



## RESUMEN

Existen diversos contaminantes en el agua como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), el etanol y los detergentes, entre otros; los AINEs son altamente consumidos en todo el mundo debido a su eficacia como analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios por lo que hay diversos estudios sobre los efectos que causan en organismos como *Cyprinus carpio*. El propósito de este estudio fue evaluar la toxicidad en branquias de *Cyprinus carpio* producida por un efluente industrial el cual contiene los compuestos anteriormente mencionados a través de biomarcadores de estrés oxidativo. Para este estudio se utilizó una concentración del 0.1173 % del efluente industrial y se evaluó el grado de lipoperoxidación, el contenido de proteínas carboniladas, el nivel de hidroperóxidos y la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa a las 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los resultados de este estudio demostraron que la exposición produjo incremento en el porcentaje del grado de lipoperoxidación, el contenido de proteínas carboniladas, el nivel de hidroperóxidos, la actividad en las enzimas de la superóxido dismutasa y la catalasa, mientras que se vio una disminución del porcentaje de la actividad de la glutatión peroxidasa con respecto a los controles. En conclusión, el efluente industrial contenía antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) que produjeron estrés oxidativo en branquias de *Cyprinus carpio*.



## 1. INTRODUCCIÓN

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) presentan diversas propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antipiréticas mediante el bloqueo de la enzima ciclooxigenasa, la cual es la encargada de transformar al ácido araquidónico en prostaglandinas (PX) y tromboxanos (TX) (Katzung et al., 2007).

Se calcula que unos 30 millones de personas los usan éstos diariamente, además de que se pueden adquirir sin una receta médica. En este grupo de fármacos los más utilizados son el naproxeno, el paracetamol, el ibuprofeno, el diclofenaco y ácido acetilsalicílico (Lanas, 2001).

Estos compuestos se encuentran en efluentes industriales y hospitalarios, que llegan a descargas municipales, generando daños celulares y genéticos a los organismos acuáticos. Se ha visto que el uso excesivo de fármacos como naproxeno, ácido acetilsalicílico, diclofenaco e ibuprofeno, generan efectos en organismos acuáticos (Lanas, 2001).

Para evaluar los efectos de la toxicidad de este tipo de fármacos en los organismos, se han desarrollado diversos bioensayos de toxicidad en laboratorio. Entre los efectos adversos que se han presentado en estas pruebas destacan los cambios en crecimiento, desarrollo del organismo, reproducción, inhibición de algunas enzimas antioxidantes (Lanas, 2001).

Otros compuestos que son comúnmente encontrados en los cuerpos de agua son compuestos como el etanol y los detergentes, los cuales modifican la respuesta antioxidante (Lanas, 2001).

El etanol se ha demostrado que su presencia en efluentes puede causar a los organismos acuáticos problemas de mortalidad, crecimiento y reproducción



(Martínez et al., 2005). La oxidación del etanol forma especies altamente reactivas mediante la liberación de prostaglandinas que aumentan la actividad metabólica de los hepatocitos y consumen más oxígeno (King, 2013).

El dodecil bencen sulfato de sodio (DBSS) el cual se utiliza como detergente y agente humectante (Wade, 1994), es capaz de formar micelas las cuales privan de oxígeno a los organismos acuáticos y de esta manera provoca la muerte por asfixia, puede causar daños a nivel genético dando la formación de las estructuras nerviosas en la espina bífida o ciclopía (Clive et al., 1998).

Este tipo de contaminantes (fármacos, etanol, DBSS) se pueden encontrar en efluentes industriales, que se componen por la descarga residual derivada de los procesos industriales, así como los originados por distintos usos del agua que se utiliza en la industria (Allegre et al., 2005).

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) provenientes de las transformaciones químicas de los AINES, etanol y DBSS, son muy inestables, se generan por procesos metabólicos, contaminación o por la exposición a radiación (Lanas, 2001). Estas especies son neutralizadas por distintas enzimas antioxidantes entre ellas la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Luna, 2010). Cuando la defensa antioxidante se ve superada por las EROs y las ERNs ocurre un fenómeno conocido como estrés oxidativo (Soledad, 2007).

Un gran problema de la producción de los fármacos es su desecho, por lo que a pesar de ser tratados los efluentes en plantas tratadoras, estas no los eliminan al 100 % (García, 2002). Para observar el efecto tóxico se han llevado a cabo estudios en diversos bioindicadores acuáticos como la especie *Cyprinus carpio*, debido a su fácil obtención, mantenimiento y por su alta sensibilidad (Lowe et al., 2000).



## Evaluación del estrés oxidativo inducido por el efluente proveniente de una industria farmacéutica en branquias de *Cyprinus carpio*

---



Por lo que el propósito de este estudio fue evaluar la toxicidad producida por un efluente industrial en branquias de *Cyprinus carpio*



## **2. MARCO CONCEPTUAL**

### **2.1 GENERALIDADES**

#### **2.1.1 Contaminación**

La contaminación es la presencia o incorporación al ambiente de sustancias o elementos tóxicos que son perjudiciales para el hombre o los ecosistemas. Existen diferentes tipos de contaminación, entre los más importantes se encuentran los que afectan el agua, al aire y el suelo (Bermúdez, 2010).

#### **2.1.2 Contaminación del agua**

Se entiende por contaminación del agua a la acción o al efecto de introducir materiales o inducir condiciones sobre el agua que, de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación a sus usos posteriores o sus servicios ambientales (Bermúdez, 2010).

Existen dos tipos de fuentes de contaminación, la de tipo natural por componentes que hay en el aire y suelo como las sales minerales de calcio, magnesio y hierro, a pesar de que pueden ser nocivos para la salud, son sustancias que se pueden eliminar fácilmente; la segunda es de tipo artificial por consecuencia de las actividades humanas y estos son muy difíciles de eliminar (García, 2002).

Los principales contaminantes del agua son ocho tipos; a) microorganismos patógenos (son los diferentes tipos de bacterias, virus, protozoos y otros organismos que transmiten enfermedades como el cólera, tifus, gastroenteritis diversas, hepatitis); b) desechos orgánicos (son el conjunto de residuos orgánicos producidos por los seres humanos y el ganado, incluyen heces y otros materiales que pueden ser descompuestos por bacterias aeróbicas, es decir en procesos con consumo de oxígeno); c) sustancias químicas inorgánicas (se incluyen a los



ácidos, sales y metales tóxicos como el mercurio y el plomo); d) nutrientes vegetales inorgánicos (nitratos y fosfatos); e) compuestos orgánicos (muchas moléculas orgánicas como petróleo, gasolina, plásticos, plaguicidas, disolventes, detergentes); f) sedimentos y materiales suspendidos (muchas partículas arrancadas del suelo y arrastradas a las aguas, junto con otros materiales que hay en suspensión en las aguas); g) sustancias radiactivas (isótopos radiactivos solubles); h) contaminación térmica (el agua caliente liberada por centrales de energía o procesos industriales eleva la temperatura de ríos o embalses con lo que disminuye su capacidad de contener oxígeno y afecta a la vida de los organismos) (García, 2002). Otros contaminantes que causan grandes problemas en los organismos acuáticos son los detergentes como el dodecil bencen sulfato de sodio (DBSS) y otros como el etanol (Clive et al., 1998).

### 2.1.3 Contaminación del agua por la industria farmacéutica

La industria farmacéutica comprende la fabricación de materias primas de uso farmacéutico y de especialidades farmacéuticas como lo son los medicamentos empleados para un uso terapéutico o profiláctico.

Dentro de las materias primas de uso farmacéutico se encuentran los principios activos terapéuticos, los productos intermedios y los excipientes o sustancias auxiliares. El poder contaminante de esta especialidad de la industria química que es consta entre el 10 y el 20 % del total de ésta se encuentra en su mayor parte en la producción del principio activo.

En estos procesos se pueden diferenciar dos tipos de operaciones: las operaciones previas comprenderán etapas de molienda, mezcla, etc., y en general no resultan contaminantes. El segundo tipo engloba a aquellas etapas de producción específica de los principios activos farmacéuticos. Se trata de la parte



más problemática respecto al medio ambiente. La producción de antibióticos conjuga los procedimientos químicos con los biológicos y microbiológicos.

El mayor impacto ambiental de la industria farmacéutica es el producido sobre el medio acuoso. La industria farmacéutica utiliza el agua para muchos fines distintos: medio de limpieza, como disolvente, para refrigerar, como producto de reacción y para uso general.

Después de estas operaciones el agua contaminada debe de tener un tratamiento por separación mecánica (precipitación, floculación, flotación o filtración) y la separación por adsorción química, adsorción biológica, destilación, extracción, neutralización, oxidación. A pesar del tratamiento los contaminantes no son removidos en su totalidad y esto se descarga en cuerpos de agua en donde causa gran daño al ecosistema (Bueno et al., 1997).

#### **2.1.4 Contaminantes emergentes**

Estos se definen como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales cuya presencia en el medio ambiente no es nueva, estos han sido poco investigados por lo que no están regulados.

Dentro de este grupo se incluyen los surfactantes, productos farmacéuticos, productos para el cuidado personal, aditivos de las gasolinas, retardantes de fuego, antisépticos, aditivos industriales, esteroides y hormonas y subproductos de la desinfección del agua (tabla 1). Se caracterizan por su baja persistencia en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente. (Barceló, 2003).



**Tabla 1.** Clase de contaminantes emergentes

Compuesto	Ejemplos
Surfactante	Dodecil sulfonato de sodio, dimetil éter del ácido tetradecil fosfónico, lauril mono etanol amida, octil fenol polietoxilado (Fernández et al., 2004).
Productos farmacéuticos	Bufexamac, niflúmico, piroxicam, ketoprofeno, indometacina, flurbiprofeno, aceclofenaco, diclofenaco (Brooks et al., 1991).
Retardantes de fuego	Trihidrato de aluminio, hidróxido de magnesio y compuestos con boro, borato de zinc, zinc y estaño (González, 2009).
Antisépticos	Yodo, polividona yodada, clorhexidina, etanol (Tormo et al., 2004).
Esteroides y hormonas	Estradiol, estriol, estrona, (Farré et al., 2008).

### 2.1.5 Antiinflamatorios no esteroideos

El consumo de antiinflamatorios no esteroideos alrededor del mundo se estima en torno a doscientos dieciséis millones de dosis al día, con una media de consumo de aproximadamente 100 comprimidos de aspirina por persona al año en los EE.UU (Clive et al., 1998).

Los AINES son un grupo de agentes principalmente conformados por antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos, por lo que reducen síntomas de inflamación, dolor y fiebre respectivamente (Clive et al., 1998). Actúan sobre la enzima ciclooxigenasa (COX), por la inhibición de la producción de prostaglandinas (PGs) a partir del ácido araquidónico (Katzung et al., 2007).

Existen dos isoformas de la ciclooxigenasa: la primera es la COX-1 la cual se encarga de las funciones fisiológicas de las PGs, como el mantenimiento de la integridad de la mucosa gastrointestinal y la segunda es la COX-2 responsable de la respuesta a estímulos inflamatorios y es responsable de la producción de PGs que participan en la inflamación (Figura 1).



Los AINEs tradicionales inhiben tanto la COX-1 como la COX-2 por lo cual se recomienda el uso de AINES selectivos para COX-2 de esta manera no se afecta la mucosa intestinal (Figura 2) (Katzung et al., 2007).

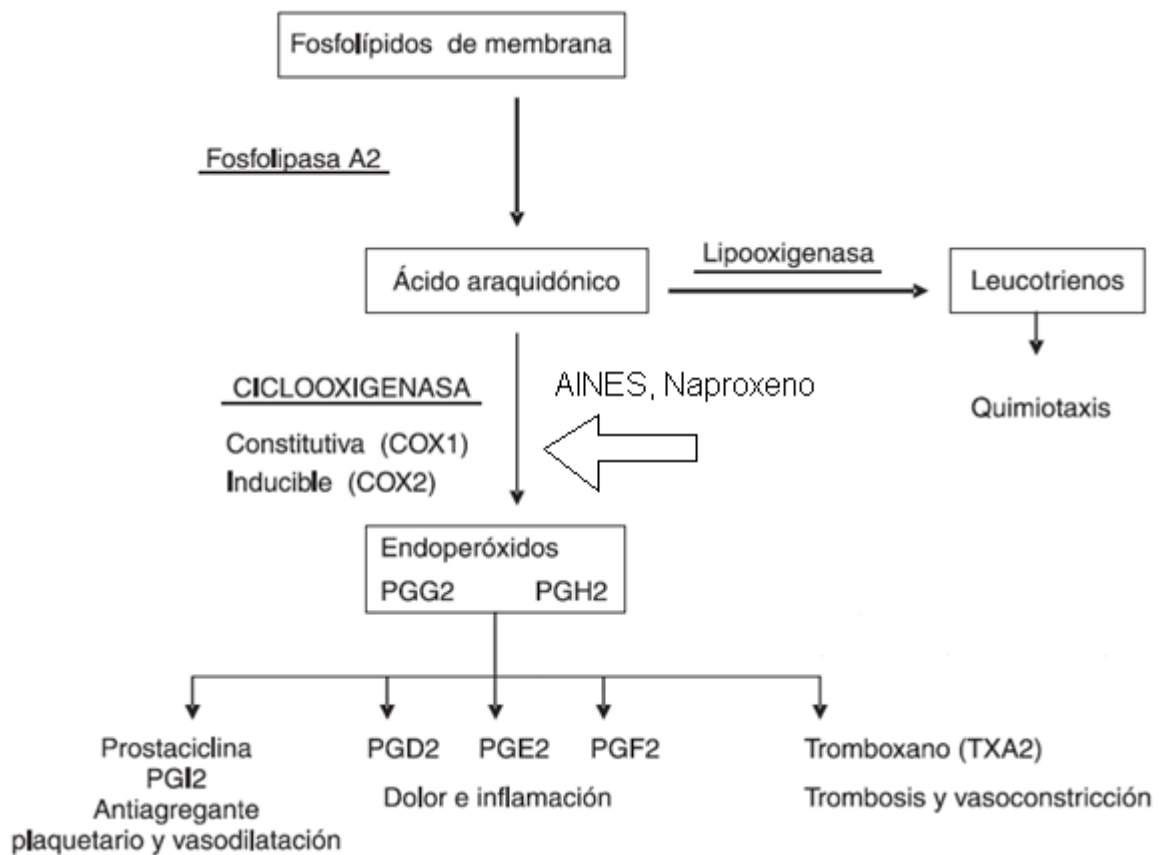
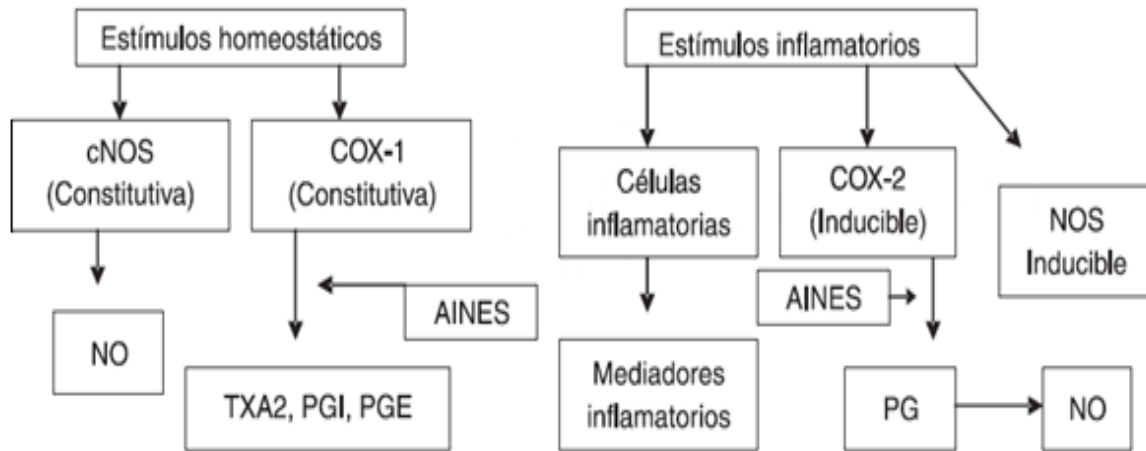


Figura 1. Síntesis y función de los eicosanoides (modificado de Rivera, 2006).



**Figura 2.** Modelo de las interacciones entre el óxido nítrico y la ciclooxygenasa (modificado de Rivera, 2006).

Los antiinflamatorios naturales que son generados por el cuerpo humano causan efectos secundarios no deseados debido a que generan derivados de los corticoides, por lo que el termino "no esteroideo" se aplica a los AINES para resaltar su estructura química no esteroidea y por lo cual se tiene una menor cantidad de efectos secundarios (Goodman and Gilman, 1996). Existe una clasificación para estos antiinflamatorios (Tabla 2).



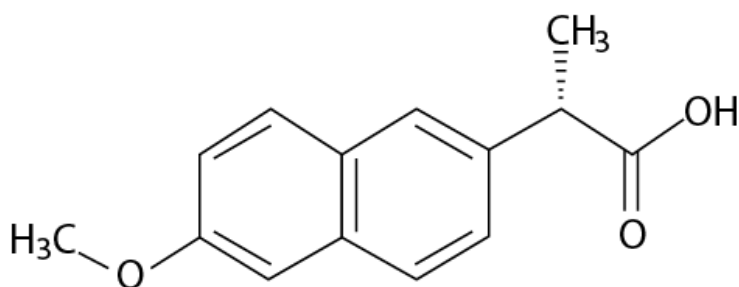
**Tabla 2.** Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos

Ácidos propiónicos	Ácidos acéticos	Ácidos antranílicos	Oxicanes	Inhibidores selectivos de COX-2
Fenoprofeno	Diclofenaco sódico	Meclofenamato	Piroxicam	Celecoxib
Fluboprofeno	Diclofenaco potásico	Ácido mefenámico	Meloxicam	Rofecoxib
Ibuprofeno	Etodolac		Tenoxicam	
Ketoprofeno	Indometacina			
Naproxeno	Sulindaco			
Oxaprozin	Ketocolac			

Fuente: Tomado de Lacy et al., 2001

### 2.1.5.1 Naproxeno

El naproxeno (Figura 3) pertenece al grupo de derivados del ácido propiónico, tiene distintas características (Tabla 3) entre ellas distingue que es un analgésico de uso general que requiere dosis superiores a otros AINES, su dosis mínima efectiva es de aproximadamente 200 mg, empleado por su fácil unión con la albumina y tiene una vida media más larga en la sangre ideal para el tratamiento del dolor leve a moderado, la fiebre, la inflamación y la rigidez provocados por enfermedades como la osteoartritis, la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante, diversas lesiones, la tendinitis y la bursitis, y en el tratamiento de la dismenorrea primaria (Mosquera et al., 2005)



**Figura 3.** naproxeno

### 2.1.5.1.1 Características

**Tabla 3.** Características del naproxeno

Identidad	Datos químicos	Datos físicos
Nombre sistemático (IUPAC): Ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil)propiónico	Fórmula química: $C_{14}H_{14}O_3$	Identificación: Sustancia blanca, inodora y cristalina
Número CAS: 22204-53-1	Peso molecular: 230.26	Punto de fusión: 153 °C
	Sinónimos: d-2-(6-metoxi-2-naftil) propiónico ácido.	Solubilidad en agua: Insoluble (pH<4), Soluble (pH>6)

### 2.1.5.1.2 Indicaciones terapéuticas

El naproxeno es un miembro del grupo ácido propiónico de fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Es muy usado en forma de tabletas para el tratamiento de la artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante y artritis juvenil. También está indicado para el tratamiento de tendinitis, bursitis, esguinces y para el manejo del dolor posquirúrgico (Núñez et al., 2001)



### 2.1.5.1.3 Farmacocinética

#### a) Absorción:

El naproxeno se absorbe completa y rápidamente del tracto gastrointestinal después de la administración oral. La concentración plasmática máxima se alcanza las 2-4 horas después de la administración oral, este tiempo se puede ver disminuido por la presencia de alimentos en el cuerpo pero no afecta nada en el porcentaje de absorción. El naproxeno en su forma de sal es más fácilmente absorbido.

#### b) Distribución

Después de ser absorbido tiene mucha facilidad de unirse a la albumina por lo que a niveles terapéuticos, más de 99 % del naproxeno se encuentra unido a la albúmina sérica en sangre. El naproxeno tiene facilidad por recorrer el cuerpo ya que es capaz de penetrar al líquido sinovial, atravesar la placenta e incluso se ha encontrado en la leche materna en una concentración de 1% de la plasmática.

#### c) Biotransformación

Se biotransforma totalmente en el hígado y genera al 6-desmetilnaproxeno y en conjugados glucorónicos del 6-desmetilnaproxeno, ambos carecen de efecto antiinflamatorio (Montoya et al., 2004).

#### d) Eliminación

Aproximadamente 95% de una dosis de naproxeno se elimina en la orina como naproxeno inalterado, 6-O-desmetilnaproxeno o sus conjugados. La velocidad de eliminación coincide cercanamente con la velocidad de desaparición del fármaco



en plasma. El naproxeno tiene una vida media biológica de aproximadamente 13 a 14 horas (Montoya et al., 2004).

#### **2.1.5.1.4 Efectos tóxicos**

El naproxeno puede provocar molestias gastrointestinales. Se toma junto con las comidas para ayudar a mitigar estos efectos. También puede inhibir la excreción del sodio y el litio. Por lo que las personas quienes deban cuidarse en la ingestión de sodio por hipertensión, o quienes tomen naproxeno junto a sales de litio, deberán tener en cuenta estas interacciones (Chaverri, 2004).

Los AINE de la familia de los salicilatos pueden interferir reduciendo la efectividad de ambos. Si se combina con anticoagulantes se puede incrementar el riesgo de hemorragias. Con sulfonilureas aumenta el efecto hipoglucemiante (Chaverri, 2004).

Por el efecto inhibitor en la producción renal de prostaglandinas, puede provocar insuficiencia renal. Puede crear una importante retención de líquidos, que generan presión arterial alta o desestabilizarla, causa nefritis intersticial (infiltración por células inflamatorias del riñón) de diversa gravedad (Chaverri, 2004).

#### **2.1.5.2 Paracetamol**

El paracetamol (Figura 4) también conocido como acetaminofén (acetaminofeno) es un fármaco con propiedades (Tabla 4) analgésicas, antipiréticas y sin propiedades antiinflamatorias clínicamente significativas. Es un ingrediente frecuente de una serie de productos contra el resfriado común y la gripe. No provoca euforia ni altera el estado de humor (Swierkosz et al., 2002).

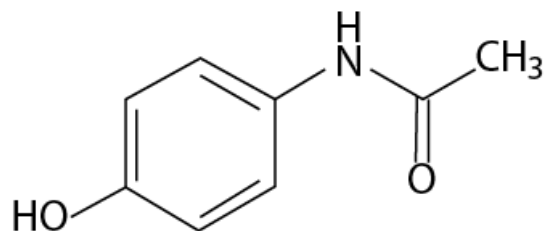


Figura 4. paracetamol

### 2.1.5.2.1 Características

Tabla 4. Características del paracetamol

Identidad	Datos químicos	Datos físicos
Nombre sistemático: <i>N</i> -(4-hidroxifenil)acetamida <i>N</i> -(4-hidroxifenil)etanamida	Formula: C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Identificación: Color blanco cristalino de estado solido, inodoro
Número CAS: 103-90-2	Peso molecular: 151.17	Densidad: 1,263 g/cm <sup>3</sup>
Código ATC: N02BE01	Sinónimos: Acetaminofeno	Punto de fusión: 169 °C
		Solubilidad en agua: 12,78 mg/mL (20 °C)

### 2.1.5.2.2 Indicaciones terapéuticas

Oral o rectal: fiebre; dolor de cualquier etiología de intensidad leve o moderado, intravenosa: dolor moderado y fiebre, a corto plazo, cuando existe necesidad urgente o no son posibles otras vías (Ortiz et al., 2007).



### 2.1.5.2.3 Farmacocinética

#### a) Absorción

El paracetamol administrado por vía oral se absorbe rápida y completamente, y por vía rectal tiene la ventaja de evitar el primer paso hepático. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan en función de la forma farmacéutica en un tiempo de treinta minutos hasta dos horas.

#### b) Distribución

Su distribución se da rápidamente por todos los tejidos. Las concentraciones son muy similares tanto en la sangre, la saliva y el plasma. El paracetamol por vía rectal tiene una biodisponibilidad muy elevada aproximadamente del 100 %, mientras que la biodisponibilidad por vía oral es del 75-85 %.

#### c) Biotransformación

Su metabolización se da principalmente a nivel del hígado. Las dos principales rutas metabólicas que sigue son la glucuroconjugación y sulfuroconjugación. Una pequeña proporción se metaboliza mediante el sistema enzimático del citocromo P-450 en el hígado, por acción de las oxidasas mixtas, generando un intermedio reactivo, N-acetilbenzoquinonaimida que en condiciones normales es inactivado por reacción con los grupos sulfhidrilo del glutatión y eliminado en la orina conjugado con cisteína y ácido mercaptúrico. Si se toman dosis elevadas de paracetamol, saturan sus otras dos vías metabólicas y se crea un exceso de N-acetilbenzoquinonaimida que agota los niveles hepáticos de glutatión (Boutaud et al., 2002).





#### d) Eliminación

La eliminación se da principalmente por la vía urinaria. El 90% de la dosis ingerida la elimina el riñón en 24 horas, principalmente como glucurónidos (60 a 80%) y sulfoconjugados (20 a 30%). Menos del 5% se elimina del cuerpo sin modificar. La semi-vida de eliminación del paracetamol es de 2-4 horas en los pacientes con la función hepática normal, siendo prácticamente indetectable en el plasma 8 horas después de su administración (Boutaud et al., 2002).

##### 2.1.5.2.4 Efectos tóxicos

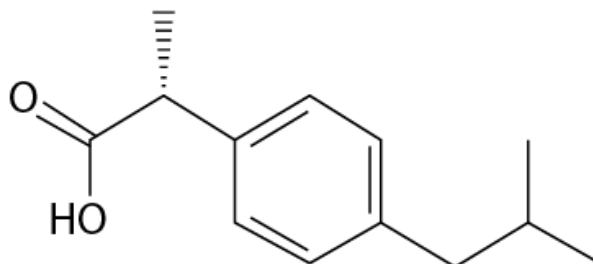
Ya que el paracetamol tiene un índice terapéutico muy ajustado. La dosis de 4 gramos al día en adultos ya es una dosis cercana a la sobredosis. Una dosis única de paracetamol de 10 g o dosis continuadas de 5 g/día en un no consumidor de alcohol con buena salud, o 4 g/día en un consumidor habitual de alcohol, pueden causar daños importantes en el hígado.

Sin un tratamiento adecuado en el momento oportuno, la sobredosis o la dosis casi normal de paracetamol puede dar como resultado un fallo hepático (insuficiencia hepática) seguido de la muerte inevitable. El paracetamol no debe tomarse tras consumir alcohol, debido a que el hígado, cuando está metabolizando el alcohol, no puede metabolizar simultáneamente el paracetamol, aumentando por tanto el riesgo de hepatotoxicidad (Oliva et al., 2001).

##### 2.1.5.3 Ibuprofeno

El ibuprofeno (Figura 5) entre sus distintas características (Tabla 5) es un potente antiinflamatorio además de analgésico y antipirético, su efecto analgésico es central y periférico y difiere del mecanismo antiinflamatorio. Es un potente inhibidor de la enzima ciclooxigenasa y por lo tanto, un potente reductor de la síntesis de

prostaglandinas. Es similar en potencia al ácido acetilsalicílico, aunque menos potente que el naproxeno y la indometacina (Adams, 1992).



**Figura 5.** ibuprofeno

### 2.1.5.3.1 Características

**Tabla 5.** Características del ibuprofeno

Identidad	Datos químicos	Datos físicos
Nombre sistemático: ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil)propiónico	Formula: C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	Identificación: Polvo cristalino blanco con olor característico
Número CAS: 15687-27-1	Peso molecular: 206.29	Solubilidad en agua: 0.01139 g/l
Código ATC: M01AE01		Punto de fusión: 76 °C

### 2.1.5.3.2 Indicaciones terapéuticas

El ibuprofeno es un analgésico y antiinflamatorio utilizado para el tratamiento de estados dolorosos, acompañados de inflamación significativa como lo es la artritis reumatoide leve y moderada, alteraciones musculoesqueléticas entre ellas la osteoartritis, lumbago, bursitis, tendinitis, hombro doloroso, esguinces y torceduras, entre otros. Se utiliza para el tratamiento del dolor moderado en postoperatorio, en dolor dental, postepisiotomía, dismenorrea primaria y dolor de cabeza (McElwee et al., 1990).



### 2.1.5.3.3 Farmacocinética

#### a) Absorción

Su administración es muy común por la vía oral, el ibuprofeno tiene una biodisponibilidad del 80%. Este es absorbido rápidamente en un tiempo máximo entre una y dos horas, este tiempo puede variar con la presencia de alimentos ya que estos retrasan el tiempo de la absorción (Volans et al., 2003).

#### b) Distribución

Tiene una gran facilidad por unirse a la albumina y proteínas plasmáticas, por lo cual tiene una rápida y amplia distribución por el torrente sanguíneo, el grado de unión a proteínas plasmáticas se encuentra entre el 90 % y el 99 % (Adams, 1992).

#### c) Biotransformación

Es metabolizado en el hígado por oxidación dando lugar al 2 (2-carboxipropil) p-hexilpropiónico (ácido 37%). (Volans et al., 2003).

#### d) Eliminación

Su vida media de eliminación es aproximadamente de 2 h. Su excreción es mayoritariamente por vía renal, esta se da por un 90 % en forma de metabolitos inactivos conjugados con ácido glucurónico y un 10 % en forma inalterada, la pequeña parte restante se elimina por vía biliar (Adams, 1992).

#### 2.1.5.3.4 Efectos tóxicos

Entre los efectos tóxicos que se pueden presentar por el consumo de este antiinflamatorio se encuentra el estreñimiento, diarrea, gases o distensión abdominal, mareo, vómito, nerviosismo, zumbidos en los oídos, aumento de peso inexplicable, fiebre, ampollas, sarpullido, comezón, urticaria, hinchazón, dificultad para respirar o tragar, ronquera, cansancio excesivo, náuseas, pérdida del apetito, síntomas parecidos a los de la gripe, palidez, latidos del corazón rápidos, orina turbia, dolor de espalda, sinagesia, dificultad o dolor al orinar, visión borrosa, cambios en el color de la visión u otros problemas de la visión, ojos enrojecidos o doloridos (Baselt, 2008).

#### 2.1.5.4. Diclofenaco

El diclofenaco (Figura 6) es un medicamento de la familia de los antiinflamatorios no esteroideos derivado fenilacético, entre sus características (Tabla 6) esta la de ser un inhibidor relativamente no selectivo de la ciclooxigenasa por lo cual no es muy efectivo para inhibir la producción de las prostaglandinas, es utilizado para reducir inflamaciones leves y como un analgésico (Katzung et al., 2007).

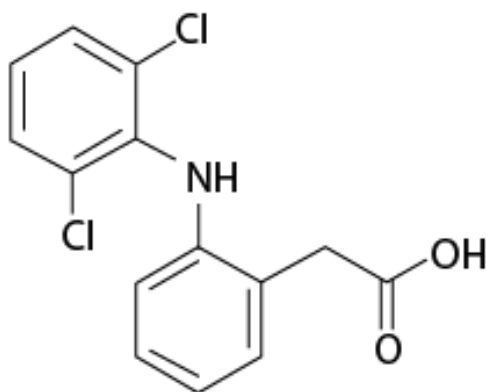


Figura 6. diclofenaco



#### 2.1.5.4.1. Características

Tabla 6. Características del diclofenaco

Identidad	Datos químicos	Datos físicos
Nombre sistemático: Ácido 2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acético	Fórmula: $C_{14}H_{11}NCl_2O_2$	Identificación: Polvo cristalino blanco
Número CAS: 15307-86-5	Peso molecular: 296.14	Solubilidad en agua: Parcial
Código ATC: M01AB05		Punto de fusión: 280 °C

#### 2.1.5.4.2. Indicaciones terapéuticas

El diclofenaco es utilizado para el tratamiento de padecimientos músculoesqueléticos como la artritis reumatoide, osteoartritis, espondiloartritis, espondilitis anquilosante, dolor menstrual, ataques de gota y manejo del dolor causado por cálculos renales y vesiculares. El diclofenaco se usa regularmente para tratar el dolor leve a moderado posterior a cirugía o tras un proceso traumático, particularmente cuando hay inflamación presente (Katzung et al., 2007).

#### 2.1.5.4.3. Farmacocinética

##### a) Absorción

Se absorbe rápidamente cuando se administra en forma de solución oral, supositorio rectal o inyección intramuscular. Por vía oral y rectal sufre metabolismo de primer paso hepático por lo que la biodisponibilidad es del 50-60 %. En el caso de la administración oral la concentración máxima se alcanza entre los 10 y 30 minutos. Para la administración rectal se alcanzan las concentraciones



plasmáticas máximas al cabo de 1 h, y la concentración máxima es aproximadamente dos tercios de la alcanzada tras administración oral. Para la administración intravenosa la absorción es inmediata y las concentraciones plasmáticas máximas medias de 2,5 mg/ml se alcanzan a los 20 minutos. Si hay ingesta de alimentos antes de la administración, existe una disminución aproximada del 16 % en cantidad de diclofenaco absorbido.

### **b) Distribución**

Este se fija en un 99,7 % a proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina (99,4 %). El volumen de distribución aproximadamente es de 0,12 – 0,17 L/kg. Después penetra en el líquido sinovial, en donde las concentraciones son menores que en el plasma, pero tienen una mayor duración entre las 2 y 4 horas de haberse alcanzado los valores plasmáticos máximos. Se puede difundir a la leche materna, es capaz de atravesar la placenta en ratones y ratas.

### **c) Biotransformación**

La biotransformación del diclofenaco comienza por la glucuronidación de la molécula, pero principalmente por hidroxilación simple, múltiple y metoxilación, dando lugar a varios metabolitos fenólicos (3'-hidroxi-, 4'-hidroxi-, 5-hidroxi-, 4'5-dihidroxi- y 3' hidroxi-4' metoxidiclofenaco), estos metabolitos fenólicos no son biológicamente activos (López, 2002).

### **d) Eliminación**

Aproximadamente el 60% de la dosis absorbida se excreta en la orina como conjugado glucurónico de la molécula y como metabolitos, de los cuales la mayoría son convertidos a conjugados glucurónicos. Menos del 1% se excreta como sustancia inalterada y el resto de la dosis se elimina en forma de metabolitos



con las heces. Tiene un tiempo de vida media entre 1 y 2 horas y su tiempo de vida media en el líquido sinovial es de 3 a 6 horas.

#### 2.1.5.4.4 Efectos tóxicos

Por el consumo constante puede causar diarrea, estreñimiento, gases o hinchazón abdominal, dolor de cabeza, mareos, zumbido en los oídos, aumento de peso inexplicable, cansancio excesivo, falta de energía, malestar estomacal, pérdida de apetito, comezón, coloración amarilla de la piel o los ojos, síntomas parecidos a los de la influenza, fiebre, ampollas, sarpullido, urticaria, hinchazón de ojos, cara, lengua, labios, garganta, brazos, manos, pies, tobillos o pantorrillas, dificultad para respirar o tragar, ronquera, palidez, orina turbia, pálida o sanguinolenta, dolor de espalda, dificultad o dolor al orinar (López, 2002).

#### 2.1.5.5 Etanol

El etanol (Figura 7) es un alcohol que debido a sus características (Tabla 7) es utilizado para distintos usos: fines culinarios como bebida alcohólica, en el sector farmacéutico, como excipiente de algunos medicamentos y cosméticos, es usado como disolvente, es un desinfectante, también es empleado como combustible industrial y doméstico (Stevens et al., 2001).

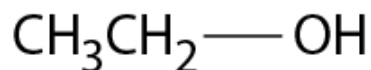


Figura 7. Etanol



### 2.1.5.5.1 Características

Tabla 7. Características del Etanol

Identidad	Datos químicos	Datos físicos
Nombre sistemático: Etanol	Fórmula: $C_2H_6O$	Identificación: Líquido incoloro, es volátil y de olor característico
Número CAS: 64-17-5	Peso molecular: 46.07	Solubilidad en agua: Miscible
Sinónimos: Alcohol etílico		Punto de fusión: $-114^{\circ}C$
		Punto de ebullición: $78^{\circ}C$

### 2.1.5.5.2 Indicaciones terapéuticas

Se utiliza para tratar la intoxicación por metanol ya que impide la formación de metanal y ácido fórmico, también es utilizado para el tratamiento de enfermedades coronarias (Stevens et al., 2001).

### 2.1.5.5.3 Farmacodinamia

El etanol actúa como agente perturbador inespecífico de la membrana neuronal alterando la permeabilidad y las propiedades de sus componentes lipídicos, afecta la transmisión de glicina, la cual es un neurotransmisor inhibitorio y existen sustancias como la serotonina, la dopamina y la noradrenalina que tienen la capacidad reforzadora por el hábito de seguir bebiendo. También altera otros procesos celulares de neuro-transmisión, a través de la modificación de la actividad enzimática de los sistemas de generación de "segundos mensajeros" (Gisbert et al., 2005).





#### 2.1.5.5.4 Farmacocinética

##### a) Absorción

El etanol es absorbido en un 20% en el estómago (principal sitio de absorción) y el 80% restante en el intestino delgado por difusión pasiva. Las diferencias en la velocidad de vaciado gástrico dependen de factores como la cantidad de alimentos, la concentración de glucosa, si el individuo fuma o consume medicamentos como la ranitidina.

##### b) Distribución

Esta sustancia presenta una cinética de dos compartimientos, y su velocidad de distribución depende de la circulación periférica. Un aumento en el flujo sanguíneo periférico produce menor concentración máxima. Si hay un aumento en el volumen de distribución del etanol se da una disminución en la concentración máxima de etanol.

##### c) Biotransformación

El etanol ingerido se metaboliza en el hígado entre el 95 % y el 98 %, el paso limitante es la reoxidación del NADH a NAD<sup>+</sup>, que es la coenzima para la conversión del etanol a acetaldehído y de éste a acetato mediante el empleo de las enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasas. Cuando hay una ingestión moderada de etanol, éste es eliminado siguiendo una cinética de orden cero, mientras que la NADH se satura luego de haber bebido cantidades mínimas. En el caso de los individuos que beben grandes cantidades de etanol actúa la enzima CYP2E1 microsomal, la cual es inducible y aumenta la depuración del etanol. Si hay consumo de alimentos se incrementa la velocidad de metabolismo del etanol mediante el aumento en la actividad enzimática (Norberg et al., 2003).



#### d) Eliminación

Aproximadamente entre el 2 y el 10 % del etanol ingerido es eliminado de forma inalterada por sudor, orina y pulmón (Roldán et al., 2003).

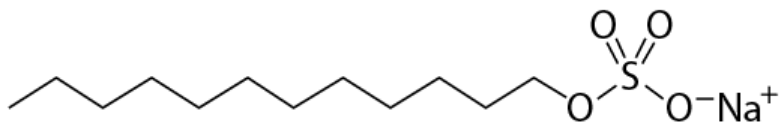
##### 2.1.5.5.5 Efectos tóxicos

El etanol intensifica los efectos tóxicos de la etionamida, guanetidina, nitroglicerina, sulfonilureas, salicilatos e incrementan la hepatotoxicidad del metrexato, afecta el hígado y los riñones. Inhibe gradualmente las funciones cerebrales, disminución de la alerta, retardo de los reflejos, cambios en la visión, pérdida de coordinación muscular, temblores y alucinaciones, disminuye el autocontrol, afecta a la memoria, la capacidad de concentración y las funciones motoras, daño las células cerebrales, enfermedad de Wernicke-Korsakoff, aumenta la actividad cardíaca, hipertensión, debilita la capacidad para bombear sangre, produce vasodilatación periférica, aumenta la producción de ácido gástrico, úlceras, hemorragias y perforaciones de la pared gástrica, provoca esofagitis, puede producir pancreatitis aguda, puede provocar pancreatitis crónica, otras alteraciones posibles son la diabetes tipo II y peritonitis, hepatitis alcohólica, ictericia, inhibe la producción de glóbulos blancos y rojos, anemia megaloblástica, puede causar infertilidad y disfunción eréctil, el síndrome alcohólico fetal (Gisbert et al., 2005).

##### 2.1.5.6 Dodecil Bencen Sulfonato de Sodio

El dodecil bencen sulfonato de sodio (Figura 8) es un compuesto tensoactivo iónico capaz de retirar aceites y grasas de la piel, por sus características (Tabla 8) es empleado en la composición de productos de higiene personal, como lo es la pasta de dientes, el shampoo y en jabones de baño. Su estructura molecular consta de una cola de doce átomos de carbono, adosada a un grupo sulfato, lo

que le proporciona propiedades anfífilas a la molécula. El DBSS se prepara mediante la sulfonación del dodecanol con una posterior neutralización con carbonato sódico (Panez, 2011).



**Figura 8.** dodecil bencen sulfonato de sodio

#### 2.1.5.6.1 Características

**Tabla 8.** Características del dodecil bencen sulfonato de sodio

Identidad	Datos químicos	Datos físicos
Nombre sistemático: Dodecilbencensulfato sódico	Fórmula: $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$	Identificación: Polvo blanco con olor característico
Número CAS: 151-21-3	Peso molecular: 288.38	Solubilidad en agua: Soluble
Sinónimos: laurilsulfato sódico		Punto de fusión: 206 °C

#### 2.1.5.6.2 Indicaciones terapéuticas

El DBSS es utilizado en pastas dentales en una concentración entre el 0,5% a 2% ya que esta sustancia ayuda a desalojar los residuos de alimentos y placa, contribuyendo a eliminar manchas (Panez, 2011).



### **2.1.5.6.3 Efectos tóxicos**

Puede causar irritación en la nariz, piel y ojos, por inhalación o contacto directo y en el caso de se ingerido causa alteración en la circulación (Marrakchi et al., 2006).

### **2.1.6 Biomarcadores**

Un biomarcador se puede definir como un organismo vivo que se encuentra en contacto con un xenobiótico, éste sirve para medir las alteraciones inducidas por el xenobiótico sobre los componentes celulares o bioquímicos del organismo (Silbergeld et al., 1994).

Un biomarcador ideal debe cumplir ciertos aspectos: a) fácil recolección y análisis de la muestra; b) ser específico; c) reflejar únicamente un cambio subclínico y reversible; d) permitir adoptar medidas preventivas; e) ser éticamente aceptable (Grandjean et al., 1994).

#### **2.1.6.1 Tipos de biomarcadores**

Existen varios tipos de biomarcadores pero son tres los más importantes: biomarcadores de exposición, biomarcadores de susceptibilidad y biomarcadores de respuesta (Repetto, 1997).

##### **2.1.6.1.1 Biomarcadores de exposición**

Este tipo de biomarcador se realiza en fluidos corporales como en la sangre y orina y es utilizado para reflejar la exposición de un compuesto exógeno a un organismo (Van et al., 1996). En el caso de tóxicos acumulativos, la dosis interna



puede reflejar la cifra del geobiótico almacenado en uno o varios compartimentos corporales.

Existen dos tipos de biomarcadores de exposición: los selectivos y los no selectivos. Los biomarcadores selectivos se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos y los no selectivos constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (Bernard et al., 1986).

#### **2.1.6.1.2 Biomarcadores de susceptibilidad**

Sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN, clonación de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas (Repetto, 1997).

Existen dos tipos de biomarcadores de susceptibilidad: los marcadores de polimorfismos de sistemas activadores y los marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores. Los marcadores de polimorfismos de sistemas activadores permiten la medida de actividad de las enzimas del citocromo P-450 (Van et al., 1996). Los marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores son medidas de actividad de enzimas como la glutatión-S-transferasa, la acetiltransferasa, la sulfotransferasa, la glucuroniltransferasa (Van et al., 1996).

#### **2.1.6.1.3 Biomarcadores de respuesta (o efecto)**

El biomarcador de respuesta o efecto es indicativo de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a un xenobiótico. Estos incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m,



aumento de determinadas proteínas, aparición de anticuerpos específicos contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (Repetto, 1997).

Todos estos biomarcadores nos ayudan para observar si existe algún cambio en un organismo, éstos pueden ser físicos, biológicos o bioquímicos como la alteración de distintas enzimas que nos puedan generar estrés oxidativo (Luna, 2010).

### 2.1.7 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es causado por los radicales libres, éstos son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su última capa, lo que lo hace que sean muy inestables y reactivas, esta molécula inestable para conseguir la estabilidad modifica su alrededor provocando la aparición de nuevos radicales (Soledad, 2007).

Estos radicales libres son capaces de causar daño a diferentes niveles de la célula: ataca a los lípidos y proteínas de la membrana celular lo cual la inhabilita para realizar sus funciones normales, pueden causar cáncer al atacar al ADN impidiendo que haya replicación celular lo cual facilita el envejecimiento celular, aterosclerosis por la peroxidación de lípidos en las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL), cataratas por modificación irreversible en las proteínas y procesos inflamatorios crónicos por la activación de genes relacionados con la respuesta inflamatoria (Soledad, 2007).

Entre estos radicales libres están las series reactivas de oxígeno (el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) (Martín, 2007) y las especies reactivas del nitrógeno (el óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ), trióxido de



nitrógeno ( $N_2O_3$ ), tetraóxido de dinitrógeno ( $N_2O_4$ ) y a el radical peroxinitrito ( $ONOO\bullet$ ) formado por el óxido nítrico (NO) y el superóxido ( $O_2^-$ ) (Luna, 2010).

El estrés oxidativo es el desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno y los sistemas de defensa antioxidante. Esto se puede generar por dos razones: la disminución de antioxidantes por malnutrición o por la producción excesiva de series reactivas de oxígeno por la exposición a contaminantes que generen la activación excesiva de radicales (Soledad, 2007).

### 2.1.8 Daño producido por estrés oxidativo

El estrés oxidativo es capaz de generar mucho daño en distintos tipos de moléculas, en los lípidos se produce el mayor daño por la peroxidación lipídica, este proceso afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, lo que altera la permeabilidad de la membrana celular produciendo edema y muerte celular. La peroxidación lipídica puede ser desencadenada por las series reactivas del oxígeno (Jerlick et al., 2000).

La lipoperoxidación también conocida como peroxidación lipídica es la degradación oxidativa de los lípidos con lo que los radicales libres capturan los electrones de las membranas celulares. Este proceso en la mayoría de los casos afecta a los ácidos grasos poliinsaturados, debido a que contienen múltiples enlaces dobles entre los cuales se encuentran los grupos metileno ( $-CH_2-$ ) que poseen hidrógenos particularmente reactivos (Ela et al., 2008).

Existen factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica:

- a) La naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente inicializador.
- b) Los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad.
- c) La tensión de oxígeno.



- d) La presencia de hierro.
- e) El contenido celular de antioxidantes (betacarotenos, alfatocoferoles, glutatión).
- f) La activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutatión peroxidasa.

Cuando este proceso inicia se forma una cascada con la producción de radicales libres lo cual favorece la formación de peróxidos orgánicos que son los responsables de los efectos citotóxicos.

En el caso de las proteínas se produce la oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y dando formación de grupos carbonilos.

En el ácido desoxirribonucleico ocurren mutaciones que a su vez generan carcinogénesis, pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes (Jerlick et al., 2000).

### 2.1.8.1 Lipoperoxidación

La reacción de lipoperoxidación (Figura 9) consta de tres pasos fundamentales: la iniciación, propagación y terminación.

Iniciación de la peroxidación lipídica, aquí el radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, ocurre la abstracción de hidrógeno del grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) unido a un carbono con dobles enlaces de un ácido graso poliinsaturado, con la formación de una especie radical (radical alquílico:  $\text{L}^*$ ). Los radicales que se forman se estabilizan por la resonancia (Ela et al., 2008).





Fase de propagación, en esta etapa ocurre una reacción en cadena con la extensión del daño y la formación de más especies radicálicas. La especie radicálica formada en la primera fase reacciona con el oxígeno y forma un radical peroxilo ( $\text{LOO}^{\cdot}$ ) que puede reaccionar con otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes y originar un hidroperóxido o lipoperóxido ( $\text{LOOH}$ ) y un radical alquílico; así se produce una reacción en cadena y el daño a un número creciente de ácidos grasos.

Por último la fase de terminación o descomposición, en la que hidroperóxidos formados se descomponen en etano, pentano, aldehídos reactivos y cetonas. Los aldehídos formados, como el malonildialdehído y el 4-hidroxinonal, pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, lo que explica los efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos, así como un papel patogénico en varias enfermedades.

Si la reacción no es terminada con rapidez, habrá daño en la membrana celular, que consiste principalmente de lípidos. De esta manera la fototerapia puede provocar la hemólisis rompiendo la membrana de los eritrocitos (Ela et al., 2008).

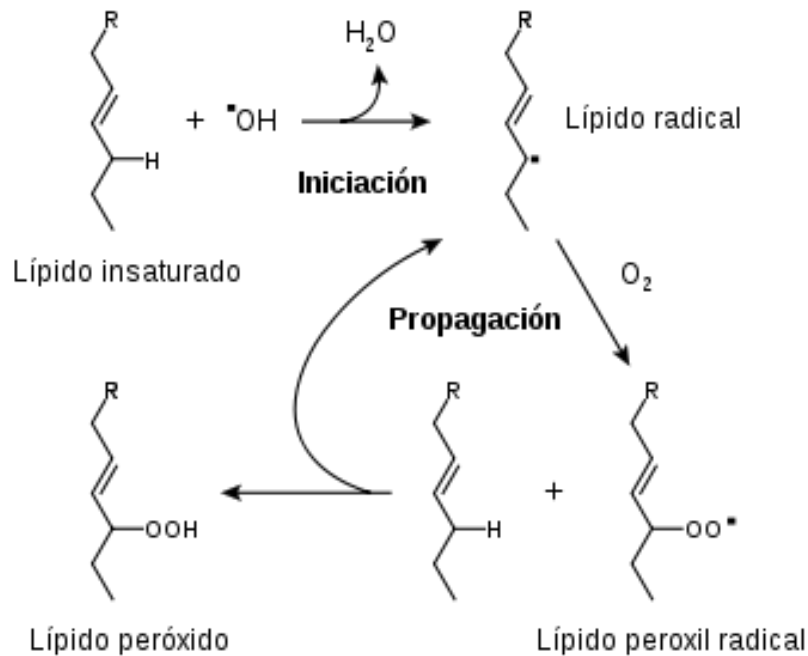


Figura 9. Reacción de la lipoperoxidación

### 2.1.8.2 Proteínas carboniladas

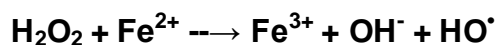
Después de diversas reacciones oxidativas en las proteínas hay formación de grupos carbonilo como los grupos cetona o grupos aldehídos, estas proteínas tienen una tendencia a ser más hidrófobas y resistentes a la proteólisis. Esta reacción puede ser catalizada por metales (Méndez, 2011).

A una mayor cantidad de proteínas carboniladas existen diversas complicaciones que se presentan en el cuerpo humano como es la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, diabetes, anemia de células falciformes, obesidad, enfermedad cardiovascular y asma (Méndez, 2011).



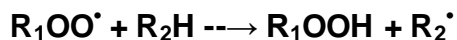
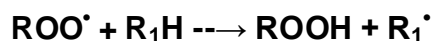
#### 2.1.8.4 Hidroperóxidos

La reacción de iniciación (Figura 10) consiste en la formación de un radical libre a partir de un ácido graso, radical a causa de un radical hidroxilo el cual se obtiene de la reacción de Fenton, esto pondrá en marcha la reacción de propagación, el uso de un metal es un catalizador de la reacción.



**Figura 10.** Reacción de los Hidroperóxidos

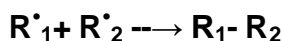
Los hidroperóxidos pueden formarse especialmente por la acción de la luz, a través de foto activadores, o por la acción de enzimas como las lipoxigenasas. Ese radical hidroperóxido es capaz de tomar una molécula de hidrogeno de un carbono con doble enlace e inicia una cadena de propagación como se observa a continuación (Frankel, 2005).





Hay dos formas de terminación de la reacción (Frankel, 2005):

Reacciones de terminación:



Formación de nuevas cadenas:



### 2.1.9 Mecanismo de defensa antioxidante

Las reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos celulares. Dichas reacciones involucran la transferencia de electrones que producen radicales libres las defensas que neutralizan los radicales libres se les llama antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un radical libre.

El antioxidante al colisionar con el radical libre, le cede un electrón oxidándose y transformándose en un RL débil no tóxico. Existen antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos y estos a su vez se clasifican en endógenos (se encuentran en el organismos) y exógenos (estos ingresan a través de la dieta) (Oxilia, 2010).



**Tabla 9.** Clasificación de los antioxidantes

Exógenos	Endógenos (No enzimáticos)	Cofactores
Vitamina E	Glutación	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Betacaroteno	Ácido tiótico	Manganeso
Flavonoides	Superóxido dismutasa, Catalasa, Glutación peroxidasa	Hierro
Licopeno		Selenio

- A) Vitamina C: Neutraliza el oxígeno singulete. Captura radicales hidroxilo. Regenera la forma oxidada de la vitamina E.
- B) Vitamina E: Neutraliza el oxígeno singulete. Captura radicales hidroxilo. Captura anión superóxido. Neutraliza peróxidos.
- C) Betacarotenos: Neutraliza el oxígeno singulete.
- D) Superóxido dismutasa: Eliminan el anión superóxido.
- E) Catalasa y glutación peroxidasa: Previene la reducción del peróxido de hidrógeno para formar el radical hidroxilo.

Hay ciertas sustancias que participan con los antioxidantes (Tabla 9), estos son los oligoelementos (cobre, zinc, selenio, manganeso y hierro) los cuales son necesarios para constituir parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes (Oxilia, 2010).



## 2.1.10 Enzimas antioxidantes

Las enzimas antioxidantes son esenciales para la supervivencia de las células aeróbicas, ya que estas enzimas tienen la capacidad de mantener principalmente las concentraciones de especies reactivas de oxígeno dentro de niveles aceptables.

### 2.1.10.1 Superóxido dismutasa

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es la primera línea de defensa antioxidante ya que cataliza la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno (Figura 11), esta enzima es una metaloenzima ya que tiene un metal de sitio activo para tener un mecanismo redox y de esa manera poder participar en las reacciones de dismutación. El zinc actúa como un estabilizador de la enzima y en su variedad mitocondrial contiene manganeso de sitio activo.

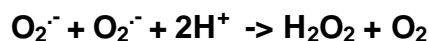


Figura 11. Reacción de superóxido dismutasa

### 2.1.10.2 Catalasa

En la reacción de la catalasa (Figura 12) la enzima se encuentra en los peroxisomas pero también está en abundancia en todos los tejidos, su función es catalizar la inactivación de la molécula peróxido de hidrógeno convirtiéndola en agua y oxígeno, su sitio activo es el grupo hemo ( $\text{Fe}^{+3}$ ) protoporfirina (Teixeira et al., 1993).

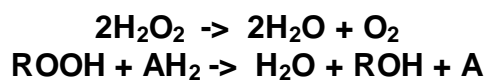


Figura 12. Reacción de catalasa



### 2.1.10.3 Glutación peroxidasa

La reacción de la glutatión peroxidasa (Figura 13) cataliza la reducción de peróxidos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos, mediante el sustrato glutatión reducido y este a su vez es transformado en glutatión oxidado, en su sitio activo contiene selenio (Teixeira et al., 1993).



**Figura 13.** Reacción de glutatión peroxidasa

### 2.1.11 Bioindicadores

Los bioindicadores son organismos o comunidades de ellos que pueden responder a la contaminación ambiental mediante alteraciones en su fisiología o a través de su capacidad para acumular contaminantes o también llamado bioacumulación (Pignata, 2003). Los bioindicadores miden los efectos de la contaminación en seres vivos, por lo tanto ofrecen información sobre los riesgos para otros organismos, ecosistemas y el hombre (Anze et al., 2007).

La presencia de un bioindicador nos da información sobre características ecológicas del medio o sobre el impacto de ciertas prácticas en el medio ambiente. El principio consiste en observar los efectos biológicos, individualmente o en las poblaciones de diferentes ecosistemas. Estos efectos se miden dependiendo de los diversos grados de alteraciones morfológicas, alteraciones de comportamiento, de los tejidos o fisiológicas como son el crecimiento y la reproducción (Hare, 1992).



### 2.1.11.1 Características

Un bioindicador debe cumplir con ciertas características básicas: debe estar suficientemente disperso en el territorio y ser relativamente abundante, fácilmente detectable, tener un tamaño que permita el estudio de los diferentes tejidos y sus componentes (músculos, huesos, los órganos en el caso de un animal), tolerar los contaminantes en concentraciones similares a las observadas en el medio ambiente contaminado, sin efectos letales, sobrevivir fuera del medio natural y tolerar las diferentes condiciones de laboratorio (pH, temperatura), ser reproducible, de taxonomía sencilla y sensible (Hare, 1992).

### 2.1.11.2 *Cyprinus carpio*

La carpa común (*Cyprinus carpio*) (Figura 14) es un pez de agua dulce, del reino Animalia, Filo Chordata, Clase Actinopterygii, Orden Cypriniformes, Familia Cyprinidae, Genero *Cyprinus*, Especie *Cyprinus carpio*. Esta especie es muy reproducida en México debido a que su carne es altamente consumida y tiene un gran interés comercial.

Es un animal muy resistente, capaz de vivir en aguas salobres con una temperatura entre 17 y 24 °C. En muchos lugares donde ha sido introducida se considera una amenaza para el ecosistema debido a su predilección por el sustrato vegetal de los fondos poco profundos, que sirve de alimento a numerosas especies animales (Lowe et al., 2000).





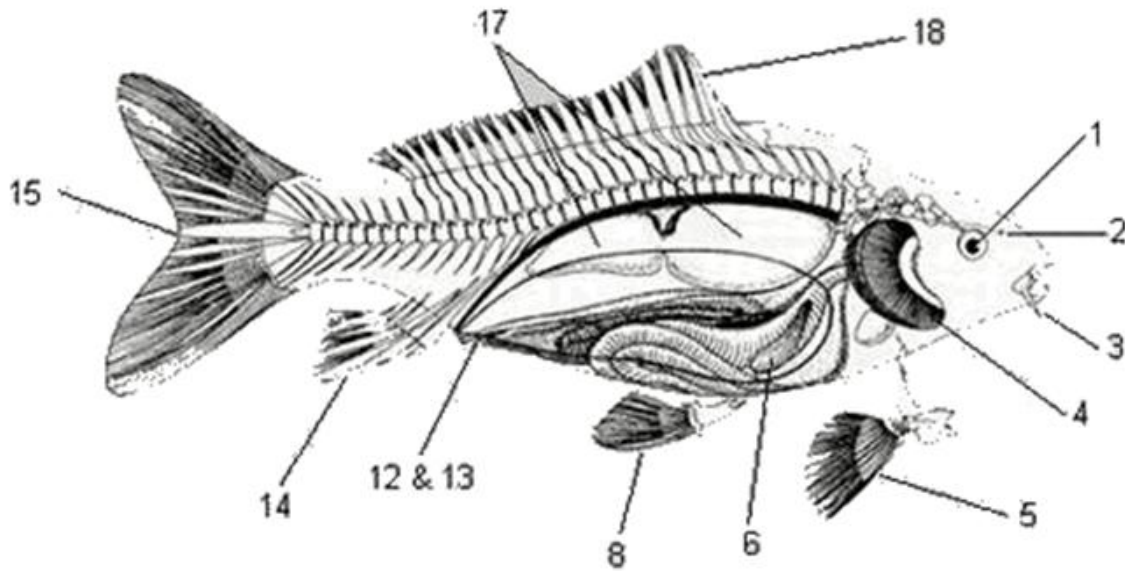
**Figura 14.** *Cyprinus carpio*

Para la especie de *Cyprinus carpio* se han descrito tres subespecies:

- *Cyprinus carpio carpio*.
- *Cyprinus carpio haematopterus*.
- *Cyprinus carpio rubrofuscus*.

La anatomía de la especie *Cyprinus carpio* (Figura 15) puede llegar a medir 1,2 m de largo y hasta 40 Kg de peso, aunque normalmente mide en estado adulto de 60-90 cm, y su peso ronda los 9 Kg. Presenta una espina dorsal cerrada característica y sus escamas son largas y finas. Los machos tienen la aleta ventral más larga que las hembras. El color y el tamaño son muy variables.

Tiene el cuerpo alargado, con grandes escamas redondas, labio superior con cuatro barbillas, dorsal bastante largo con un hundimiento y el primer radio es dentado. El dorso es generalmente marrón verdoso y en el vientre amarillento. El corazón consta de cuatro partes: el seno venoso, el [atrio](#), el [ventrículo](#) y el [bulbo arterioso](#). Y se compone por una aurícula y un ventrículo (Lowe et al, 2000).



**Figura 15.** Anatomía de *Cyprinus carpio*

1. Ojos: Los ojos se encuentran delante de las agallas. La carpa puede ver en dos direcciones al mismo tiempo así como arriba o abajo.
2. Fosas nasales: Están por delante y ligeramente encima de los ojos.
3. Bigotes: están localizados sobre el labio superior. Son receptores que ayudan a localizar alimento.
4. Branquias: Tienen función similar a los pulmones, contiene una serie doble de filamentos largos y finos. Cuando el agua pasa a través de ellas el oxígeno es absorbido por los filamentos y transportado al cuerpo.
5. Aleta pectoral: Son pares y se sitúan en los lados inferiores de la carpa, le dan la posibilidad al pez de dar la vuelta casi sobre el mismo eje.
6. Hígado: Cumple la misma función que el hígado humano, filtra la sangre y elimina las impurezas.
7. Vesícula: Localizada por debajo del hígado, almacena la bilis y la libera para ayudar con la digestión.
8. Aleta pélvica: Son pares y se encuentran en los lados inferiores en el medio cuerpo que permiten a la carpa elevarse o descender cuando nada.



9. Bazo: Produce células de linfa y son almacén de células rojas.
10. Intestinos: La carpa no tiene estómago así que su digestión es en los intestinos.
11. Órganos reproductores: Se localizan debajo de la vejiga natatoria.
12. Ano: esta por delante de la aleta anal.
13. Vejiga urinaria: Cuando el volumen contenido de sal de la carpa es mas alto que del agua el pez iguala la concentración de sal por osmosis.
14. Aleta anal: Se encuentra por delante de la cola y le da estabilidad.
15. Aleta caudal: Hace la función de timón y puede usarse para aumentar la velocidad.
16. Riñón
17. Vejiga natatoria: Situada debajo de la espina dorsal y tiene dos cámaras y se inflan según la posición del pez.
18. Aleta dorsal: Se encuentra en la parte superior y es el mayor estabilizador (Lowe et al., 2000).



## 2.2 ANTECEDENTES

La presencia de diversos contaminantes en el agua han causado muchos problemas en los organismos que se encuentran en este medio, desde cambios físicos, cambios químicos y cambios genéticos (Alonso et al., 2012).

En referencia a la ocurrencia, existen estudios de organismos acuáticos expuestos a fármacos como los AINEs en lugares como España donde se halló ibuprofeno, diclofenaco, ácido acetilsalicílico a concentraciones por debajo de 250 ng/L (Kuster et al., 2005). En países como Alemania se halló en Lodos residuales sulfametoasol, trimetoprim, claritromicina y naproxeno en concentraciones de 6.8–125.6 ng/g (Göbel et al., 2005). En Australia se encontró paracetamol, diclofenaco, ketoprofeno, ibuprofeno, naproxeno y ácido salicílico en efluentes de plantas de tratamiento en concentraciones de 0.018–0.702 ng/L (Al Rifai et al., 2007).

Se ha realizado diversos estudios por exposición a etanol en organismos acuáticos en donde a concentraciones de etanol al 2 – 2.5 % se vio retraso en la formación de la notocorda en embriones de pez cebra y el cierre neural (Alonso et al., 2012). Se hallaron alteraciones en peces cebra en sistema circulatorio, y en la formación de la espina bífida (Victoria, 2004).

Para el caso de los detergentes se realizó un estudio donde se encontró que éste aumenta la permeabilidad de las branquias de peces, modificando sus procesos respiratorios, y debido a que en altas concentraciones o exposiciones prolongadas producen necrosis y alteraciones en el funcionamiento de las branquias, causando asfixia y muerte (Wang y Huang, 1999; Malagriño y Almeida, 1989). Malagriño y Almeida, 1989 refieren que el detergente potencia los efectos dañinos de otros contaminantes al remover la capa de mucosidad que cubre al pez, promueve el desarrollo de hongos y protozoarios patógenos.



## 2.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ya que en los últimos años los antiinflamatorios no esteroideos se han convertido en un problema ambiental en ascenso, éstos han atraído el interés de los investigadores a realizar estudios y cada vez más profundos sobre el efecto de estos fármacos en el medio y sobre los organismos que lo habitan. Como existe una gran demanda de estos fármacos en el mercado hay una sobre producción y esto resulta en un aumento en la cantidad de residuos. Debido a que las plantas tratadoras de aguas residuales no eliminan al 100 % estos compuestos al ser depositados en cuerpos de agua los animales acuáticos tienen daños. Existen especies que son de alto interés comercial debido a su alto nivel nutricional como lo es *Cyprinus carpio*, ésta puede estar contaminada por el contacto con los AINEs pudiendo bioacumularse y generando radicales libres que promueven estrés oxidativo. En este estudio se plantea emplear a *Cyprinus carpio* como bioindicador empleando biomarcadores de estrés oxidativo y enzimas antioxidantes, para poder observar el efecto de los AINEs en esta especie de alto interés en México.



### 3. JUSTIFICACIÓN

Los efluentes industriales son cuerpos de agua que contienen contaminantes diversos entre los cuales están los AINEs, el etanol y el DBSS. Los tratamientos que son utilizados en las plantas tratadoras de aguas residuales no son capaces de eliminar estos compuestos y la contaminación en el agua afecta a organismos acuáticos; la carne de la especie *Cyprinus carpio* tiene un alto nivel proteico por lo cual es altamente consumida, por lo que tiene un gran interés comercial. El consumo de la especie *Cyprinus carpio* contaminada puede generar efectos sobre la salud humana. Es importante resaltar que en México no existen legislación ni límites permisibles para estos fármacos, este estudio permitirá sentar las bases para su regulación. Este estudio se realizó en las branquias de la especie *Cyprinus carpio* debido a que es una parte del organismo que está en contacto directo con el efluente de la industria. Se seleccionó como biomarcador de efecto al estrés oxidativo por el daño genérico que puede producir a las diferentes biomoléculas del pez afectando su integridad y funcionalidad.



#### 4. HIPÓTESIS

El efluente proveniente de una industria farmacéutica modificará los niveles de oxidación de lípidos, contenido de proteínas carboniladas e hidroperóxidos, así como la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en branquias de *Cyprinus carpio*.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el estrés oxidativo inducido por el efluente proveniente de una industria farmacéutica en branquias de *Cyprinus carpio*.

### 5.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar el grado de lipoperoxidación, contenido de proteínas carboniladas e hidroperóxidos en branquias de *Cyprinus carpio* después de la exposición al efluente proveniente de una industria farmacéutica.
- 2) Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en branquias de *Cyprinus carpio* después la exposición al efluente proveniente de una industria farmacéutica.



## 6. METODOLOGIA

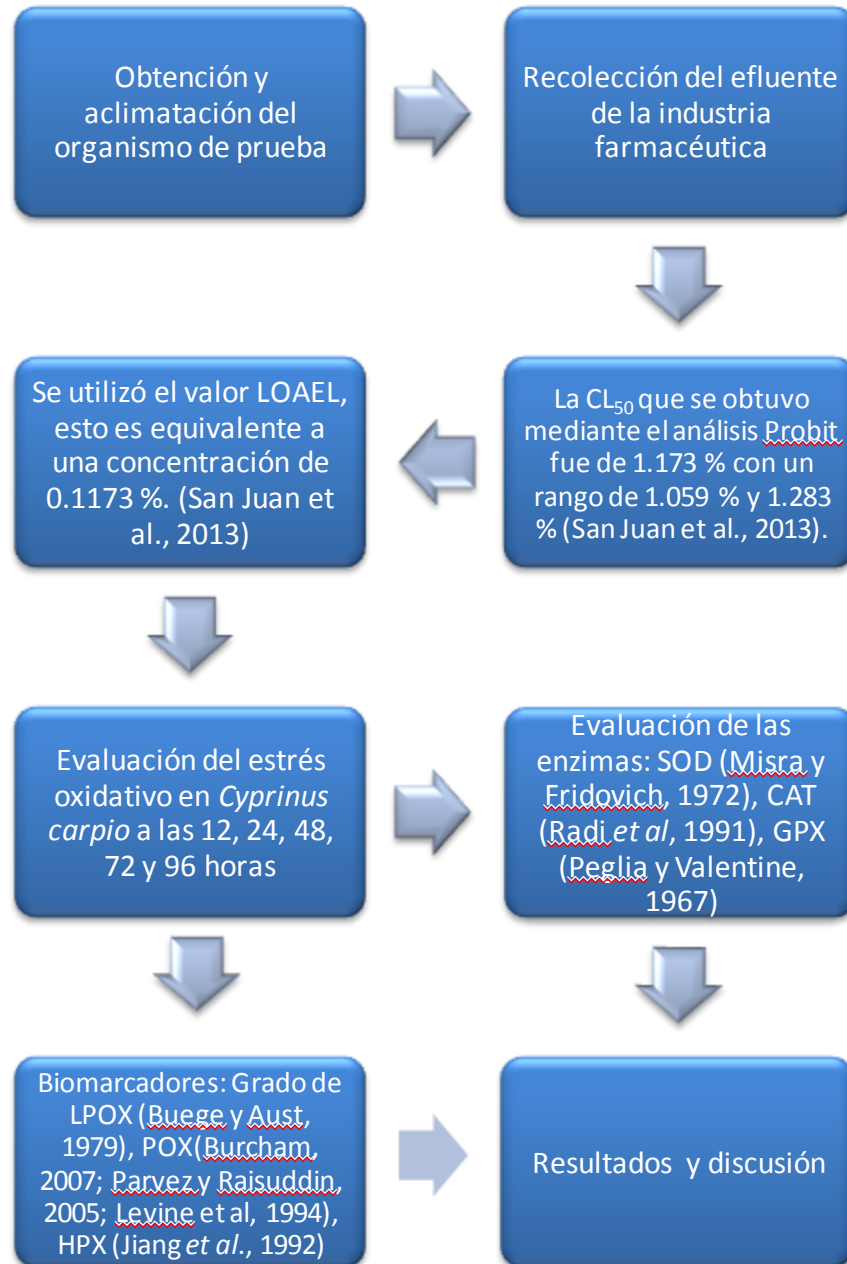


Figura 16. Diseño experimental



## 6.1 Obtención y mantenimiento de *Cyprinus carpio*

La especie *Cyprinus carpio* se obtuvo del Centro Acuícola Tiacaque, ubicado en el municipio de Jilotepec en el Estado de México. Para el mantenimiento de los organismos se les colocó en recipientes de vidrio de capacidad de 120 L, con una aireación constante y alimentación diaria.

## 6.2 Determinación de toxicidad subletal

La concentración para los ensayos fue la equivalente a 1/10 CL<sub>50</sub> es cual fue el valor del LOAEL (nivel mínimo de efecto adverso observable), esto es equivalente a una concentración de 0.1173 % (San Juan et al., 2013).

### 6.2.1 Homogenización del tejido

Primero se anestesió al organismo en agua con aceite de clavo al 5%, ya anestesiado se procedió a obtener las branquias, estas se colocaron en un tubo eppendorf con PBS a un pH de 7.4, posteriormente se llevó a 1 mL, se homogenizó y centrifugó.

### 6.2.2 Determinación de estrés oxidativo

#### 6.2.2.1 Determinación del grado de lipoperoxidación

A 100 µL de la muestra (sin centrifugar) se completó a 1 mL con solución reguladora tris-HCl 150 mM a pH 7.4 y se le adicionó 2mL de TCA-TBA (ácido tiobarbitúrico al 0.375% en ácido tricloroacético al 15 %) se indujo un choque térmico de la muestra con agua en ebullición y se dejó en un baño maría. Se incubó a 37 °C por 30 min. Concluido el tiempo se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min y se determinó la absorbancia a 535 nm. Los resultados se expresaron en



mM de malondialdehído/mg proteínas/g tejido, usando el coeficiente de extinción molecular (CEM) el cual es de  $1.56 \times 10^5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Método de Buege y Aust, 1979).

$$\text{nM de malondialdehído / mg proteínas / g tejido} = \text{Abs} / \text{CEM}$$

### 6.2.2.2 Determinación de hidroperóxidos

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra (previamente desproteinizada con ácido tricloroacético al 10 %) y se agregó 900  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción ( $\text{FeSO}_4$  0.25 mM,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25 mM, naranja de xilenol 0.1 mM y 4 mM hidroxitolueno butilado en 90% (v/v) de metanol). La mezcla se incubó durante 60 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 560 nm frente a un blanco que contuvo únicamente la mezcla de reacción. Los resultados se extrapolaron en una curva estándar, y se expresaron en nmol de CHP/mg de proteínas/g de tejido (Método de Jiang et al., 1992).

### 6.2.2.3 Determinación de proteínas carboniladas

A 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante se le adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de 10 mM de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)/2M HCl. Se incubó durante 1 h en la oscuridad. Después de la incubación se le adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 20 % y se dejó reposar durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se centrifugó a 11000 rpm durante 5 minutos. El botón se lavó dos veces con etanol-acetato de etilo 1:1 y posteriormente se disolvió en 1 mL de una solución de guanidina 6M pH 2.3 y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. La absorbancia se determinó a 366 nm. Los resultados se expresaron en mM o nM de carbonilos reactivos (C=O)



/mg proteínas, se utilizó el coeficiente de extinción molecular (CEM) de  $21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . (Método Burcham, 2007; Parvez y Raisuddin, 2005; Levine et al, 1994).

$$\text{nM de carbonilos reactivos / mg proteínas / g tejido} = \text{Abs} / \text{CEM}$$

#### 6.2.2.4 Determinación de la actividad superóxido dismutasa

Se colocaron  $40 \mu\text{L}$  del homogeneizado en una celda de cuarzo y se le adicionaron  $260 \mu\text{L}$  de la solución amortiguadora de carbonatos (carbonato de sodio  $50 \text{ mM}$  y EDTA  $0.1 \text{ mM}$ ) a pH 10.2. Se agregaron  $200 \mu\text{L}$  de adrenalina  $30 \text{ mM}$ , y se determinó la absorbancia a  $480 \text{ nm}$ , a los  $30 \text{ seg}$  y  $5 \text{ min}$ . Los resultados se expresaron en  $\text{M}$  adrenalina /mg proteínas, se utilizó el coeficiente de extinción molecular (CEM) de  $21 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . (Método de Misra y Fridovich, 1972).

$$\text{M de adrenalina / mg proteínas / g tejido} = \text{Abs} / \text{CEM}$$

#### 6.2.2.5 Determinación de la catalasa

$20 \mu\text{L}$  del sobrenadante de la muestra se colocó una celda de cuarzo, se le adicionó  $280 \mu\text{L}$  de la solución amortiguadora de aislamiento (sacarosa  $0.3 \text{ M}$ , EDTA  $1 \text{ mM}$ , HEPES  $5 \text{ mM}$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $5 \text{ mM}$ ) y  $200 \mu\text{L}$  de la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $20 \text{ mM}$ . Posteriormente se realizaron las lecturas a  $240 \text{ nm}$ , a  $0$  y  $60 \text{ seg}$  (Método Radi et al., 1991).

Los resultados que se obtuvieron de las absorbancias se utilizaron en la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de catalasa} = (A_0 - A_{60}) / \text{CEM}$$

Donde el CEM del  $\text{H}_2\text{O}_2 = 0.043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; los datos son expresados en  $\text{mM}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/g}$  tejido



### 6.3.2.6 Determinación de actividad de la glutatión peroxidasa

Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de la muestra en una celda de cuarzo y se le adicionaron 290  $\mu\text{L}$  de la solución amortiguadora de reacción ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  50mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM, glutatión reducido 3.5 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.12mM, glutatión reductasa 2 U) y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM. Posteriormente se determinó la absorbancia a 340 nm, a 0 y 60 seg (Método Peglia y Valentine, 1967)

La actividad de la enzima se calculó por medio de la siguiente ecuación

$$\text{Concentración de glutatión peroxidasa} = (A_0 - A_{60}) / \text{CEM}$$

Donde el CEM del NADPH =  $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; los datos son expresados en mM de NADPH/min/g tejido

### 6.3.2.7 Determinación de proteínas totales

A 25  $\mu\text{L}$  del sobrenadante se le agregó 75  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y 2.5 mL del reactivo de Bradford (0.05 g de azul de Commassie, 25 mL de etanol al 96% y 50 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  en 500 mL de agua desionizada). Se agitaron los tubos, se dejaron reposar por 5 min y posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm. Los resultados se extrapolaron en una curva estándar hecha con albumina (Método de Bradford, 1976).

## 6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos posterior a la exposición fueron sometidos a un análisis de varianza bifactorial (ANOVA) y las diferencias de las medias de cada grupo fueron comparadas contra el testigo correspondiente utilizando el método de *Tukey-Kramer* para comparaciones múltiples contra un testigo, con una  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

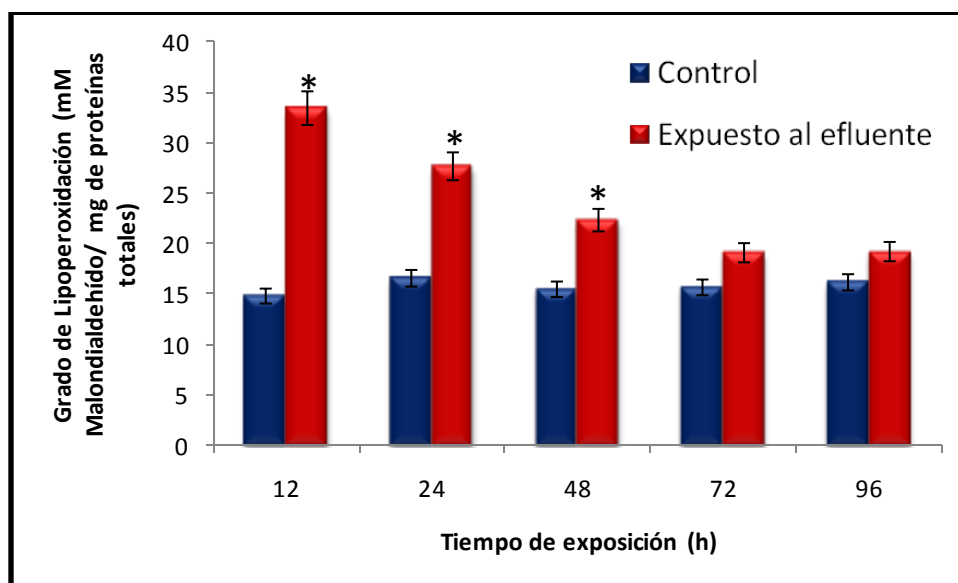
### 7.1 Determinación de toxicidad subletal

La concentración para los ensayos fue la equivalente al LOAEL, esto es equivalente a una concentración de 0.1173 % (San Juan et al., 2013).

#### 7.1.1 Determinación de estrés oxidativo

##### 7.1.1.1 Determinación del grado de lipoperoxidación

Los resultados que se obtuvieron demostraron que el grado de lipoperoxidación se incremento inversamente proporcional respecto al tiempo a las 12 h en un 126.11%, 24 h 67.06 %, 48 h 44.46 %, 72 h 21.99 % y a las 96 h 18.89 %; se ve una diferencia estadísticamente significativa a las 12, 24 y 48 h.



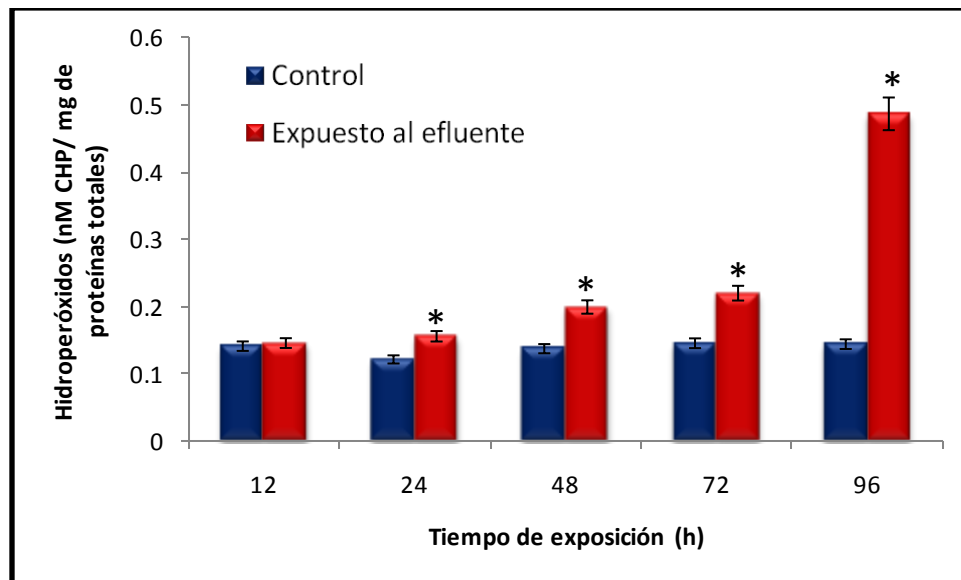
**Figura 17.** Grado de lipoperoxidación en *Cyprinus carpio* después de la exposición a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas

Se usó una n= 6 y un N= 90 ya que se realizó por triplicado

(\*) Indica diferencia significativa estadística,  $p < 0.05$  con respecto al control

### 7.2.1.2 Determinación de hidroperóxidos

Los resultados que se obtuvieron demostraron que la formación de hidroperóxidos incrementaron respecto al tiempo a las 12 h 3.26 %, 24 h 28.42 %, 48 h 45.25 %, 72 h 51.34 %, 96 h 228.48 %; se ve una diferencia estadísticamente significativa a las 24, 48, 72 y 96 h.



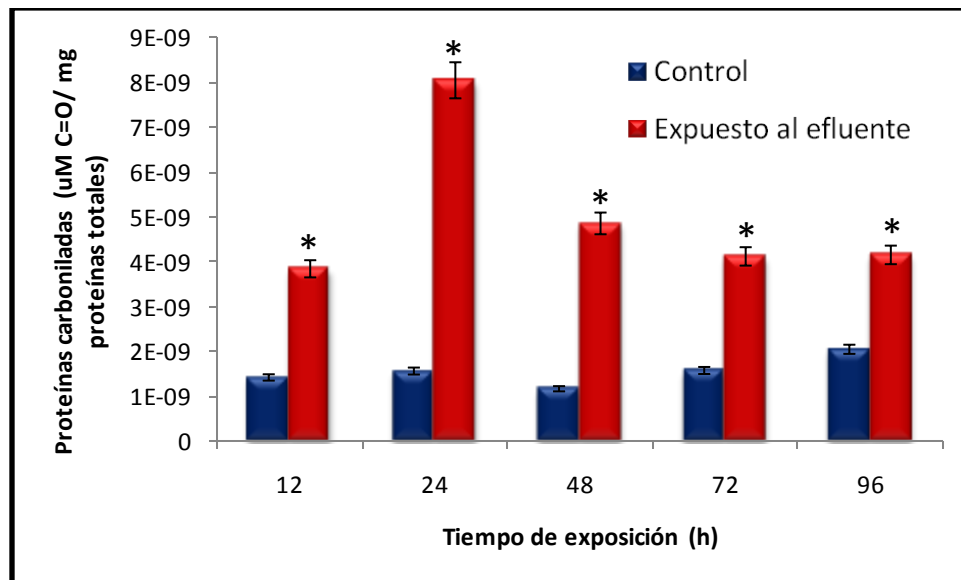
**Figura 18.** Formación de hidroperóxidos en *Cyprinus carpio* después de la exposición a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas

Se usó una n= 6 y un N= 90 ya que se realizó por triplicado

(\*) Indica diferencia significativa estadística,  $p < 0.05$  con respecto al control

### 7.2.1.3 Determinación de proteínas carboniladas

Los resultados que se obtuvieron demostraron que la cantidad de proteínas carboniladas incrementaron a las 12 h 171.63 %, 24 h 418.7 %, 48 h 318.1 %, 72 h 263.46 %, 96 h 102.84 %; se nota la diferencia estadísticamente significativa en todos los tiempos de exposición.



**Figura 19.** Formación de proteínas carboniladas en *Cyprinus carpio* después de la exposición a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas

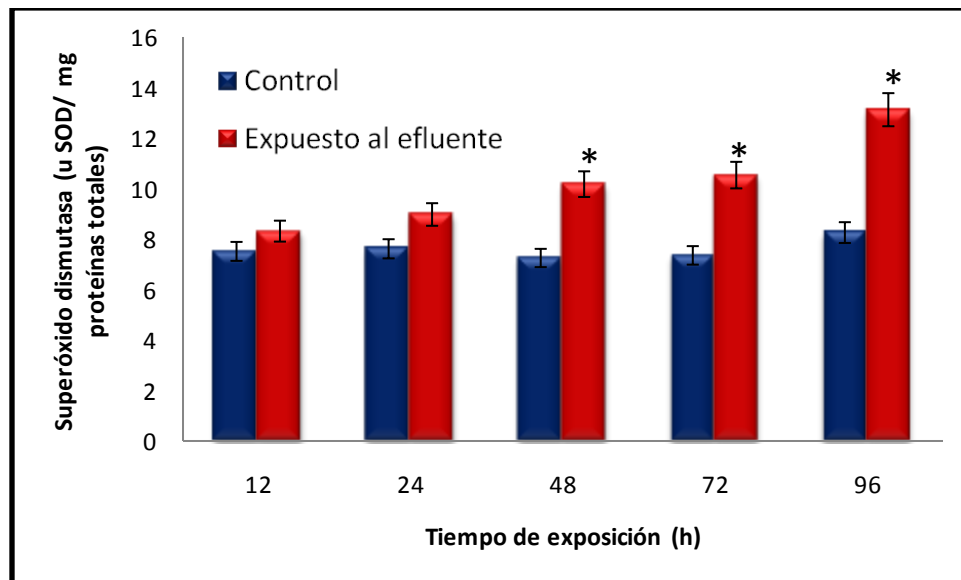
Se usó una n= 6 y un N= 90 ya que se realizó por triplicado

(\*) Indica diferencia significativa estadística,  $p < 0.05$  con respecto al control



### 7.2.1.4 Determinación de la actividad superóxido dismutasa

Los resultados que se obtuvieron demostraron que la actividad de la superóxido dismutasa incrementó a las 12 h 10.65 %, 24 h 17.87 %, 48 h 40.41 %, 72 h 43.4 %, 96 h 58.95 %; se ve una diferencia estadísticamente significativa a las 48, 72 y 96 h.



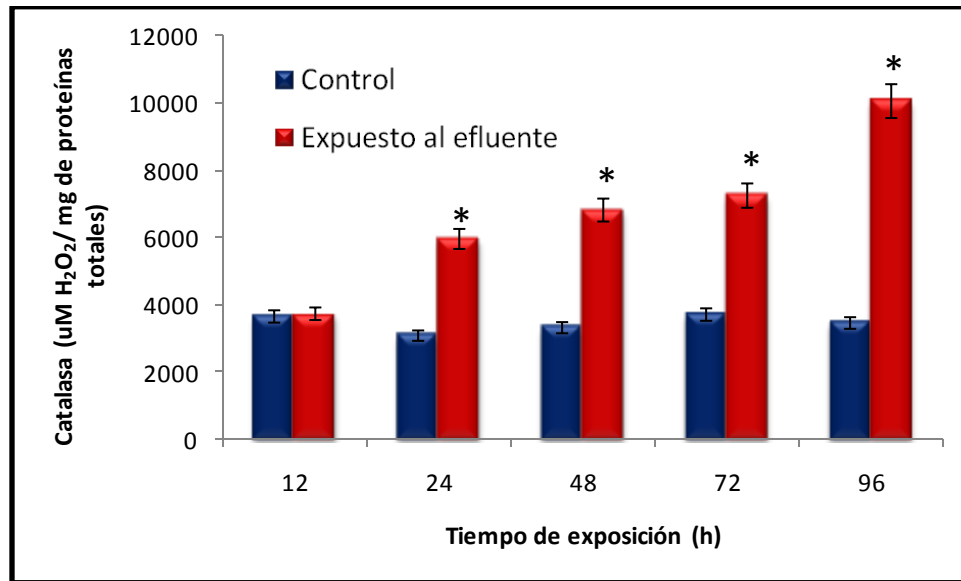
**Figura 20.** Actividad de la superóxido dismutasa en *Cyprinus carpio* después de la exposición a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas

Se usó una n= 6 y un N= 90 ya que se realizó por triplicado

(\*) Indica diferencia significativa estadística,  $p < 0.05$  con respecto al control

### 7.2.1.5 Determinación de la catalasa

Los resultados que se obtuvieron demostraron que la catalasa tuvo un incremento a las 12 h 2.2 %, 24 h 93.03 %, 48 h 105.14 %, 72 h 95.17 %, 96 h 190.41 %; se ve una diferencia estadísticamente significativa a las 24, 48, 72 y 96 h.



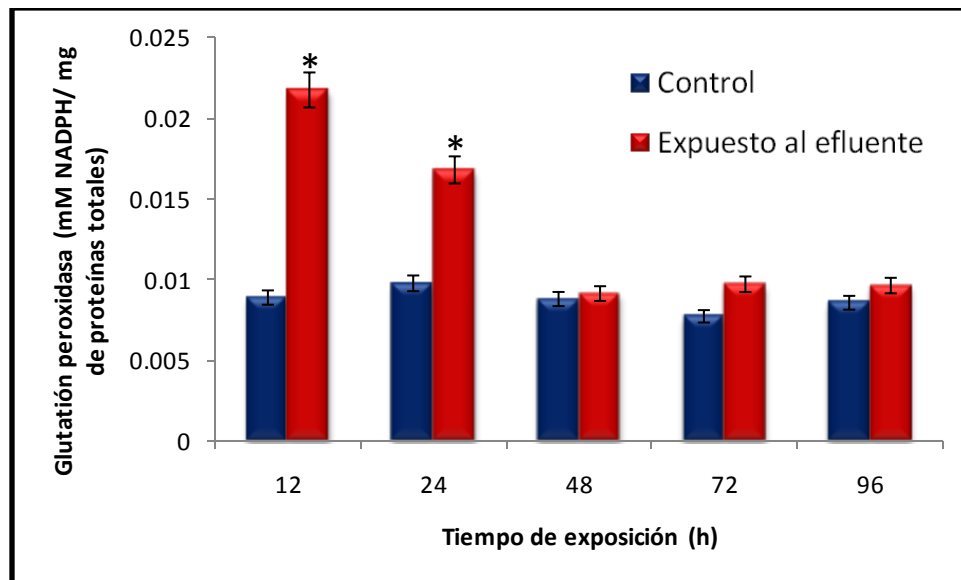
**Figura 21.** Actividad de la catalasa en *Cyprinus carpio* después de la exposición a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas

Se usó una  $n=6$  y un  $N=90$  ya que se realizó por triplicado

(\*) Indica diferencia significativa estadística,  $p < 0.05$  con respecto al control

### 7.2.1.6 Determinación de la actividad glutatión peroxidasa

Los resultados que se obtuvieron demostraron que la actividad de la glutatión peroxidasa incrementó a las 12 h 146.59 %, 24 h 72.16 %, 48 h 4.82 %, 72 h 25.97 %, 96 h 12.94 %; se ve una diferencia estadísticamente significativa a las 12 y 24 h.



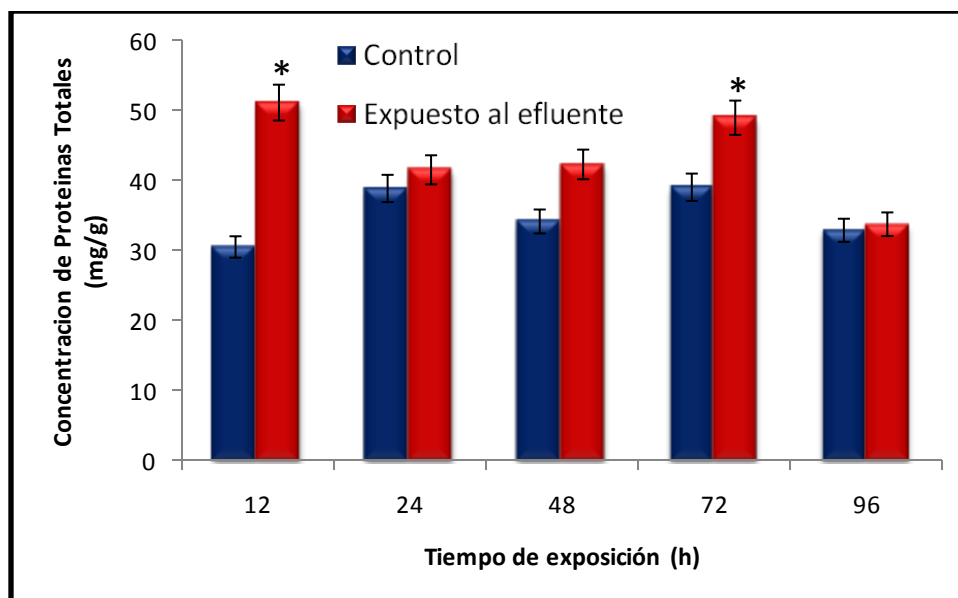
**Figura 22.** Actividad de la glutatión peroxidasa en *Cyprinus carpio* después de la exposición a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas

Se usó una n= 6 y un N= 90 ya que se realizó por triplicado

(\*) Indica diferencia significativa estadística,  $p < 0.05$  con respecto al control

### 7.2.1.7 Determinación de proteínas totales

Los resultados que se obtuvieron demostraron que las proteínas totales incrementaron a las 12 h 67.43 %, 24 h 6.83 %, 48 h 23.8 %, 72 h 25.39 %, 96 h 2.61 %; se ve una diferencia estadísticamente significativa a las 12 y 72 h.



**Figura 23.** Proteínas totales en *Cyprinus carpio* después de la exposición a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas

Se usó una n= 6 y un N= 90 ya que se realizó por triplicado

(\*) Indica diferencia significativa estadística,  $p < 0.05$  con respecto al control



## 8. DISCUSION

Ya que los AINEs bloquean a la enzima ciclooxigenasa inhiben la reacción del ácido araquidónico para la producción de prostaglandinas, lo que reduce la liberación de sustancias y mediadores inflamatorios lo cual alivia el dolor y la inflamación (Katzung et al., 2007).

La biotransformación de los AINEs conlleva a la formación de metabolitos que son capaces de formar especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que generan el estrés oxidativo. Cuando este proceso inicia se forma una cascada con la producción de radicales libres que favorece la formación de peróxidos orgánicos los responsables de los efectos citotóxicos en la célula (Jerlick et al., 2000).

Para los hidroperóxidos se observa una respuesta a las 24 horas y aumenta con cada tiempo teniendo la máxima diferencia significativa a las 96 horas debido a la cantidad de ácidos grasos en el organismo lo que genera un mecanismo en cadena con lo que existe una producción exponencial de hidroperóxidos en el organismo (Frankel, 2005).

El metabolismo del etanol por oxidación del citocromo CYP2E1 genera especies reactivas de oxígeno que conducen a la peroxidación lipídica, este metabolismo también aumenta la actividad de la superóxido dismutasa y de la catalasa (King, 2013).

Como se observa en la figura 17 el grado de lipoperoxidación presenta un aumento significativo a las 12 h, 24 h y 48 h, posteriormente disminuyó este biomarcador por el daño en el organismo lo cual causa su inhibición. Como ya se mencionó los metabolitos de los AINEs generan una producción de anión superóxido, debido a que a que estos fármacos son ácidos débiles no son ionizados por lo que son liposolubles y se difunden en células gástricas donde el



pH es muy alto y permiten que la sustancia se disocie (Barrientos et al., 2009)., por parte del metabolismo del etanol se puede producir EROs mediante la CYP2E1, el dodecil bencen sulfonato de sodio contribuye al daño mediante la modificación de las membranas lipídicas y proteicas de la célula que permiten una mayor accesibilidad de las EROs al interior de la celula: los metabolitos que tienen reacción de fase 1 generan compuestos hidroxilados por hidroxilación alifalica, oxidaciones alílicas, desaminación, hidrólisis (Batt et al., 1994); la producción de metabolitos como las benzoquinonaimidas solo pueden ser mediadas por los grupos sulfhídricos, si estos disminuyen repercuten en la actividad de la glutatión peroxidasa haciéndola deficiente (Katzung et al., 2007).

Durante el proceso del aumento del grado de lipoperoxidación se puede generar una producción de hidroxilos esto concuerda con los resultados tan altos de hidroxilos conforme al tiempo (Ela et al., 2008).

Los radicales libres son capaces de causar daño a diferentes niveles de la célula: ataca a los lípidos y proteínas de la membrana celular lo cual la inhabilita para realizar sus funciones normales, peroxidación de lípidos, modificación irreversible en las proteínas (Soledad, 2007).

Para la figura 20 de proteínas carboniladas hay una diferencia significativa durante toda la cinética respecto al tiempo lo que indica que existe una gran producción de grupos aldehídos y cetonas (Méndez, 2011), hay un daño directo a proteínas por lo que al ser carboniladas también hay un incremento en proteínas oxidadas esto refleja la pérdida de grupos sulfhídricos de la glutatión reducida lo que explica la disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa después de las 48 horas.



Para el caso de las proteínas hay oxidación de un grupo de aminoácido como la fenilalanina, la tirosina, la histidina y la metionina; esto genera entrecruzamientos de las cadenas peptídicas, y hay formación de grupos carbonilos (Jerlick et al., 2000).

La actividad de la enzima superóxido dismutasa tiene una diferencia significativa a partir de las 48 horas, con lo que refleja la mediación de los aniones superóxido los cuales pueden ser producidos por la acción del metabolismo del etanol que genera este tipo de radicales en el proceso, hubiera sido interesante alargar el tiempo de exposición para observar a que punto ya no existía la diferencia significativa (Teixeira et al., 1993).

La actividad de la enzima catalasa comienza a aumentar desde las 12 horas logrando una diferencia significativa a partir de las 24 horas e incrementa conforme al tiempo, esto concuerda con los resultados de la actividad de la enzima superóxido dismutasa, ya que a mayor acción de la superóxido dismutasa al neutralizar los aniones superóxido hay una mayor producción de peróxidos de hidrógeno para ser transformados en agua y oxígeno (Teixeira et al., 1993).

Para la actividad de la enzima glutatión peroxidasa ya no hay una diferencia significativa a partir de las 48 horas lo cual concuerda con el hecho de que el constante aumento de proteínas carboniladas acabó con los grupos sulfhídrido de la glutatión reducida los cuales se encargan de transformar las moléculas de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, además que ante la producción excesiva de peróxido de hidrógeno también se ve inhibida la enzima, por lo que si el experimento hubiera tenido más tiempo de exposición tal vez la actividad de la glutatión incluso se vería disminuida respecto al control (Teixeira et al., 1993).



El metabolito del paracetamol es el N-acetilbenzoquinonaimida que en condiciones normales es inactivado por reacción con los grupos sulfhidrilo de la glutatión reducida (Boutaud et al., 2002). La biotransformación del paracetamol se realiza en el citocromo P-450 , al tener una mayor cantidad del metabolito N-acetilbenzoquinonaimida, entra en acción la enzima CYP2E1 la cual representa el 5 % del citocromo P-450 para ayudar a metabolizar este compuesto (Katzung et al., 2007).

Cuando actúa la enzima glutatión peroxidasa en exceso hay falta de glutatión reducido, y con la presencia del radical peroxinitrilo causa oxidación y nitración de las proteínas lo cual nuevamente aumenta la cantidad de proteínas oxidadas y por lo tanto proteínas carboniladas y esto nuevamente se ve reflejado en los resultados (Teixeira et al., 1993).

Debido a que el etanol tiene un tamaño de partícula muy pequeño y es una sustancia soluble en agua, es absorbido fácilmente en el organismo afectando la membrana de las células, altera la permeabilidad y las propiedades de los componentes lipídicos de la misma (Gisbert et al., 2005), el metabolismo del etanol genera acetaldehído mediante la CYP2E1 en presencia de Nicotinamida Adenina Dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ), alcohol deshidrogenasa (ADH) y oxígeno, esto genera radicales libres como el anión superóxido e hidroxilos que explica el incremento en la formación de hidroperóxidos y la mayor actividad de la enzima superóxido dismutasa para mediar estos radicales libres.

En el caso del dodecil bencen sulfonato de sodio la tensoactividad iónica del compuesto modifica las membranas lipídicas de las moléculas permitiendo un mayor paso de radicales libres al interior de la célula creando un mayor nivel de estrés oxidativo.





## 9. CONCLUSIONES

El daño oxidativo producido por el efluente proveniente de una industrial farmacéutica se evidenció con el incremento del contenido de hidroperóxidos, del grado de lipoperoxidación y el contenido de proteínas carboniladas.

Se observó el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa respecto al control como un mecanismo para contrarrestar el daño oxidativo generado por el efluente industrial.



## 10. REFERENCIAS

Aceves C. S., Ramírez M. J. (2004). "Evaluación de la capacidad de la presa Manuel Ávila Camacho para desarrollo de la acuicultura con *Cyprinus carpio*". Escuela de ingeniería ecológica y protección ambiental.

Adams S.S. (1992). "The propionic acids: a personal perspective". *Journal Clin Pharmacol* 32 (4): p.p. 317–323.

Allegre, C.; Moulin, P.; Maisseu, M.; Chabrit, F. (2005). Treatment and reuse of reactive dying effluents, *J. Memb. Sci.*, 269, 15-34.

Alonso E., Catalano L., Corrales M., Navarro M., Revesado E. (2012). "Efectos del etanol en el desarrollo del Sistema Nervioso Central". Prezi.

Anze R., Franken M., Zaballa M. (2007). "Bioindicadores en la detección de la contaminación atmosférica en Bolivia". *Revista Virtual REDESMA*. La Paz, Bolivia.

Barceló L D., López A. M. (2005). "Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes". Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona. España.

Barrientos A., Chacón C., Luces G., Notz P., Romero I. (2009). "Empleo de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad periodontal". *Facultad de odontología, Caracas, Venezuela*. 47 (1).

Baselt R. (2008). "Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man". *Biomedical Publications*. 8th edition, Foster City, CA, p.p. 758-761.



Batt A.M., Magdalau J., Vincent-Viry M. (1994). "Drug metabolizing enzymes related to laboratory medicine: cytochromes P-450 and UDPglucuronosyl transferases". Clin Chim Acta; 226: 171-190.

Becerril J. (2009). "Contaminantes emergentes en el agua". Revista Digital Universitaria. 10 (8)

Bermudez M. (2010). "Contaminación y turismo sustentable". CETD SA.

Bernard A., Lauwerys R. (1986). "Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial chemicals". Journal Occup Med 28 (1). p.p. 559.

Boutaud O., Aronoff D.M., Richardson J.H., Marnett L.J., Oates J.A. (2002). "Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H2 synthases". Proc Natl Acad Sci USA. 99 (10).

Brooks P., Day R. (1991). "Non esteroideal antiinflammatory drugs, differences and similarities". N Engl J Med. 324 (24). p.p. 1717-1726.

Bueno J.L., Sastre H. y Lavín A.G. (1997). "Contaminación e Ingeniería Ambiental". FICYT, Oviedo.

Chaverri F. J. (2004). "Antiinflamatorios No Esteroidales Ciclooxygenasa Selectivos). Centro Nacional de Información de Medicamentos.

Clive P., Curtis M. J., Sutter M., Walker M., Hoffman B. (1998) "Farmacología integrada". Ed. Elsevier. España.

Damia Barceló (2003), Emerging pollutants in water analysis TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 22, Pages 14-16.



Ela C. M., Castillo H. J. (2008). "La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso". Facultad de Medicina "Calixto García" Ciudad de la Habana. Cuba.

Farre M., Pérez S., Kantiani L., Barceló D. (2008). "Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment". Trends in Analytical Chemistry, Vol. 27, No. 11. p.p 991-1008.

Fernandez A., et al. (2004). Surfactantes. Laboratorio FIRP. Mérida, Venezuela.

Frankel E.N. (2005). "Lipid Oxidation". The Oily Press, Bridgwater, Inglaterra. 2ª Ed.

Galán M. L., Osorio A. A., López M. A., Álvarez C. J., Álvarez J. L. (2010). "Acciones cardiovasculares del ibuprofeno".

García G. (2002). "Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente". Enfermería Comunitaria I. Salud Pública. Masón.

Gisbert C. J., Villanueva C. E. (2005). "Medicina legal y toxicología" Masson. Barcelona.

González O. (2009). "Retardantes de fuego". Ingeniería de Protección contra el Fuego.

Grandjean P., Brown S.S., Reavey P., Young D.S. (1994). Biomarkers of chemical exposure: State of the art. Clin Chem 40. p.p. 1360-1362.



Hardman J.G., Limbird L. E., Goodman Gilman A. (1996). «Capítulo 27: Analgésicos-antipiréticos, antiinflamatorios y fármacos que se utilizan en el tratamiento de la gota.». Goodman & Gilman, las bases farmacológicas de la terapéutica (9ª edición). México, D. F.: Ed. McGraw-Hill Interamericana.

Hare L., (1992), Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity, *Critical Reviews in Toxicology*. 22(5/6): 327-369.

Hoeger B., Kollner B., Dietrich D., Hitzfeld B. (2005). "Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*)". *Aquatic Toxicology* 75: (1). p.p. 53-64.

Horvath L. (1985). Egg development (oogenesis) in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). In: J. Muir & R.J. Roberts (eds.), *Recent advances in aquaculture*. Volume 2. Croom Helm, London & Sidney, Westview Press, Boulder, Colorado. pp. 31–77.

Jerlick A., Pitt A. R., Schaur R. J., Spickett C. M. (2000). "Pathway of phospholipid oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS". *Free Radic Biol Med*. 28(5). p.p.673-82.

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.

Jobling S., Burn R. W., Thorpe K., Williams R., Tyler C. (2009). "Statistical Modeling Suggests that Antiandrogens in Effluents from Wastewater Treatment Works Contribute to Widespread Sexual Disruption in Fish Living in English Rivers". *Environ Health Perspect*. 117(5): 797–802.



Katzung, Bertram G. (2007). «Chapter 36. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs, Nonopioid Analgesics, & Drugs Used in Gout». Basic & Clinical Pharmacology (9 edición). McGraw-Hill.

Lacy C., Armstrong L., Goldman M y Lance L. (2001). “Drug Information Handbook”. Ed. Internacional American Pharmaceutical Association Lexi Comp.

Lanas A., Lorente S. (2001). “Gastropatía por antiinflamatorios no esteroideos“. Programa de Actualización Nacional de Digestivo en Atención Primaria. 1ª ed. Madrid: LUZAN 5, S.A., 2.000.

López L. E. (2002). “Diclofenaco Llorens”. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Laboratorios Llorens, S.A. p.p. 7-11

Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2000). “100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. Una selección del Global Invasive Species Database”.

Luna L. A. (2010). “Mecanismos endógenos de generación de especies reactivas de oxígeno y respuesta celular antioxidante ante el estrés oxidativo”. Instituto de geriatría. p.p. 107-108.

Marrakchi S., Maibach H.I. (2006). “Sodium lauryl sulfate-induced irritation in the human face: regional and age-related differences”. Skin Pharmacol Physiol. 19(3). p.p 177-80.

Martín G.A. (2007). “El peróxido de hidrógeno como mediador en el proceso de contracción-relajación. Estudios in vitro e in vivo”. Departamento de Fisiología. Facultad de medicina. Universidad de Alcalá.



Martínez J. F, Espinosa C.F. (2005). “Ensayo de toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces *Brachydanio rerio* y *Poecilia reticulata*”.

McElwee N.E., Veltri J.C., Bradford D.C., Rollins D.E. (1990). “A prospective, population-based study of acute ibuprofen overdose: complications are rare and routine serum levels not warranted”. *Ann Emerg Med.* 19 (6): pp. 657–662.

Méndez C. D. (2011). “Proteómica redox de membrana de eritrocito humano en malaria y polimorfismos de grupos sanguíneos y G6PD”. Universidad complutense de Madrid. Facultad de veterinaria. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid.

Montoya A. M., Tataje M. J. (2004). “Biotransformación del naproxeno con *Aspergillus niger* y evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos formados”. Departamento académico de Bioquímica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. p.p. 29 – 30.

Mosquera G. J.M. y Galdós A. P. (2005). *Farmacología clínica para enfermería*, 4ª edición. Ed. Mc GrawHill- Interamericana. Madrid.

Muñoz M. (2012). “Los medicamentos, una amenaza invisible para el medio ambiente”. *Revista. La verdad es nuestra tierra.*

Noga E.J. (1996). “*Fish Disease: Diagnosis & Treatment*”. St. Louis (USA): Mosby. Chapter 22, General Concepts in Therapy; p.p. 253 – 270.

Norberg A., Jones W. A., et al. (2003). “Variabilidad en la Farmacocinética del Etanol”. *Revista Role of Variability in Explaining Ethanol Pharmacokinetics. Clinical Pharmacokinetics* 42(1). p.p. 1-31.



Nunes B., Carvalho F., Guilhermino L. (2006). "Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*". *Chemosphere* 62. p.p. 581-594.

Núñez C. C., Ventura L.P., Martínez E. J. (2001). "AINEs clásicos e inhibidores selectivos de la Cox-2". *Farmacéuticos A. Primaria Ciudad Real*. 2 (4).

Ochoa DM, González JF. (2008). "Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales". Grupo de investigación en Toxicología acuática y ambiental. Facultad de Medicina veterinaria y de Zootecnia. Colombia, Bogotá. p.p. 1-12.

Oliva S. D., Cánovas A., Mencías E. (2001). "Revisión de las intoxicaciones por paracetamol consultadas al Servicio de Información Toxicológica". Comunicación presentada en el XIV Congreso Español de Toxicología.

Ortiz P. V., López M., Arroita A., Aguilera L., Azkue J., Torre M. F., Isla B. A. (2007). "Antiinflamatorios no esteroideos y paracetamol en el tratamiento del dolor". Servicio de Anestesia, Reanimación y tratamiento del Dolor. Hospital de Basurto. p.p. 148 – 155.

Oxilia M. R. (2010). "Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante". *Rev. Inst. Med. Trop. Asunción. Paraguay*. 5(2). p.p 23-29.

Panez B. A. (2011). "Acción antimicrobiana del digluconato de clorhexidina al 0.12% en *Streptococcus* del grupo mutans después del uso de una pasta dental que contiene Lauril Sulfato de Sodio". Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima, Perú.





Repetto M. (1997). "Diagnóstico de la intoxicación". Toxicología Fundamental. Díaz de Santos, Madrid, pp. 327-333.

Rivera O.A. (2006). "AINES: Su mecanismo de acción en el sistema nervioso central". Revista Mexicana de Anestesiología. 29 (1). p.p. 36 – 40.

Roldán J., Frauca C., Dueñas A. (2003). "Intoxicación por alcoholes". ANALES Sis San Navarra; 26 (sup.1) 129-139.

Salvemini D., Doyle T.M., Cuzzocrea S. (2006). "Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation". Department of Internal Medicine. Biochemical Society. p.p 1-6.

Schafer F., Buettner G. (2001). «Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple». Free Radic Biol Med 30 (11): pp. 1191-212.

Schnick R.A., Meyer F.P., Gray D.L. (1989). "A guide to approved chemicals in fish production and fishery resource management". Little Rock (USA), US Fish & Wildlife Service – University of Arkansas Cooperative Extension Service. p.p. 241 – 289.

Segarra D. (2006). "Medicamentos en el río". El país, el archivo. Barcelona, España.

Silbergeld E.K., Davis D.L. (1994). "Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease". Clin Chem 40: 1363-1367.

Soledad A.J. (2007). "Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico". Departamento de Fisiología. Universidad de Granada. p.p. 8-11.



Stevens A., Lowe. J. (2001). "Anatomía patológica" Ed. Harcourt. Madrid.

Swierkosz TA, Jordan L, McBride M, McGough K, Devlin J, Botting RM. (2002). "Actions of paracetamol on cyclooxygenases in tissue and cell homogenates of mouse and rabbit". *Med Sci Monit* 8 (12).

Teixeira H.D., Schumacher R.I., Meneghini R. (1993). "Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase". *Proc Natl Acad Sci USA*; 90 (1). p.p. 7915-7922.

Tormo M. V., Rochina I. J. (2004). "Antisépticos. Fundamentos de uso en la práctica clínica".

Van C. H., Van S. F. (1996). "Cancer risk evaluation". *Toxicology. Principles and applications*. CRC, New York, p.p. 384-413.

Victoria P. A. (2004). "Efectos del alcohol en el desarrollo del sistema nervioso del ser humano". Salamanca.

Volans G., Hartley V., McCrea S., Monaghan J. (2003). "Non-opioid analgesic poisoning". *Clinical Medicine* 3 (2): pp. 119–23.

Wade A., Weller P. (1994). "Handbook of Pharmaceutical Excipients". American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press. Second Edition.