



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Evaluación biológica de la eficiencia de un proceso de oxidación avanzada en la remoción de contaminantes en aguas de una industria farmacéutica”

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta:

Q.F.B Karen Adriana Novoa Luna

Dirigido por:

Dr. Leobardo Manuel Gómez Olivan

Dra. Rubi Romero Romero

Dra. Reyna Natividad Rangel



Toluca Estado de México, Julio 2015

INDICE

	Pág.
1. Resumen.....	5
2. Abstract.....	6
3. Introducción.....	7
4. Antecedente.....	8
5. Justificación.....	27
6. Hipótesis.....	28
7. Objetivo.....	29
7.1.Objetivos específicos.....	29
8. Metodología.....	30
8.1. Muestreo de efluente industrial.....	30
8.2 Caracterización fisicoquímica.....	30
8.3 Cuantificación de AINE´s por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (LC-MS/MS).....	30
8.3.1 Estandar.....	30
8.3.2 Equipo.....	31
8.3.3 Curvas de calibración.....	31
8.3.4 Muestras de agua de los sistemas de prueba.....	31
8.4 Obtención, mantenimiento y reproducción de los organismos de prueba.....	32
8.4.1 Preparación del sedimento artificial.....	32

8.4.2 Sistemas de pruebas.....	33
8.4.3 Determinación de la toxicidad aguda (CL ₅₀).....	33
8.6 Determinación de la toxicidad sub-aguda.....	33
8.6.1 Determinación de proteínas totales.....	34
8.6.2 Determinación de contenido de hidroperóxidos.....	34
8.6.3 Determinación de la lipoperoxidación.....	34
8.6.4 Determinación del contenido de proteínas carboniladas.....	35
8.6.5 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa.....	35
8.6.6 Determinación de la actividad de la catalasa.....	35
8.6.7 Determinación de la actividad de la glutatión peróxidasa.....	36
8.9 Análisis estadístico.....	36
9. Resultados.....	37
10. Discusión.....	44
11. Conclusiones.....	48
12. Bibliografía.....	49
13. Artículo.....	57
14. Anexos.....	85

1. RESUMEN

La producción en la industria farmacéutica ha aumentado y con ello, la cantidad de descargas de aguas residuales de distintas características y concentraciones de contaminantes. Los principales productos químicos presentes en estos efluentes son disolventes, detergentes, desinfectantes - tales como el hipoclorito de sodio (NaClO) - y los productos farmacéuticos, todos los cuales son potencialmente ecotóxicos. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo evaluar el estrés oxidativo inducido en el anfípodo *Hyalella azteca* por el efluente que emana de una industria manufacturera de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's). Se determinó la concentración letal media (72h-CL₅₀) y posteriormente *H. azteca* fue expuesta a la concentración más baja donde se observan efectos adversos (LOAEL, 0,0732%) en tiempos de exposición de 12, 24, 48 y 72 h, y se evaluaron los biomarcadores de estrés oxidativo [contenido hidroperóxido (HPC), la peroxidación de lípidos (LPX), contenido de proteínas carboniladas (PCC), y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx)]. Se observaron aumentos estadísticamente significativas con respecto al grupo control ($P < 0,05$) en HPC, LPX y PCC en *H. azteca* en todos los tiempos de exposición. SOD, CAT y la actividad de GPx también aumentaron con respecto al grupo control. En conclusión, el efluente industrial analizado en el presente estudio que contiene AINE's y NaClO, induce estrés oxidativo en *Hyalella azteca*

2. ABSTRACT

Production in the pharmaceutical industry has increased and along with it, the amount of wastewater discharges of varying characteristics and contaminant concentrations. The main chemicals present in these effluents are solvents, detergents, disinfectants – such as sodium hypochlorite (NaClO) – and pharmaceutical products, all of which are potentially ecotoxic. Therefore, this study aimed to evaluate the oxidative stress induced in the amphipod *Hyalella azteca* by the effluent emanating from a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-manufacturing plant. The median lethal concentration (72h-LC₅₀) was determined and *H. azteca* were exposed to the lowest observed adverse effect level (LOAEL, 0.0732%) for 12, 24, 48 and 72 h, and biomarkers of oxidative stress were evaluated [hydroperoxide content (HPC), lipid peroxidation (LPX), protein carbonyl content (PCC), and the activity of the superoxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx)]. Statistically significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were observed in HPC, LPX and PCC on *H. azteca* in all exposure times. SOD, CAT and GPx activity also increased with respect to the control group. In conclusion, the industrial effluent analyzed in the present study contains NSAIDs and NaClO, and induces oxidative stress in *Hyalella Azteca*.

3. INTRODUCCION

En la actualidad, los desechos generados por la industria farmacéutica, muchos de ellos mediante descargas en aguas, han tenido o tendrán repercusiones en los organismos que la consumen, la utilizan o habitan en ella. Destacan en el grupo de fármacos los antiinflamatorios no esteróideos (AINES), pues son de uso frecuente y se ha comprobado que son generadores de estrés oxidativo en seres vivos. De ahí la necesidad de buscar métodos eficaces para la remoción de contaminantes de esta índole.

Los procesos de oxidación avanzada (POAs) han surgido como una alternativa para mitigar problemas, ya que suelen ser eficaces para la remoción de contaminantes con diferentes características. Entre estos procesos, destaca el uso del reactivo de Fenton con la irradiación de luz UV, éste proporciona la ventaja de ser poco selectivo y puede remover contaminantes con diversos grupos funcionales, sin embargo, se deben probar los efectos de aguas tratadas por este método sobre organismos vivos, ya que es común el uso de estas para actividades cotidianas o para riego, pudiendo causar efectos al entrar en contacto con la población.

El anfípodo *Hyalella azteca* ofrece muchas ventajas como bioindicador de la calidad del agua y sedimentos, entre ellas están su rápida reproducción, fácil mantenimiento en condiciones de laboratorio y su alta sensibilidad a diversos xenobióticos, convirtiéndose así en el organismo de prueba ideal para este estudio.

Para comprobar los efectos biológicos al exponer organismos a aguas contaminadas con AINES, es necesario realizar pruebas comparativas sobre organismos vivos. Se realizará la determinación de la CL50 para identificar la concentración con la que se trabajará en el estadio subletal sobre este anfípodo. Diversos estudios han demostrado que la exposición a contaminantes estimula la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno por sus siglas en inglés) en células, la inducción de aumento del grado de lipoperoxidación (LPO) y contenido de proteínas carboniladas (PCC), así como cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX), con el fin de contrarrestar los efectos de las ROS. Los cambios en estas determinaciones, permitirán evaluar los efectos del método de remoción de contaminantes en aguas residuales de una industria farmacéutica.

4. ANTECEDENTES

El agua, es un compuesto esencial para la supervivencia de los seres vivos. La disponibilidad de agua promedio anual en el mundo es de aproximadamente 1,386 millones de km³, de los cuales el 97.5% es agua salada y sólo el 2.5%, es decir 35 millones de km³, es agua dulce. De esta cantidad casi el 70% no está disponible para consumo humano debido a que se encuentra en forma de glaciares, nieve o hielo.

Del agua que técnicamente está disponible para consumo humano, sólo una pequeña porción se encuentra en lagos, ríos, humedad del suelo y depósitos subterráneos relativamente poco profundos, cuya renovación es producto de la infiltración. Mucha de esta agua teóricamente utilizable se encuentra lejos de las zonas pobladas, lo cual dificulta o encarece su utilización efectiva (CONAGUA, 2011).

El término “contaminante” se refiere a la presencia de una sustancia en el ambiente que, debido a su cantidad o composición química, prohíbe el funcionamiento de procesos naturales y produce efectos indeseables para la salud y el medio ambiente (EPA, 2014)

Las alteraciones hechas o provocadas por los seres humanos a la integridad física, biológica, química y radiológica del agua y otros medios son consideradas contaminantes.

La contaminación ambiental es una consecuencia indeseable que se presenta en formas muy diversas, así como asociaciones y sinergismos difíciles de prever, que afectan no solo la salud humana, sino también a la integridad de los ecosistemas, pudiendo ocasionar daños ecológicos irreversibles, como la pérdida de la biodiversidad de flora y fauna. Es importante señalar que la contaminación se clasifica según el sustrato en el que se encuentra es decir; suelo, aire, agua o biota.

Los contaminantes siguen una dinámica desde el momento en que se generan hasta su disposición final, está compuesta por una serie de fenómenos que se enlistan en la **tabla 1** (Barceló, 2007).

Fenómeno	Descripción
Dispersión	El contaminantes introducido al ambiente pasa de un compartimiento a otro por difusión.
Concentración	Cuando el contaminante se concentra, por la precipitación, floculación, sedimentación y diferencia de densidades.
Transporte y transferencia	Cuando el xenobiótico presente en el ambiente es llevado a otro sitio sin sufrir alteración y puede cambiar de sustrato.
Transformación	Son los cambios químico que sufre una sustancia al ingresar al cuerpo de agua. Pueden dar origen a compuestos más peligrosos que el original.
Biotransformación	Es el efecto de transformación química debido a la acción de los seres vivos del ecosistema.
Biodisponibilidad	Es la cantidad relativa de una sustancia que llega al organismo y la velocidad a la cual ocurre el proceso.
Bioacumulación	Es la transferencia de contaminantes desde el ambiente hacia el organismo.
Biomagnificación	Es el aumento de la concentración al pasar por la cadena trófica.

Tabla1. Dinámica de los contaminantes en el ambiente (Barceló, 2007).

Debido a que los contaminantes afectan al ecosistema, suelen clasificarse de diversas formas, entre ellas por el tipo de contaminante, por su origen o por el medio que contamina, destacando dentro de estos, el medio acuático debido a su importancia para la vida.

El termino contaminación acuática se refiere a la presencia de sustancias químicas, físicas o presencia microbiológica que modifica las características naturales del agua, disminuyendo su calidad y provocando daños a ser ingerida o utilizada en diversos procesos.

Las aguas residuales, ya sean de origen urbano o municipal sin tratamiento o mezcladas, son de gran importancia ya que por un lado, las descargas son abundantes y por otro, en muchos casos, son utilizadas para el riego agrícola, por lo que para prevenir el deterioro ecológico y asegurar una calidad de agua satisfactoria para el bienestar de la población, es necesario fijar los parámetros físicos, químicos y en su caso bacteriológicos de los mismos (NOM-CCA/032-ECOL/1993).

El agua, debe presentar características específicas indicadas por las leyes de cada país, en general, se deben valorar factores físicos, químicos y biológicos para poder ser empleada en diversas actividades, sin embargo, para lograr estar en condiciones óptimas, debe someterse a tratamientos para asegurar su calidad.

Los riesgos que surgen debido a la contaminación del agua son difíciles de precisar o predecir, esto se debe, a que las dosis tóxicas sobre las cuales se trabaja pueden ser muy pequeñas, y el problema aún se complica más por la presencia simultánea de diversos contaminantes y las posibles interacciones entre ellos o con el ambiente.

El estudio de los contaminantes emergentes, se encuentra entre las líneas de investigación prioritarias de los organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA), o la Agencia Europea de Medicina (Petrovic M et al., 2003). El término de “contaminantes emergentes” (CE) generalmente se utiliza para referirse a compuestos de distinto origen y naturaleza química, son un amplio grupo de sustancias de las cuales no se sabe a ciencia cierta, los posibles efectos a la salud o al medio ambiente.

Recientemente, este término, fue cambiado por el de “contaminantes de preocupación emergente” (CEC), este cambio, tiene como objetivo principal, resaltar la importancia del estudio de estas sustancias, además de aumentar el interés y fomentar a la toma de conciencia sobre el tema. Estos compuestos representan un riesgo para la salud humana y el medio ambiente asociados con su presencia, frecuencia de ocurrencia, o debido a que la fuente no es conocida.

Otra particularidad de estos compuestos, es que debido a su elevada producción y consumo, y a la introducción de los mismos en el medio ambiente, algunos son persistentes, sin embargo, no necesitan serlo para ocasionar efectos negativos, son vertidos constantemente, lo que hace que a la larga, la exposición a los mismos pueda ser continua. Un claro ejemplo pueden ser los fármacos pues cumplen las características anteriores, además, el envejecimiento de la población conlleva un aumento en el uso de fármacos y, por tanto, es un nuevo motivo de preocupación ambiental. Además, se carecen de métodos sensibles para su detección y cuantificación, y por ende, no existe normatividad que los regule (Petrovic et al., 2002).

En este grupo, se encuentran una gran variedad de productos como son: los retardantes de llama bromados, los cloroalcanos, los pesticidas polares, los compuestos perfluorados, los fármacos y las drogas de abuso, así como los metabolitos y/o productos de degradación de las clases de sustancias anteriores (Barceló, 2007).

La preocupación por estos temas ha aumentado, por ello, la EPA y un gran número de organismos internacionales (destacando los de Europa central), están trabajando para mejorar su comprensión, poniendo un particular interés en productos farmacéuticos y de higiene personal (PPCP), así como en compuestos perfluorados entre otros (EPA, 2014).

De todos los contaminantes emergentes, los que probablemente suscitan mayor preocupación y estudio en los últimos años son los fármacos, ya que el consumo de estos en los países de la UE se cifra en toneladas por año, y muchos de los más usados, se emplean en cantidades similares a las de los pesticidas (Jones OA et al., 2001). Estos químicos, en su mayoría, poseen una compleja estructura química, en su mayoría son moléculas hidrofílicas y pueden estar cargadas, incluso pueden poseer más de un grupo funcional ionizable, esto debido a que han sido diseñados para presentar un efecto biológico en los seres vivos (en específico en humanos y algunos, son diseñados para uso veterinario) (Ternes y Joss, 2006; Kummerer, 2001).

Además, el consumo de estos productos es en grandes cantidades, se estima que el consumo global en el mundo entero es de 100 000 ton/año (esta cifra corresponde al consumo promedio

per cápita mundial de 15 g/per cápita. año) (Ternes y Joss, 2006; Kummerer, 2001). La mayor parte de las investigaciones relacionadas con los productos farmacéuticos son aquellas que evidencian su presencia en el medio ambiente pero un número relativamente escaso de trabajos se centran en el tratamiento de estos productos. Están diseñados para tener un modo específico de acción, y muchos de ellos por alguna persistencia en el cuerpo. Estas características hacen que los productos farmacéuticos sean considerados para evaluar sus efectos potenciales sobre el ambiente acuático, la flora y la fauna (Kummerer, 2001).

En la **tabla 2** se presentan algunos de los grupos farmacéuticos de mayor relevancia, algunos son debido a que su consumo a nivel internacional va en aumento, por tanto existe una gran cantidad de residuos de producción, otros, de los expuestos en esta tabla, son considerados debido a que se ha comprobado que a concentraciones muy pequeñas pueden producir efectos mayores (por ejemplo las hormonas), así mismo, se dan algunas características y ejemplos de ellos de ellos.

Grupo	Características	Ejemplo
Analgésicos	<p>Son productos de venta libre, lo que incrementa su consumo.</p> <p>Es un grupo muy amplio y cada integrante sufre biotransformación, esta se produce en el hígado mediante procesos de hidrólisis, oxidación y conjugación con el ácido glucurónico.</p> <p>Actúan sobre todo inhibiendo a unas enzimas llamadas ciclooxigenasas, cruciales en la producción de prostaglandinas que son mediadoras del dolor.</p>	<p>El diclofenaco y el ácido acetyl salicílico se reportaron presentes en aguas residuales, el naproxeno, el ibuprofeno y el acetaminofén se reportaron en aguas residuales hospitalarias (Gómez, 2006)</p>

Antihipertensivos

La hipertensión arterial es la enfermedad cardiovascular más común en el mundo, por tanto, el consumo de sustancias para controlarla va en drástico aumento.

Actualmente se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción en: diuréticos, bloqueadores adrenérgicos beta, bloqueadores de los canales del calcio, bloqueadores de la enzima convertidora de la angiotensina, bloqueadores de los receptores de la angiotensina, e inhibidores adrenérgicos centrales y periféricos.

Pueden sufrir diversos tipos de biotransformación e interactuar debido a la irradiación de luz UV.

Algunos β -bloqueadores como el atenolol, el metoprolol y el propranolol son los más usados para el tratamiento de hipertensión, por tanto, se han encontrado en aguas (Ternes,1998)

Antibióticos

Son usados para combatir patógenos, se usan tanto en humanos como en animales, además, se adicionan para la conservación de algunos productos.

En la actualidad la definición de un antibiótico está siendo usada para incluir a los antimicrobianos sintéticos o quimioterapéuticos antimicrobianos como las quinolonas, sulfamidas y otros agentes antimicrobianos derivados de productos naturales y aquellos con propiedades antibióticas descubiertas empíricamente.

Entre los antibióticos con mayor reporte en los cuerpos de agua están las tetraciclinas, los aminoglicósidos, los macrólidos, los betalactámicos y la vancomicina, entre otros (Akinbowale, 2007)

	<p>Pueden actuar afectando la pared celular, bloqueando la síntesis de ADN o ARN o evitando la síntesis de ribosomas. Estas sustancias, generan resistencia.</p>
<p>Hormonas y esteroides</p>	<p>Los estrógenos son un grupo de compuestos esteroides, llamados así por su importancia en el ciclo de celo y en la función primaria de la hormona sexual femenina, siendo un compuesto muy abundante y excretado constantemente por las mujeres; entre los más estudiados están los estrógenos naturales estrone, 17-β-estradiol y estriol; y estrógenos sintéticos como el 17-α-etinilestradiol; mientras entre los andrógenos, los compuestos naturales como testosterona y androstenoide, además de los sintéticos como oxandrolona y nandrolona.</p> <p>La importancia de este grupo, radica en que a muy bajas concentraciones, pueden causar efectos potentes.</p>
	<p>Destacan los estrógenos, utilizados fundamentalmente como anticonceptivos y para el tratamiento de desordenes hormonales frecuentes como la menopausia, son los responsables en muchos casos de la aparición de fenómenos de feminización, hermafroditismo, y disminución de la fertilidad (Barceló, 2007)</p>

Tabla 2. Fármacos de interés como contaminantes emergentes

Según las propiedades físico-químicas de los fármacos y sus metabolitos y productos de degradación, y las características de los suelos, estas sustancias pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica (Barceló, 2007).

Los primeros reportes acerca de la presencia de fármacos en el agua, se produjeron en los años 70 con la identificación en aguas residuales en EEUU del ácido clofíbrico, que es el metabolito activo de varios reguladores de lípidos en sangre (clofibrato, etofilin clofibrato, y etofibrato). Sin embargo, fue hasta principios de los 90 que este tema despertó un gran interés científico y social (Barceló, 2007).

En los últimos 15 años diferentes reportes demuestran que los fármacos representan una nueva clase de contaminantes del medio ambiente. Estos productos incluyen antibióticos, hormonas, analgésicos, tranquilizantes y los productos de la quimioterapia suministrados a los pacientes con cáncer. La contaminación proviene no solo de las excreciones, donde una parte importante del fármaco es eliminado del cuerpo sin metabolizarse, sino que proviene también de la fabricación y disposición inadecuada de los desechos de estos productos (Boxall, 2004). Los fármacos han sido encontrados en aguas superficiales, en aguas subterráneas e incluso en el agua potable (Montague, 2006).

Se considera que las vías principales de productos farmacéuticos en el medio ambiente son a través de la excreción humana, la eliminación de los productos no utilizados y por el uso agrícola.

Las concentraciones a las que se han encontrado en aguas superficiales (como consecuencia de una eliminación incompleta en las plantas de depuración de aguas) o en aguas subterráneas (debido a la escasa atenuación que experimentan algunos compuestos durante la filtración a través de suelos) se sitúan normalmente en el rango de ng/L o µg/L, mientras que en suelos y sedimentos, en donde pueden persistir durante largos periodos de tiempo (la vida media del ácido clofíbrico, por ejemplo, se estima en 21 años), alcanzan concentraciones de hasta g/Kg (Hernando MD et al., 2006a; Díaz-Cruz MS, Barcelo D, 2007). Pero lo que ha despertado una mayor preocupación ha sido el hallazgo de algunos de ellos (como el ibuprofeno, el diclofenaco, la carbamacepina, o el ácido clofíbrico) en aguas potables (Bedner M, et al, 2006).

Los antiinflamatorios no esteroideos, son un grupo muy amplio y consumido de fármacos, presentan estructuras químicas diversas pero, en general, ejercen las mismas acciones farmacológicas, usos terapéuticos y presentan efectos secundarios similares (Tobin y cols., 1986).

Este grupo de fármacos presenta (en mayor o menor medida) cuatro acciones farmacológicas características que son:

- a) **Acción antiinflamatoria:** La principal acción terapéutica de los AINE's y fármacos semejantes al ácido acetil salicílico es su capacidad de disminuir la respuesta inflamatoria gracias al bloqueo de la síntesis de prostanoïdes mediante inhibición de la enzima ciclooxigenasa (Vane, 1973; Vane, 1994; Vane & Botting, 1998).
- b) **Acción analgésica:** Disminuyen la hipersensibilidad provocada por la inflamación, pero no disminuyen la percepción del dolor en los tejidos no inflamados (Kallings, 1993; Tobin y cols.1986). La respuesta analgésica que logran, indicada para dolores de baja o moderada intensidad, es más débil que la obtenida por los analgésicos narcóticos tipo morfina, en comparación con la morfina, los AINES's presentan la ventaja de que su consumo no generan dependencia.
- c) **Acción antipirética:** La fiebre, suele ser una manifestación clínica presente en los procesos inflamatorios, los AINE's, pueden ayudar a disminuir la temperatura corporal, llevándola a valores normales.
Este efecto antipirético se debe a la inhibición de la producción de prostaglandinas, como consecuencia de la actividad de la enzima ciclooxigenasa en el centro hipotalámico termorregulatorio. Existe también un mecanismo periférico, consecuencia indirecta de otros efectos provocados por los AINE's: vasodilatación e incremento del flujo periféricos, con sudoración. Como consecuencia, se incrementa la pérdida de calor (Serrano & Serrano, 1993; Insel, 1998).
- d) **Acción antiagregante:** En estudios recientes se ha encontrado presencia de AINES en mantos acuíferos, la importancia de su presencia se debe básicamente, a que han

sido formulados para tener efectos biológicos sobre los seres humanos (tanto los fármacos como sus metabolitos), sin embargo, al entrar en contacto con otros organismos, los daños pueden ser graves y diversos. Se ha comprobado que los organismos acuáticos, pueden ser muy sensibles a este tipo de sustancias, incluso en concentraciones de $\mu\text{g/L}$. (Feng, et.al. 2013)

Por otro lado, las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, pueden ocasionar alteraciones en el medio, por ejemplo, compuestos de alto peso molecular y baja solubilidad pueden sedimentarse, otros tantos, tienden a acidificar o a basificar el medio, así mismo, debido a su solubilidad, otros pueden dispersarse con gran facilidad en medio acuoso, siendo este uno de los medios más impactados por la presencia de estas sustancias

Si bien, aun es difícil determinar las concentraciones exactas de fármacos en el ambiente debido a que no siempre se cuenta con la tecnología necesaria para su detección y cuantificación, los riesgos asociados a la presencia de fármacos en el ambiente, pueden percibirse. Por ejemplo, el diclofenaco es un fármaco ampliamente usado para consumo humano y para uso veterinario, sin embargo, se ha asociado con la desaparición de los buitres blancos en la India y Pakistán (Fent K et al., 2006).

Se sabe también, que los AINE's como el ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno y el ácido acetilsalicílico, ejercen un efecto inhibitorio en relación al crecimiento, y la movilidad sobre determinadas funciones en vertebrados (no mamíferos) e invertebrados (Cleuvers, 2003, Pépin, 2006).

En un estudio realizado en por Gómez-Olivan y colaboradores en 2012, determinaron la concentración letal cincuenta (CL_{50}) en *Hyaella azteca* tras un tiempo de exposición de 72 horas a diferentes AINE's, obteniendo como resultado: diclofenaco 4.6 mg/L, paracetamol 7.7 mg/L, ibuprofeno 1.7 mg/L, naproxeno 7.6 mg/L y ácido acetilsalicílico 2.6 mg/L. Comprobaron también, que inducen estrés oxidativo en esta especie.

Las concentraciones a las que se han encontrado productos farmacéuticos en aguas superficiales (como consecuencia de una eliminación incompleta en las plantas de

depuración de aguas) o en aguas subterráneas (debido a la escasa atenuación que experimentan algunos compuestos durante la filtración a través de suelos) se sitúan normalmente en el rango de ng/L o µg/L, mientras que en suelos y sedimentos, en donde pueden persistir durante largos periodos de tiempo (la vida media del ácido clofbrico, por ejemplo, se estima en 21 años), alcanzan concentraciones de hasta g/Kg (Hernando MD et al., 2006a; Díaz-Cruz MS, Barcelo D, 2005). Santos y colaboradores en 2010 reportan la presencia de 70-19,400 ng/L de ácido acetilsalicílico, 1,300-2900 ng/L de diclofenaco; 1,750-4,50 ng/L de ibuprofeno; 160-390 ng/L de indometacina y 60.150 ng/L de ketoprofeno en afluentes y efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales.

Reportaron también las concentraciones encontradas en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales obteniendo: diclofenaco 0.99 µg/L, ibuprofeno 1.3 µg/L, 0.18 ug/L de ketoprofeno y 2.6 µg/L de naproxeno (Tixier et al 2003); diclofenaco 424 ng/L, ibuprofeno 3,086 ng/L y ácido mefenámico 133 ng/L (Ashton et al.2004); ibuprofeno, ácido mefenámico y diclofenaco en 150-2,000 ng / L (Tauxe-Wuersch et al. 2005); naproxeno, ibuprofeno, ácido salicílico (metabolito del ácido acetilsalicílico), diclofenaco en 3-47ng / L (Comeau et al., 2008); diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno en 4,4 ng / L-6,6 g / L Sui et al. 2010).

Otro compuesto presente en los efluentes industriales es de SDBS, un detergente aniónico ampliamente utilizada que tiene aplicaciones en productos para el hogar, mezclas industriales y productos de limpieza (Sirisattha et al. 2004). Su constante entrada en el medio ambiente puede ser responsable de sus altas concentraciones en las aguas residuales, que van de 0,2 a 10 mg / L e inducen toxicidad en los organismos acuáticos, como el estrés oxidativo en *Gambusia holbrooki* (Nunesetal.2008) .La presencia y la toxicidad de El etanol también se han evaluado en diversos cuerpos de agua; este compuesto se ha informado de inducir estrés oxidativo en latipes *Oryzias* (Who et al. 1996).

Los recursos hídricos del país están enfrentados a graves problemas de contaminación, la calidad del agua suele estar por debajo de los límites permisibles para la salud humana, tanto las aguas superficiales como las subterráneas, además, las normatividades no son plenamente

respetadas. El monitoreo de la calidad del agua es un proceso que debe ser eficaz, regulado y actualizado. Así mismo, la evaluación de la calidad del agua es indispensable para poder orientar esfuerzos a su reutilización.

El impacto ambiental de la contaminación a mantos freáticos, cuerpos de agua en general y en agua potable, ha aumentado la demanda de la sociedad para la remoción y saneamiento de esta, traduciéndose en regulaciones cada vez más estrictas, que han impulsado, en la última década, el desarrollo de nuevas tecnologías de purificación. En la práctica, la aplicación de los métodos de tratamiento debe tener en cuenta fundamentalmente la naturaleza y las propiedades fisicoquímicas de las aguas o efluentes a tratar (Baur et al., 2005).

Dentro de las estaciones depuradoras de aguas residuales los fármacos pueden o bien degradarse y mineralizarse rápidamente, o bien pueden permanecer invariables. Los compuestos hidrofílicos resistentes a la degradación pueden permanecer disueltos en la fase acuosa o pueden adsorberse a los fangos.

Los procesos y tecnologías existentes en la actualidad para el tratamiento de aguas residuales son diversos y se clasifican frecuentemente en tratamientos primarios, secundarios y terciarios. Los tratamientos primarios son aquellos destinados a la eliminación de sólidos suspendidos y grasas del agua residual. Los secundarios por su parte son procesos biológicos cuyo objetivo es la remoción de la materia orgánica disuelta y los terciarios tienen como fin la eliminación de los microorganismos peligrosos presentes en el agua residual (cloración, ultravioleta). La incapacidad de los sistemas biológicos convencionales para remover sustancias tóxicas y/o recalcitrantes, por un lado, y la existencia de una legislación más rigurosa respecto al control de la polución, por el otro, evidencian la necesidad de desarrollar nuevos sistemas de tratamientos. En los últimos 25 años la búsqueda de nuevos sistemas de purificación de aguas se ha intensificado y particularmente en los últimos 15 años se ha prestado una atención especial a los procesos avanzados de oxidación. Estos procesos son complementos útiles a las técnicas ya existentes como la floculación, precipitación, adsorción, ósmosis inversa, combustión y los procesos biológicos (Sarría, 2003).

Los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs) fueron definidos por Glaze et al. (1987) como aquellos procesos y tratamientos de aguas a presión y temperatura cercanas a las condiciones ambientales, que implican la generación de radicales hidroxilo en cantidad suficiente para interaccionar con los compuestos orgánicos del medio. Se trata de una familia de métodos en los que se incluyen todos los procesos catalíticos y no catalíticos que utilizan la elevada capacidad oxidante del radical hidroxilo y que se diferencian entre sí en la forma en la que generan dicho radical.

Entre los tratamientos de oxidación avanzada, destaca por su efectividad el proceso Fenton, descrito a finales del siglo XIX por H.J.H. Fenton, quien comprobó que las soluciones de peróxido de hidrógeno y sales ferrosas eran capaces de oxidar los ácidos tartárico y málico y otros compuestos orgánicos (Domenech et al., 2001).

Se sabe que en presencia de materia orgánica, los radicales generados pueden oxidarla (Fig. 1a), obteniéndose radicales (R•) altamente reactivos que pueden seguir reaccionando, bien con Fe²⁺ (Fig. 1b), entre sí (fig.1c) formándose dímeros o productos de reacciones de desproporción, o con Fe³⁺ (Fig. 1d), lo que regenera el catalizador.

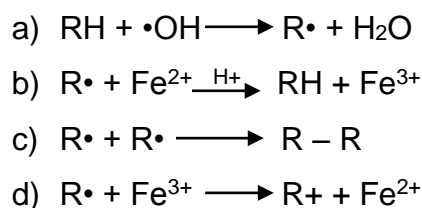


Fig. 1 Oxidación de materia orgánica (Beltrán de Heredia et al., 2001)

Los ensayos biológicos son considerados herramientas de diagnóstico, que permiten la determinación del efecto de diversos agentes sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, modificaciones en su crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Ronco, A., et al., 2004).

Los efectos pueden presentarse en diversos niveles (células, sistemas, organismos, comunidades e incluso, ecosistemas) y dependerán tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo. Sin embargo, los organismos poseen mecanismos de defensa para contrarrestar los daños, para ello, poseen diferentes estrategias, tales como reacciones metabólicas de detoxificación, excreción de tóxicos, sistemas enzimáticos, etcétera. Por tanto, la toxicidad que se evalúa en un ensayo biológico es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico (Ronco, A., et al., 2004).

Los bioensayos, se pueden clasificar dependiendo de sus características, por ejemplo:

- Su duración: corto, mediano o largo plazo.
- El método utilizado para incorporar la muestra al sistema de ensayo: estático, con renovación, de flujo continuo.
- El propósito para el cual son utilizados: control de calidad de vertidos, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad relativa, etcétera.

Para estos ensayos, se debe elegir un organismo (bioindicador) y una o varias pruebas que permitan evidenciar el daño tras la exposición a cierta sustancia (biomarcadores).

Un bioindicador es un organismo vivo que va a permitir determinar y evaluar el daño causado tras la exposición a cierta sustancia de prueba. Estos organismos deben cumplir las siguientes características:

- Alta y constante sensibilidad a tóxicos.
- Alta disponibilidad y abundancia.
- Estabilidad genética y uniformidad en las poblaciones.
- Representatividad de su nivel trófico.
- Significado ambiental en relación con el área de estudio.
- Amplia distribución e importancia comercial.
- Facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio

Si bien, no todos los bioindicadores cumplen con la totalidad de los requerimientos anteriormente mencionados, es necesario tener en cuenta que en algunos procesos de selección, los investigadores, de acuerdo con cada situación, darán mayor o menor peso a ciertos criterios de selección (Dutka, 1996).



Clase	Malacostraca
Orden	Anfípodo
Familia	Dogielinotidae
Género:	Hyalella
Clasificación NCBI	294128

La especie *H. azteca* fue descrita por primera vez en México por Saussure en 1858 y en 2002, Gonzales y Watling la describen nuevamente. Es un anfípodo epibentónico de agua dulce que vive cerca de la superficie de los sedimentos, penetra y hurgando en la basura de hojas, algas, y el material presente en el sedimento, suele encontrarse adherida a raíces de plantas presentes en su medio.

Son tolerantes a una amplia gama de hábitats y pueden sobrevivir temperaturas extremas de 0 °C a 33 °C; aunque el crecimiento y la reproducción óptima se producen de 20-28 °C. Si bien se encuentran principalmente en hábitats de agua dulce, también son resistentes a la salinidad, tolerando hasta 15 o / oo (EPA 2000).

Su contacto continuo con los sedimentos, su fácil mantenimiento y reproducción en el laboratorio, y la tolerancia a los parámetros ambientales más variado, hacen de *H. Azteca* una especie ideal para evaluar la toxicidad de los sedimentos y la biodisponibilidad de los contaminantes en un medio acuático (Burton et al. 2003), además, su amplia distribución en todo tipo de ríos, es indicio de su importancia en la cadena trófica.

Por otro lado, es necesario hablar de los biomarcadores. Una definición del término “biomarcador” es: un cambio bioquímico, celular, fisiológico o variación de comportamiento

que pueden medirse en muestras de tejidos, fluidos corporales o en organismos completos, para proporcionar evidencia de la exposición y / o efectos de uno o más contaminantes (Depledge 1994). En diversos estudios, se ha comprobado que gran cantidad de sustancias, entre ellas los fármacos (como los AINE's), inducen estrés oxidativo en gran variedad de especies animales.

Helmut Sies en 1985 definió el estrés oxidativo como “una situación de desequilibrio con un aumento de oxidantes o con una disminución de antioxidantes”, este puede ser causado por las especies reactivas de oxígeno y los radicales libres.

Un radical libre se define como un átomo o grupo de átomos que contienen un electrón desapareado dentro de su estructura. Estos presentan alta reactividad y buscan combinarse para generar moléculas más estables.

Los radicales libres se forman cuando un enlace se fragmenta hemolíticamente, esto requiere mucha energía, esto se puede lograr mediante energía térmica, fotoquímica, radioquímica o mediante reacciones de óxido-reducción.

Dentro de las especies reactivas de oxígeno, podemos encontrar al ozono (O₃), al oxígeno singulete, el superóxido y el peróxido de hidrógeno, estos suelen reaccionar con una variedad de sustancias y pueden ocasionar estrés oxidativo.

Si bien se ha demostrado que tanto las especies reactivas de oxígeno como las de nitrógeno son usadas en diversos procesos fisiológicos que abarcan desde el crecimiento y proliferación hasta la diferenciación y muerte celular, ayudando en la transducción de señales donde algunas especies actúan como segundos mensajeros. Sin embargo, diversas actividades y condiciones a las que nos encontramos expuestos diariamente, ocasionan un desbalance, provocando con esto, daños en diversos niveles.

a) Daño a lípidos

Las membranas celulares están conformadas por una bicapa lipídica de carácter antipático (poseen una parte polar y una no polar), esto les permite poseer una estructura fluida.

Si los lípidos que conforma esta membrana, son expuestos a las ERO, se ocasiona la producción de compuestos tóxicos, se modifica su fluidez y permeabilidad, así como la actividad de las proteínas, las enzimas, los receptores o canales iónicos asociados a ellas, esto pone en riesgo la estructura y función celular.

Esta peroxidación de los lípidos puede ocurrir por la vía no enzimática y por la enzimática. En el primer caso, las ERO's causan daños a los lípidos de la membrana liberando radicales que propagan el proceso, esto crea una acumulación de hidroperóxidos que se descomponen en diversos productos, entre ellos se encuentran el malondialdehído (MDA), el hexanal, el 4-hidroxinonanal (4HNE).

En la lipoperoxidación enzimática, los ácidos grasos oxidados, son liberados de los lípidos de las membranas con ayuda de fosfolipasas.

b) Daño a proteínas

Después del agua, las proteínas son el componente más abundante en los sistemas biológicos, de ahí la importancia de su estudio.

Las ERO's, tienden a reaccionar más rápido con cadenas laterales ricas en electrones, tal es el caso de los residuos de los aminoácidos triptófano, tirosina, histidina, metionina, cisteína y fenilalanina. Además de este daño, las ERO's pueden afectar a la columna vertebral de la proteína. Las reacciones que se llevan a cabo, se acompañan de un cambio en la función de la estructura, función y actividad de la proteína.

c) Daño a DNA

Se sabe que múltiples agentes endógenos o exógenos, como las ERO's, pueden modificar el DNA celular teniendo consecuencias biológicas serias como lo son mutaciones o transformaciones carcinogénicas, e incluso pueden llevar a la muerte celular.

Por otro lado, tenemos a los antioxidantes, estos son un conjunto de compuestos químicos o productos biológicos que contrarrestan de una manera directa o indirecta los efectos nocivos de los radicales libres u oxidantes, tales como oxidación a lípidos, proteínas y ácidos

nucleicos, alterando las funciones celulares. Se han clasificado en dos principales sistemas, el sistema enzimático y no enzimático.

Conocidos también como antioxidantes no enzimáticos, están integrados por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres, estos logran retrasar la producción y acción de los radicales libres. Como ejemplos tenemos al ácido lipoico, la bilirrubina, las ubiquinonas, los bioflavonoides, la vitamina E (alfa tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina A, los carotenoides, acetil-L- carnitina, coenzima Q10, curcumina, N-acetil-cisteína (NAC), resveratrol, selenio, vitamina B; también incluye minerales como el selenio, cobre, zinc y magnesio pues forman parte de la estructura molecular de algunas de las enzimas antioxidantes. Las vitaminas C y E, los carotenoides, el selenio y flavonoides son las moléculas químicas antioxidantes más conocidas (Lademann J, et al., 2011).

También llamados antioxidantes enzimáticos, están conformados por enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peróxidasa (GSH-PX), tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa.

La catalasa está ampliamente distribuida en el organismo humano pero su actividad varía según el tejido en el que se encuentre. En la célula se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol (Chance B, et al., 1955).

Tiene como función la destrucción del H_2O_2 generado durante el metabolismo celular. Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero relativamente poca afinidad por el sustrato. Presenta 2 funciones: la catalítica y la peroxidativa.

Por su parte, la glutatión peroxidasa es una enzima que forma parte del mecanismo de defensa antioxidante, evita la oxidación de los L-OOH, reduciéndolos en presencia de glutatión reducido (GSH). Esta reacción produce hidróxidos que son elementos potencialmente dañinos y que al oxidarse se convierten en radicales alcohólicos, para los que no se conoce enzima que los metabolice (Lam KW, et al., 1993, Maiorino M, et al., 1991).

La superóxido dismutasa es una metaloenzima ampliamente encontrada en las células, que permite la dismutación del ión superóxido en peróxido de hidrógeno y cuya acumulación se evita por el sistema de catalasa/glutación peroxidasa, transformándolo en oxígeno no molecular, agua y glutación oxidado (Robbins D, et al., 2011).

5. JUSTIFICACIÓN

Las actividades humanas generan grandes cantidades de residuos, muchos de estos son desechados a mantos acuíferos. La industria farmacéutica es uno de estos grandes generadores, ocasionando problemas debido a que compuestos como los AINES, al ir disueltos en agua, llegan a causar graves daños al ambiente y a los organismos que en el habitan, esto debido a que generan estrés oxidativo.

Los procesos de oxidación avanzada, son eficaces para la remoción de contaminantes, más aun, en el caso del uso del reactivo de Fenton, su eficacia aumenta al ser combinado con la irradiación de luz UV, esto nos muestra disminuciones considerables y poco selectivas de los contaminantes.

Sin embargo, es necesario demostrar la eficiencia biológica de este método, debido a que el agua tratada, suele emplearse como agua de riego afectando no solo a los organismos, sino también a quienes consumen alimentos regados con estas aguas. Los biomarcadores, como las determinaciones de estrés oxidativo, permiten evaluar y comparar datos entre los efectos sufridos por los organismos de prueba en aguas residuales y los mismos organismos pero expuestos a aguas residuales con tratamiento previo por POAs.

El bioindicador *Hyaella azteca* permite llevar a cabo las determinaciones antes mencionadas, destacando su fácil reproducción y mantenimiento así como su sensibilidad ante la presencia de contaminantes.

En la actualidad, es necesario no sólo aplicar métodos para el tratamiento de aguas, sino que se requiere evaluar los cambios en los efectos biológicos que sufren los organismos al ser expuestos a estas aguas, esto permitirá dar una solución integral a los problemas de contaminación generados por las aguas residuales de las industrias farmacéuticas que cada día presentan mayor demanda.

6. HIPÓTESIS

El método de oxidación avanzada será útil para la remoción de contaminantes de aguas de una industria farmacéutica, dando características idóneas para la vida de organismos, esto se determinará basándose en los resultados obtenidos de las determinaciones de estrés oxidativo al exponer al anfípodo *Hyalella azteca* a estas aguas.

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar biológicamente la eficiencia de un método de remoción de contaminantes de aguas residuales de la industria farmacéutica mediante un proceso de oxidación avanzada usando *Hyalella azteca* como bioindicador.

7.1 Objetivos específicos

- Determinar la CL_{50} sobre *Hyalella Azteca* al ser expuesta a aguas residuales de la industria farmacéutica.
- Determinar el grado de lipoperoxidación, contenido de hidroperoxidos y contenido de proteínas carboniladas por exposición a aguas residuales de la industria farmacéutica sobre *Hyalella azteca* para establecer el daño subletal.
- Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peróxidasa por exposición a aguas residuales de la industria farmacéutica sobre *Hyalella azteca*.
- Determinar el grado de lipoperoxidación, contenido de hidroperoxidos y contenido de de proteínas carboniladas por exposición a aguas residuales de la industria farmacéutica tratadas con un método avanzado de oxidación sobre *Hyalella azteca*.
- Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peróxidasa por exposición a aguas residuales de la industria farmacéutica tratadas con un método avanzado de oxidación sobre *Hyalella azteca*.

8. METODOLOGÍA

8.1 Muestreo de efluente industrial

El efluente que emana de una planta de fabricación de AINE's en Toluca (Estado de México) se muestreó mediante el procedimiento estipulado en la norma oficial mexicana para la toma de muestras de aguas residuales (NMX-AA-003-1980). Las muestras se tomaron a la salida de la zona de producción que se conecta directamente con la salida de aguas de la industria. Las muestras se recogieron en recipientes de polietileno de 20 L, previamente lavados con ácido nítrico (Sigma-Aldrich) 30% y después con agua desionizada, las muestras se taparon, identificaron y protegieron de la luz, inmediatamente se trasladaron al laboratorio y se almacenaron a 4 ° C .Es importante indicar que los desechos no tienen ningún tipo de tratamiento previo y van directamente al efluente municipal de la ciudad de Toluca, México. Después del muestreo, se realizó la caracterización físico-química de los efluentes.

8.2 Caracterización fisicoquímica

Las características físico-químicas de las muestras de efluentes [temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, pH, cloruros, fluoruros, dureza, amoníaco, sólidos suspendidos totales, fósforo total, nitrógeno total, la demanda bioquímica de oxígeno, y el hipoclorito de sodio (NaClO)] se determinaron como se estipula en las normas oficiales mexicanas NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-073-ECOL-1994 [30,31] y APHA, AWWA, WPCF. Las normas oficiales mexicanas establecen los niveles máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales que se plantean en las industrias farmacéutica y farmacoquímicas y entran, respectivamente, aguas internas y los recursos, y la recepción de los cuerpos de agua; mientras APHA, AWWA, WPCF establecen los métodos de referencia para el examen de agua y aguas residuales.

8.3 Cuantificación de AINE's por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (LC-MS/MS)

8.3.1 Estandar

Las soluciones estándar se prepararon en una mezcla 60:40 de acetonitrilo y formiato de amonio a pH 6 (el pH se reguló usando HCl 1M). Estandars de 10 mg mL⁻¹ de DCF, IBP,

NPX y PAR se prepararon y almacenaron en la oscuridad a -8°C . A $1000\ \mu\text{g ml}^{-1}$ la solución se utiliza para calibrar el espectrómetro de masa (MS), $200\ \mu\text{g ml}^{-1}$ de solución para estudios de recuperación, y soluciones que contienen 1, 2, 10, 50, y $250\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de los AINE anteriores para la calibración del instrumento.

8.3.2 Equipo

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) -MS / MS utilizada fue un Agilent 1290 unidad Infinito HPLC (Santa Clara, CA). La columna de cromatografía fue RRHD Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm, 1,8- μm) y se mantuvo a 40°C . La fase móvil era una / v mezcla 60:40 v de acetonitrilo y formiato de amonio (10 mM). La tasa de flujo fue de $0,3\ \text{ml min}^{-1}$, el tiempo de ejecución 1,8 min, y el volumen de inyección de 2 mL. DCF, IBP, NPX y PAR se cuantificaron en un Agilent 6430 de triple cuadrupolo MS equipado con ionización por electrospray (ESI). El modo positivo ESI se utilizó en todo. Tensión electropulverización funcionar a 4000 V como el MS recolectó datos en el modo de ion negativo. Optimización MS se realizó por infusión directa de una solución estándar de $10\ \text{mg mL}^{-1}$ de DCF, IBP, NPX y PAR; A continuación, se selecciona el modo de modo de ionización y el ion precursor. Estos fármacos fueron seleccionados porque son uno de los remedios medicinales más utilizados en México.

8.3.3 Curvas de calibración

Las curvas de calibración de cada uno de los AINE's se determinaron utilizando soluciones estándar de 1, 3, 10, 50 y $250\ \text{mg ml}^{-1}$ preparados en una mezcla 60:40 de acetonitrilo y formiato de amonio a pH 6. Los coeficientes de regresión lineal (R^2) fueron > 0.99 por DCF, IBP, NPX y PAR. El detector de MS / MS se mantuvo de acuerdo con las especificaciones del fabricante y es limpiado regularmente, pero cuando los cambios en las pendientes de la curva de calibración se observaron $>50\%$, se le dio una limpieza adicional haciendo que la fase móvil utilizada pase bajo las mismas condiciones de trabajo durante 30 min.

8.3.4 Muestras de agua de los sistemas de prueba

Las muestras de agua (5 ml) tomadas directamente de los tres recipientes 60-L para cada tiempo de exposición se recogieron en viales de vidrio y fueron refrigeradas a 4°C para su

posterior determinación de concentraciones de ensayo. Las muestras se filtraron al vacío a través de filtros de microfibra de 1-0 micras GF/ C de cristal, seguido de filtros de membrana de nylon 0,45- micras (Whatman, Cambridge, UK). A la extracción líquido-líquido con 5 ml (1: 1, v / v) de hexano / acetato de etilo se lleva a cabo para extraer DCF, IBP, NPX y PAR a partir de muestras de agua 1 ml. Estas muestras se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 min y la capa orgánica superior se extrajo de nuevo. La extracción se repitió y las capas orgánicas se combinaron y se evaporaron a sequedad. El procedimiento se llevó a cabo por quintuplicado. Los resultados se expresan como concentraciones medias ponderadas en el tiempo de DCF, IBP, NPX y PAR.

8.4 Obtención, mantenimiento y reproducción de los organismos de prueba

La *Hyaella azteca* se colectó de su hábitat natural en el lago de San Miguel Almaya, municipio de Chapultepec (Estado de México), y fue transportada al laboratorio en contenedores plásticos con aireación constante. Durante el cultivo, las muestras se mantuvieron en agua reconstituida ($\text{NaHCO}_3 = 174 \text{ mg /L}$, $\text{MgSO}_4 = 120 \text{ mg /L}$, $\text{KCl} = 8 \text{ mg /L}$, y $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 120 \text{ mg /L}$; todos los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), pH 7.5 a 8.5 y temperatura ambiente con oxígeno constante (6.4 a 6.6 mg /L, 7260 Environ Monit Evaluar (2014) 186: 7259-7271O2), con fotoperiodos 12-h / 12 h de luz /oscuridad y fueron alimentados a libitum con lechuga. Los organismos utilizados en los ensayos de toxicidad fueron neonatos de tercera generación obtenidos mediante reproducción sexual a partir de un cultivo de 4 meses de edad.

8.4.1 Preparación del sedimento artificial

El sedimento está conformado por arena 70% (0,2 mm), 20% caolinita (<0,002 mm), y 10% de materia orgánica (0,2 mm). La fuente de materia orgánica se obtiene de composta de cordero inactivado por calor seco a 55-60 ° C durante 3 días. El sedimento se esteriliza con tres ciclos de 15-min en la autoclave a 121 ° C y presión de 15 libras, separados por intervalos de 1 h (Martínez-Tabche et al., 2000).

8.4.2 Sistemas de pruebas

Los sistemas de pruebas se establecieron mediante la adición de agua reconstituida y sedimento artificial en una proporción de 3:1 en recipientes de polietileno de 150 ml equipados con oxigenación constante y mantenido bajo a 12 h / 12 h fotoperíodo a temperatura ambiente. Se utilizaron sistemas estáticos, sin renovación de medio, y no se les proporcionó alimento a los especímenes durante la exposición.

8.5 Determinación de la toxicidad aguda (CL₅₀)

Los sistemas de pruebas se realizaron en recipientes de polietileno de 20 mL, conteniendo una relación de 3:1 de agua reconstituida y sedimento artificial bajo un fotoperíodo horas luz/oscuridad de 16 h: 08 h a temperatura ambiente. Los sistemas de intoxicación fueron estáticos sin renovación de medio, no se proporcionó alimento a los especímenes durante los períodos de exposición.

La concentración letal media (CL₅₀) de las aguas residuales en *H. azteca* se determinó a través de cinco pruebas en sistemas con diferentes concentraciones de aguas residuales y un sistema de control libre de aguas residuales. Cada uno contenía diez especímenes. Los especímenes muertos se contaron después de 72 horas. Se realizaron cinco repeticiones del ensayo. Se realizó un análisis Probit y la significancia fue evaluada por el grado de 95% de superposición LC₅₀ (v1.5 Programa de Análisis de la EPA). La prueba de ajuste χ^2 lineal no fue significativo en $p < 0,05$.

8.6 Determinación de la toxicidad sub-aguda

En el ensayo de toxicidad subletal se usaron sistemas de prueba a los que se les adiciono agua residual/ kg de sedimento (equivalente al valor del NOAEL). Se añadieron 150 mg de peso húmedo de *H. azteca* (se usarán organismos enteros, adultos y que no estén en periodo de apareamiento).

Los tiempos de exposición fueron de 0, 12, 24, 48, y 72 h después de lo cual se extrajeron los organismos retirándoles el exceso de humedad, estos se homogenizaron en 1 ml de solución de tampón Tris (pH 7). La mezcla se mantuvo en un baño de hielo durante todo el procedimiento. El sobrenadante se centrifugo a 12.500 rpm y -4 ° C durante 15 min.

Se evaluaron los siguientes marcadores: HPX, LPO y PCC, además, la actividad de enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX. El contenido total de proteína se utilizó para expresar los resultados de todos los biomarcadores empleados. Todas las pruebas se realizarán en el sobrenadante excepto para la determinación de LPO en que se utiliza el precipitado celular. Se realizaron cinco repeticiones de cada prueba.

8.6.1 Determinación de proteínas totales

Para 25 μ l de sobrenadante se añadieron 75 μ l de agua desionizada y 2,5 ml de reactivo de Bradford (0.05 g de colorante azul de Coomassie, 25 ml de etanol al 96%, y 50 ml de H_3PO_4 , en 500 ml de agua desionizada). Los tubos se agitaron y se dejó reposar durante 5 minutos antes a la lectura de la absorbancia a 595 nm y se realizó la interpolación en una curva de albúmina bovina (Bradford 1976).

8.6.2 Determinación de contenido de hidroperóxidos

HPC se determinó por el método Jiang et al. (1992). Para 100 μ l de sobrenadante (previamente desproteinizado con 10% de ácido tricloroacético) (Sigma-Aldrich, St. Louis) se añadieron 900 μ l de la mezcla de reacción [0,25 mM $FeSO_4$ (Sigma-Aldrich, St. Louis), 25 mM H_2SO_4 (Sigma -Aldrich, St. Louis), 0,1 mM de naranja de xilenol (Sigma-Aldrich, St. Louis) y 4 mM hidroxitolueno de butilo (Sigma-Aldrich, St. Louis) en 90% (v / v) de metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis)]. La mezcla se incubó durante 60 min a temperatura ambiente y la absorbancia se leyó a 560 nm frente a un blanco que contiene sólo mezcla de reacción. Los resultados se interpolan en la curva y se expresaron como nM CHP (hidroperóxido de cumeno) (Sigma-Aldrich, St. Louis) $mg\ prote\acute{a}na^{-1}$.

8.6.3 Determinación de la lipoperoxidación

La determinación de LPX se realizó utilizando el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (Buege y Aust 1978). A cien microlitros del sobrenadante se le adicionan solución tampón Tris-HCl de pH ,4 (Sigma-Aldrich, St. Louis) para completar un volumen de 1 ml. Las muestras se incubaron a 37 ° C durante 30 min; Se añadieron 2 ml de reactivos TBA-TCA [ácido tiobarbitúrico 0,375% (Fluka-Sigma-Aldrich, Toluca, México) en ácido tricloroacético 15% (Sigma-Aldrich, St. Louis)], y las muestras se agitaron en un vórtex.

Posteriormente se calentó a ebullición durante 45 min y se dejó enfriar, el precipitado se separó por centrifugación a $3000 \times g$ durante 10 min. Se leyó la absorbancia a 535 nm frente a un blanco de reacción. Se calculó el contenido de MDA utilizando el coeficiente de extinción molar (MEC) de malondialdehído (MDA) ($1,56 \times 10^5 \text{ M} / \text{cm}$). Los resultados se expresaron como milimoles de MDA por miligramo de proteína⁻¹.

8.6.4 Determinación del contenido de proteínas carboniladas

La determinación del contenido de proteínas carboniladas PCC se realizó por el método de Levine et al. (1994), modificado por Parvez y Raisuddin (2005) y Burcham (2007). Para 100 μL de sobrenadante se añaden 150 μL de 10 mM dinitrofenil hidrazina en HCl 2 M (Sigma) antes de la de incubación a temperatura ambiente durante 1 h en la oscuridad. A continuación se añaden 500 μL de ácido tricloroacético al 20%, y la muestra se dejó reposar durante 15 min a 4°C , El precipitado se centrifugó a $11.000 \times g$ durante 5 min. El boton se lavó varias veces con 1: 1 de etanol / acetato de etilo, después se disolvió en 1 ml de guanidina 6 M (pH 2.3), y se incubó a 37°C durante 30 min. Los reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich, St. Louis. La absorbancia se leyó a 366 nm. Los resultados se expresaron como nanomolares de carbonilos reactivos formados ($\text{C} = \text{O}$) por miligramo de proteína, utilizando el CEM de $21.000 \text{ M} / \text{cm}^{-1}$.

8.6.5 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa

La actividad de SOD se determinó por el método de Misra y Fridorich (1972). Se añaden a una cubeta de 1 cm, 40 μL de sobrenadante, 250 μL de una solución tampón de carbonato (carbonato de sodio 50 mM y 0.1 mM EDTA), pH 10.2, y 200 μL de adrenalina (30 mM). Todos los reactivos fueron de Sigma-Aldrich, St. Louis. La absorbancia se leyó a 480 nm después de 30 s y 5 min. La actividad enzimática se determinó utilizando el MEC de SOD ($21 \text{ M} / \text{cm}$). Los resultados se expresaron como unidades internacionales de SOD por miligramo de proteína⁻¹.

8.6.6 Determinación de la actividad de la catalasa

La actividad de la catalasa CAT se determinó de acuerdo con Radi et al. (1991). Para 20 μL de sobrenadante se añade 1 ml de una solución tampón de aislamiento [(0.3 M de sacarosa

(VETEC-Sigma-Aldrich, St. Louis), 1mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis), 5 mM de HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis), y 5 mM de KH_2PO_4 (VetecSigma-Aldrich, St. Louis)] y 0.2 ml de peróxido de hidrógeno 20 mM (VETEC-Sigma-Aldrich, St. Louis)). La absorbancia se leyó a 240 nm después de 0 y 60 s. Los resultados se derivan mediante la sustitución del valor de absorbancia obtenido para cada uno de estos tiempos mediante la fórmula: concentración de CAT = $(A_0 - A_{60}) / \text{MEC}$, donde el MEC de H_2O_2 es 0,043 mM / cm y se expresó como micromoles de H_2O_2 por miligramo de proteína⁻¹.

8.6.7 Determinación de la actividad de la glutatión peróxidasa

La actividad de la glutatión peroxidasa GPX se determinó por el método de Gunzler y Flohe-Clairborne (1985) modificado por Stephensen et al. (2000). Para 100 μl del sobrenadante, se añadió 10 μl de glutatión reductasa (2 U glutatión reductasa, Sigma-Aldrich, St. Louis), mas 290 μl de buffer de reaccion [50 mM MK_2HPO_4 (VETEC, St. Louis), 50 mM KH_2PO_4 50 (VETEC, St. Louis) pH 7,0, 3,5 mM de glutatión reducida (Sigma-Aldrich, St. Louis), 1 mM de azida de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis), 0.12mM NADPH (Sigma-Aldrich, St. Louis)] y 100 μl H_2O_2 (0,8 mM, VETEC, St. Louis). Se leyó la absorbancia a 340 nm a los 0 y 60 s. La actividad enzimática se calculó utilizando la ecuación: concentración GPx = $(A_0 - A_{60}) / \text{MEC}$, donde el MEC de NADPH = 6,2 mM / cm. Los resultados se expresaron como milimoles de NADPH por miligramo de proteína⁻¹.

8.9 Análisis estadístico

En los ensayos de toxicidad subletal, la evaluación estadística de los resultados se realizó con el análisis de una vía de la varianza (ANOVA), y las diferencias entre las medias se compararon usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, con p conjunto a <0,05. Las determinaciones estadísticas se realizaron con el paquete de software SPSS v10 (SPSS, Chicago, IL).

9. RESULTADOS

Caracterización físico-química de las aguas residuales

Los resultados de la caracterización físicoquímica se muestran en la Tabla 3. Las características físico-químicas de los efluentes no excedan de los límites establecidos en las normas oficiales mexicanas (NOM-001-SEMARNAT-1996, NOM-073-ECOL-1994). El oxígeno disuelto fue de 12,2 mg L⁻¹, conductividad 143,2 microsiemens cm⁻¹, amoníaco 0,73 mg L⁻¹ y NaClO 1.0 mg L⁻¹; estos cuatro parámetros no se toman en cuenta en cualquiera de estas normas.

Características físicoquímicas	NOM-001-SEMARNAT-1996^a	NOM-073-ECOL-1994^b	Efluente industrial
Temperatura (°C)	40	40	15.6
Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)	NI	NI	12.2
Conductividad (μS cm ⁻¹)	NI	NI	143.2
pH	6.5-8.5	6-9	6.3
Cloruros (mg L ⁻¹)	Maximum 250	NI	101
Fluoruros (mg L ⁻¹)	0-15	NI	3.8
Dureza(mg L ⁻¹)	Maximum 500	NI	245.7
Amonio (mg L ⁻¹)	NI	NI	0.73
Solidos suspendidos totales (mg L ⁻¹)	60	150	36
P Total (mg L ⁻¹)	10	10	7.3
N Total (mg L ⁻¹)	25	NI	18
Demanda Bioquímica de oxígeno (mg L ⁻¹)	60	100	33
NaClO (mg L ⁻¹)	NI	NI	1.0

Tabla.3 Valores físico-químicos obtenidos del efluente industrial. ^{a,b} Normas oficiales mexicanas que establecen los límites o concentraciones permisibles en descargas de aguas

residuales que surjan en las industrias farmacéuticas y farmacoquímicas, ^(a) en aguas y bienes nacionales, ^(b) cuerpos de agua receptores.

Concentraciones de los fármacos presentes

En la Tabla. 4 se muestran las concentraciones de fármacos presentes en las muestras de aguas del efluente industrial.

Fármaco	Concentración
Diclofenaco	1.04 ± 0.05
Ibuprofeno	1 ± 0.03
Naproxeno	1.72 ± 0.03
Paracetamol	3.03 ± 0.02

Tabla.4 concentraciones de los diversos fármacos expresadas en mg/L⁻¹.

Determinación de la CL₅₀

La CL₅₀ determinada en las aguas residuales en el ensayo de toxicidad aguda es 0.732 a 72h de exposición, con un intervalo de confianza del 95 % [0,725-0,741]. La prueba de ajuste X² lineal no fue significativo en $p < 0,05$.

Evaluación de estrés oxidativo

La determinación de la toxicidad sub-aguda mediante la batería de estrés oxidativo, mostro los siguientes resultados:

HPC

Los cambios del contenido de hidroperóxidos inducidos por efluentes industriales se muestran en la **Fig. 2**. Como se puede ver hay un aumento significativo en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) en todos los tiempos de exposición. Estos aumentos fueron de 44,5, 77,8, 130,3 y 105,7% a los 12, 24, 48 y 72 h, respectivamente.

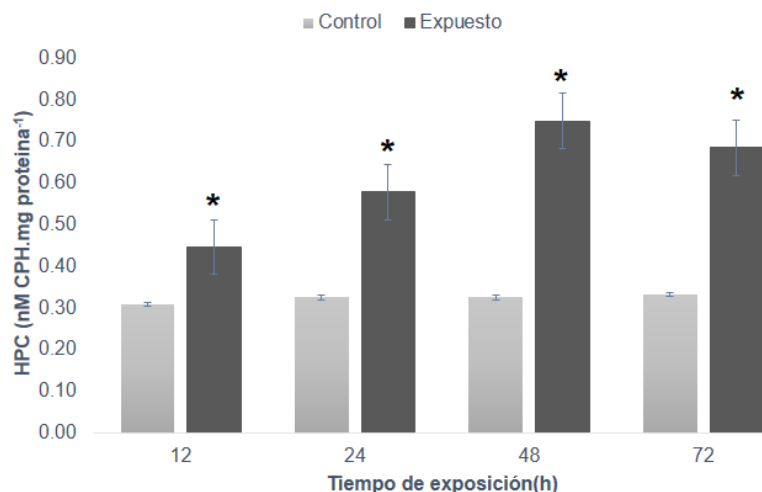


Fig. 2 Contenido de hidroperóxidos en *H. azteca* después de 12, 24, 48 y 72 horas de exposición a efluentes de una industria farmacéutica. Son valores promedio de tres repeticiones. * Existe diferencia significativa entre el grupo expuesto y el grupo testigo, ANOVA y Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

LPX

La cantidad de MDA inducido por efluentes industriales se muestra en la **Fig. 3**. Como se puede ver hay aumentos tiempo dependientes significativos en comparación con el grupo control ($p < 0,05$). Estos aumentos fueron 270,2, 317,9, 419,7 y 531,9% en 12, 24, 48 y 72 h, respectivamente.

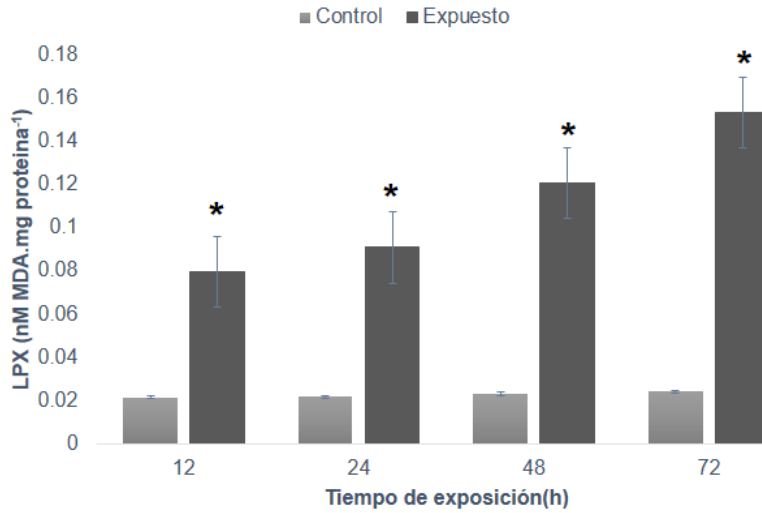


Fig.3 Lipoperoxidación en *H. azteca* después de 12, 24, 48 y 72 horas de exposición a efluentes de una industria farmacéutica. Son valores promedio de tres repeticiones. * Existe diferencia significativa entre el grupo expuesto y el grupo testigo, ANOVA y Kruskal-Wallis (($p < 0.05$)).

PCC: La oxidación de proteínas en las muestras expuestas a los efluentes industriales se presenta en la **Fig. 4**. Se observa un incremento significativo de este biomarcador con respecto al control ($p < 0,05$) en todos los tiempos de exposición. Estos aumentos fueron del 80,1, 74,2, 71,2, 117,4% a los 12, 24, 48 y 72 h, respectivamente.

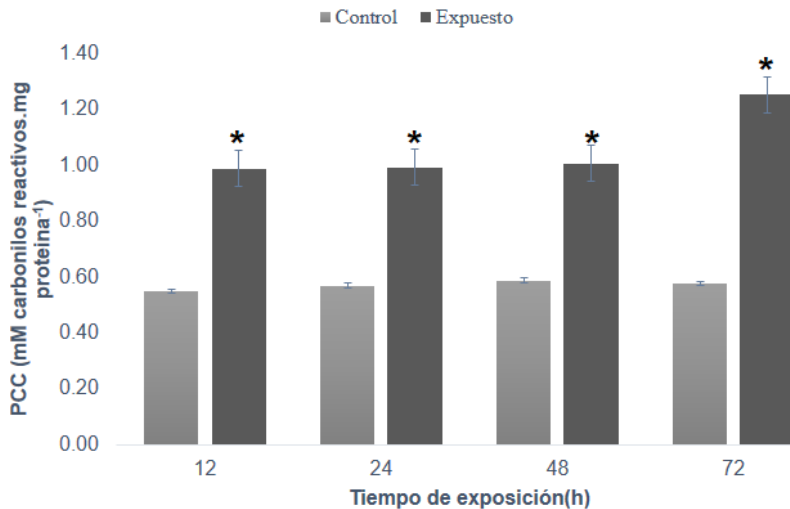


Fig. 4 Contenido de proteínas carboniladas en *H. azteca* después de 12, 24, 48 y 72 horas de exposición a efluentes de una industria farmacéutica. Son valores promedio de tres

repeticiones.* Existe diferencia significativa entre el grupo expuesto y el grupo testigo, ANOVA y Kruskal-Wallis (($p < 0.05$).

SOD

La **Fig. 5** muestra los resultados de la actividad SOD. El efluente industrial indujo aumentos significativos con respecto al grupo control ($p < 0,05$). Los aumentos observados fueron 82.0, 91.0, 155.1, 184.4% a los 12, 24, 48 y 72 h, respectivamente.

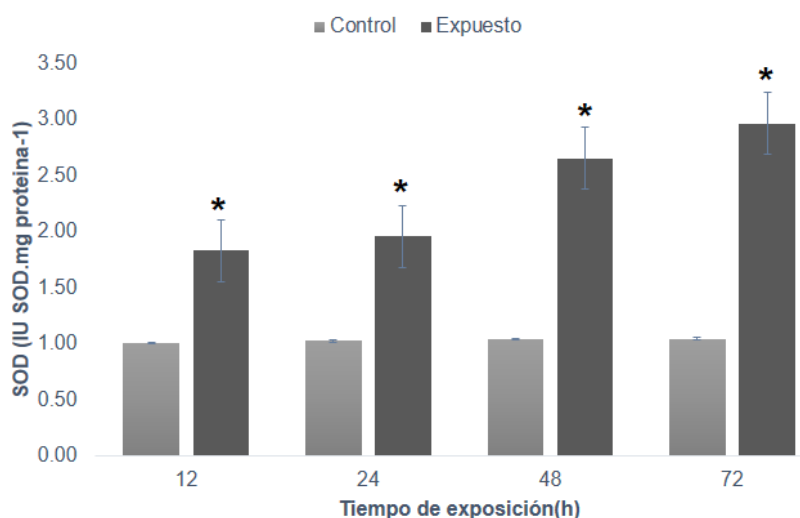


Fig. 5 Actividad de la superoxido dismutasa en *H. azteca* después de 12, 24, 48 y 72 horas de exposición a efluentes de una industria farmacéutica. Son valores promedio de tres repeticiones. * Existe diferencia significativa entre el grupo expuesto y el grupo testigo, ANOVA y Kruskal-Wallis (($p < 0.05$).

CAT

La actividad de CAT, expresada como mM H₂O₂. mg de proteína⁻¹, se muestra en la **Fig. 6**. El efluente industrial indujo un aumento significativo con respecto al grupo control ($p < 0,05$). Aumentos significativos ocurrieron a las 12, 24, 48 y 72 h fueron 70,4, 81,4, 129,8 y 178,8%, respectivamente.

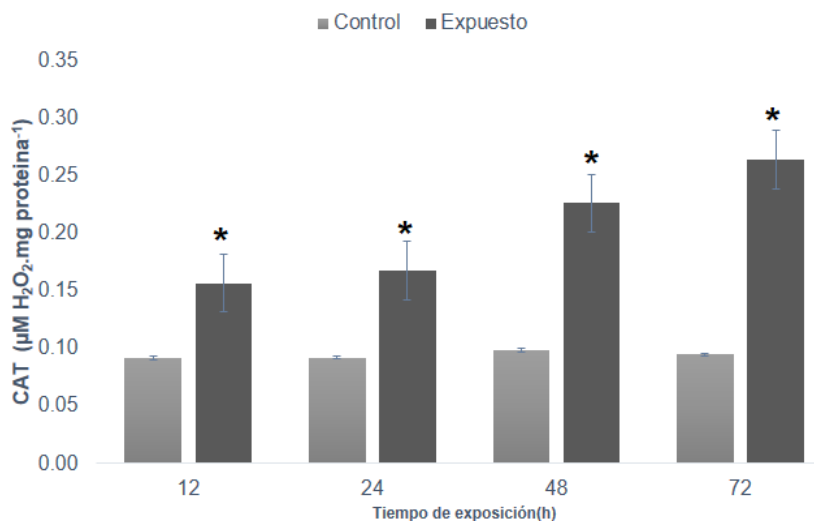


Fig. 6 Actividad de la catalasa en *H. azteca* después de 12, 24, 48 y 72 horas de exposición a efluentes de una industria farmacéutica. Son valores promedio de tres repeticiones. * Existe diferencia significativa entre el grupo expuesto y el grupo testigo, ANOVA y Kruskal-Wallis (($p < 0.05$)).

GPx

La **Fig. 7** muestra los resultados de su actividad. El efluente industrial produjo un aumento significativo con respecto al grupo control ($p < 0,05$). Los aumentos significativos ocurrieron a las 12, 24, 48 y 72 h fueron 41,9, 50,6, 74,7 y 120,5%, respectivamente.

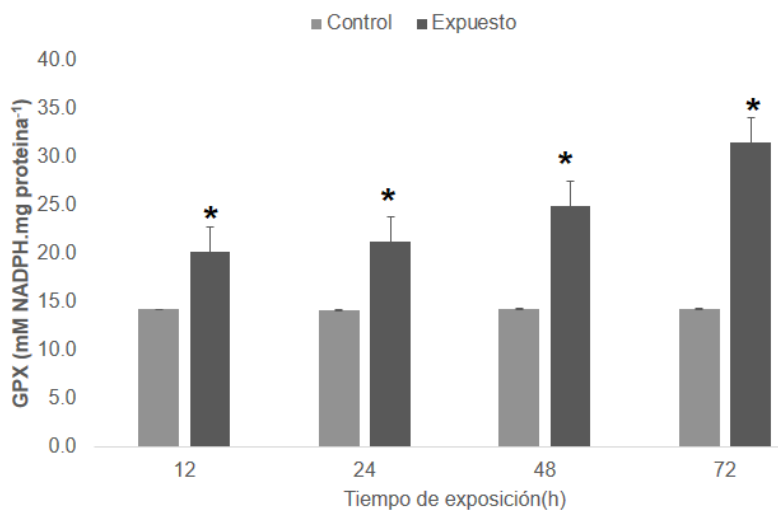


Fig. 7 Actividad de la glutatión peroxidasa en *H. azteca* después de 12, 24, 48 y 72 horas de exposición a efluentes de una industria farmacéutica. Son valores promedio de tres repeticiones. * Existe diferencia significativa entre el grupo expuesto y el grupo testigo, ANOVA y Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

10. DISCUSIÓN

Las propiedades físico-químicas de los efluentes analizados en el presente estudio (Tabla 3) no superan los límites establecidos en las normas oficiales mexicanas NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-073-ECOL-1994. El oxígeno disuelto, la conductividad, el amoníaco y el NaClO no se consideran en cualquiera de estas normas. El amoníaco y conductividad son factores de confusión que pueden interferir con los efectos biológicos de los microcontaminantes. Postma et al. 2002 indica los valores más altos en los cuales observaron efectos significativos que fueron 13-60 mg L⁻¹ de amoníaco y conductividad <650 microsiemens cm⁻¹. Sobre esta base, la conductividad y amoníaco en nuestro estudio (143.2 microsiemens cm⁻¹ y 0,73 mg L⁻¹, respectivamente) no son factores de confusión.

Otro contaminante identificado en el efluente fue de NaClO en 1,0 mg L⁻¹ que se utiliza, junto con otras sustancias, como desinfectante en la cloración del agua. Este tipo de compuestos puede formar productos altamente tóxicos como haloalcanos, ácidos haloacéticos, haloacetosnitrilos, halocetonas y haloaldehídos (OMS, 1996). Estas se forman por reacciones del cloro con los ácidos húmicos y fúlvicos normalmente presentes en el agua de superficie (Torre 1977; Cantor 1997; Boorman 1999).

La planta farmacéutica que emana el efluente analizado en nuestro estudio se utiliza exclusivamente para la fabricación de AINE's. Dado que la planta no tiene un sistema de tratamiento de aguas residuales, los efluentes que genera contienen AINE's derivados del proceso de fabricación. Los AINE's detectados en el efluente (Tabla 3) incluyen DCF, IBP, NPX y PAR en concentraciones de 1,0 a 3,03 mg L⁻¹. Estos contaminantes son productos farmacéuticos polares que tienen la capacidad de moverse a través del perfil de sedimentos (cinética ambiental) y lo suficientemente persistente para contaminar acuíferos (Almeida et al. 2013). Las concentraciones de IBP, NPX y DCF superior a 1 µg L⁻¹ son un riesgo de contaminación de las aguas subterráneas resultante del riego con aguas residuales (Gibson et al. 2010).

En nuestro estudio, la CL₅₀ del efluente en *H. azteca* fue de 0,732%, con un intervalo de confianza del 95% de (0,725 hasta 0,741). En otras especies como *Danio rerio*, la CL₅₀ de la producción de drogas a granel ha oscilado 2,7-8,1% (Carlsson et al. 2010). Estos resultados

pueden explicarse por el hecho de que los AINE actúan mediante el bloqueo de la enzima ciclooxigenasa. Este último es responsable de catalizar la degradación del ácido araquidónico en la producción de prostaglandinas (Cha et al 2006;. Fortier et al., 2008). Estos eicosanoides actúan como mensajeros autocrina y paracrina y, en especies de invertebrados tales como *H. azteca*, como mediadores importantes durante la reproducción y en el sistema inmune (Stanley 2000;. Fortier et al 2008). Las prostaglandinas también están implicados en la neurotransmisión y el transporte de iones a través de las membranas celulares (Arkhipova et al. 2005). El resultado final de estas acciones en el presente estudio podría haber sido la inhibición de la neurotransmisión evidenciado por la inmovilización de *H. azteca*.

Diversos estudios han demostrado que los AINE's son inestables y son fotodegradables a metabolitos más tóxicos para los organismos acuáticos que los fármacos no alterados (Borgmann et al 2007;. Araujo et al 2011). Además, la biotransformación de los AINE's, una vez que entran en el cuerpo también debe ser considerada. La principal vía de biotransformación de los AINE's (ASA, DCF, NPX, y IBP) es la conjugación de ácido glucurónico catalizada por la difosfoglucuronosil uridina transferasa, superfamilia de enzimas, lo que resulta en glucurónidos de acilo carboxilato de etilo (Pritchard 1993). Estos compuestos son intermediarios reactivos que pueden experimentar la migración de acilo y la hidrólisis. También pueden formar aductos con residuos de aminoácidos nucleófilos. Muchos glucurónidos acilo derivados de AINE's, incluidos los obtenidos de DCF e IBP, se ha demostrado para formar enlaces covalentes con proteínas intra y extracelulares, con consecuencias toxicológicas (Boelsterli 2007).

En el proceso LPX, los ácidos grasos poliinsaturados reaccionan con ERO, en particular el radical hidroxilo (HO.) Y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) peroxinitrito (ONOO-), a través de un mecanismo de reacción en cadena. Esto permite la formación de hidroperóxidos que se degradan a los productos de bajo peso molecular, incluyendo MDA (Wilhelm Filho 1996). Como puede verse en la Fig. 2, un aumento dependiente del tiempo en HPC ocurrido respecto al grupo control ($P < 0,05$). Además, en la Fig. 3 se observó un comportamiento similar, el nivel dependiente del tiempo del daño a los lípidos respecto al control se muestra en LPX biomarcador. Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que en la biotransformación de los AINE's por CYP2C9 se forman ERO tal como OH^- y

los intermedios oxigenados como el oxi-citocromo P450 complejo [P450 (Fe³⁺) O₂.] como resultado de la liberación del anión superóxido por desacoplamiento de reacción. En ambos casos, la producción de ERO se incrementa, lo que explica los aumentos en LPX y HPC en nuestro estudio. Efectos similares fueron observados por Oviedo-Gómez et al. (2010), que indican que el azteca anfípodo *Hyaella* expuesto a DCF en 46,7 mg kg⁻¹ mostró un aumento significativo ($p < 0,05$) con respecto a los controles, a las 12, 24, 48 y 72 h. Estos autores mencionan que el aumento LPX se puede explicar en términos de formación de 4'-hidroxi DCF y 5'-hidroxi DCF y su biotransformación subsecuente a benzoquinonas que aumentan la formación de EROS. Además, Gómez-Oliván et al. 2012 encontraron efectos similares cuando se expone a *Hyaella azteca* a PCM a 770 mg / kg. Este aumento puede ser debido a la formación de N-acetil-p benzoquinonimine que es capaz de unirse a las membranas celulares. En los mamíferos, este metabolito reactivo es conocido para inducir la producción de ERO y especies reactivas de nitrógeno, especialmente el anión superóxido, el radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno, así como óxido de nitrógeno y peroxinitrito (Yen et al. 2007), que se unen a lípidos en la membrana y los oxidan. Estos estudios apoyan los resultados de los biomarcadores HPC y LPX obtenidos en este estudio.

Los metabolitos reactivos y ERO producidos durante la biotransformación mediada por CYP también puede afectar a las proteínas que induzca a incrementar en PCC, lo que conduce a la pérdida de grupos sulfidrilos y los cambios en las estructuras de resonancia de aminoácidos, alterar su función y, por tanto, la integridad del cuerpo (Parvez y Raisuddin 2000). El ion superóxido reacciona rápidamente con el óxido nítrico (NO) derivado de metabolismo de la arginina, la formación de peroxinitrito (ONOO⁻) (Halliwell 1997; Doi et al 2002; Jifa et al., 2006). Se sabe que el peroxinitrito, agente oxidante que induce la oxidación de proteínas y nitración en ausencia de GSH, provocando la disfunción mitocondrial y a la larga, conduce a un daño irreversible y la pérdida severa de ATP celular (Jaeschke et al. 2003). Esta información apoya los resultados obtenidos en este estudio, como se puede ver en la Fig. 4, un aumento dependiente del tiempo en PCC ocurrido respecto al grupo control ($P < 0,05$).

El sistema de defensa antioxidante es esencial en la neutralización de ERO y el daño relacionado (Regoli et al., 2002). Este sistema está mediado por una cascada de enzimas antioxidantes que secuestran ERO y las convierten a especies menos tóxicas y reactivas. Este

grupo de enzimas incluye SOD, CAT y GPx. La superóxido dismutasa es el primer mecanismo de defensa antioxidante y la principal enzima responsable de la compensando los efectos de ROS, en particular el ion superóxido (Van der Oost et al. 2003) que se convierte en peróxido de hidrógeno por SOD. Posteriormente, el H₂O₂ se secuestra y se degrada a H₂O por el CAT y GPx.

En relación con las enzimas antioxidantes, la actividad SOD en el anfípodo *Hyalella azteca* en este estudio aumentó en todos los tiempos de exposición respecto a los controles ($p < 0,05$). Estos aumentos pueden ser debido al hecho de que durante la biotransformación mediada por CYP de NSAID, el radical anión superóxido, responsable del aumento de la actividad de SOD, se libera (Doi et al. 2002).

La mayoría de los compuestos de cloro son prooxidantes potentes que pueden afectar las defensas antioxidantes en los organismos expuestos (Ueno et al 2000; Pozzetti et al 2003). Cuando se añade NaClO al agua, la solución reacciona fácilmente con biomoléculas (incluyendo proteínas y bases de nucleótidos) para producir una variedad de compuestos orgánicos clorados que son en su mayoría lipofílicos, persistente y tóxicos en ambientes acuáticos (Emmanuel et al. 2004). Aumento de la actividad SOD puede actuar como una señal de estrés oxidativo, que conduce a la activación y / o la inducción de enzimas antioxidantes asociados con un sistema de H₂O₂-secuestro tal como CAT o GPx (Vlahogianni et al., 2007).

En nuestro estudio, la actividad de la CAT y de la GPx en *Hyalella azteca* se incrementó con respecto al grupo control en todos los tiempos de exposición ($P < 0,05$). El aumento observado en la actividad de CAT puede ser debido a mayores concentraciones de H₂O₂ como resultado de la actividad de la SOD. Los resultados obtenidos son consistentes con los obtenidos por Oviedo-Gómez et al. (2010), quienes reportaron aumentos en la actividad de la CAT y GPx en *H. azteca* expuesto a DCF. Además, resultados similares fueron encontrados por Gómez-Oliván et al. (2014) en *Daphnia magna* expuesta a IBP y DCF. Este resultado indica que esta enzima no es capaz de compensar los daños inducidos por ERO. Bagnyukova et al. (2006) afirman que los productos LPX pueden estar involucrados en la regulación de algunas enzimas antioxidantes, por lo que el aumento LPX encontrado en nuestro estudio puede igualmente explicar el aumento de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) observándose daños.

11. CONCLUSIONES

El efluente industrial analizado en el presente estudio contiene AINE's y NaClO, e induce estrés oxidativo en *Hyalella azteca*. El conjunto de ensayos utilizados en el presente estudio constituye un biomarcador de advertencia confiable para su uso en la evaluación de la toxicidad inducida por estos contaminantes emergentes en *Hyalella azteca*.

12. BIBLIOGRAFÍAS

Almeida B, Oehmen A, Marques R, Brito D, Carvalho G, Barreto Crespo MT (2013) Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture. *Bioresour. Technol.* 133:31- 37

APHA, AWWA, WPCF (1995) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, 19th ed. Washington, DC.

Araujo L, Villa N, Camargo N, Bustos M, García T, & Prieto A (2011) Persistence of gemfibrozil, naproxen and mefenamic acid in natural waters. *Environ. Chem. Letters.* 9:13–18

Arkhipova OV, Grishin SN, Sitdikova GF, & Zefirov AL (2005) Presynaptic effects of arachidonic acid and prosta- glandin E2 in the frog neuromuscular synapse. *Russ. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova.* 91:268– 276

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

Barceló L, López de Alda J.M (2007). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC (Barcelona)

Baur, S., Schmidt, H., Krämer, A., Gerber, J., (2005).” The destruction of industrial aqueous waste containing biocides in supercritical water-development of the SUWOX process for the technical application.” *J. Supercrit. Fluids*, 33 (2), 149-157.

Bedner M, Maccrehan WA (2006) *Environ. Sci.Technol.* 40, 516.

Boelsterli UA (2007) Mechanistic toxicology. The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets (2nd ed.). Boca Ratón: CRC Press

Boorman GA (1999) Drinking water disinfection by products: review and approach to toxicity evaluation. *Environ. Health Perspect.* 107:207-217

Borgmann U, Bennie DT, Ball AL, & Palabrica V (2007) Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations. *Chemosphere* 66:1278– 1283

Boxall, A., 2004. The environmental side effects of medication. How are human and veterinary medicines in soils and water bodies affecting human and environmental health?. *EMBO reports* 5(12).

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254

Büege JA, & Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52:302–310

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

Burton, G. A., D. L. Denton, K. Ho, and D. S. Ireland. 2003. Sediment Toxicity Testing: Issues and Methods. Pages 111-150 in D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton, and J. Cairns, editors. *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL

Cantor KP (1997) Drinking water and cancer. *Cancer Causes Control* 8:292-308

Carlsson C, Johansson A, Alvan G, Bergman, Kuhler T (2006) Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total Environ.* 364:67–87

Cha YI, Solnica-Krezel L, DuBois RN (2006) Fishing for prostanoids: deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Develop. Biol.* 289:263–272

Chance B, Maehly AC. Assay of catalases and peroxidases. En: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in enzymology*. New York: Academic, 1955;764-5

Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142 (3), 185-194.

Conagua, (2011). Estadísticas del agua en México. Capítulo 8 Agua en el mundo. México.

Depledge MH, Fossi MC. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment 2. Invertebrates. *Ecotoxicology* 3:161–172.

Díaz-Cruz MS, Barceló D (2005) TRAC-Trend. *Anal. Chem* 24, 645.

Doi H, Iwasaki H, Masubuchi Y, Nishigaki R, Horie T (2002) Chemiluminescence associated with the oxidative metabolism of salicylic acid in rat liver microsomes. *Chem-Biol. Int.* 140(2): 109–119

Dutka, B.J., 1996, Bioassays: a Historical Summary of those Used and Developed in our Laboratories at NWRI. National Water Research Institute, Environment Canada, Burlington. 93 pp

Emmanuel E, Keck G, Blanchard JM, Vermande P, Perrodin Y (2004) Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Environ. Int.* 30:891–900

EPA. Water: Contaminants of Emerging Concern. (2014). Disponible en: <http://water.epa.gov/scitech/cec/>. 21 de octubre de 2014.

Feng Ling D., Hullebusch van, A., Manuel R., Esposito G., Oturan Mehmet A. (2013) Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review. *Chemical Engineering Journal* 228, Pag. 944–964.

Fent K, Weston AA, Caminada D (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76:122-159

Fortier MA, Krishnaswamy K, Danyod G, Boucher-Kovalik S, & Chapdalaine P (2008) A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. *J. Physiol. Pharmacol.* 59:65–89

Gibson R, Durán AJC, León EK, Chávez A, Jiménez CB (2010) Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, México. *Chemosphere* 81:1437–45

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

Gonzalez, E. R. and L. Watling. 2002. Redescription of *Hyalella azteca* from its type locality, Vera Cruz, Mexico (Amphipoda : Hyalellidae). *Journal of Crustacean Biology* 22:173-183.

Gunzler W, & Flohe CA (1985) Glutathione peroxidase. In R. A. Green-Wald (Ed.), *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Ratón, FL: CRC Press 285–290

Halliwell B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nut Rev*, 55(1), S44–S49.

Hargrave, B. T. 1970. The utilization of benthic microflora by *Hyalella azteca* (Amphipoda). *Journal of Animal Ecology* 39:427-437.

Hernando MD, Mezcuca M, Fernandez-Alba AR, Barcelo D (2006a) *Talanta* 69, 334

Insel, P.A. (1998) Agentes analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios; drogas empleadas en el tratamiento de la artritis reumatoidea y la gota, en *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (Goodman & Gilman)

Jaeschke H, Knight TR, Bajt ML (2003) The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 144:279–288

Jones OA, Voulvoulis N, Lester JN (2001) *Environ. Toxicol.* 22, 1383.

Kallings, P. (1993) Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.* 9 (3):523-541.

Kummerer, K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewaters by hospitals in relation to others sources- A review. *Chemosphere* 45, 957-969.

Lademann J, Patzelt A, Schanzer S, Richter H, Meinke MC, Sterry W, et al. Uptake of antioxidants by natural nutrition and supplementation: pros and cons from the dermatological point of view. *Skin Pharmacol Physiol* 2011; 24 (5): 69-73

Lam KW, Wang L, Hong BS, Treble D. Purification of phospholipid hydroxiperioxide glutathione peroxidase from bovine retina. *Curr Eye Res* 1993;12(1):9-15.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, & Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233:346–357.

Maiorino M, Chu F, Ursoni F. GPx-PH is the 18 KDa seleno proteins expressed in human tumor cell lines. *J Biol Chem* 1991;266(12):7728-32.

Martinez-Tabche, L., Gutierrez Cabrera, I., Gomez Olivan, L., Galar Martinez, M., & German Faz, C. (2000). “Toxic effects of zinc from trout farm sediments on ATP, protein, and hemoglobin concentrations of *Limnodrilus hoffmeisteri*”. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 59(7), 575–583.

Misra HP, & Fridovich I (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247:3170–3175

Montague, P., 2006. Drugs in the Water. *Rachel’s Environment and Health Weekly* 614.

NMX-AA-003-1980. Las aguas residuales, el muestreo, la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, *Diario Oficial de la Federación* 25 de marzo 1980

NOM-001-SEMARNAT-1996 Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas de tratamiento al entrar en aguas nacionales y los recursos, la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, *Diario Oficial de la Federación* 30 de octubre 1996 Norma Oficial Mexicana

NOM-073-ECOL-1994, que fija los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales que se plantean en las industrias farmacéuticas y farmacoquímicas al entrar cuerpos de agua receptores. Norma Oficial Mexicana, Secretaría de Desarrollo Social, Diario Oficial de la Federación 10 de junio 1994

NORMA Oficial Mexicana NOM-CCA/032-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las aguas residuales de origen urbano o municipal para su disposición mediante riego agrícola.

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

Pépin, J.M., 2006. Impacts écotoxicologiques de certains médicaments dans l'environnement. Essai présenté au Centre Universitaire de Formation en Environnement en vue de l'obtention du grade de maître en environnement. Sherbrooke, Québec, Canada.

Petrovic M, Gonzalez S, Barcelo D (2003) TRAC-Trends Anal. Chem. 22, 685.

Petrovic M, Sole M, de Alda MJL, Barcelo D (2002) Environ. Toxicol. Chem. 21, 2146

Postma JF, De Valk S, Dubbeldam M, Maas JL, Tonkes M, Schipper CA, Kater BJ (2002) Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms, Ecotox. Environ. Safe. 53:226-237

Pozzetti L, Broccoli M, Potenza G, Canestro D, Affatato A, Sapone A, Antelli A, D'Amico E, Vangelisti S, Cantelli-Forti G, Paolini M, Ferrara G, Elia Ac, Dorr AJM, Taticchi MI, Mantilacci L, Natali M (2003) Tecniche enzimatiche per valutare la tossicità di acque potabilizzate. Acqua Aria 4:64–68

Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush K M, Carpo JD, & Freeman BA (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. J. Biol. Chem. 266:22028–22034

Rand, G. M. y S. R. Petrocelli. 1985. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Methods and applications. Taylor and Francis, Nueva York. 666 pp.

Regoli F, Gorbi S, Frenzilli G, Nigro M, Corsi I, Focardi S, Winston GW (2002) Oxidative stress in ecotoxicology: From the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar. Environ. Res.* 54:419–423

Robbins D, Zhao Y. The role of manganese superoxide dismutase in skin cancer. *Enzyme Res* 2011; 2011: 1-7.

Ronco A, María Consuelo Díaz Báez y Yolanda Pica Granado (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones / Gabriela Castillo (ed.). Capítulo 1, pag. 17 - México: IMTA,

Serrano, J.S y Serrano, M.I. (1993) Fármacos antitérmicos-analgésicos y antiinflamatorios-gotosos, en *Farmacología* (Velasco, A., y cols., editores). MacGraw-Hill-Interamericana, Madrid.

Stanley DW (2000) Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems. Princeton: Princeton University Press, 231–234

Ternes, T.A., Joss, A., 2006. Human pharmaceuticals, hormones and fragrances. The challenge of micropollutants in urban water management., IWA Publishing.

Tobin, T.; Chay, S.; Kamerling, S.; Woods, W.E.; Weckman, T.J.; Blake, J.W. & Lees, P. (1986) Phenylbutazone in the horse: a review. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 9:1-25.

U.S. EPA, 2000. Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

Ueno H, Sayato Y, Nakamuro K (2000) Hematological effects of chlorine dioxide on in vitro exposure in mouse, rat and human blood and on subchronic exposure in mice. *J. Health Sci.* 46:110–116

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13:57–149

Vane J.R. & Botting, R.M. (1998). The mode of action of antiinflammatory drugs. *Postgrad. Med. J.*, 66 (suppl.4):S2-S17.

Vane, J.R. (1973) Prostaglandins and aspirin-like drugs, en Maxwell, R.A. & Acheson, G.H. *Cellular mechanisms*, vol. 5. Proceedings of the 5th International Congress in Pharmacology, Basilea, pp.353-378.

Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M, Valavanidis A (2007) Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54:1361.

WHO (1996) *Revision of the WHO Guidelines for Drinking Water Quality*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Wilhelm Filho D (1996) Fish antioxidant defenses—a comparative approach. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:1735–1742

13. ARTICULO

Environmental Science and Pollution Research

Oxidative stress induced in *Hyalella azteca* by effluent from an NSAID-manufacturing plant in México --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Oxidative stress induced in <i>Hyalella azteca</i> by effluent from an NSAID-manufacturing plant in México
Article Type:	Research Article
Keywords:	<i>Hyalella azteca</i> ; oxidative stress; nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NaClO; amphipod
Corresponding Author:	Leobardo Manuel Gómez-Oliván MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Karen Adriana Novoa-Luna, MSci
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Karen Adriana Novoa-Luna, MSci Leobardo Manuel Gómez-Oliván Rubi Romero-Romero, PhD Reyna Natividad-Rangel, PhD Marcela Galar-Martínez, PhD Sandra García-Medina, PhD Catalina Martínez-Vieyra, MSci Nadia Neri-Cruz, MSci
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-Mexico (Project 151665) Dr. Leobardo Manuel Gómez-Oliván
Abstract:	Production in the pharmaceutical industry has increased and along with it, the amount of wastewater discharges of varying characteristics and contaminant concentrations. The main chemicals present in these effluents are solvents, detergents, disinfectants - such as sodium hypochlorite (NaClO) - and pharmaceutical products, all of which are potentially ecotoxic. Therefore, this study aimed to evaluate the oxidative stress induced in the amphipod <i>Hyalella azteca</i> by the effluent emanating from a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-manufacturing plant. The median lethal concentration (72h-LC50) was determined and <i>H. azteca</i> were exposed to the lowest observed adverse effect level (LOAEL, 0.0732%) for 12, 24, 48 and 72 h, and biomarkers of oxidative stress were evaluated [hydroperoxide content (HPC), lipid peroxidation (LPX), protein carbonyl content (PCC), and the activity of the superoxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx)]. Statistically significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were observed in HPC, LPX and PCC on <i>H. azteca</i> in all exposure times. SOD, CAT and GPx activity also increased with respect to the control group. In conclusion, the industrial effluent analyzed in the present study contains NSAIDs and NaClO, and induces oxidative stress in <i>Hyalella azteca</i>

Suggested Reviewers:	Angeluz Olvera-Velona, PhD Researcher, Universidad Autónoma del Estado de Morelos olvera@buzon.uaem.mx; olvera@uaem.mx Because she has worked with pharmaceuticals
	Guy Brun, PhD Environment Canada Science and Technology Branch guy.brun@ec.gc.ca Because the researcher is expert in pharmaceuticals toxicity
	Beate I Escher, PhD Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology escher@eawag.ch Because the researcher has wrked with NSAID
Opposed Reviewers:	

Environmental Science and Pollution Research

25 de abril de 2015 16:31

ES

Para: Leobardo Manuel Gomez Olivan

Responder a: Environmental Science and Pollution Research

ESPR: Submission Confirmation for Oxidative stress induced in Hyalella azteca by effluent from an NSAID-manufacturing plant in México - [EMID: 70fd263f62161551]

Dear Leobardo Manuel Gómez-Oliván,

Your submission entitled "Oxidative stress induced in Hyalella azteca by effluent from an NSAID-manufacturing plant in México" has been received by Environmental Science and Pollution Research

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://espr.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Editorial Office
Environmental Science and Pollution Research

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding. Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

Oxidative stress induced in *Hyalella azteca* by effluent from an NSAID-manufacturing plant in México

Karen Adriana Novoa-Luna^a, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a*}, Rubi Romero-Romero^b,
Reyna Natividad-Rangel^b, Marcela Galar-Martínez^c, Sandra García-Medina^c, Catalina
Martínez-Vieyra^a, Nadia Neri-Cruz^a

^a Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, México.

^b Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM, Carretera Toluca-Atlacomulco Km 14.5, Unidad San Cayetano, Toluca, Estado de México 50200, México

^c Laboratorio de Toxicología Acuática, Sección de Graduados e Investigación, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Plan de Ayala y Carpio s/n, 11340 México D.F., México.

*Corresponding author:

Leobardo Manuel Gómez-Oliván

Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, Mexico. Tel.: (52) 7222173890; fax: (52) 7222173890; e-mail: imgomezo@uaemex.mx; lgolivan74@gmail.com

Abstract

Production in the pharmaceutical industry has increased and along with it, the amount of wastewater discharges of varying characteristics and contaminant concentrations. The main chemicals present in these effluents are solvents, detergents, disinfectants – such as sodium hypochlorite (NaClO) – and pharmaceutical products, all of which are potentially ecotoxic. Therefore, this study aimed to evaluate the oxidative stress induced in the amphipod *Hyalella azteca* by the effluent emanating from a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-manufacturing plant. The median lethal concentration (72h-LC₅₀) was determined and *H. azteca* were exposed to the lowest observed adverse effect level (LOAEL, 0.0732%) for 12, 24, 48 and 72 h, and biomarkers of oxidative stress were evaluated [hydroperoxide content (HPC), lipid peroxidation (LPX), protein carbonyl content (PCC), and the activity of the superoxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx)]. Statistically significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were observed in HPC, LPX and PCC on *H. azteca* in all exposure times. SOD, CAT and GPx activity also increased with respect to the control group. In conclusion, the industrial effluent analyzed in the present study contains NSAIDs and NaClO, and induces oxidative stress in *Hyalella azteca*.

Keywords: *Hyalella azteca*; oxidative stress; nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NaClO; amphipod

1. Introduction

Because effluents are a main source of direct and continuous input of pollutants in aquatic ecosystems, the study of the effects of effluent exposure on organisms, populations or communities has high ecological relevance (Smolders et al. 2004). Water treatment plants, hospitals and the pharmaceutical industry are the principal sources of contamination by pharmaceutical agents.

Approximately 3000 compounds are used as medicine, and the annual production amount exceeds hundreds of tons (Sarmah et al. 2006; Calisto and Esteves 2009). Considerable amounts of pharmaceuticals are produced by pharmaceutical manufacturers and dispensed in the hospitals (Brown et al. 2006; Li et al. 2008).

Production in the pharmaceutical industry has increased and along with it, the amount of wastewater discharges of varying characteristics and contaminant concentrations, which depend on the nature of the production process and the season of year. The effluents generated proceed for the most part from the cleaning of machinery (Balçioğlu and Ötör 2003), in the process of which other compounds, such as detergents, solvents and disinfectants, are incorporated. Current wastewater treatment systems are not sufficiently effective in reducing and/or removing these contaminants (Kümmerer 2001). Thus, pharmaceutical agents are at present of environmental concern at world level, and have been termed “emerging contaminants” (Fent et al. 2006; Richardson et al. 2009).

Such emerging contaminants include NSAIDs which are one of the most commonly used groups of pharmaceuticals. NSAIDs have diverse antiinflammatory, analgesic and antipyretic properties. Chemically, they are a heterogeneous group and are not closely related in terms of structure, although they share diverse therapeutic actions and adverse effects (Hardman et al. 2003). Their mechanism of action is through inhibition of the cyclooxygenase (COX) enzymes: COX-1 (constitutive) and COX-2 (inducible) which convert arachidonic acid to prostaglandins and thromboxanes, mediators involved in diverse homeostatic processes throughout the body (Hardman et al. 2003; Parolini et al. 2009). The most common members of this group of pharmaceuticals in terms of consumption and

biological action are naproxen (NPX), paracetamol (PAR), diclofenac (DCF), ibuprofen (IBP) and acetylsalicylic acid (ASA) (Katzung 2007). Environmentally, the importance of NSAIDs lies in their inherent properties of persistence, bioaccumulative nature, water solubility, low volatility and low tendency for adsorption by organic matter, which enable them to remain in the aquatic environment for extended periods favoring their uptake and bioconcentration by hydrobionts (Benz et al. 2005; Carlsson et al. 2006).

Many investigations have been conducted to understand the occurrence and fate of NSAIDs in wastewater. IBP and DCF have been detected in water bodies worldwide at concentrations ranging from $\mu\text{g L}^{-1}$ to ng L^{-1} (Ferrari et al. 2003; Santos et al. 2010). In Mexico, several studies have reported their presence in effluents and water systems. Siemens et al. (2008) found IBP and DCF at concentrations of 0.12 to 2.30 $\mu\text{g L}^{-1}$ in Mexico City effluent in the Mezquital Valley; Gibson et al. (2010) detected 742 to 4824 ng L^{-1} in wastewater from the Tula Valley; while Felix-Cañedo et al. (2013) recorded 25 to 100 ng L^{-1} in surface water and 1 to 5 ng L^{-1} in ground water in tributaries of the Lerma-Cutzamala system, one of the largest water supply networks in Latin America. A study conducted in Madín Reservoir in State of México, México show that water contains a considerable nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) load such as diclofenac (DCF), ibuprofen (IBP), and naproxen (NPX) are present at $\mu\text{g L}^{-1}$ levels (González-González et al. 2014).

Recent studies have shown that NSAIDs induce reactive oxygen species (ROS) production in cells (Ruas et al. 2008) and elicit and/or contribute to oxidative stress generation, and consequently, DNA damage (Gómez-Oliván et al. 2012; Gómez-Oliván et al. 2013; Islas-Flores 2013; San Juan-Reyes et al. 2013). Also, NSAIDs induce both genotoxicity and cytotoxicity on aquatic organisms such as *Oryzias latipes*, *Dreissena polymorpha*, *Ruditapes philippinarum* and *Daphnia magna* (Hong et al. 2007; Parolini et al. 2010; Matozzo et al. 2012; Gómez-Oliván et al. 2013).

Oxidative stress is defined as disruption of the balance between ROS and the antioxidant systems in the body (Barata et al. 2005). ROS, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), the superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) and the hydroxyl radical (HO^{\bullet}), are formed in cells as a result of metabolic processes (Valavanidis et al. 2006). Aerobic organisms produce ROS due to their

oxidative metabolism. Hydroxyl radicals may initiate lipid peroxidation (LPX) in body tissues. To mitigate the negative effects of ROS, fish and other vertebrates possess an antioxidant defense system that uses both enzymatic and non-enzymatic mechanisms. The most important antioxidant enzymes are superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST). Antioxidants protect the body against oxyradical-induced damage such as breaks in the DNA chain, protein oxidation and LPX induction (Winzer et al. 2000). A change towards increased oxidant status or any imbalance between ROS production and degradation in animal tissues may induce LPX, plasma membrane alterations, or enzyme deactivation (Anand et al. 2000).

Hyalella azteca is a sentinel organism that is widely used to evaluate toxicity in water bodies because of the many advantages it offers, such as being a bioindicator of water and sediment quality and being easy to reproduce and maintain under laboratory conditions and also highly sensitive to diverse xenobiotics. Toxicity in natural ecosystems is usually not due to exposure to a single substance, but is the result of exposure to mixtures of toxic substances (Backhaus et al. 2003; Silva et al. 2002).

The present study aimed to evaluate the oxidative stress induced on *Hyalella azteca* by effluent from an NSAID-manufacturing plant.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling of industrial effluent

Effluent emanating directly from an NSAID-manufacturing plant in Toluca (State of Mexico) was sampled as stipulated in the official Mexican norm on wastewater sampling (NMX-AA-003-1980). Samples taken from the outlet draining the production area, which is directly connected to the drainpipe exiting the plant, were collected in stoppered 20-L polyethylene containers previously washed first with 30% nitric acid (Sigma-Aldrich, Toluca, Mexico) and then deionized water. Samples were labeled, protected from light, and immediately transported to the lab, where they were stored at 4°C. It is worth noting that industrial waste receives no treatment and goes directly to the municipal effluent from the city of Toluca, ultimately entering the aquatic environment and causing deleterious effects in organisms living in receiving water bodies.

2.2. Physicochemical characterization

The physicochemical characteristics of effluent samples [temperature, dissolved oxygen, conductivity, pH, chlorides, fluorides, hardness, ammonia, total suspended solids, total P, total N, biochemical oxygen demand, and sodium hypochlorite (NaClO)] were determined as stipulated in the official Mexican norms NOM-001-SEMARNAT-1996 and NOM-073-ECOL-1994 and APHA, AWWA, WPCF. The official Mexican norms set the maximum permissible levels of contaminants in wastewater discharges arising in the pharmaceutical and pharmacochemical industries and entering, respectively, domestic waters and resources, and receiving water bodies; while APHA, AWWA, WPCF set the standard methods for the examination of water and wastewater.

2.3. Quantification of NSAIDs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

2.3.1. Standards

Standard solutions were prepared in a 60:40 mixture of acetonitrile and ammonium formate at pH 6 (pH was regulated using 1M HCl). Standards of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of DCF, IBP, NPX and PAR were prepared and stored in the dark at -8°C . A 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ solution was used for mass spectrometer (MS) tuning, a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ solution for recovery studies, and solutions containing 1, 2, 10, 50, and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of the above NSAIDs for instrument calibration.

2.3.2. Equipment

The high-performance liquid chromatography (HPLC)-MS/MS system used was an Agilent 1290 Infinity HPLC unit (Santa Clara, CA). The RRHD Eclipse Plus C18 chromatography column (2.1 x 50 mm, 1.8- μm) was maintained at 40°C . The mobile phase was a 60:40 v/v mixture of acetonitrile and ammonium formate (10 mM). Flow rate was 0.3 mL min^{-1} , run time 1.8 min, and injection volume 2 μL . DCF, IBP, NPX and PAR were quantified on an Agilent 6430 Triple Quadrupole MS equipped with electrospray ionization (ESI). The ESI positive mode was used throughout. Electrospray voltage operated at 4000 V as the MS collected data in the negative ion mode. MS optimization was performed by direct

infusion of a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ standard solution of DCF, IBP, NPX and PAR; thereafter, the ionization mode and precursor ion mode were selected. These pharmaceuticals were selected because they are among the most commonly used medicinal remedies in Mexico.

2.3.3. Calibration curves

Calibration curves of each of the NSAIDs were determined using standard solutions of 1, 3, 10, 50 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ prepared in a 60:40 mixture of acetonitrile and ammonium formate at pH 6. Linear regression coefficients (R^2) were > 0.99 for DCF, IBP, NPX and PAR. The MS/MS detector was maintained according to manufacturer specifications and was cleaned regularly, but when changes $> 50\%$ were observed in calibration curve slopes, it was given additional cleaning by making the mobile phase used pass under the same work conditions for 30 min.

2.3.4. Water samples from test systems

Water samples (5 mL) taken directly from the exposure containers for each time were collected in glass vials and refrigerated at 4°C for subsequent determination of test concentrations. The samples were vacuum-filtered through 1–0 μm GF/C glass microfiber filters, followed by 0.45- μm nylon membrane filters (Whatman, Cambridge, UK). A liquid-liquid extraction with 5 mL (1:1, v/v) hexane/ethyl acetate was performed to extract DCF, IBP, NPX and PAR from 1-mL water samples. These samples were centrifuged at 1800 x g for 10 min and the upper organic layer was re-extracted. The extraction was repeated and organic layers were combined and evaporated to dryness. The procedure was carried out in quintuplicate. Results were expressed as time-weighted average concentrations of DCF, IBP, NPX and PAR.

2.4 Procurement, culturing and maintenance of specimens

H. azteca was collected from its natural habitat in Lake San Miguel de Almaya, municipality of Capulhuac (State of Mexico), and transported to the laboratory in plastic bags with constant aeration. During culture, specimens were maintained in reconstituted water ($\text{NaHCO}_3 = 174 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 = 120 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{KCl} = 8 \text{ mg L}^{-1}$ and $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 120 \text{ mg}$

L⁻¹; all reagents were obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis MO) pH 7.5-8.5 at room temperature with constant oxygen (6.4-6.6 mg L⁻¹, O₂) and a 12 h/12 h light/dark photoperiod, and were fed ground lettuce ad libitum. Specimens used in toxicity assays were third-generation neonates obtained by sexual reproduction from a four-month culture.

2.5 Artificial sediment

The artificial sediment used was 70% sand (0.2 mm), 20% kaolinite (<0.002 mm) and 10% organic matter (0.2 mm). The organic matter source was lamb compost inactivated by dry heating at 55-60 °C for three days. The sediment was sterilized with three 15-min autoclave cycles at 121 °C and 15-lb pressure, separated by 1-h intervals.

2.6 Determination of the median lethal concentration (LC₅₀)

2.6.1 Test systems

Test systems were set up by adding reconstituted water and artificial sediment in a 3:1 ratio to 50-ml polyethylene containers equipped with constant oxygenation and maintained under a 12 h/12 h photoperiod at room temperature. Static systems were used, the medium was not replaced and no food was provided to specimens during exposure.

2.6.2 Determination of the LC₅₀

To establish the target concentration to be used in evaluating oxidative stress, the median lethal concentration (LC₅₀) of the industrial effluent was determined. To this end, five experimental systems containing different proportions of industrial effluent (0.71, 0.73, 0.75, 0.76 and 0.78%) in reconstituted water and a six effluent-free control system were set up, and ten specimens were placed in each system. A total of 180 organisms were used in the LC₅₀ determination.

Duration of the exposure period was 72 h, at the end of which the number of dead specimens in each system was counted. The assay was performed in triplicate. The 72-h LC₅₀ of industrial effluent and its 95% confidence limits ($P < 0.05$) were estimated by Probit analysis (EPA, v1.5). The data obtained were used to estimate the concentration to be used in the assays for oxidative stress determination.

Graph plots of these LC₅₀ estimates were used to derive lowest observed adverse effect level (LOAEL) values, these being the lowest concentration or amount of a substance, found by experiment or observation, which elicits an adverse alteration in morphology, functional capacity, growth, development, or life span of a target organism distinguishable from normal (control) organisms of the same species and strain under defined conditions of exposure. The approximate LOAEL values determined for industrial effluent was 0.732 %.

2.7 Sublethal toxicity assays

Sublethal toxicity assays involved adding industrial effluent at a concentration equal to the lowest observed adverse effect level (LOAEL), i.e. 0.0732%, to four test systems with 150 mg wet tissue of *Hyalrella azteca*. A kinetics was run for the following exposure periods: 12, 24, 48 and 72h. An industrial effluent-free control system with 150 mg wet tissue of *Hyalrella azteca* for each exposure period, and sublethal assays were performed in triplicate.

A sublethal toxicity assay was performed to determine the oxidative stress induced on *H. azteca* by industrial effluent. To each exposure system were added 150 mg (wet weight) of the amphipod and a concentration equal to the LOAEL of the corresponding to industrial effluent. After 72 h of exposure, specimens were removed and homogenized in 1 ml Tris buffer solution pH 7. The supernatant was centrifuged at 12, 500 x g for 15 min at -4 °C. The following oxidative stress biomarkers were evaluated: hydroperoxide content (HPC); lipid peroxidation (LPX); protein carbonyl content (PCC) in order to assess oxidized protein levels; and activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). Total protein content (Bradford 1976) was determined and was used to express the results of the biomarkers evaluated. All biochemical assays were done on the supernatant, except for LPX assessment in which the bud was used.

2.7.1 Determination of HPC

HPC was determined by the Jiang et al. (1992) method. To 100 µL of supernatant (previously deproteinized with 10% trichloroacetic acid) (Sigma-Aldrich, St. Louis) was added 900 µL of the reaction mixture [0.25 mM FeSO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis), 25 mM

H₂SO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis), 0.1 mM xylenol orange (Sigma-Aldrich, St. Louis) and 4 mM butyl hydroxytoluene (Sigma-Aldrich, St. Louis) in 90% (v/v) methanol (Sigma-Aldrich, St. Louis)]. The mixture was incubated for 60 min at room temperature and absorbance was read at 560 nm against a blank containing only reaction mixture. Results were interpolated on a type curve and expressed as nM CHP (cumene hydroperoxide) (Sigma-Aldrich, St. Louis) mg protein⁻¹.

2.7.2 Determination of LPX

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

2.7.3 Determination of PCC

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

2.7.4 Determination of SOD activity

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

2.7.5 Determination of CAT activity

CAT activity was determined by the Radi et al. (1991) method. To 20 ml of supernatant was added 1 ml isolation buffer solution [0.3 M saccharose (Vetec-Sigma-Aldrich, St. Louis), 1 ml EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis), 5 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis) and 5 mM KH_2PO_4 (Vetec-Sigma-Aldrich, St. Louis)], plus 0.2 ml of a hydrogen peroxide solution (20 mM, Vetec-Sigma-Aldrich, St. Louis). Absorbance was read at 240 nm after 0 and 60 s. Results were derived by substituting the absorbance value obtained for each of these times in the formula: CAT concentration = $(A_0 - A_{60})/\text{MEC}$ where the MEC of H_2O_2 is 0.043 mM/cm, and were expressed as $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}^{-1}$.

2.7.6 Determination of GPx activity

GPx activity was determined by the Gunzler and Flohe-Clairborne (1985) method as modified by Stephensen et al. (2000). To 100 μl of supernatant was added 10 μl glutathione reductase (2 U glutathione reductase, Sigma-Aldrich, St. Louis), plus 290 μl reaction buffer [50 mM K_2HPO_4 (Vetec, St. Louis), 50 mM KH_2PO_4 (Vetec, St. Louis) pH 7.0, 3.5 mM reduced glutathione (Sigma-Aldrich, St. Louis), 1 mM sodium azide (Sigma-Aldrich, St. Louis) and 0.12 mM NADPH (Sigma-Aldrich, St. Louis)] and 100 μl H_2O_2 (0.8 mM, Vetec, St. Louis). Absorbance was read at 340 nm at 0 and 60 s. Enzyme activity was estimated using the equation: GPx concentration = $(A_0 - A_{60})/\text{MEC}$, where the MEC of NADPH = 6.2 mM cm^{-1} . Results were expressed as mM NADPH mg protein⁻¹.

2.7.7 Determination of protein content

To 25 µl of supernatant was added 75 µl deionized water and 2.5 ml Bradford's reagent (0.05 g Coomassie Blue dye, 25 ml of 96% ethanol and 50 ml H₃PO₄, in 500 ml deionized water). The test tubes were shaken and allowed to rest for 5 min prior to reading of absorbance at 595 nm and interpolation on a bovine albumin curve (Bradford 1976).

2.8 Statistical analysis

In the acute toxicity assay (72-h LC₅₀ of industrial effluent), Probit analysis was performed and significance assessed by the degree of 95% LC₅₀ overlap (EPA Analysis Program v1.5). The χ^2 linear adjustment test was not significant at $p < 0.05$.

In the sublethal toxicity assays, statistical evaluation of results was done with one-way analysis of variance (ANOVA) and differences between means were compared using the Tukey-Kramer multiple comparisons test, with p set at < 0.05 . Statistical determinations were made with the SPSS v10 software package (SPSS, Chicago IL).

3. Results

3.1 Physicochemical characterization

Results of physicochemical characterization are shown in Table 1. The physicochemical characteristics of the effluent do not exceed the limits established in the official Mexican norms (NOM-001-SEMARNAT-1996; NOM-073-ECOL-1994). Dissolved oxygen was 12.2 mg L⁻¹, conductivity 143.2 µS cm⁻¹, ammonia 0.73 mg L⁻¹ and NaClO 1.0 mg L⁻¹; these four parameters are not taken into account in either of these norms.

3.2 DCF, IBP, NPX and PAR quantification

NSAID quantification in the industrial effluent is shown in Table 2. DCF, IBP, NPX and PAR concentrations ranged from 1.0 to 3.03 mg L⁻¹.

3.3 LC₅₀-72h determination

The LC₅₀ of the industrial effluent as well as their 95% confidence intervals was 0.732% [0.725-0.741]. The χ^2 linear adjustment test was not significant at $p \leq 0.05$.

3.4 Oxidative stress status

3.4.1 HPC

The HPC induced by industrial effluent is shown in Fig. 1. As you can see there are significant increases compared to the control group ($p < 0.05$) at all exposure times. These increases were 44.5, 77.8, 130.3 and 105.7% at 12, 24, 48 y 72 h respectively.

3.4.2 LPX

The amount of MDA induced by industrial effluent is shown in Figure 2. As you can see there are time dependent significant increases compared to the control group ($p < 0.05$). These increases were 270.2, 317.9, 419.7 and 531.9 % at 12,24,48 y 72 h respectively.

3.4.3 PCC

Protein oxidation in specimens exposed to industrial effluent is shown in Figure 3. Significant increases in this biomarker with respect to control were observed ($p < 0.05$) in all exposure times. These increases were 80.1, 74.2, 71.2, 117.4 % at 12, 24, 48 and 72 h respectively.

3.4.4 SOD activity

Figure 4 shows SOD activity results. The industrial effluent induced significant increases with respect to the control group ($p < 0.05$). The observed increases were 82.0, 91.0, 155.1, 184.4 % at 12, 24, 48 and 72 h respectively.

3.4.5 CAT activity

CAT activity, expressed as mM H₂O₂/mg proteína, is shown in Figure 5. The industrial effluent induced a significant increase with respect to the control group ($p < 0.05$). Significant increases occurred at 12, 24, 48 and 72 h were 70.4, 81.4, 129.8 and 178.8%, respectively.

3.4.6 GPx activity

Figure 6 shows GPx activity results. As regards the industrial effluent was a significant increase with respect to the control group ($p < 0.05$). Significant increases occurred at 12, 24, 48 and 72 h were 41.9, 50.6, 74.7 and 120.5%, respectively.

4. Discussion

The physicochemical properties of the effluent analyzed in the present study (Table 1) do not exceed the limits established in the official Mexican norms NOM-001-SEMARNAT-1996 and NOM-073-ECOL-1994. The dissolved oxygen, conductivity, ammonia and NaClO are not considered in either of these norms. Ammonia and conductivity are confounding factors that may interfere with the bioeffects of micropollutants. Postma et al. 2002 indicates that the highest values at which observed no significant effects were ammonia 13-60 mg L⁻¹ and conductivity < 650 μ S cm⁻¹. On this basis, conductivity and ammonia in our study (143.2 μ S cm⁻¹ and 0.73 mg L⁻¹ respectively) are not confounding factors.

Another contaminant identified in the effluent was NaClO in 1.0 mg L⁻¹ which is used, together with other substances, as a disinfectant in water chlorination. This type of compounds can form highly toxic products such as haloalkanes, haloacetic acids, haloacetonitriles, haloketones and haloaldehydes (WHO, 1996). These are formed by reactions of chlorine with the humic and fulvic acids normally present in surface water (Rook 1977; Cantor 1997; Boorman 1999).

The pharmaceutical plant emanating the effluent analyzed in our study is used exclusively for NSAID manufacture. Since the plant has no wastewater treatment system, the effluents it generates contain NSAIDs derived from the manufacturing process. The NSAIDs detected in the effluent (Table 2) include DCF, IBP, NPX and PAR at concentrations of 1.0 to 3.03 mg L⁻¹. These contaminants are polar pharmaceuticals which gives them the capacity

to move through the sediment profile (environmental kinetics) and persistent enough to contaminate the aquifer (Almeida et al. 2013). Concentrations of IBP, NPX and DCF greater than $1 \mu\text{g L}^{-1}$ are a risk for groundwater contamination resulting from the wastewater irrigation (Gibson et al. 2010).

In our study the LC_{50} of the effluent in *H. azteca* was 0.732%, with a 95 % confidence interval of (0.725-0.741). In other species such as *Danio rerio*, the LC_{50} from bulk drug production has ranged from 2.7 to 8.1 % (Carlsson et al. 2010). These findings may be explained by the fact that NSAIDs act by blocking the enzyme cyclooxygenase. The latter is responsible for catalyzing arachidonic acid degradation in prostaglandin production (Cha et al. 2006; Fortier et al. 2008). These eicosanoids act as autocrine and paracrine messengers and, in invertebrate species such as *H. azteca*, as important mediators during reproduction and in the immune system (Stanley 2000; Fortier et al. 2008). Prostaglandins are also involved in neurotransmission and the transport of ions across cell membranes (Arkipova et al. 2005). The final result of these actions in the present study might have been inhibition of neurotransmission evidenced by *H. azteca* immobilization.

Diverse studies have shown that NSAIDs are unstable and are photodegradable to metabolites more toxic to aquatic organisms than the unaltered pharmaceuticals (Borgmann et al. 2007; Araujo et al. 2011). Also, the biotransformation of NSAIDs once they enter the body must also be considered. The major pathway of biotransformation of carboxylate NSAIDs (ASA, DCF, NPX, and IBP) is glucuronic acid conjugation catalyzed by the uridine diphosphoglucuronosyl transferase superfamily of enzymes, which results in acyl glucuronides (Pritchard 1993). These compounds are reactive intermediates that can undergo acyl migration and hydrolysis. They can also form adducts with nucleophilic amino acid residues. Many NSAID-derived acyl glucuronides, including those obtained from DCF and IBP, have been shown to form covalent bonds with intra and extracellular proteins, with toxicological consequences (Boelsterli 2007).

In the LPX process, polyunsaturated fatty acids react with ROS, particularly the hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$) and the reactive nitrogen species (RNS) peroxynitrite (ONOO^-), via a chain reaction mechanism. This permits the formation of hydroperoxides that are degraded

to low molecular weight products, including MDA (Wilhelm Filho 1996). As can be seen in Fig. 1, a time-dependent increase in HPC occurred respect to control group ($P < 0.05$). Also, in Fig. 2 a similar behaviour was observed, time-dependent level of damage to lipids respect to control is shown in LPX biomarker. These findings may be explained by the fact that in the NSAID biotransformation by CYP2C9 are formed ROS such as $\text{OH}\cdot$ and oxygenated intermediates like the oxy-cytochrome P450 complex $[\text{P450}(\text{Fe}^{3+})\text{O}^{2-}]$ as a result of release of the superoxide anion by reaction decoupling. In both cases, ROS production is increased, which explains the increases in LPX and HPC in our study. Similar effects were observed by Oviedo-Gómez et al. (2010), they indicate that the amphipod *Hyaella azteca* exposed to DCF in 46.7 mg Kg^{-1} showed a significant increase ($p < 0.05$) with respect to controls at 12, 24, 48 and 72 h. These authors mention that LPX increase can be explained in terms of formation of 4'-hydroxy DCF and 5'-hydroxy DCF and their subsequent biotransformation to benzoquinones which increase ROS formation. Also, Gómez-Oliván et al. 2012 found similar effects when exposed to *Hyaella azteca* to PCM to $770 \mu\text{g/kg}$. This increase may be due to formation of N-acetyl p-benzoquinonimine which is able to bind to cellular membranes. In mammals, this reactive metabolite is known to induce production of ROS and reactive nitrogen species, particularly the superoxide anion, the hydroxyl radical, and hydrogen peroxide as well as nitro oxide and peroxy nitrite (Yen et al. 2007), which bind to lipids in the membrane and oxidize them. These studies support the results of HPC and LPX biomarkers obtained in this study.

The reactive metabolites and ROS produced during CYP-mediated biotransformation can also affect proteins inducing increased in PCC, which leads to loss of sulfhydryl groups and changes in the resonance structures of amino acids, altering their function and therefore the integrity of the body (Parvez & Raisuddin 2000). The superoxide ion reacts rapidly with the nitric oxide (NO) derived from arginine metabolism, forming peroxy nitrite (ONOO^-) (Halliwell 1997; Doi et al. 2002; Jifa et al. 2006). The oxidant agent peroxy nitrite is known to induce protein oxidation and nitration in absence of GSH, eliciting mitochondrial dysfunction and eventually leading to irreversible damage and severe loss of cellular ATP (Jaeschke et al. 2003). This information supports the results obtained in this study, as can be seen in Fig. 3, a time-dependent increase in PCC occurred respect to control group ($P < 0.05$).

The antioxidant defense system is essential in the neutralization of ROS and related

damage (Regoli et al., 2002). This system is mediated by a cascade of antioxidant enzymes that sequester ROS and convert them to less toxic and reactive species. This group of enzymes includes SOD, CAT, and GPx.

Superoxide dismutase is the first mechanism of antioxidant defense and the main enzyme responsible for offsetting the effects of ROS, particularly the superoxide ion (van der Oost et al. 2003) that is converted to hydrogen peroxide by SOD. Subsequently, H₂O₂ is sequestered and degraded to H₂O by CAT and GPx.

In relation to the antioxidant enzymes, SOD activity in the amphipod *Hyalella azteca* in this study increased significantly in all exposure times respect to controls ($P < 0.05$). These increases may be due to the fact that during the CYP-mediated biotransformation of NSAID, the superoxide anion radical, responsible for increased SOD activity, is released (Doi et al. 2002).

Most chlorine compounds are powerful prooxidants which can affect antioxidant defenses in exposed organisms (Ueno et al. 2000; Pozzetti et al. 2003). When NaClO is added to water, the solution reacts readily with biomolecules (including proteins and nucleotide bases) to produce a variety of chlorinated organic compounds which are mostly lipophilic, persistent and toxic in aquatic environments (Emmanuel et al. 2004).

Increased SOD activity may act as a signal of oxidative stress, leading to activation and/or induction of antioxidant enzymes associated with a system of H₂O₂-sequestration such as CAT or GPx (Vlahogianni et al., 2007).

In our study, CAT and GPx activity in *Hyalella azteca* was increased with respect to control group in all exposure times ($P < 0.05$). The increase observed in CAT activity may be due to higher concentrations of H₂O₂ as a result of SOD activity.

Present results are consistent with those obtained by Oviedo-Gómez et al. (2010), who reported increases in the activity of CAT and GPx in *H. azteca* exposed to DCF. Also, similar results were found by Gómez-Oliván et al. (2014) in *Daphnia magna* exposed to IBP and DCF. This result indicates this enzyme is unable to offset ROS-induced. Bagnyukova et al. (2006) state that LPX products may be involved in the regulation of some antioxidant

enzymes, so that the LPX increase found in our study may likewise explain the increased antioxidant enzyme (SOD, CAT, and GPx) activity observed. damage.

5. Conclusions

The industrial effluent analyzed in the present study contains NSAIDs and NaClO, and induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. The set of assays used in the present study constitutes a reliable early warning biomarker for use in evaluating the toxicity induced by these emerging contaminants on *Hyalella azteca*.

Acknowledgments

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

References

- Almeida B, Oehmen A, Marques R, Brito D, Carvalho G, Barreto Crespo MT (2013) Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture. *Bioresour. Technol.* 133:31- 37
- Anand RJK, Arabi M, Rana KS, Kanwar U (2000) Role of vitamin C and E with GSH in checking the peroxidative damage to human ejaculated spermatozoa. *Int. J. Urol.* 7:S1–S98
- APHA, AWWA, WPCF (1995) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, 19th ed. Washington, DC.
- Araujo L, Villa N, Camargo N, Bustos M, García T, & Prieto A (2011) Persistence of gemfibrozil, naproxen and mefenamic acid in natural waters. *Environ. Chem. Letters.* 9:13–18

- Arkhipova OV, Grishin SN, Sitdikova GF, & Zefirov AL (2005) Presynaptic effects of arachidonic acid and prostaglandin E2 in the frog neuromuscular synapse. *Russ. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova.* 91:268–276
- Backhaus T, Altenburger R, Arrhenius A, Blanck H, Faust M, Finizio A, Gramatica P, Grote M, Junghans M, Meyer W, Pavan M, Porsbring T, Scholze M, Todeschini R, Vighi M, Walter H, & Grimme LH (2003) The BEAM-project: prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. *Cont. Shelf. Res.* 23:1757–1769
- Bagnyukova T, Chahrak O, Lushchak V (2006) Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78:325–331
- Balcıoğlu IA, Ötker M (2003) Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ processes. *Chemosphere* 50:85-95
- Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C (2005) Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 140(2):175–186
- Bendz D, Paxéus NA, Ginn TR, Loge FJ (2005) Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.* 122:195–204
- Boelsterli UA (2007) Mechanistic toxicology. The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Boorman GA (1999) Drinking water disinfection by products: review and approach to toxicity evaluation. *Environ. Health Perspect.* 107:207-217
- Borgmann U, Bennie DT, Ball AL, & Palabrica V (2007) Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations. *Chemosphere* 66:1278–1283
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254

- Brown KD, Kulis J, Thomson B, Chapman TH, Mawhinney DB (2006) Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci. Total Environ.* 366:772–783
- Büege JA, & Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52:302–310
- Burcham PC (2007) Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: A new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 56:18–22
- Calisto V, Esteves VI (2009) Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77:1257–1274
- Cantor KP (1997) Drinking water and cancer. *Cancer Causes Control* 8:292-308
- Carlsson C, Johansson A, Alvan G, Bergman, Kuhler T (2006) Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total Environ.* 364:67–87
- Carlsson G, Örn S, Larsson DG (2010) Effluent from bulk drug production is toxic to aquatic vertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 28(12):2656–2662
- Cha YI, Solnica-Krezel L, DuBois RN (2006) Fishing for prostanoids: deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Develop. Biol.* 289:263–272
- Doi H, Iwasaki H, Masubuchi Y, Nishigaki R, Horie T (2002) Chemiluminescence associated with the oxidative metabolism of salicylic acid in rat liver microsomes. *Chem-Biol. Int.* 140(2): 109–119
- Emmanuel E, Keck G, Blanchard JM, Vermande P, Perrodin Y (2004) Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Environ. Int.* 30:891–900

- Félix-Cañedo TE, Durán-Álvarez JC, Jiménez-Cisneros B. (2013) The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Sci. Total Environ.* 454/455:109–118
- Fent K, Weston AA, Caminada D (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76:122-159
- Ferrari B, Paxéus N, Giudice RL, Pollio A (2003) Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters; study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 55:359–70
- Fortier MA, Krishnaswamy K, Danyod G, Boucher-Kovalik S, & Chapdalaine P (2008) A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. *J. Physiol. Pharmacol.* 59:65–89
- Gibson R, Durán AJC, León EK, Chávez A, Jiménez CB (2010) Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, México. *Chemosphere* 81:1437–45
- Gómez-Oliván LM, Carmona-Zepeda F, Galar-Martínez M, Téllez-López A, Amaya-Chávez A (2009) A study of self-medication in a communitarian pharmacy in the city of Toluca, *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 40:5-11
- Gómez-Oliván LM, Neri-Cruz N, Galar-Martínez M, Vieyra-Reyes P, García-Medina S, Razo-Estrada C, Dublán-García O, Corral-Avitia AY (2012) Assessing the oxidative stress induced by paracetamol spiked in artificial sediment on *Hyalella azteca*, *Water Air Soil Pollut.* 223:5097-5104
- Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, García-Medina S, Valdés- Alanís A, Islas-Flores H, Neri Cruz N (2014) Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug. Chem. Toxicol.* 37(4):391-399.
- González-González ED, Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, Vieyra-Reyes P, Islas-Flores H, García-Medina S, Jiménez-Vargas JM, Razo-Estrada AC, Pérez-Pasten BR (2014) Metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals drugs present in

- water from Madín Reservoir (Mexico) induce oxidative stress in gill, blood and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 67:281–295
- Gunzler W, & Flohe CA (1985) Glutathione peroxidase. In R. A. Green-Wald (Ed.), Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Ratón, FL: CRC Press 285–290
- Halliwell B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. Nut Rev, 55(1), S44–S49.
- Hardman JG, Limbird LE, Goodman A (2003) Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw-Hill Interamericana, 10th ed. Mexico DF.
- Hong HN, Kim HN, Park KS, Lee SK, Gu MB (2007) Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. Chemosphere 67:2115-2121
- Islas-Flores H, Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, Colín-Cruz A, Neri-Cruz N, García-Medina S (2013) Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*), Ecotox. Environ. Safe. 9232-38
- Jaeschke H, Knight TR, Bajt ML (2003) The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. Toxicol. Lett. 144:279–288
- Jifa W, Yu Z, Xiuxian S, You W (2006) Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo [a] pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. Ecotox. Environ. Saf. 65(2):230–236
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, & Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 233:346–357
- Li D, Yang M, Hu J, Zhang Y, Chang H, Jin F (2008) Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. Water Res. 42:307–317
- Matozzo V, Rova S, Marin MG (2012) The nonsteroidal anti-inflammatory drug, ibuprofen, affects the immune parameters in the clam *Ruditapes philippinarum*, Mar. Environ. Res. 79:116-121

- Misra HP, & Fridovich I (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247:3170–3175
- NMX-AA-003-1980, Wastewater, sampling, Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, Diario Oficial de la Federación 25 March 1980
- NOM-001-SEMARNAT-1996, Official Mexican Norm setting the maximum permissible limits of contaminants in wastewater discharges entering national waters and resources, Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, Diario Oficial de la Federación 30 October 1996
- NOM-073-ECOL-1994, Official Mexican Norm setting the maximum permissible limits of contaminants in wastewater discharges arising in the pharmaceutical and pharmaceutical industries and entering receiving water bodies, Secretaría de Desarrollo Social, Diario Oficial de la Federación 10 June 1994
- Parolini M, Binelli A, Cogni D, Provini A (2010) Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 79:489-498
- Parolini M, Binelli A, Cogni D, Riva C, Provini (2009) An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicol. Vitro* 23:935–42
- Parvez S, & Raisuddin S (2005) Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ.Toxicol. Pharmacol.* 20:112–117
- Postma JF, De Valk S, Dubbeldam M, Maas JL, Tonkes M, Schipper CA, Kater BJ (2002) Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms, *Ecotox. Environ. Safe.* 53:226-237
- Pozzetti L, Broccoli M, Potenza G, Canestro D, Affatato A, Sapone A, Antelli A, D'Amico E, Vangelisti S, Cantelli-Forti G, Paolini M, Ferrara G, Elia Ac, Dorr AJM, Taticchi MI,

- Mantilacci L, Natali M (2003) Tecniche enzimatiche per valutare la tossicità di acque potabilizzate. *Acqua Aria* 4:64–68
- Pritchard JB (1993) Aquatic toxicology—past, present, and prospects. *Environ. Health Persp.* 100: 249– 257.
- Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush K M, Carpo JD, & Freeman BA (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266:22028–22034
- Regoli F, Gorbi S, Frenzilli G, Nigro M, Corsi I, Focardi S, Winston GW (2002) Oxidative stress in ecotoxicology: From the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar. Environ. Res.* 54:419–423
- Richardson SD (2009) Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 81:4645-4677
- Rook JJ (1977) Chlorination reactions of fulvic acids in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 11:478-482
- San Juan-Reyes N, Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, Vieyra-Reyes P, García-Medina S, Islas-Flores H, Neri-Cruz N (2013) Effluent from an NSAID-manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus carpio*. *Water Air Soil Pollut.* 224:1-14
- Santos LH, Araújo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C (2010) Montenegro MCBSM. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175:45–95
- Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65:725–759
- Siemens J, Huschek G, Siebe C, Kaupenjohann M (2008) Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley. *Water Res.* 42:2124–34

- Silva E, Rajapakse N, & Kortenkamp A (2002) Something from “nothing”—eight weak chemicals combined at concentrations below NOEC’s produce significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 36(8):1751–1756
- Smolders R, Bervoets L, Blust R (2004) In situ and laboratory bioassays to evaluate the impact of effluent discharges on receiving aquatic ecosystems. *Environ. Poll.* 132: 231–243
- Stanley DW (2000) Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems. Princeton: Princeton University Press, 231–234
- Ueno H, Sayato Y, Nakamuro K (2000) Hematological effects of chlorine dioxide on in vitro exposure in mouse, rat and human blood and on subchronic exposure in mice. *J. Health Sci.* 46:110–116
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotox. Environ. Safe.* 64:178–189
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13:57–149
- Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M, Valavanidis A (2007) Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54:1361.
- WHO (1996) Revision of the WHO Guidelines for Drinking Water Quality, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wilhelm Filho D (1996) Fish antioxidant defenses—a comparative approach. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:1735–1742
- Winzer K, Becker W, Van Noorden CJ, Köhler A (2000) Short-time induction of oxidative stress in hepatocytes of the European flounder (*Platichthys flesus*). *Mar. Environ. Res.* 50:495–501

Yen FL, Wu TH, Lin LT, Lin CC (2007) Hepatoprotective and antioxidant effects of *Cuscuta chinensis* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *J. Ethnopharmacol.* 111(1): 123–128

Figure captions

Fig. 1 Hydroperoxide content (HPC) in *H. azteca* exposed to industrial effluent for 12, 24, 48, and 72 h. Values are the mean of three replicates \pm SE. CHP = cumene hydroperoxide. *Significantly different from control values, ANOVA and Tukey Kramer ($P < 0.05$)

Fig. 2 Lipid peroxidation (LPX) in *H. azteca* exposed to industrial effluent for 12, 24, 48, and 72 h. Values are the mean of three replicates \pm SE. MDA = malondialdehyde. *Significantly different from control values, ANOVA and Tukey Kramer ($P < 0.05$)

Fig. 3 Protein carbonyl content (PCC) in *H. azteca* exposed to industrial effluent for 12, 24, 48, and 72 h. Values are the mean of three replicates \pm SE. *Significantly different from control values, ANOVA and Tukey Kramer ($P < 0.05$)

Fig. 4 Superoxide dismutase (SOD) activity in *H. azteca* exposed to industrial effluent for 12, 24, 48, and 72 h. Values are the mean of three replicates \pm SE. *Significantly different from control values, ANOVA and Tukey Kramer ($P < 0.05$)

Fig. 5 Catalase (CAT) activity in *H. azteca* exposed to industrial effluent for 12, 24, 48, and 72 h. Values are the mean of three replicates \pm SE. *Significantly different from control values, ANOVA and Tukey Kramer ($P < 0.05$)

Fig. 6 Glutathione peroxidase (GPx) in *H. azteca* exposed to industrial effluent for 12, 24, 48, and 72 h. Values are the mean of three replicates \pm SE. *Significantly different from control values, ANOVA and Tukey Kramer ($P < 0.05$)

14. ANEXOS

Se realizaron diversas pruebas para evaluar la toxicidad de las aguas tras ser sometidas a un tratamiento (Proceso de oxidación avanzada) para la remoción de contaminantes.

El primer paso consistió en una prueba presuntiva para evidenciar la presencia de peróxidos. Para esto, se colocaron 100 µl de sangre (de *Cyprinus carpio*) con 100 µl de H₂O₂ (control positivo), observándose la aparición de burbujeo característico debido a la reacción de la hemoglobina con el peróxido.

El procedimiento anterior se realizó con las muestras tratadas, observándose la aparición de burbujeo similar al de nuestro control. En la **fig. 8** se presenta un ejemplo de la prueba realizada.

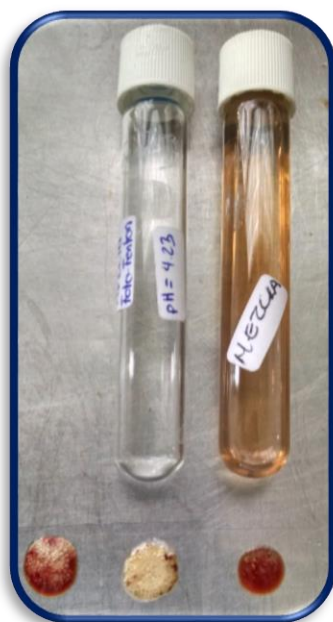


Figura 8. Prueba presuntiva para detectar la presencia de peróxido. La primera muestra corresponde al control, las dos siguientes, son muestras tratadas con el proceso de oxidación avanzada, en el caso de la muestra dos, se observa un mayor burbujeo en comparación con el testigo.

Al ver los resultados de estas muestras, se pudo tener una idea del factor determinante de la toxicidad de las aguas tras el tratamiento, ya que si bien en cuanto a parámetros físico-químicos, los resultados eran alentadores, al ser expuestos los organismos, se observaba una muerte en un tiempo menor a 24 hrs.

Se hicieron diversas pruebas para determinar la CL₅₀ de los organismos, realizándose de como se muestra en la tabla siguiente:

Características de los sistemas	CL₅₀
Tipo de medio	Estático
Proporción sedimento/agua	1:3
Concentraciones	5 concentraciones más 1 control
Repeticiones	3
Organismos por sistema	10
Tiempo de exposición	72 hrs

Los resultados obtenidos en estas pruebas no son concluyentes debido a que los organismos mueren en un tiempo máximo de 24 hrs. presentando desde un inicio (a las pocas horas de exposición), problemas de movilidad y cambios de coloración.

Los procesos de oxidación avanzada como el empleado en estas pruebas, han demostrado ser muy útiles para la remoción de gran variedad de sustancias, sin embargo, es necesario realizar más determinaciones biológicas para obtener resultados reales y poder aplicar correctamente estas nuevas tecnologías.