONES

1. La concentración de los antiinflamatorios no esteroideos (diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno) presentes en el agua proveniente de los diferentes sitios de muestreo de la presa Madín fue de 0.20 a 0.31 ng/L, 3.61 a 4.51 ng/L y 0.18 a 0.21 ng/L, respectivamente.
2. El agua proveniente de los diferentes sitios de muestreo de la presa Madín es capaz de producir estrés oxidativo, modificando el grado de lipoperoxidación, el contenido de proteínas carboniladas y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa en branquias, sangre y músculo de *Cyprinus carpio*.

8. PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos y a que se ha demostrado que el estrés oxidativo regula la expresión génica, es importante:

1. Realizar la caracterización del daño al ADN (genotoxicidad) inducida por los antiinflamatorios no esteroideos presentes en agua de la presa Madín sobre *Cyprinus carpio*.
2. Evaluar el efecto citotóxico inducido por los antiinflamatorios no esteroideos presentes en agua de la presa Madín sobre *Cyprinus carpio*.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad I, Hamid T, Fatima M, Chand HS, Jain SK, Athar M, et al. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. biophys. acta.* 2000; 1523(1): 37-48.
- Andreozzi R, Raffaele M, Nicklas P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere.* 2003; 50(10): 1319-1330.
- Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. biochem. physiol., C. Toxicol. Pharmacol.* 2005; 140(2): 175-186.
- Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. cell biol.* 1990; 68(7-8): 989-998.
- Beausse J. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends analyt. chem.* 2004; 23(10-11): 753-761.
- Borel JF, Baumann G, Chapman I, Donatsch P, Fahr A, Mueller EA, et al. *In vivo* pharmacological effects of ciclosporin and some analogues. *Adv. pharmacol.* 1996; 35: 115-246.
- Boxall ABA. The environmental side effects of medication: How are human and veterinary medicines in soils and water bodies affecting human and environmental health?. *EMBO rep.* 2004; 5(12): 1110-1116.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. biochem.* 1976; 72: 248-254.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods enzymol.* 1978; 52: 302-310.

- Burcham PC. Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: a new tool for assessing drug -and chemically- induced oxidative cell injury. *J. pharmacol. toxicol. methods.* 2007; 56(1): 12-22.
- Buser H-R, Poiger T, Müller MD. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ. sci. technol.* 1998; 32(22): 3449-3456.
- Carrara C, Ptacek CJ, Robertson WD, Blowes DW, Moncur MC, Sverko E, et al. Fate of pharmaceutical and trace organic compounds in three septic system plumes, Ontario, Canada. *Environ. sci. technol.* 2008; 42(8): 2805–2811.
- Cleuvers M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. lett.* 2003; 142(3): 185-194.
- Cleuvers M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol. environ. saf.* 2004; 59(3): 309-315.
- Daughton CG, Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. health perspect.* 1999; 107(Suppl 6): 907-938.
- DellaGreca M, Fiorentino A, Iesce MR, Isidori M, Nardelli A, Previtiera L et al. Identification of phototransformation products of prednisone by sunlight: toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms. *Environ. toxicol. chem.* 2003; 22(3): 534-539.
- DellaGreca M, Iesce MR, Isidori M, Nardelli A, Previtiera L, Rubino M. Phototransformation products of tamoxifen by sunlight in water. Toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms. *Chemosphere.* 2007; 67(10): 1933-1939.
- Domitrovic HA. El empleo de peces autóctonos para la realización de ensayos de toxicidad: evaluación de la especie *Aequidens portalerensis* (Hensel, 1870). *Rev Ictiol.* 1997; 5(1-2): 37-42.

- Fent K, Weston AA, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. toxicol.* 2006; 76(2): 122-159.
- Ferrari B, Paxéus N, Lo Giudice R, Pollio A, Garric J. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. environ. saf.* 2003; 55(3): 359-370.
- Ferreira M, Moradas-Ferreira P, Reis-Henriques MA. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquat. toxicol.* 2005; 71(1): 39-48.
- Flippin JL, Huggett D, Foran CM. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. toxicol.* 2007; 81(1): 73-78.
- Fraga CG, Cavanagh E, Carrasquedo F, Lotito S, Lucesoli F, Oteiza PI. Antioxidant defenses and mechanisms of protection against oxygen radicals. In: *Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon*. Manaus; 1996. p. 323-330.
- Gómez-Oliván LM, Carmona-Zepeda FA, Galar-Martínez M, Téllez-López AM, Amaya-Chávez A. Estudio de automedicación en una farmacia comunitaria de la ciudad de Toluca. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 2009; 40(1): 5-11.
- Gómez-Oliván LM, Neri-Cruz N, Galar-Martínez M, Vieyra-Reyes P, García-Medina S, Razo-Estrada C, Dublán-García O, Corral-Avitia AY. Assessing the oxidative stress induced by paracetamol spiked in artificial sediment on *Hyalella azteca*. *Water air soil pollut.* 2012; 223(8): 5097-5104.
- Hai DQ, Varga SI, Matkovics B. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. biochem. physiol., Part C Pharmacol. toxicol. endocrinol.* 1997; 117(1): 83-88.

- Halling-Sorensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhof HC, Jorgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment--a review. *Chemosphere*. 1998; 36(2): 357-393.
- Heberer T, Reddersen K, Mechlinski A. From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceuticals residues in the aquatic environment in urban areas. *Water sci. technol*. 2002; 46(3): 81-88.
- Heberer T, Schmidt-Bäumler K, Stan H-J. Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Part I: drug residues and other polar contaminants in Berlin surface and groundwater. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. 1998; 26(5): 272–278.
- Heberer T, Stan H-J. Determination of clofibric acid and N-(phenylsulfonyl)-sarcosine in sewage, river, and drinking water. *Int. j. environ. anal. chem*. 1997; 67(1-4): 113-124.
- Hignite C, Azarnoff DL. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life sci*. 1977; 20(2): 337-341.
- Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Parrella A, Previtiera L, Rubino M. Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Sci. total environ*. 2005; 348(1-3): 93-101.
- Islas-Flores H, Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, Colín-Cruz A, Neri-Cruz N, García-Medina S. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. environ. saf*. 2013; 92:32-38.
- Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. biochem*. 1992; 202(2): 384-389.
- Jones OA, Voulvoulis N, Lester JN. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water res*. 2002; 36(20): 5013-5022.

- Kelly KA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ. health perspect.* 1998; 106(7): 375-384.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods enzymol.* 1990; 186: 464-478.
- Martí EA. Clima y calidad ambiental. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 2003. p. 32.
- Medical Products Agency. Environmental effects of pharmaceuticals, cosmetics and hygiene products. Excerpts from the Report of Swedish Medical Products Agency regarding the environmental effects of pharmaceuticals. Sweden: Medical Products Agency; 2004.
- Metcalfe CD, Koenig BG, Bennie DT, Servos M, Ternes TA, Hirsch R. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ. toxicol. chem.* 2003; 22(12): 2872-2880.
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. biol. chem.* 1972; 247(10): 3170-3175.
- Montague P. Drug in the water. Rachel's. *Environment & Health Weekly # 614.* Environmental Research Foundation, USA. 1998.
- Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC. *Farmacología.* 2ª ed. México: McGraw-Hill; 2004. p. 477.
- Newman MC, Unger MA. *Fundamentals of ecotoxicology.* 2nd edition. Boca Raton: CRC Press; 2003.
- Oviedo-Gómez DGC, Galar-Martínez M, García-Medina S, Razo-Estrada C, Gómez-Oliván LM. Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environ. toxicol. pharmacol.* 2010; 29(1): 39-43.
- Park J. *Pharmaceuticals in the environment and management approaches in Korea.* RE-12. Korea: Korea Environment Institute; 2005.

- Park S, Choi K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*. 2008; 17(6): 526-538.
- Parvez S, Raisuddin S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. toxicol. pharmacol.* 2005; 20(1): 112-117.
- Pedrajas JR, Peinado J, López-Barea J. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu, Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem. biol. interact.* 1995; 98(3): 267-282.
- Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. biol. chem.* 1991; 266(32): 22028-22034.
- Raloff J. Drugged waters: does it matter that pharmaceuticals are turning up in water supplies?. *Sci. news.* 1998; 153(12): 187-189.
- Saravanan M, Karthika S, Malarvizhi A, Ramesh M. Ecotoxicological impacts of clofibric acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: haematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses. *J. hazard. mater.* 2011; 195:188-194.
- Scheytt T, Mersmann P, Lindstädt R, Heberer T. Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments. *Chemosphere.* 2005; 60(2): 245-253.
- Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele RD. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. toxicol.* 2004; 68(2): 141-150.
- Siemens J, Huschek G, Siebe C, Kaupenjohann M. Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley. *Water res.* 2008; 42(8-9): 2124-2134.

- Storey KB. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. j. med. biol. res.* 1996; 29(12): 1715-1733.
- Stuer-Lauridsen F, Birkved M, Hansen LP, Lützhof HC, Halling-Sorensen B. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere.* 2000; 40(7): 783-793.
- Stumpf M, Ternes TA, Haberer K, Seel P, Baumann W. Determination of pharmaceuticals in sewage plants and river water. *Vom Wasser.* 1996; 86: 291-303.
- Ternes TA. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water res.* 1998; 32(11): 3245-3260.
- Triebkorn R, Casper H, Heyd A, Eikemper R, Köhler HR, Schwaiger J. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. toxicol.* 2004; 68(2): 151-166.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. environ. saf.* 2006; 64(2): 178-189.
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. toxicol. pharmacol.* 2003; 13(2): 57-149.
- Villaroel UMJ. Alteraciones fisiológicas en el crustáceo *Daphnia magna* por exposición a plaguicidas. [Tesis Doctoral] España: Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia; 2004.
- Wiegel S, Aulinger A, Brockmeyer R, Harms H, Löffler J, Reincke H, et al. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere.* 2004; 57(2): 107-126.
- Wong CK, Pak AP. Acute and subchronic toxicity of the heavy metals copper, chromium, nickel, and zinc, individually and in mixture, to the

freshwater copepod *Mesocyclops pehpeiensis*. Bull. environ. contam. toxicol. 2004; 73(1): 190-196.

- Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R, Reitano G, Bagnati R, Chiabrando C, et al. Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control. Environ. sci. pollut. res. int. 2006; 13(1): 15-21.