

*Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
Facultad de Ciencias Agropecuarias.*



“TESIS DE DIPLOMA”

*Ecotoxicidad aguda en semillas de *Lactuca sativa* L. de
antibióticos con riesgo ambiental*

Autor: Williams Madrigal Gutiérrez



Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
Facultad de Ciencias Agropecuarias.
Departamento Biología.



“TESIS DE DIPLOMA”

Ecotoxicidad aguda en semillas de *Lactuca sativa* L.
de antibióticos con riesgo ambiental

Autor: Williams Madrigal Gutiérrez

Tutores: Dra. C. Daymí Carrazana García

Departamento de Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

Lic. Esther María Hernández Martínez

Centro de Bioactivos Químicos (CBQ)

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

2014

"No se equivoca el hombre que ensaya distintos caminos para alcanzar sus metas; se equivoca aquel que por temor a equivocarse nunca acciona."

"El error más grande lo cometes cuando, por temor a equivocarte, te equivocas dejando de arriesgar en el viaje hacia tus objetivos."

Rabindranath Tagore, (Calcuta 1861 - 1941)
Poeta, filósofo. Premio Nobel de Literatura 1913.

A mis padres, porque me quieren tal como soy.

A mis hermanos y cuñadas, porque fueron mi ejemplo a seguir.

A mi sobrina Laura Margarita por ser alguien especial.

A Roly, porque una amistad verdadera es un milagro.

A Anabel por querer compartir su vida conmigo.

A todos los que me ayudarán en el futuro a seguir adelante.

A todos los trabajadores del Centro de Toxicología (CENTOX) y en especial a Beatriz, sin ustedes no hubiera sido posible la culminación de este trabajo.

A todos los trabajadores del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) por una ayuda inestimable cada vez que los necesitaba.

A mis tutoras Daymí y Esther María por su dedicación y ayuda.

A mis compañeros durante estos 5 años de estudio porque sin ellos la vida en la universidad no hubiera sido ni remotamente lo que fue. A todos los que hicieron posible este trabajo.

RESUMEN

En los últimos años existe una creciente preocupación por los efectos que los desechos de los medicamentos producen en el medio ambiente. El objetivo de la investigación fue evaluar la ecotoxicidad aguda de antibióticos en *Lactuca Sativa L.* en un área de uno de los dos ríos que atraviesan las zonas más urbanizadas de la ciudad de Santa Clara. Para esto se estimaron los posibles residuos de antibióticos mediante un estudio de consumo durante un año en un hospital, se predijo sus concentraciones en el agua de río mediante un modelo matemático y se determinó su riesgo ecotoxicológico. En el período de estudio se utilizaron 22 antibióticos, el de mayor consumo fue la Cefotaxima y el de menor el Anfotericin. Todos constituyen un riesgo para el ambiente exceptuando Anfotericin B, Doxiciclina y Miconazol. Se observó inhibición de la germinación de las semillas *Lactuca sativa L.* en todos los antibióticos resaltando el Sulfaprim con un 38,67% de inhibición para la raíz y un 38,78% para el hipocotilo y la Cefepima la de menor efecto en la inhibición de la germinación con un 11,03 en ambos casos. También resulto el Sulfaprim el que presentó mayor inhibición de la elongación de la raíz y el hipocotilo con la Vancomicina como la de menor inhibición. En la mezcla solamente hubo inhibición de la germinación a la mayor concentración evaluada, mientras que en el resto de las concentraciones muestra una tendencia a la estimulación del crecimiento tanto en la raíz como en el hipocotilo.

Palabras claves: Cefepima, Cefotaxima, Sulfaprim, Vancomicina, *Lactuca*, mezcla

ABSTRACT

In the last years a growing concern exists for the goods that the waste of the medications take place in the environment. The objective of the investigation was to evaluate the acute ecotoxicity of antibiotics in *Lactuca sativa L.* in an area of one of the two rivers that cross the urbanized areas in Santa Clara's city. For this they were considered the possible residuals of antibiotics by means of a consumption study during one year in a hospital, it was predicted their concentrations in the river water by means of a mathematical model and their risk ecotoxicological risk was determined. In the period of study 22 antibiotics were used, that of more consumption was the Cefotaxime and the one of smaller the Amphotericin. All constitute a risk for the atmosphere excepting Amphotericin B, Doxycycline and Miconazole. Inhibition of the germination of the seeds *Lactuca sativa L.* was observed in all the antibiotics standing out the Sulfaprim with 38,67 inhibition% for the root and 38,78% for the hypocotile and the Cefepime that of smaller effect in the inhibition of the germination with a 11,03 in both cases. Also turned the Sulfaprim which had higher inhibition of root elongation and hypocotyl with Vancomycin as low inhibition. In the mixture there was only inhibition from the germination to the biggest valued concentration, while in the rest of the concentrations sample a tendency to the stimulation of the growth as much in the root as in the hypocotile.

Key Words: Cefepime, Cefotaxime, Vancomycin, Sulfaprim, *Lactuca* mixture

1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	5
2.1. Contaminación ambiental por compuestos químicos.....	5
2.1.1. Contaminantes emergentes.....	6
2.1.2. Fármacos como contaminantes emergentes.....	7
2.1.3. Rutas potenciales de entrada de fármacos al medio ambiente.....	10
2.1.4. Antibióticos.....	13
2.2. Modelos y métodos de experimentación para el estudio de medicamentos como contaminantes ambientales.....	14
2.2.1. Modelos de distribución y destino de medicamentos en el ambiente.....	15
2.2.2. Modelos y métodos de exposición ambiental para el estudio de medicamentos como contaminantes ambientales.....	17
2.2.3. Fases para la evaluación ecotoxicológica de un fármaco en el ambiente.....	19
2.3. Efecto de los medicamentos en el ambiente.....	23
2.3.1. Conceptos generales para comprender los estudios de ecotoxicidad.....	24
2.3.2. Ensayos utilizados en los estudios de riesgos ecotoxicológicos.....	26
2.3.3. Consecuencias ecotoxicológicas.....	28
2.3.4. ·Ecotoxicología de mezclas farmacéuticas.....	29
3. MATERIALES Y METODOS.....	30
3.1. Determinación del consumo de antibióticos.....	31
3.2. Predicción de la concentración ambiental (PEC).....	32
3.3. Evaluación ecotoxicológica del riesgo ambiental.....	33
3.3.1. Ensayo de toxicidad aguda en semilla de <i>Lactuca sativa</i> L.....	33
3.3.2. Ensayo de toxicidad aguda en semilla de <i>Lactuca sativa</i> L con la mezcla de antibióticos.....	36
3.3.3. Concentración-Adición (CA).....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1 Determinación del consumo de antibióticos.....	39
4.2. Predicción de la concentración ambiental (PEC).....	39
4.3. Evaluación ecotoxicológica del riesgo ambiental.....	40

4.3.1. Ensayo de toxicidad aguda en semilla de <i>Lactuca sativa</i> L.....	40
4.3.2. Ensayo de toxicidad aguda en semilla de <i>Lactuca sativa</i> L. con la Mezcla de antibióticos.....	44
4.3.3. Concentración-Adición (CA).....	44
5. DISCUSION.....	46
5.1. Determinación del consumo de antibióticos.....	46
5.2. Predicción de la concentración ambiental (PEC).....	48
5.3. Evaluación ecotoxicológica del riesgo ambiental.....	49
5.3.1. Ensayo de toxicidad aguda en semilla de <i>Lactuca sativa</i> L.....	49
5.3.2. Ensayo de toxicidad aguda en semilla de <i>Lactuca sativa</i> L. en la mezcla de antibióticos.....	53
5.3.3. Concentración-Adición(CA).....	54
6. CONCLUSIONES.....	55
7. RECOMENDACIONES.....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	57
ANEXO.....	69

1. Introducción.

Los productos farmacéuticos son sustancias que intentan curar, mitigar o prevenir en su aplicación en el cuerpo humano o animal, de enfermedades, sufrimiento, daño corporal y problemas patológicos. Los productos de cuidado personal y cosméticos (PPCPs) como las fragancias, champús y cosméticos en conjunto con los fármacos activos o emergentes debido a su uso intenso y extensivo ingresan al ambiente cada año, y estiman que su cantidad es similar al total de plaguicidas utilizados durante el mismo periodo (Filho *et al.*, 2007).

Últimamente existe una creciente preocupación por los efectos que los medicamentos consumidos y los desechos de estos, producen en el medio ambiente. El motivo es que se ha detectado presencia de trazas de fármacos en aguas superficiales y subterráneas, incluidos en los seres vivos que los habitan, los suelos y en aguas residuales (Quesada, 2009).

Fármacos con diferentes estructuras, funciones y actividades como antibióticos, hormonas, anestésicos, antihipertensivos, antiulcerosos, antilipémicos, cardiovasculares, antidrepesivos, medios de contraste de rayos X y antiinflamatorios entre otros han sido detectados en diferentes matrices ambientales acuáticas (Bila & Dezotti, 2003).

Para entender cómo se comporta un medicamento en el ambiente, y en particular en el agua de río a la cual son vertidos sus residuos se necesita conocer las propiedades físico-químicas del mismo, así como las características del medio ambiente y geográficas del lugar donde se encuentra (Ramos, 2009)

A pesar de lo difícil que es predecir exactamente lo que ocurrirá con un medicamento cuando ha entrado en el ambiente, los científicos han logrado determinar características físico-químicas cuantificables para los medicamentos. Con esta información pueden predecirse la concentración a la que pudiera encontrarse un medicamento en el medio (Ramos, 2009).

En el caso particular de los anti infecciosos no se conoce adecuadamente las consecuencias ecológicas del ingreso de estos a los cuerpos de agua. Los anti infecciosos comprenden a todos los antibacterianos, antifúngicos y antivirales, y

son utilizados para combatir las enfermedades infecciosas. Son muy pocos los que hoy en día poseen algún estudio de toxicidad (Stockholm County Council, 2012). Por ende, la evaluación del efecto de estos compuestos en bioensayos a través de una evaluación del riesgo ecológico permitirá tomar las medidas de mitigación necesarias para la protección de los ambientes acuáticos por productos farmacéuticos (*Iannacone y Alvariano, 2009*).

Por medio de estos estudios se establecen los criterios de calidad para la protección de la vida acuática, los que posteriormente, se usan para determinar los estándares de calidad ambiental para cada agente químico (*Iannacone y Alvariano, 2009*).

Desde una perspectiva normativa, el sector sanitario nunca se ha situado al mismo nivel que los demás (ejemplo: sector industrial) en cuanto a los riesgos sanitarios implícitos.

Como consecuencia, hasta hace muy poco no existían legislaciones específicas al respecto, si bien en estos últimos años se ha procurado subsanar tal deficiencia. A diferencia de lo que ocurre en muchas otras actividades, en las que la salud y la seguridad se integran en la organización, en la mayoría de los centros sanitarios se presta aún muy escasa atención al problema. Esto podría obedecer, en parte, a que a veces este sector se muestra más interesado en la investigación y la adquisición de nuevas tecnologías y en las más modernas técnicas de tratamiento y diagnóstico que en investigar los efectos que estos avances pueden tener en la salud y en el medio ambiente.

Un hospital no es un entorno social aislado; su misión le impone unas responsabilidades sociales muy serias. El hospital debe integrarse en su entorno y tratar de reducir sus efectos sobre éste, contribuyendo así a la salud ambiental. El progreso de la ciencia y la asistencia sanitaria se debe combinar con la protección del medio ambiente, ya que las políticas medioambientales aplicadas en un hospital pueden afectar a la calidad de vida tanto de sus propios trabajadores y pacientes, de las personas que viven en su entorno así como al medio ambiente. Es por esto que reviste especial importancia ambiental y para la salud pública, el

manejo y disposición final de residuos sólidos y líquidos hospitalarios en las instituciones de salud. Una deficiente gestión de los residuos líquidos por ejemplo, es una fuente potencial de entrada de medicamentos al medio ambiente, específicamente a los ecosistemas acuáticos.

El área de estudio abordada en la presente investigación abarca el segmento del río Bélico desde la calle Hospital hasta la calle Barcelona, de los Consejos Populares Hospital y Condado Sur, respectivamente, en la ciudad de Santa Clara, provincia Villa Clara, Cuba. Ocupa una extensión superficial de aproximadamente 0,6 ha y se ubica geográficamente al sur de la ciudad (ver anexo, Fig. 1).

Es un área con un alto grado de antropización donde se asienta la población de la Circunscripción No.12 ubicada al Noroeste del Consejo Popular Hospital y la Circunscripción No. 148 del Consejo Popular Condado. La población está formada por un total de 1964 y 3227 habitantes respectivamente (Planificación Física, 2012).

En esta área coexisten serios problemas urbano-ambientales dados fundamentalmente por el deficiente estado técnico de las viviendas, problemas de accesibilidad y de inundaciones provocadas por la disminución del cauce del río debido al vertimiento inadecuado de los desechos sólidos y escombros que realiza la población circundante en el área, así como el mal funcionamiento del alcantarillado y la ausencia de un sistema de drenaje, que se agudiza con el incremento de los volúmenes de agua a partir de la ocurrencia de ciclones e intensas lluvias (Planificación Física, 2012). Se suma a esta problemática, como factor fundamental del presente estudio, la incorporación de aguas residuales procedentes del Hospital Provincial Universitario “Dr. Celestino Hernández Robau”, situación que agudiza las negativas condiciones ambientales e higiénicosanitarias existentes en el río “Bélico” que atraviesa el área (ver anexo, Figs. 2,3,4,5).

Teniendo en cuenta que los ríos constituyen una fuente vital de agua para el consumo humano y que además, son receptores importantes de contaminantes

químicos y biológicos, en Cuba se han realizado varias investigaciones sobre el tema, dada su importancia y actualidad para la salud de la población.

Aunque las más recientes investigaciones han demostrado que los fármacos o medicamentos están ampliamente distribuidos en los ecosistemas acuáticos y que su principal fuente de entrada es a partir de los centros asistenciales de salud, es difícil valorar la amenaza o el riesgo que ellos representan para el medio ambiente ya que son compuestos químicos que están diseñados para tener modos específicos de acción y muchos de ellos son persistentes en el cuerpo humano.

No obstante es importante continuar investigando esta problemática ya que todas las investigaciones relacionadas con la presencia de antibióticos en el agua son de un interés inestimable, por el riesgo potencial que representan para el medio ambiente y muy especialmente para los seres vivos y la calidad del agua.

Por lo que el objetivo general de esta investigación es: Evaluar la ecotoxicidad aguda de antibióticos vertidos por el Hospital Provincial Universitario “Dr. Celestino Hernández Robau” en un área del río Bélico en Santa Clara, Cuba.

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

1. Precisar cualitativa y cuantitativamente a través de un estudio de consumo los antibióticos consumidos en el Hospital Provincial “Dr. Celestino Hernández Robau”.
2. Predecir la concentración de los antibióticos en el agua de río mediante un modelo matemático.
3. Determinar la ecotoxicidad aguda de antibióticos con riesgo ambiental empleando el ensayo de toxicidad aguda en papel de filtro con *Lactuca sativa* L.
4. Determinar la ecotoxicidad aguda de la mezcla de antibióticos con riesgo ambiental empleando el ensayo de toxicidad aguda en papel de filtro con *Lactuca sativa* L.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Contaminación ambiental por compuestos químicos

La utilización indiscriminada por parte del hombre de los recursos naturales esenciales ha generado una gran cantidad y múltiple variedad de contaminantes, que a menudo sobrepasan los niveles que pueden ser físicamente asumidos, es decir, sobrepasan las propias limitaciones de la naturaleza. En los últimos años, donde se ha incrementado el desarrollo industrial y tecnológico, han entrado en el mercado nuevas moléculas de sustancias que se sintetizan y tienen un uso extensivo en el sector industrial, agropecuario, farmacéutico y en la medicina.

Los medicamentos se han convertido en un problema de gran envergadura medioambiental. Si hasta hace unos años lo que preocupaba prioritariamente eran los vertidos de carácter industrial, ahora los investigadores dirigen su mirada hacia el impacto directo que ejercen los vertidos que reciben los ríos desde los núcleos de población. Con este crecimiento se ha comenzado a hacer referencia sobre el destino y efectos de estos compuestos en el Medio Ambiente y su descubrimiento en los ecosistemas acuáticos, ha estimulado la investigación de estos desde la década pasada.

El *Convenio de Basilea sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación*¹ es el tratado multilateral de medio ambiente que se ocupa más exhaustivamente de los desechos peligrosos y otros desechos.

Este convenio se negoció a finales de 1980, bajo los auspicios del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Fue aprobado en 1989 y entró en vigor el 5 de mayo de 1992. Cuenta con 170 países miembros (partes) y su objetivo es proteger el medio ambiente y la salud humana contra los efectos nocivos derivados de la generación, el manejo, los movimientos transfronterizos y la eliminación de los desechos peligrosos y otros desechos, entre ellos los desechos de medicamentos y productos farmacéuticos.

En Cuba está en vigor la *Resolución No. 136 /2009 del CITMA* que tiene como objetivo, establecer las disposiciones que contribuyen a asegurar el manejo integral de los desechos peligrosos en el país, mediante la prevención de su generación en las fuentes de origen y el manejo seguro de los mismos a lo largo de su ciclo de vida, con el fin de minimizar los riesgos a la salud humana y al medio ambiente.

2.1.1. Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes se definen como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma. Los contaminantes emergentes son compuestos de los cuales se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales, razón por la cual y a su vez consecuencia de que no hayan sido regulados, y de que la disponibilidad de métodos para su análisis sea nula o limitada. (López de Alda & Barceló, 2003). Este término se refiere a productos farmacéuticos, del cuidado personal, surfactantes, aditivos industriales, plastificantes, plaguicidas y una gran variedad de compuestos químicos (García-Gómez *et al.*, 2011). Estos compuestos se encuentran en bajas concentraciones generalmente en partes por millón o partes por trillón (Jiménez, 2011). Otra particularidad de estos compuestos, es que debido a su elevada producción y consumo, y a la como consecuente continua introducción de los mismos en el medio ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos (Petrovic M *et al.*, 2002).

En algunos casos, la liberación de contaminantes emergentes (químicos o microbiales) en el ambiente sucede probablemente desde hace mucho tiempo, pero pueden no haber sido reconocidos como contaminantes hasta que fueron desarrollados nuevos métodos de detección. Debido a la falta de métodos analíticos apropiados para identificar dichas sustancias, los subproductos de su fabricación y sus productos de degradación y a la falta de métodos toxicológicos para determinar su actividad biológica y efecto potencial sobre los seres vivos, las consecuencias de su presencia en el medio ambiente pasaron, y en gran medida aún lo hacen, inadvertidas. En otros casos, la síntesis de nuevos productos químicos o los cambios en el uso y distribución de los productos químicos existentes, pueden crear nuevas causas para la existencia de contaminantes emergentes (Daughton & Ternes, 1999a; Daughton, 2001).

Existe un gran número de productos químicos que no han sido considerados hasta el momento como contaminantes a escala mundial, sin embargo están presentes en el medio ambiente (López de Alda & Barceló, 2003). Una de las principales fuentes de contaminantes emergentes son las aguas residuales que no reciben ningún tratamiento y los efluentes de plantas tratadoras de aguas, las cuales no están diseñadas para tratar este tipo de

sustancias, por lo que una alta proporción de estos compuestos y sus metabolitos no sufren ningún cambio y entran con una gran toxicidad al medio acuático, como acuíferos y sistemas marinos entre otros (García-Gómez *et al.*, 2011).

El reciente reconocimiento de estos contaminantes representa un cambio en el pensamiento convencional de la comunidad científica y mundial, ya que muchos son producidos industrialmente aún y por ende, están dispersos en el medio ambiente por su uso doméstico, comercial e industrial (Daughton, 2001).

El principal objetivo del estudio de los contaminantes emergentes según la EPA, es proveer información de estos compuestos para la evaluación de su potencial amenaza al ambiente y a la salud humana. Para llevar a cabo este objetivo, es necesario efectuar la actividad investigadora según los siguientes puntos:

- Desarrollar métodos analíticos para medir los químicos y microorganismo o sus derivados en diferentes matrices (agua, sedimentos, residuales, etc) hasta el nivel de trazas.
- Determinar la presencia en el medio ambiente de estos contaminantes potenciales.
- Caracterizar un gran número de causas y vías de origen que determinan la liberación de estos contaminantes al ambiente.
- Definir y cuantificar los procesos que determinan su transporte y destino a través del medio ambiente.
- Identificar los efectos ecológicos potenciales por la exposición de estos químicos o microorganismos. (<http://www.epa.gov/esd/chemistry/org-anal/reports/regmsf.htm>)

De todos los contaminantes orgánicos emergentes, los que probablemente susciten más preocupación en la actualidad son los medicamentos o compuestos farmacéuticamente activos (PhACs, por sus siglas en inglés); especialmente los antibióticos debido a la posibilidad de que como consecuencia de su uso extensivo se desarrollen cepas bacterianas resistentes que hagan que, los que normalmente se usan en medicina humana, dejen de ser efectivos para el fin con el que fueron diseñados (*Hirsch et. al.*, 1999; *Jones et. al.*, 2001).

En la actualidad los contaminantes emergentes siguen ignorados y poco monitoreados, aunque sus efectos adversos para la vida acuática y humana han sido reportados en diversas investigaciones. Por consiguiente, es imprescindible desarrollar nuevos métodos analíticos para su detección en el ambiente, caracterizar todas las vías de entradas al mismo

y promover el estudio de estos contaminantes y sus posibles formas de remoción con nuevos sistemas de tratamiento de aguas residuales.

2.1.2. Fármacos como contaminantes emergentes

Los Fármacos y Productos de Cuidado Personal (Pharmaceuticals and Personal Care Products, PPCPs), constituyen un grupo diverso de químicos que han sido recientemente reconocidos como contaminantes del medio ambiente acuático, especialmente en áreas urbanizadas (Daughton & Ternes, 1999). Los PPCPs comprenden todas las drogas (medicamentos o fármacos) prescritas y de venta libre, los agentes de diagnóstico y otros químicos que son consumidos en grandes cantidades, como las fragancias en perfumes y otros productos del hogar (Rodríguez, 2007).

En los últimos 15 años, diferentes reportes demuestran que los fármacos representan una nueva clase de contaminantes del medio ambiente que presentan las propiedades necesarias para su bioacumulación, provocando efectos desconocidos en los ecosistemas acuáticos o terrestres. Por lo que los medicamentos se han convertido en un problema medio ambiental de envergadura (Hernández, 2011).

Desde hace más de 20 años, investigaciones en Estados Unidos y Europa han identificado la presencia de cafeína, aspirina, nicotina y compuestos de productos de cuidado personal en las descargas de aguas residuales que impactan los ríos (Colon, 2010).

El primer estudio sobre la contaminación por productos farmacéuticos tuvo lugar en una planta de tratamiento de residuos de Kansas City en 1976 (Jiménez, 2001). Los resultados fueron publicados y luego ignorados por 15 años. En 1992, investigadores alemanes que trabajaban en la búsqueda de herbicidas en agua, encontraron el ácido clofíbrico, que es el metabolito activo de varios reguladores de lípidos en sangre (clofibrato, etofilin clofibrato, y etofibrato). Ese mismo año, estudios en Alemania, Dinamarca y Suecia hallaron este compuesto en ríos, lagos y en el Mar del Norte (Quesada *et al.*, 2009).

Entre 1999 y 2000, el Servicio Geológico de los Estados Unidos llevó a cabo la primera investigación a nivel nacional sobre la aparición de compuestos farmacéuticos, hormonas y otros contaminantes orgánicos en 139 corrientes de agua ubicadas en 30 estados de la nación norteamericana. Se enfocó en un total de 95 contaminantes, entre los cuales se destacaron los antibióticos, 82 de estos contaminantes se encontraron, al menos, en una

muestra. A pesar de que los investigadores advirtieron que los sitios se seleccionaron a base del aumento de susceptibilidad a la contaminación urbana o a actividades agrícolas, un 80% de las corrientes de agua de las cuales se tomaron muestras, revelaron la presencia de uno o más contaminantes. Además, el 75% de las corrientes contenían dos o más contaminantes, 54% tenían más de cinco, mientras que 34% de ellas tenían más de 10 contaminantes y un 13% de las corrientes de aguas revelaron la presencia de más de 20 de los contaminantes enfocados (Colón, 2010).

Debido a las grandes cantidades de PPCPs consumidos en las sociedades desarrolladas, se han encontrado concentraciones significativas de éstos compuestos en aguas residuales (Ternes, 1998; Miége *et al.*, 2009). Según varias investigaciones realizadas en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) convencionales, se han encontrado que estas no constituyen una barrera eficaz para estas sustancias, debido a sus bajas concentraciones y a sus propiedades metabólicas específicas. Por consiguiente, estos compuestos se resisten a los procesos de tratamiento comúnmente empleados en las PTAR u otras transformaciones que pueden ocurrir naturalmente en el medio ambiente, por lo que pueden llegar finalmente tanto a las aguas superficiales y subterráneas como a los sedimentos y suelos (Rodríguez, 2007).

En años recientes se ha reconocido que la presencia y el destino de los compuestos farmacéuticos activos en el ambiente acuático constituyen uno de los eventos emergentes en la química ambiental (Kümmerer, 2001; Heberer, 2002). Algunos investigadores han mostrado evidencias sobre sustancias de origen farmacéutico que no son eliminadas frecuentemente durante el tratamiento de las aguas residuales y tampoco son biodegradables en el ambiente (Colón, 2010; Heberer, 2002).

La presencia y los posibles efectos adversos de los productos farmacéuticos en el medio ambiente acuático han comenzado a recibir mayor atención en la prensa popular y científica en los últimos años. Este aumento se debe en gran parte a raíz de una serie de artículos científicos publicados en la década de 1990 que reportaron niveles de trazas de medicamentos detectados en muestras ambientales, incluyendo las aguas residuales efluentes, aguas superficiales, aguas subterráneas, e incluso el agua potable (Heberer, 2002; Ternes, 1998; Nikolaou *et al.*, 2007).

Investigaciones realizadas en el Instituto Federal Suizo de Ciencias Ambientales y Tecnología, arrojaron la presencia de fármacos en efluentes de tres Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) que finalizaban en un lago en Suiza (Colón, 2010).

En otro estudio realizado por investigadores de Suecia se midió por primera vez las sustancias químicas en un río cercano a Patancheru, India y encontraron concentraciones escandalosamente elevadas de fármacos que fluían río abajo: por ejemplo, los niveles del potente antibiótico ciprofloxacina eran mayores que los que se encuentran en la sangre de los seres humanos que lo toman. Una de las principales fuentes de estos fármacos era el agua residual tratada de las fábricas farmacéuticas que desagua en el río y sus alrededores (Lubick, 2011).

Actualmente en Europa hay más de 3 000 ingredientes activos permitidos para su uso en el cuidado de la salud. Sin embargo, desde que se detectara el primer residuo de ácido clofibrico hasta el momento, únicamente unos 100 de ellos han sido alguna vez analizados en diferentes compartimentos medioambientales. La necesidad de seguir trabajando en esta línea de investigación, en la que se debe incluir el estudio de los metabolitos y los productos de transformación, es, por tanto, evidente (Barceló & López de Alda, 2008).

2.1.3. Rutas potenciales de entrada de fármacos al medio ambiente

Existen disímiles rutas para la entrada de fármacos al medio ambiente (Fig. 1).

La primera ruta potencial es la vía de los efluentes provenientes o no de PTARs (Gros *et al.*, 2010; Nikolaou *et al.*, 2007) posterior a la excreción del cuerpo. Después de la administración, una proporción significativa del medicamento puede pasar a través de este sin metabolizar. El grado en el cual es cambiado en el organismo, depende de la estructura y del mecanismo de acción del medicamento (Bound & Voulvoulis, 2005; Kümmerer *et al.*, 2000; Heberer, 2002).

La segunda ruta de entrada de fármacos al medio ambiente es a través de su uso en la agricultura, la medicina veterinaria y la acuicultura, para la prevención, terapia y como sustancias activas antimicrobianas para mejorar la absorción de nutriente en el tracto gastrointestinal (promotores del crecimiento). Al ser aplicados en la acuicultura pueden terminar en los sedimentos (Kümmerer, 2001).

El vertido de productos veterinarios al ambiente acuático representa uno de los principales problemas ambientales, destacándose el elevado uso profiláctico de antibióticos, la aplicación de quimioterapéuticos para el control de ectoparásitos y otros aditivos en el forraje de los ganados (Medina & Ramos-Jilberto, 2009; Heberer, 2002; Halling-Sørensen *et al.* 1998).

Existen disimiles rutas para la entrada de fármacos al medio ambiente (Fig. 1).

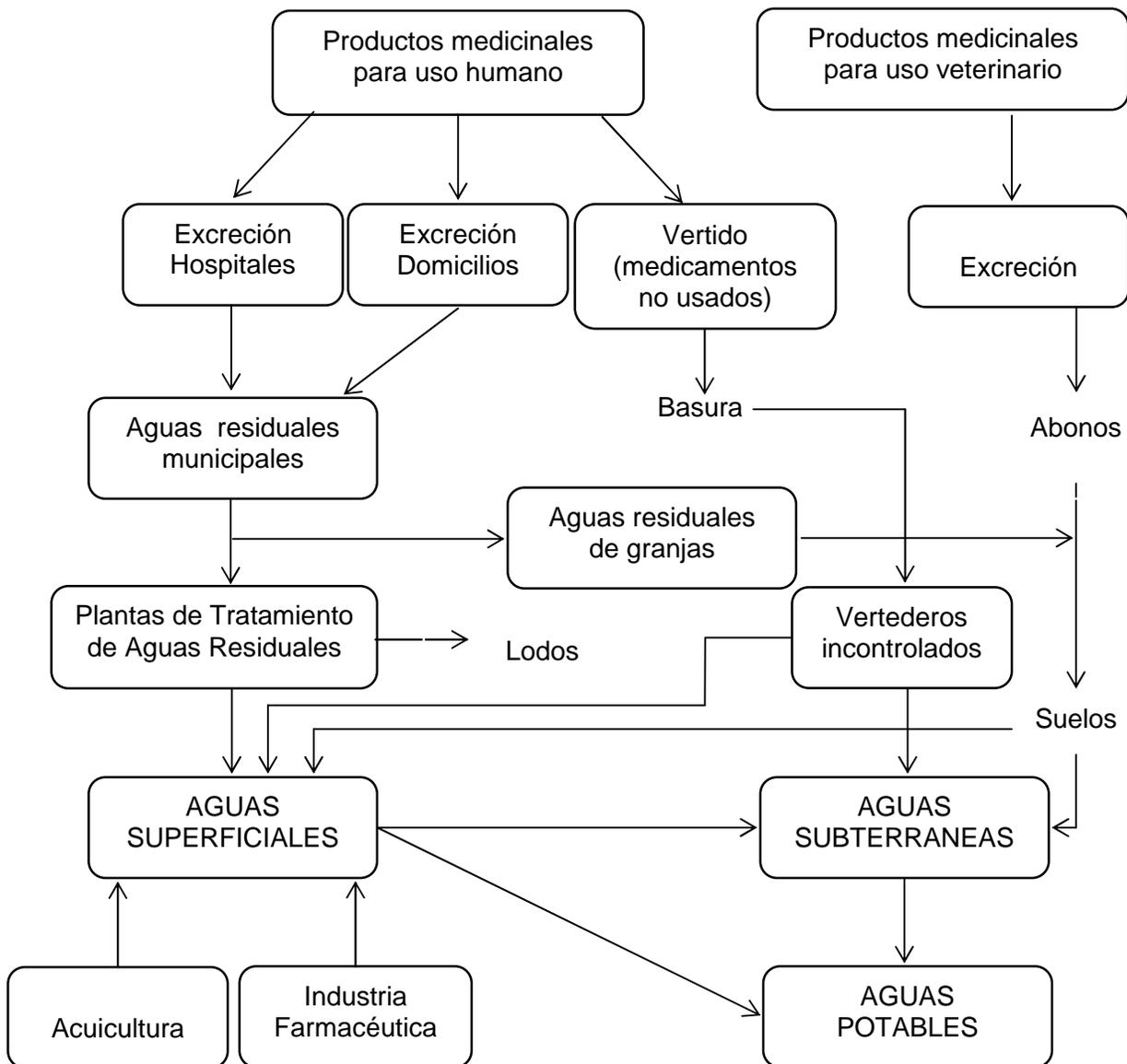


Figura 1. Posibles rutas de entrada de fármacos al ambiente tomado de Gómez, 2011.

En Europa, aproximadamente 13 500 toneladas de antibióticos son consumidos por año, de los cuales el 35% son usados en medicina veterinaria. Una cantidad desconocida de estos componentes son evacuados al ambiente a través de las aguas residuales o cuando las heces son usadas con residuos farmacéuticos para la fertilización de tierras agrícolas como ocurre en la agricultura (Iannacone & Alvariño, 2007a; Kümmerer, 2001).

La tercera ruta, por la cual los medicamentos pueden entrar al medio ambiente, es por la disposición de los medicamentos. Esta puede ocurrir de las siguientes formas: cuando vencen (caducos), los que pierden su identificación, los que no se utilizan porque no se necesitan (lo cual puede ocurrir por el desecho directo a través del alcantarillado, sin un previo tratamiento) y los que se toman de los sitios de depósitos puesto que forman parte de los residuos domésticos (Bound & Voulvoulis, 2005).

Desechando los fármacos caducos o que ya no se usan al inodoro o a un entorno natural, estos pueden dañar la flora y la fauna y contaminar ríos y acuíferos. De esta forma, se presume que los ríos están más contaminados por la presencia de fármacos que por los desechos de las industrias y es muy claro que se deben tomar medidas a corto plazo para tratar de evitar riesgos para la salud del hombre y del medio ambiente (Prieto, 2011).

La entrada al ambiente por estas rutas depende de los hábitos de los pacientes, de los métodos de tratamiento y disposición de medicamentos por parte de las entidades de salud (hospitales, farmacias) y la eficiencia en las prescripciones médicas para pacientes que realmente necesiten los medicamentos (Rodríguez, 2007).

Estos hábitos de disposición se hacen mucho más difíciles de encontrar en países subdesarrollados, donde la cultura en estos temas es más limitada, aunque eso no significa que no existan leyes y regulaciones que controlen, regulen o fiscalicen el vertimiento al medio de medicamentos. En Cuba, estos aspectos están contenidos en la Resolución No. 32/2005 del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente.

La cuarta ruta la constituyen los hospitales pues son una de las principales fuentes de emisión de medicamentos hacia el medio ambiente, por ser altos consumidores de estas sustancias químicas (Kümmerer, 2001). Tanto los residuos sólidos como los efluentes líquidos provenientes de centros hospitalarios representan un fuerte impacto sobre la salud pública (Tzoc *et. al.*, 2004).

Un vertido incontrolado al medio aunque sea en pequeñas proporciones puede traer consecuencias desfavorables al ambiente. En Cuba, donde los residuos sólidos hospitalarios son tratados como residuos domésticos como regla general, es decir que no son diferenciados, esto se agrava pues no existe un tratamiento en específico que minimice el problema (Palacios *et. al.*, 2005).

Las aguas residuales de establecimientos hospitalarios pueden contener compuestos capaces de dañar a la molécula de ADN. Entre ellos se encuentran desinfectantes, drogas, citostáticos y algunos antibióticos con actividad genotóxica. Estos efluentes son mezclas complejas de sustancias cuya actividad tóxica y genotóxica dependerá, de interacciones sinérgicas y antagónicas entre sus distintos componentes y entre estos y el ambiente (Kümmerer, 2001).

Las industrias productoras de compuestos farmacéuticos pueden ser otro origen de vertido de estos compuestos al medio acuático. Sin embargo, con las normativas cada vez más estrictas y la implementación de tecnologías limpias en los procesos de fabricación, hay razones fundadas para creer que esta vía supone una contribución mínima (Gómez, 2011).

Conocer las posibles rutas potenciales de entrada de los fármacos al ambiente garantiza la evaluación de riesgos así como su posterior manejo para preservar los ecosistemas y mejorar la calidad de vida de los organismos que en estos habitan.

2.1.4. Antibióticos

Los antibióticos, del griego *anti* (contra) y *bios* (vida), son sustancias químicas que suprimen el crecimiento de otros microorganismos (acción bacteriostática), u originan su destrucción (acción bactericida). El gran éxito terapéutico trajo como consecuencia natural su empleo continuo, utilizándose, de forma progresiva, a partir de 1945 (Bailón, 2009; Hernández, 2011). Estos fármacos pueden ser clasificados según su estructura química (ver Anexo, Fig. 6), su tipo de acción o su espectro de actividad (Gómez, 2011).

Entre 1999 y 2000, el Servicio Geológico de los Estados Unidos llevó a cabo la primera investigación a nivel nacional sobre la aparición de compuestos farmacéuticos, hormonas y otros contaminantes orgánicos en 139 corrientes de agua ubicadas en 30 estados de la nación norteamericana. Se enfocó en un total de 95 contaminantes, entre los cuales se destacaron los antibióticos (Colon, 2010).

Entre los antibióticos con mayor reporte en los cuerpos de agua están las tetraciclinas, los aminoglicósidos, los macrólidos, los betalactámicos y la vancomicina (Jiménez, 2011).

El consumo de fármacos en los países de la Unión Europea se cifra en toneladas por año, y muchos de los más usados, entre ellos los antibióticos, se emplean en cantidades similares a las de los pesticidas (Barceló & López de Alda, 2008).

Los antibióticos constituyen uno de los grupos de compuestos farmacéuticos que se han encontrado en lagos y corrientes a través del mundo, la presencia de estos compuestos en el ambiente ha aumentado la toxicidad de los organismos acuáticos y la presencia de especies de bacterias con resistencia antibiótica (Ramos & Pellón, 2006). El problema de la resistencia a los antibióticos es ecológico y nunca antes se había visto que los organismos infecciosos fueran resistentes a tan alto número de antibióticos (Márquez, 2008).

La aplicación indiscriminada y el uso irracional de antibióticos ha provocado que estos se encuentren en cantidades cada vez mayores en el medio ambiente, amplificando las consecuencias ecológicas y poniendo en peligro la salud del hombre.

2.2. Modelos y métodos de experimentación para el estudio de medicamentos como contaminantes ambientales

La mayoría de los enfoques utilizados en los estudios para evaluar las implicaciones de los medicamentos en el ambiente siguen los procedimientos de valoración de riesgo clásicos: calcular o determinar balances de masa sobre consumo y usos y monitorear la presencia de las sustancias químicas más comunes en diferentes compartimentos ambientales para evaluar la exposición potencial. Otros grupos proveen datos de experimentos sobre degradación y ecotoxicología (Kümmerer, 2008).

Según las propiedades físico-químicas de los fármacos, sus metabolitos, 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 & López de Alda, 2008).

La Oficina de Tóxicos y Prevención de la Contaminación (OPPT) de la EPA (Environmental Protection Agency) ha desarrollado modelos para estimar propiedades físico-químicas que pueden ser de utilidad en la determinación de la movilidad de las sustancias en el ambiente.

La OPPT también proporciona modelos para simular exposiciones, daños ambientales y para estimar algunos tipos de toxicidades (Peña *et al.*, 2001).

2.2.1. Modelos de distribución y destino de medicamentos en el ambiente

Hoy en día existen metodologías disponibles para evaluar la distribución y el destino de los medicamentos en el ambiente. Estas metodologías parten de las propiedades físico-químicas de los fármacos mediante procedimientos que van desde un escenario genérico hasta una situación específica. Comprende cuatro etapas: la evaluación de datos, el uso de modelos genéricos, el uso de modelos regionales y el empleo de modelos sitio-específico (Kümmerer, 2008).

La evaluación de datos involucra la colecta y análisis de las fórmulas estructurales y datos físico-químicos (peso molecular, presión de vapor, solubilidad en agua, coeficiente de partición octanol – agua (K_{ow}), y pH al cual se encuentra ionizado el 50% del fármaco (pK_a). Estos datos son necesarios para caracterizar los medicamentos y seleccionar el tipo de modelo para realizar las simulaciones. La clasificación depende de las características del químico, de acuerdo a estas pueden ser: (Mackay *et al.* 1996 a-c).

- Tipo 1. Sustancias cuya presión de vapor es significativa y medible.
- Tipo 2. Sustancias no volátiles.
- Tipo 3. Sustancias insolubles.
- Tipo 4: Sustancias no volátiles e insolubles.
- Tipo 5: Sustancias especiales (e.j. mercurio).

Los modelos genéricos son una etapa necesaria para comprender los principales destinos ambientales del medicamento en un ambiente genérico con escenarios de emisión predefinidos (en agua, aire o suelo). Brindan una información importante sobre la movilidad y la persistencia total de una sustancia química en diferentes fases. Solamente se enfoca el ingrediente activo del medicamento (API, por sus siglas en inglés); ni sus metabolitos ni productos de degradación se analizan (estos requieren evaluaciones por separado). La información clave obtenida en esta etapa incluye la tendencia para el transporte intermedio (e.j.: evaporación), para la bioconcentración y la bioacumulación y la persistencia de la sustancia. Mackay y colaboradores (1996a) sugieren un área de evaluación de 105 km^2 con

alrededor del 10% cubierta de agua a una temperatura de 25°C. Un ejemplo de modelo genérico es el EQC (Equilibrium Criterion Model) este modelo posee tres niveles:

- Nivel 1. Representa una situación ambiental en la cual una cantidad fija de la sustancia química es introducida en un sistema cerrado bajo el estado estable y en condiciones de equilibrio.
- Nivel 2. Representa una situación ambiental en la cual la sustancia química es descargada a una velocidad constante y alcanza un estado estable y en condiciones de equilibrio donde la velocidad de entrada y salida son iguales.
- Nivel 3. Representa la aplicación de la sustancia química en un estado de no equilibrio entre compartimentos, debido a su resistencia de transferencia de un medio a otro. Este nivel es el más realista.

Los resultados de los tres niveles muestran la tendencia general de la distribución de una sustancia (%) y los fenómenos de eliminación más importantes (Kümmerer, 2008).

El empleo de un modelo regional (por ejemplo el modelo ChemCAN) implica la colecta de datos medioambientales y las simulaciones en escenarios regionales. Posee la ventaja de brindar una simulación más realista del área de interés según los datos (extensión del suelo y de los compartimentos acuosos, profundidad y composición de carbono orgánico del suelo y los sedimentos, promedio de temperatura, entre otras) y del patrón de distribución de la sustancia química en el ambiente (Kümmerer, 2008).

Cuando un modelo regional confirma que un medio (suelo, agua, sedimento) es el compartimento ambiental relevante para el destino de una sustancia química, se requiere el empleo de un modelo sitio específico con el objetivo de predecir su concentración ambiental con un nivel satisfactorio de precisión. Dentro de este tipo de modelo se encuentra el Fate of Chemicals in Amended Soils (FOCAS) (evalúa el destino de químicos empleados en enmiendas de suelos) (Di Guardo *et al.* 2001), el Soil Fugacity Model (SoilFug) (evalúa el escurrimiento de un químico en suelos tratados) (Di Guardo *et al.* 1994) y el Quant. Water Air Sediment Interaction (QWASI) (evalúa la concentración y distribución de químicos en lagos y ríos) (Mackay, 1991). El FOCAS y el SoilFug pueden ser modificados para adaptarse a sitios de deposición de desechos o suelos contaminados (Kümmerer, 2008).

2.2.2. Modelos y métodos de exposición ambiental para el estudio de medicamentos como contaminantes ambientales

Conocer y evaluar las exposiciones potenciales y el impacto de los fármacos en el ambiente es un requisito esencial para la valoración del riesgo (Kümmerer, 2008). Los modelos de exposición ambiental nos permiten una valoración prospectiva inicial de la exposición cuando no se pueden obtener las concentraciones reales del químico.

Las aproximaciones más simples para estimar las concentraciones de medicamentos en aguas superficiales son las de la Guía regulatoria para la aprobación de medicamentos (Food and Drugs Administration: FDA 1998; The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: EMEA 2005). Entre los modelos de exposición ambiental se encuentra el EIC (Concentración Introducida Esperada). Este modelo es esencialmente una medida de la concentración máxima esperada en el efluente de una PTAR y asume que:

- Todos los medicamentos producidos en un año son utilizados y entran en el sistema de las PTAR.
- El medicamento es usado en el país de forma proporcional a la población y cantidad de aguas residuales generadas.
- El medicamento no es metabolizado, no se elimina durante el tratamiento de las aguas residuales y no es diluido. Este cálculo sería más realista si se tuvieran datos del metabolismo humano.

Otro modelo es el de la Concentración Ambiental Predicha (PEC por sus siglas en inglés) a la que se espera que estén expuestos los organismos en el ambiente acuático (Kümmerer, 2008). Este modelo tiene en cuenta:

- La dosis máxima de medicamento utilizada por habitante.
- La cantidad de agua per cápita utilizada (incluye toda el agua industrial, comercial y doméstica que se mezclan antes de ser incluidas en el sistema de tratamiento de aguas residuales).
- Fracción de penetración (puede refinarse por datos de penetración del mercado razonablemente justificados, se consideran diferencias por área geográfica, que no hay biodegradación ni retención en las PTAR y que el medicamento no es metabolizado).
- Un factor de dilución en el ambiente acuático (con valor 10).

Esta fórmula puede ser modificada en función de datos reales como la dosis diaria a la que un medicamento es consumido. Con este valor no se necesita del factor de penetración (Kümmerer, 2008).

Los modelos basados en GIS (Geographic Information System) se utilizan para predecir las PECs para medicamentos en el ambiente. Se requiere de la disponibilidad de gran cantidad de datos GIS, datos de aseguramiento de calidad y hardware y software apropiados; su empleo incrementa la precisión de las estimaciones basadas en modelos de exposición local y regional; pueden utilizarse para manejar datos hidrológicos de colectores; insertan un sistema computacional capaz de recopilar, almacenar, manipular y mostrar información geográfica referenciada (Kümmerer, 2008).

El modelo *PhATE*TM (Pharmaceutical Assessment and Transport Evaluation) (Anderson *et al.*, 2004) puede utilizarse con datos de ingreso o destino de medicamentos; predice concentraciones para efluentes de PTAR, para aguas superficiales y para el agua de beber. La desventaja radica en que no predice los PECs resultantes de descargas en ambientes estuarinos o marinos (Kümmerer, 2008).

El modelo GREAT-ER (Geo-referenced Regional Exposure Assessment Tool for European Rivers) (Feijtel *et al.*, 1997) se desarrolló para predecir la distribución de las concentraciones en aguas superficiales de productos consumidos. Para cada colector se definen: Ubicación y tipo de PTAR, población que se sirve de esta y velocidades de flujo de aguas residuales. Los datos de salida aparecen en mapas y opcionalmente se pueden usar datos en Excel para generar gráficos similares a los del modelo *PhATE*TM (Kümmerer, 2008).

La ventaja de los modelos basados en GIS (colectores) es que son fáciles de usar ya que solamente se requiere el uso per cápita de producto para estimar PEC y cuando el modelo se corre, los resultados aparecen automáticamente, en función de la población que se sirve de la planta, la eliminación puede ser asumida como cero y la dilución en el agua se calcula a partir del agua residual el flujo del río para cada planta. Es más confiable ya que todos los datos hidrológicos y de las PTAR se fijan internamente para cada colector. El usuario no puede cambiarlos. Este modelo es más preciso ya que ambos modelos pueden incluir datos de biodegradación, velocidad de eliminación o rangos de valores de incertidumbre (Kümmerer, 2008).

Los modelos de exposición ambiental de forma general poseen la ventaja de tener bajo costo, ser de fácil uso y permiten evaluar escenarios diferentes por lo que poseen un gran cubrimiento espacial y temporal. El modelo más utilizado para la predicción de fármacos en aguas superficiales a las que desembocan efluentes hospitalarios es el PEC, pues brinda datos conservadores y fiables para determinar la posible existencia de riesgo ambiental.

2.2.3. Fases para la evaluación ecotoxicológica de un fármaco en el ambiente

La evaluación de riesgo ecológico es un proceso de asignación de magnitudes y probabilidades a los efectos adversos de actividades antrópicas y catástrofes naturales y recurre tanto a métodos predictivos para la evaluación de la exposición, como de los efectos de sustancias tóxicas a distintos niveles de organización y escala trófica (Ronco *et al.*, 2004). La evaluación de los riesgos potenciales para el medio ambiente es un proceso gradual que se realiza en dos fases: Fase I, cálculo de la concentración prevista (PEC) y Fase II, estudios sobre su distribución medioambiental y análisis de efecto calculando el valor de la concentración prevista sin efecto (PNEC) según el Reglamento 440/2008 de la Comisión Europea. (Tabla I) (Küster, 2010).

La cuantificación del riesgo medioambiental es expresada por el cociente PEC/PNEC. Valores inferiores a 1 indican que el medicamento no presenta riesgo de bioacumulación o toxicidad. Si el valor es superior a 1 se pasaría a la Fase II nivel B donde se obtendrán datos específicos sobre toxicidad crónica, en microorganismos, y estudios de bioacumulación.

En esta Fase II se realizan estudios de biodegradabilidad. Un coeficiente de reparto n-octanol/agua (K_{ow}) > 1000, indica que el medicamento se acumula en los organismos acuáticos, por lo que hay que tener en cuenta un factor de bioconcentración.

El valor de la constante de adsorción/desorción (K_{oc}) indica la mayor o menor afinidad del medicamento por los lodos en las plantas de depuración (EDAR); si K_{oc} es mayor de 10,000 L/kg, se debe realizar una evaluación del medicamento en los compartimentos terrestres. La constante de la Ley de Henry [$H=C$ (gas)/ C (agua)] es el coeficiente de partición entre la concentración del compuesto en estado de equilibrio en el aire y el agua en contacto. Regula la volatilización de los compuestos que se encuentran en el medio acuoso. Un alto valor de la constante de Henry de un contaminante puede sugerir que la exposición sería a través de la vía inhalatoria (Lobo *et al.*, 2012)

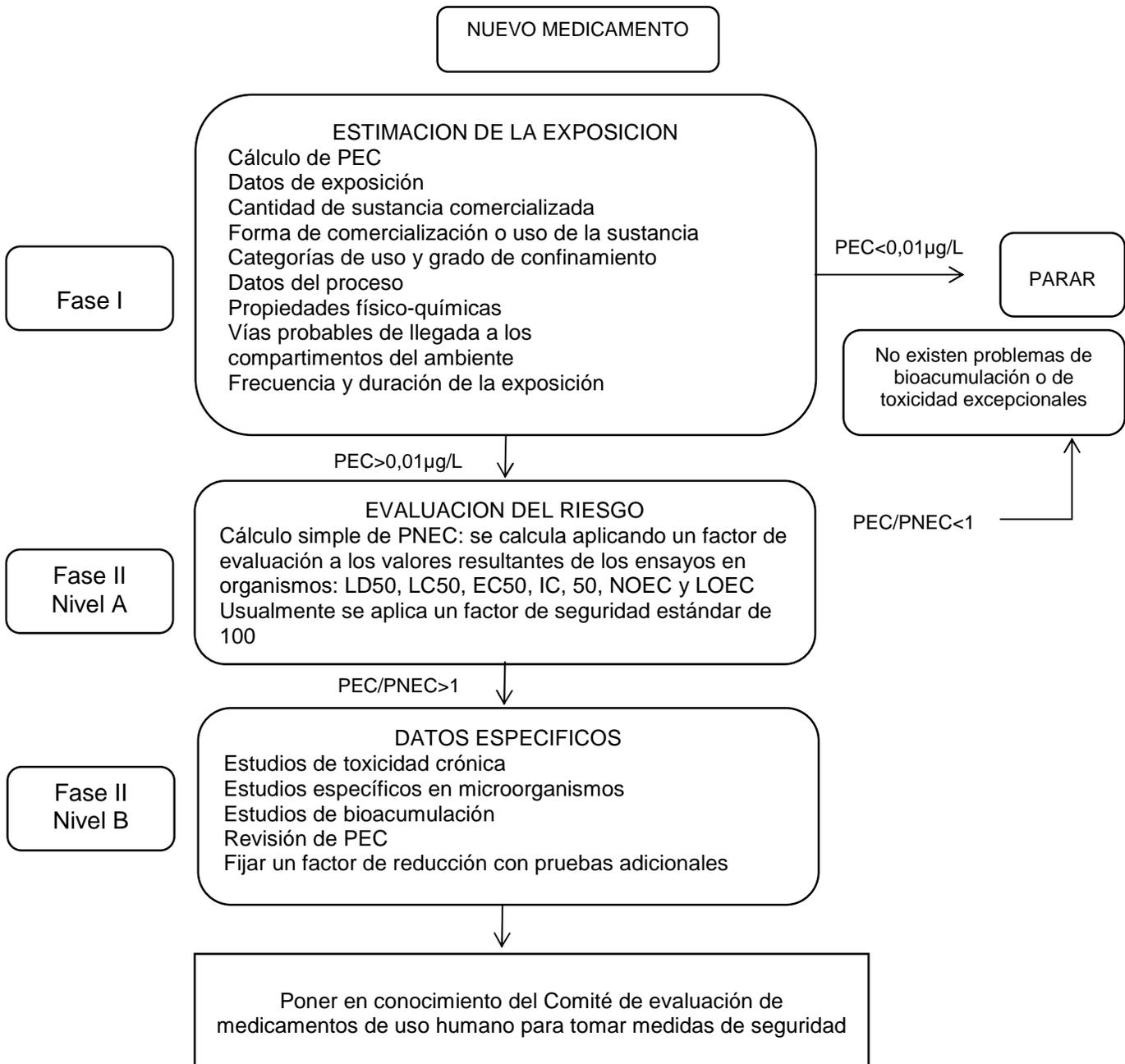


Figura 2. Esquema de las diferentes fases que se deben realizar para la evaluación del riesgo medioambiental de medicamentos de uso humano según EMEA. Tomada de Lobo *et al.*, 2002. (PEC: Concentración ambiental en el agua en mg/L, PNEC: Concentración ambiental de toxicidad en agua en mg/L usando el peor escenario sin degradación, DL₅₀: Dosis letal media, CL₅₀: Concentración letal media, EC₅₀: Concentración efectiva media, IC₅₀: Concentración inhibitoria media, NOEC: Concentración de efectos no observables, LOEC: Concentración de efectos observables)

Tabla I. Ensayo gradual en la evaluación del riesgo medio ambiental. Tomada de Lobo *et al.*, 2002.

Etapas en la evaluación	Etapas en la evaluación del riesgo medioambiental	Objetivo	Pruebas/datos
FASE I	Pre-selección	Estimación de la exposición	Datos de consumo/ log Kow
FASE II Nivel A	Selección	Predicción inicial del riesgo	Distribución y toxicología acuática
Fase II Nivel B	Completo	Evaluación del riesgo en un compartimento específico	Estudio completo de la emisión, destino y efectos

El valor del coeficiente de partición octanol-aire (K_{oa}) indica la posible bioacumulación de la sustancia en los vegetales a través del aire. Estos estudios experimentales deben seguir los protocolos fijados por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) o Normas de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO, por sus siglas en inglés).

Además de los estudios sobre propiedades físico-químicas (Tabla II), toxicológicas y ecotoxicológicas exigidas por las reglamentaciones antes señaladas hay que tener en cuenta otro parámetro, el índice de persistencia, bioacumulación y toxicidad (PBT), que nos da una idea de la persistencia del medicamento en el medio ambiente (Lobo *et al.*, 2012).

El análisis de la ecotoxicidad de los medicamentos es el objetivo del modelo PBT desarrollado en Stockholms Läns Landsting (Consejo del Condado de Estocolmo) y la Apoteket AB (Sociedad Farmacéutica Sueca). Se calcula el índice PBT, a partir de datos científicos, generalmente aportados por los propios laboratorios farmacéuticos. Con la información procedente de diversas fuentes de información, se publica anualmente un documento titulado Medicamentos clasificados ambientalmente (Stockholm County Council, 2012). Este es de acceso libre y relaciona este índice para medicamentos que actúan sobre o como: Desórdenes del tracto alimentario y el metabolismo, sangre y órganos formadores de sangre, sistema cardiovascular, piel, sistema génito-urinario, hormonas sexuales, hormonas excluyendo las sexuales e insulina, anti infecciosos de uso sistémico,

antineoplásicos e inmunomoduladores, sistema musculo-esquelético, sistema nervioso, antiparasitarios, insecticidas y repelentes, sistema respiratorio y órganos sensoriales. Además se incluyen medios de contraste y otros agentes terapéuticos. En este documento además se clasifica el riesgo ambiental de los medicamentos en función del valor del cociente PEC/PNEC, dado como:

- PEC/PNEC <0,1: Insignificante
- PEC/PNEC: 0,1–1: Bajo
- PEC/PNEC: 1–10: Moderado
- PEC/PNEC >10: Alto

Tabla II. Afinidad de los medicamentos por los compartimentos medioambientales según sus propiedades físico-químicas. Tomada de Lobo *et al.*, 2002.

Afinidad	Agua S(g·L ⁻¹)	Aire Constante de Henry (atm·m ³ ·mol ⁻¹)	Suelo log Koc (mL·g ⁻¹ de carbono orgánico)	Biota animal log Kow	Biota vegetal log Koa
Alta	>1	>10	>5	<5	>8
Media-alta	1-10 ⁻²	10-10 ⁻¹	5-4	5-3,5	8-7
Media	10 ⁻² -10 ⁻³	10 ⁻¹ -10 ⁻²	4-2	3,5-3	7-5
Media-baja	10 ⁻³ -10 ⁻⁵	10 ⁻² -10 ⁻⁴	2-1	3-1	4-5
Baja	<10 ⁻⁵	<10 ⁻⁴	<1	<1	<4

El índice PBT está formado por la suma de tres parámetros, persistencia (P), bioacumulación (B) y toxicidad (T), de donde deriva el término PBT. Cada uno de estos tiene un valor que puede ir de 0 hasta 3 y, por lo tanto, un índice PBT=0 significa que el medicamento en cuestión es plenamente biodegradable, no es bioacumulable y tiene baja ecotoxicidad; por el contrario un PBT= 9 indica un producto que no es biodegradable, es potencialmente bioacumulable y presenta una elevada ecotoxicidad (Lobo *et al.*, 2012).

2.3. Efecto de los medicamentos en el ambiente

Los medicamentos son producidos y usados en grandes volúmenes que se incrementan cada año. Con este crecimiento se comienza a hacer referencia sobre el destino y efectos de estos compuestos en el medioambiente (Bound & Voulvoulis, 2005; Iannacone & Alvaríño, 2007a).

Cabe destacar que los productos farmacéuticos son formulaciones complejas y que sus coadyuvantes también genera productos de transformación, que interactúan con la materia orgánica y bajo las condiciones propias del ecosistema, pueden ser potencialmente más tóxicos, más recalcitrantes e incluso más bioacumulables (Jiménez, 2011).

El descubrimiento de los medicamentos en los ecosistemas acuáticos, ha estimulado la investigación de estos en la década pasada y el principal problema radica, en que son los contaminantes emergentes más importantes puesto que aún no se conoce bien el riesgo ambiental que suponen (López de Alda & Barceló, 2003).

Una amplia variedad de fármacos se han encontrado en aguas dulces y marinas, y en investigaciones más recientes se ha demostrado que incluso en pequeñas cantidades, algunos de estos compuestos tienen el potencial de causar daño a la vida acuática (Bound & Voulvoulis, 2005; Nikolaou *et al.*, 2007).

La principal inquietud radica en que los principios activos sintetizados para la formulación de fármacos han sido diseñados con el objetivo de producir efectos biológicos, los cuales, a su vez, pueden extenderse a los organismos acuáticos que habitan en los diversos sistemas ambientales afectados (Gómez, 2011).

Los medicamentos están diseñados para tener una ruta y una acción específica tanto en los seres humanos como en los animales, pero poseen también efectos secundarios indeseables. Una vez que estos productos llegan al medio ambiente pudieran afectar a los animales con similares órganos, tejidos, células o biomoléculas (Quesada *et al.*, 2009).

Muchos productos antihelmínticos como el praziquantel y el albendazol son usados en grandes cantidades y tienen alta potencialidad de ingresar al ambiente. Sin embargo, no se encuentran bien caracterizadas las consecuencias ecológicas de su ingreso al medio acuático (Iannacone & Alvaríño, 2007a).

Los compuestos químicos pueden alterar al sistema endocrino, bloqueando o perturbando las funciones hormonales. Afectan a la salud de los seres humanos y de especies animales;

provocando alteraciones en la función reproductiva de humanos (disminución de la fertilidad en el hombre), defectos en recién nacidos y la aparición del cáncer testicular y de mama (Nikolaou *et al.*, 2007; Argemi *et al.*, 2005). Se ha reportado que el diclofenaco afecta a los tejidos de las branquias y de riñones en peces de agua dulce, lo que sugiere un posible riesgo para este tipo de poblaciones (Hoeger *et al.*, 2005). Este fármaco es el responsable de la muerte de decenas de millones de buitres en Asia, esto ha provocado que en los últimos 35 años tres especies de buitres hayan disminuido en un 97% y ahora se clasifica como en grave peligro. La causa de la muerte es un fallo renal provocada por el diclofenaco mediante estudios experimentales (Sumpter, 2010). Aunque estos contaminantes los encontramos en muy bajas concentraciones sus efectos son significativos, por lo que es necesario implementar adecuados diseños de tratamientos de aguas para su eficiente remoción.

2.3.1. Conceptos generales para comprender los estudios de ecotoxicidad

La toxicología ambiental o ecotoxicología, estudia las sustancias químicas que contaminan los alimentos, el agua, el suelo y la atmósfera. También aborda las sustancias tóxicas que ingresan a masas de agua como lagos, arroyos, ríos y océanos y además, estudia la forma en que las diferentes plantas, animales y seres humanos son afectados por la exposición a las sustancias tóxicas (Rodríguez, 2007). De ahí que el término de Ecotoxicología tenga varias definiciones:

- Es la ciencia que se ocupa del estudio del efecto y destino de los agentes tóxicos de origen antropogénico a los ecosistemas acuícolas y terrestres (Silva *et al.*, 2003).
- Es una rama de la ciencia que estudia y analiza los efectos de agentes químicos y físicos sobre organismos vivos, con particular atención a poblaciones y comunidades de ecosistemas definidos (Ronco *et al.*, 2004).
- La ecotoxicología aplicada tiene como objetivo el desarrollo de protocolos de ensayo para ser utilizados como herramientas de predicción tempranas que permitan definir umbrales permisibles, con niveles de incertidumbre aceptables, y sirvan de guía a las entidades reguladores para la toma de decisiones (Day *et al.*, 1988; Ronco *et al.*, 2004).

Bioensayo: ensayo en el cual el poder o potencia de una sustancia es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes (Ronco *et al.*, 2004). Permiten dar una

respuesta rápida en la evaluación directa de la toxicidad. Estos métodos son rápidos, poco onerosos y sensibles y se pueden aplicar en el laboratorio o sobre el terreno (Gómez & Ramírez, 2004).

Contaminante: sustancia ajena, presente en un sistema natural en una concentración más elevada de lo normal por causa de actividad antrópica directa o indirecta. En un sentido más amplio se le define como la presencia de cualquier agente físico, químico o biológico, o de combinaciones de los mismos en lugares, formas y concentraciones tales y con tal duración que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o bienestar de la población, o perjudiciales para la vida animal y vegetal, o que impidan el uso y goce de las propiedades y lugares de recreación (Ronco *et al.*, 2004).

Ensayo de toxicidad: determinación del efecto de un material o mezcla sobre un grupo de organismos seleccionados bajo condiciones definidas. Mide las proporciones de organismos afectados (efecto cuantal) o el grado de efecto (graduado) luego de la exposición a la muestra (Ronco *et al.*, 2004).

Los efectos de los contaminantes pueden ser observados en los diferentes niveles de organización biológica, extendiéndose desde el nivel molecular y la respuesta fisiológica global del individuo, hasta los niveles por encima del organismo como: población, comunidad y ecosistema. Las alteraciones moleculares son usualmente las primeras respuestas detectables y cuantificables, destacándose por su capacidad para señalar la presencia de contaminantes aún a niveles subletales. Tal conjunto de señales recibe la denominación de biomarcadores (Gómez & Ramírez, 2004).

Índices de toxicidad: expresan los resultados de diferentes ensayos de toxicidad como un único valor numérico que clasifica, según categorías, a la muestra. No existen reglas fijas para la designación de los índices (Ronco *et al.*, 2004).

CE₅₀/CI₅₀: concentración efectiva o de inhibición media: concentración del contaminante en agua, suelo o sedimento que se estima afecta al 50% de los organismos de ensayo. La CE₅₀ y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadísticos (Ronco *et al.*, 2004; Gutiérrez, 2008).

CL₅₀: concentración letal media, concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima letal para el 50% de los organismos de ensayo. La CL₅₀ y sus límites de confianza

(95%) son usualmente derivados de análisis estadísticos (Ronco *et al.*, 2004; Gutiérrez, 2008).

LOEC: concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC, por sus siglas en inglés) (Ronco *et al.*, 2004).

NOEC: concentración a la cual no se observa efecto (NOEC, por sus siglas en inglés) (Gutiérrez, 2008).

TOEC: concentración umbral a la cual se observa efecto (media geométrica del NOEC y LOEC) (Ronco *et al.*, 2004).

Toxicidad aguda: efecto adverso (letal o subletal) inducido sobre los organismos de ensayo en prueba durante un periodo de exposición del material de ensayo, usualmente de pocos días (Ronco *et al.*, 2004).

Toxicidad crónica: efectos tóxicos a largo plazo relacionados con cambios en el metabolismo, crecimiento o capacidad de supervivencia (Ronco *et al.*, 2004).

Límite de detección: El menor contenido a partir del cual resulta posible deducir la presencia de la sustancia analizada con una seguridad estadística razonable (Huetos, 2004).

Límite de determinación: Contenido más pequeño de sustancia analizada respecto al cual el método ha sido validado con una exactitud y precisión determinadas (Huetos, 2004).

2.3.2. Ensayos utilizados en los estudios de riesgos ecotoxicológicos

La mayoría de los contaminantes tiene un efecto directo sobre diferentes procesos fisiológicos y biológicos de la biota, manifestándose algunos de sus efectos tóxicos, ejemplo, la reducción del crecimiento, inhibición de la fotosíntesis, variación en el contenido de pigmentos fotosintéticos celulares, inhibición de la actividad enzimática y degeneración de cloroplastos y mitocondrias, entre otros (Gómez & Ramírez, 2004).

Los bioensayos son herramientas ampliamente utilizadas en el campo de la ecotoxicología. Estas pruebas de toxicidad permiten realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos o físicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones concentración-respuesta bajo condiciones controladas en terreno o en laboratorio (Silva *et al.*, 2003). Los efectos a medir pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Ronco *et al.*, 2004).

Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades. Por tanto, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismos o la biocenosis, y dependerá 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; las pruebas podrán ser de tipo agudo o crónico (Ronco *et al.*, 2004).

Las evaluaciones de toxicidad de aguas superficiales, por lo general se realizan en sitios en los que se sospecha la existencia de contaminación. No es de esperar encontrar importantes efectos letales sobre los organismos, o sólo de manera transitoria, excepto en el caso de cuerpos de agua altamente contaminados (Ronco *et al.*, 2004).

A pesar del limitado alcance de la información proveniente de los ensayos de toxicidad para su extrapolación a escala ambiental, los estudios con organismos en laboratorio, en condiciones controladas y estandarizadas para la evaluación de respuestas, han venido siendo las fuentes de información predominantes para la evaluación ecológica de los efectos de los contaminantes tóxicos (Ronco *et al.*, 2004).

Los resultados de los bioensayos se refieren, en primer lugar, a los organismos usados en el ensayo y las condiciones estipuladas en el procedimiento de prueba. Un efecto nocivo evaluado por medio de ensayos biológicos normalizados puede indicar niveles de peligrosidad trasladable y asimilable a organismos que forman parte de los sistemas naturales y la biocenosis (Ronco *et al.*, 2004). De manera general pueden ser definidos de acuerdo con:

- 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.

En principio, se debe considerar que no existe ningún organismo ni biocenosis que pueda ser usado para evaluar todos los efectos posibles sobre el ecosistema bajo las diversas condiciones abióticas y bióticas presentes. En la práctica, solamente unas pocas especies (especies modelo), que representen funciones ecológicas relevantes, pueden ser ensayadas.

Además de estas limitaciones fundamentales y prácticas en la selección de organismos de ensayo, la muestra a ser ensayada puede también plantear problemas experimentales para la realización de la prueba (Ronco *et al.*, 2004).

Los modelos ecotoxicológicos utilizan microorganismos, especies ícticas, crustáceos, entre otros, pero estos no logran describir del todo el efecto de los fármacos sobre las comunidades acuáticas (Jiménez, 2011).

2.3.3. Consecuencias ecotoxicológicas

La cantidad de fármacos detectados en ecosistemas acuáticos es bastante extensa y sigue creciendo, sin embargo, existe un gran desconocimiento en cuanto a sus efectos potenciales en la vida silvestre acuática (Cleuvers, 2004). La mayoría de las investigaciones en este campo, han estado dedicadas a los efectos en los vertebrados acuáticos (como los peces) en experimentos de exposición acuática (Oetken *et al.*, 2005).

Por ejemplo, algunos estudios ecotoxicológicos han sido desarrollados para el etinilestradiol (utilizado como contraceptivo oral), observándose actividad de feminización en peces, siendo los efectos más evidentes concentraciones elevadas de la vitelogenina del plasma, ovocitos en testículos y conductos reproductivos interrumpidos (Sumpter, 2010). Otro ejemplo significativo es el propanolol, que produce efectos negativos en el crecimiento del pez *medaka*, una variedad asiática de agua dulce (Petrovic *et al.*, 2002; Cleuvers, 2005).

El potencial impacto en los invertebrados es muchísimo menos observado por estar ligados a los sedimentos, a pesar del hecho de que los fármacos son a menudo moderadamente menos lipofílicos y pueden ser capaces de convertirse en un riesgo potencial especialmente para los organismos que habitan en los sedimentos y en el bento (Oetken *et al.*, 2005). Los efectos de la carbamazepina han sido estudiadas para diferentes organismos de ecosistemas acuáticos y se ha comprobado, por ejemplo, que esta constituye un riesgo para los crustáceos (Rodríguez, 2007).

Aunque las concentraciones de medicamentos en el ambiente acuático, son generalmente por lo bajo del rango de los nanogramos por litro (ng/L) y los microgramos por litro ($\mu\text{g/L}$), estos compuestos exhiben una alta actividad biológica también asociada a la alta estabilidad, lo que confirma su posible potencial de impacto en la vida silvestre acuática a pesar de las bajas concentraciones que se reportan en el medio ambiente (Young *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que los cambios planctónicos producidos por el uso masivo de antibióticos pueden traducirse en cambios de la flora y fauna macroscópica, incluyendo peces, aves y mamíferos marinos con repercusiones para otras actividades humanas como la pesca (Cabello & Doren, 2003)

2.3.4. Ecotoxicología de mezclas farmacéuticas

Un factor que puede afectar la toxicidad individual de un contaminante es la presencia de otros contaminantes, debido a las interacciones que ocurren en mezcla (sinérgica, antagónica, aditiva) (Faust *et al.*, 2003, Ren *et al.*, 2004).

Burton & Nordstrom (2004) indican que es importante la identificación del grupo químico crítico en una mezcla de contaminantes en el medio acuático. Generalmente es relevante establecer cuál es el químico que más contribuye a la toxicidad de una muestra ambiental.

La investigación del efecto ecotoxicológico de mezclas otorga peso y solidez a la evaluación de la calidad de agua, debido a la gran variedad de químicos orgánicos e inorgánicos que habitualmente contienen tales mezclas (Wong & Pak, 2004).

Por esta razón, la evaluación por bioensayos de los efectos de las sustancias químicas combinadas o en mezcla resulta extremadamente importante. Mediante estos estudios se establecen los criterios de calidad para la protección de la vida acuática, así como los estándares de calidad ambiental para cada agente químico (Burton & Nordstrom, 2004).

3. MATERIALES Y METODOS

La diversidad de la vegetación en el área de estudio y sus alrededores es limitada. Es una vegetación secundaria asociada al margen del río, con predominio de plantas herbáceas de ambientes húmedos como: *Eleocharis interstincta* (junquillo), *Cyperus alternifolius* (paragüita chino) y algunas plantaciones locales como: *Musa x paradisiaca* (plátano), *Cucurbita moschata* (calabaza), *Mangifera indica* (mango). Además existen plantas de jardín como: *Hibiscus rosa-sinensis* (marpacífico), *Hedychium coronarium* (mariposa) y *Mirabilis jalapa* (maravilla).

Permanentemente se encuentra una fauna menor asociada al agua (peces, anfibios, insectos acuáticos). Con frecuencia el río es visitado por animales domésticos, siendo común la presencia de rapaces (buitres) y otras aves.

Para realizar esta investigación se utilizó como caso de estudio el Hospital Provincial Universitario “Dr. Celestino Hernández Robau” (HCHR). La caracterización del Hospital se hizo a partir de datos provenientes de la vicedirección docente del centro. Esta es una instalación con más de 100 años de creada, cuenta con área de 5000 m² y se encuentra ubicado en calle Cuba No 564 entre Hospital y Alejandro Oms, en la ciudad de Santa Clara, provincia Villa Clara, Cuba. Es un hospital de alta complejidad, dedicado a la atención hospitalaria, investigación y docencia médica.

El hospital brinda servicio a todas las provincias del centro del país: Villa Clara Cienfuegos, Sancti Spíritus y Ciego de Ávila. Atiende todos los remitidos de los municipios Placetas, Cifuentes y Ranchuelo y dentro del municipio de Santa Clara los policlínicos: “Santa Clara”, “Marta Abreu” y “José R. León Acosta”.

En este hospital en el período comprendido entre noviembre de 2012 y octubre de 2013 trabajaban 871 personas, entre profesionales de la salud, técnicos y empleados. Las camas-día disponibles, período de 24 horas durante en el cual una cama de hospital se mantiene a disposición para el uso de pacientes internados, en la fecha citada son 214, las cuales se distribuyen por sala como se evidencia en la Tabla III (Datos tomados del Departamento Estadística HCHR).

Tabla III. Distribución de camas por salas en el Hospital Provincial Universitario Dr. "Celestino Hernández Robau" (Santa Clara, Cuba) en el período de noviembre 2012- octubre 2013.

Sala (identificación)	Número de camas
Unidad de terapia intensiva (5 y 6)	9
Medicina hombres (3)	24
Cirugía oncológica mujeres (4)	22
Cardiología (7 y 8)	16
Cirugía oncológica hombres (9)	12
Medicina mujeres (10 A y 10B)	29
Radioterapia hombres (11)	14
Psiquiatría (12)	16
Oncología radioterapia hombres (13)	12
Paliativos oncológicos (14)	14
Quimioterapia (15)	24
Oncología radioterapia mujeres (16)	18
Unidad de cuidados intensivos emergentes	2
Medicina nuclear	2

En caso de ser necesario, por problemas epidemiológicos en la provincia se incrementan las salas en función de esta tarea según se requiera.

El hospital cuenta con instalaciones generadoras de desechos peligrosos que se refieren a continuación:

- Salones de operaciones, Cuerpo de guardia, Salas para pacientes hospitalizados: instrumentos cortopunzantes, residuos infecciosos, frascos de medicamentos usados.
- Laboratorios clínico y microbiológico: desechos biológicos e/o infecciosos, instrumentos corto punzantes, residuos patológicos.
- Medicina nuclear: desechos biológicos e/o infecciosos, radioisótopos.
- Anatomía patológica y laboratorio de Anatomía Patológica: Xilol, formaldehidos, alcohol.
- Quimioterapia ambulatoria: Citostáticos.
- Radiología: Fijadores, reveladores, Placas.
- Farmacia intrahospitalaria: Alcoholes, fenoles, cloruros, citotóxicos, cáusticos.

3.1. Determinación del consumo de antiinfecciosos.

El estudio de consumo se llevó a cabo en el período comprendido entre noviembre de 2012 y octubre de 2013. Para la obtención de la información necesaria se revisaron los expedientes de antiinfecciosos presentes en la farmacia intrahospitalaria del hospital objeto de estudio.

Para el cálculo del consumo de los antiinfecciosos a estudiar se utilizaron las siguientes fórmulas (Telechea *et al.*, 2009):

$$\text{No. de DDD} = \frac{\text{Medicamento total consumido durante un año (mg)}}{\text{DDD del medicamento (mg)}}$$

$$\text{DDD / 100 camas - día} = \frac{\text{consumo de un determinado fármaco en mg durante un período «a»}}{\text{DDD en mg} \times \text{n.º de días incluidos en el período «a»} \times \text{n.º de camas} \times \% \text{ de ocupación}} \times 100$$

Donde:

DDD: Unidad técnica de medida de consumo de fármacos conocida como dosis diaria definida, y que expresa la dosis diaria de un fármaco para su principal indicación en adultos.

% de ocupación: es el número promedio de camas que estuvieron ocupadas diariamente durante un período, expresado en porcentaje.

3.2. Predicción de la concentración ambiental (PEC)

Según los datos obtenidos en el estudio de consumo se realizó una predicción de la concentración ambiental de los antiinfecciosos en el río Bélico.

La Predicción de la Concentración Medioambiental (Predicted Environmental Concentrations, PEC) según Kümmerer, 2008; se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{PEC}_w = \frac{\text{Consumo anual (mg)}}{365 \cdot V \cdot D \cdot v}$$

Dónde:

V: volumen de agua residual producida per cápita por día.

D: factor de dilución en el medio ambiente (valor por defecto).

v: proporción de vertimiento de agua residual al río.

Se predijo un valor de concentración de fármacos en aguas superficiales (PEC_w) considerando el factor de dilución en los cuerpos receptores de 10.

El volumen de agua residual producida per cápita por día se estimó considerando un índice de consumo de 80 L por trabajador-día y 1 200 L por paciente-día que es un valor medio de los reportados para un paciente ingresado (Galindo, 2001) y corrobora las estimaciones realizadas sobre el consumo de agua en el hospital. El caudal de aguas residuales se estimó a partir de los resultados del proyecto JICA-GTE (2004) y según Palacios y colaboradores (2005) (Citado por Rodríguez, 2007), donde el 90% corresponde a residuales líquidos hospitalarios) teniendo en cuenta que en este hospital existen calderas (transformación del agua en vapor).

Los antibióticos con valores de PEC_w 0,01 µg/L se consideraron riesgosos para el ambiente (Kümmerer, 2008).

3.3. Evaluación ecotoxicológica del riesgo ambiental

Los bioensayos toxicológicos agudos de exposición de los antibióticos se realizaron en el Centro de Toxicología Experimental (CENTOX) ubicado en la Universidad de Ciencias Médicas “Serafín Ruiz de Zarate Ruiz”, bajo la asesoría de especialistas. Para el desarrollo de las técnicas y procedimientos ecotoxicológicos se utilizaron las guías aprobadas por la US-EPA (United States-Environmental Protection Agency) y la OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Se realizó el ensayo de toxicidad aguda en semilla de *Lactuca sativa* Linnaeus, 1758 (EPA, 1996) (anexo, Fig. 7).

Según la predicción y teniendo en cuenta el elevado número de antibióticos que constituyeron un riesgo para el ambiente se hizo una selección preliminar de aquellos de mayor consumo y/o carencia de datos ecotoxicológicos para evaluar su ecotoxicidad. Se considera un ensayo del tipo estático cuando no hay renovación de la solución en estudio.

3.3.1. Ensayo de toxicidad aguda en semilla de *Lactuca sativa* L.

Diseño del ensayo:

Se conformaron quince grupos de concentración del producto y un grupo control con tres réplicas cada uno.

Reactivos y materiales:

- Material biológico: semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) provenientes de la Empresa Provincial de Semillas Varias de Villa Clara, con certificado de calidad suministrado por el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Villa Clara.
- Sustancia a evaluar
- Agua destilada
- Placas de Petri de 100 mm de diámetro
- Papel de filtro de 90 mm de diámetro
- Matraces aforados de 50 mL
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Regla graduada
- Pinzas
- Bolsas plásticas (de color negro)
- Local con temperatura a 22 ± 2 °C

Preparación de las diluciones:

Se prepararon diluciones seriadas (50; 40; 30; 20; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,000001; 0,0000001; 0,00000001; 0,000000001 g/L) que permitan establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0% necesarios para calcular la CL_{50} . Se realizó simultáneamente a la evaluación de la toxicidad de las muestras un grupo control utilizando agua destilada.

Protocolo de ensayo:

El procedimiento a seguir es:

- Colocar en cada placa de Petri un disco de papel de filtro.
- Rotular cada placa con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo.
- Saturar el papel de filtro con 4 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire.
- Colocar cuidadosamente veinte semillas, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces.

- Tapar las placas y colocarlas en bolsas plásticas (negras) para evitar la pérdida de humedad y proporcionar oscuridad. Incubar durante 120 horas a una temperatura de 22 ± 2 °C.

En la Tabla IV se resumen las condiciones recomendadas.

Tabla IV. Resumen de las condiciones para las pruebas de toxicidad con *Lactuca sativa* L.

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	22 ± 2 °C
Calidad de luz	Oscuridad
Volumen de solución de prueba	4 mL
Agua de dilución	Agua destilada
Número de semillas por réplica	20
Número de réplicas	3
Duración de la prueba	120 horas
Efecto medido	Inhibición de la germinación y en la elongación de la radícula y el hipocotilo
Resultado final	CE ₅₀ o CL ₅₀ al 0% inhibición
Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90% para el control negativo
Control	Agua destilada

Expresión de los resultados:

Se realizaron los siguientes cálculos:

- Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y el hipocotilo de las plántulas.
- Porcentaje de inhibición en la germinación.

Se elaboró una hoja de cálculo en Microsoft Excel (2003) y se utilizó el programa StatSoft, Inc. (2007) versión 8.0 realizando ajustes de modelos de curvas sigmoides para estimar la CL₅₀ y la CI₅₀. Se comparó mediante un ANOVA (One-way; $p < 0,001$) para verificar diferencias y un test de Dunnett para los resultados obtenidos utilizando el programa: StatSoft, Inc. (2007) versión 8.0. Para verificar las diferencias con respecto al grupo control, los resultados con un $p < 0,05$ se consideraron con diferencias estadísticas. En función de los resultados obtenidos se elaboró la gráfica concentración-efecto colocando en la ordenada el valor del largo de la raíz y el hipocotilo (mm) y en la abscisa, la concentración del producto.

3.3.2. Ensayo de toxicidad aguda en semilla de *Lactuca sativa* L con la mezcla de antibióticos.

Diseño del ensayo:

Se conformaron cinco grupos de concentración de la mezcla y un grupo control con tres réplicas cada uno.

Reactivos y materiales:

- Material biológico: semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) provenientes de la Empresa Provincial de Semillas Varias de Villa Clara, con certificado de calidad suministrado por el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Villa Clara.
- Sustancias a evaluar en la mezcla
- Agua destilada
- Placas de Petri de 100 mm de diámetro
- Papel de filtro de 90 mm de diámetro
- Matraces aforados de 50 mL
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Regla graduada
- Pinzas
- Bolsas plásticas (de color negro)
- Local con temperatura a 22 ± 2 °C

Preparación de las diluciones:

Se prepararon 5 diluciones seriadas en escala logarítmicas 100; 10; 1; 0,01; 0,0001%, que permitan establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0% necesarios para calcular la CL_{50} partiendo de una solución de la mezcla de antibióticos (concentraciones que no alcanzaran la CL_{50} previamente calculada para cada antibiótico). Se realizó simultáneamente a la evaluación de la toxicidad de la mezcla un grupo control utilizando agua destilada.

Protocolo de ensayo:

El procedimiento a seguir es:

- Colocar en cada placa de Petri un disco de papel de filtro.

- Rotular cada placa con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo.
- Saturar el papel de filtro con 4 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire.
- Colocar cuidadosamente veinte semillas, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces.
- Tapar las placas y colocarlas en bolsas plásticas (negras) para evitar la pérdida de humedad y proporcionar oscuridad. Incubar durante 120 horas a una temperatura de 22 ± 2 °C.

En la Tabla IV se resumen las condiciones recomendadas.

Tabla IV. Resumen de las condiciones para las pruebas de toxicidad con *Lactuca sativa* L.

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	22 ± 2 °C
Calidad de luz	Oscuridad
Volumen de solución de prueba	4 mL
Agua de dilución	Agua destilada
Número de semillas por réplica	20
Número de réplicas	3
Duración de la prueba	120 horas
Efecto medido	Inhibición de la germinación y en la elongación de la radícula y el hipocotilo
Resultado final	CE ₅₀ o CL ₅₀ al 0% inhibición
Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90% para el control negativo
Control	Agua destilada

Expresión de los resultados:

Se realizaron los siguientes cálculos:

- Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y el hipocotilo de las plántulas.
- Porcentaje de inhibición en la germinación.

Se elaboró una hoja de cálculo en Microsoft Excel (2003) y se utilizó el programa StatSoft, Inc. (2007) versión 8.0 realizando ajustes de modelos de curvas sigmoides para estimar la CL₅₀ y la CI₅₀. Se comparó mediante un ANOVA (One-way; $p < 0,001$) para verificar diferencias y un test de Dunnett para los resultados obtenidos utilizando el programa: StatSoft, Inc. (2007) versión 8.0. Para verificar las diferencias con respecto al grupo control, los resultados con un $p < 0,05$ se consideraron con diferencias estadísticas. En función de los resultados obtenidos se elaboró la gráfica concentración-efecto colocando

en la ordenada el valor del largo de la raíz y el hipocotilo (mm) y en la abscisa, la concentración del producto.

3.3.3. Concentración-Adición (CA)

Este modelo asume que cuando dos tóxicos actúan de modo similar siendo mezclados en cualquier proporción, ellos se sumaran para dar la respuesta observada (Gaete y Chávez, 2008). El valor de CL₅₀ estimada se obtiene sumando los valores de CL₅₀ de los antibióticos obtenidos experimentalmente de forma individual según su contribución en la mezcla. Luego estos valores de CL₅₀ estimados son divididos por los valores obtenidos experimentalmente de la mezcla, para así determinar la clase de acción conjunta de acuerdo con la siguiente ecuación,

$$CA = \frac{CL_{50} \text{ estimada}}{CL_{50} \text{ experimental de la mezcla}}$$

Donde CA = 1 indica que el efecto es aditivo, CA > 1 que hay sinergia y que CA < 1 que hay antagonismo.

4. RESULTADOS

4.1 Determinación del consumo de antiinfecciosos

Se emplearon 22 antiinfecciosos en el período de estudio, 18 inyectables (ámpulas, bulbos y frascos) y 4 de administración oral (tabletas). Los antibióticos consumidos en este período y los valores del No. de DDD y DDD/100 camas-días se muestran en la Tabla IX.

Tabla IX. Consumo de antibióticos en el período de noviembre 2012- octubre 2013 en el Hospital Dr. "Celestino Hernández Robau" de Villa Clara, Cuba, según datos adquiridos de los expedientes de antibióticos presentes en la Farmacia intrahospitalaria.

Antibiótico	Consumo (mg)	No. de DDD	DDD/ 100 camas-días
Amikacina 500 mg (bb)	931500	621	0,009309516
Gentamicina 80 mg (amp)	161680	673,6666667	0,010099051
Ceftriaxona 1000 mg (bb)	6729000	6729	0,100875574
Cefazolina 1000 mg (bb)	2884000	1442	0,021617265
Cefotaxima 1000 mg (bb)	4632000	2316	0,034719547
Ceftazidima 1000 mg (bb)	3677000	1225,666667	0,018374176
Cefepima 1000 mg (bb)	795000	397,5	0,00595899
Cefuroxima 750 mg (bb)	1646250	731,6666667	0,010968538
Ciprofloxacina 200 mg (fco)	540600	1351,5	0,020260565
Metronidazol 05% (fco)	3470500	2313,666667	0,034684567
Meropenem 1000 mg (bb)	1107000	738	0,011063483
Vancomicina 500 mg (bb)	485500	242,75	0,003639106
Sulfaprim 480 mg (amp)	946560	986	0,014781292
Azitromicina 500mg (tabl)	213500	427	0,006401229
Trifamox 500mg (tabl)	649000	432,6666667	0,006486179
Fluconazol 200 mg (bb)	43200	216	0,003238092
Aciclovir 250 mg (bb)	21000	21	0,000314815
Miconazol 10 mg (amp)	1110	37	0,000554673
Trifamox 750 mg (bb)	578950	257,3111111	0,003857394
Doxicilina 100 mg (tabl)	4500	22,5	0,000337301
Anfotericin B 50 mg (bb)	0	0	0
Fluconazol 100 mg (tabl)	14000	140	0,002098764

4.2. Predicción de la concentración ambiental (PEC)

El volumen de agua por día, necesario para el funcionamiento del HCHR, es de aproximadamente 327 m³/día considerando la cantidad de trabajadores, de camas/pacientes y de población fluctuante. El consumo de agua de los 871 trabajadores se estimó en 70 m³/día y el de los pacientes en 257 m³/día, mientras que el caudal de aguas residuales se estimó en 294 m³/día. En la Tabla X se muestran los resultados obtenidos de la predicción de la concentración ambiental (PEC) en el río. De los 22 antiinfecciosos 19 (86,36%) constituyen un riesgo para el ambiente.

Tabla X. Predicción de la Concentración Ambiental de los antiinfecciosos vertidos en las aguas residuales procedentes del Hospital Dr. "Celestino Hernández Robau" de Villa Clara, Cuba, en un fragmento del río Bético en el período de noviembre 2012- octubre 2013.

Antibiótico	PEC_w (µg/L)
Amikacina 500 mg (bb)	0,868045848
Gentamicina 80 mg (amp)	0,150666294
Ceftriaxona 1000 mg (bb)	6,270617836
Cefazolina 1000 mg (bb)	2,68754077
Cefotaxima 1000 mg (bb)	4,316466313
Ceftazidima 1000 mg (bb)	3,426521293
Cefepima 1000 mg (bb)	0,740844283
Cefuroxima 750 mg (bb)	1,534106793
Ciprofloxacina 200 mg (fco)	0,503774112
Metronidazol 05% (fco)	3,234088156
Meropenem 1000 mg (bb)	1,031590718
Vancomicina 500 mg (bb)	0,452427546
Sulfaprim 480 mg (amp)	0,882079955
Azitromicina 500mg (tabl)	0,198956295
Trifamox 500mg (tabl)	0,604789861
Fluconazol 200 mg (bb)	0,040257199
Aciclovir 250 mg (bb)	0,019569472
Miconazol 10 mg (amp)	0,001034386
Trifamox 750 mg (bb)	0,539511695
Doxicilina 100 mg (tabl)	0,004193458
Anfotericin B 50 mg (bb)	0
Fluconazol 100 mg (tabl)	0,013046314

Los antiinfecciosos con valores de PEC_w 0,01 µg/L se consideraron riesgosos para el ambiente y se señalan en letras negritas los que no se consideran un riesgo ambiental (Kümmerer, 2008).

4.3. Evaluación ecotoxicológica del riesgo ambiental.

4.3.1 Ensayo de toxicidad aguda en semilla de *Lactuca sativa* L.

Tabla XI. Inhibición en la germinación de la raíz y el hipocotilo.

Antibiótico	% IG Raiz	% IG Hipocotilo	% IG Raiz corr	% IG Hipocotilo corr
Vancomicina	8,78	16,22	8,78	16,22
Ceftazidima	30,45	31,33	28,05	28,96
Cefotaxima	18,56	18,78	14,27	14,5
Sulfaprim	38,67	38,78	38,67	38,78
Trifamox	22,11	22,56	22,11	22,56
Cefuroxima	21,89	22,22	21,89	22,22
Cefazolina	38	38	34,73	34,73
Cefepima	35,5	35,5	11,03	11,03
Ceftriaxona	52	52	36	36

En todos los antibióticos evaluados se observó inhibición en la germinación de las semillas, en la tabla XI se muestran los resultados obtenidos.

El efecto de los antibioticos estudiados sobre la germinación y la elongación de la raíz y el hipocotilo se muestra en la Tabla XII.

Tabla XII Efecto sobre la germinación y la elongación de raíz e hipocotilo.

Antibiótico	CE ₅₀ Raíz	CE ₅₀ Hipocotilo	CL ₅₀ Raíz	CL ₅₀ Hipocotilo
Vancomicina	0,20	0,63	44,14	28,99
Ceftazidima	11,38	22,16	10,70	9,83
Cefotaxima	17,83	16,64	34,90	25,14
Sulfaprim	0,0000024	0,02	0,52	0,49
Trifamox	6,09	24,41	8,57	8,57
Cefuroxima	22,91	27,27	20,20	19,70
Cefazolina	0,28	7,42	1,64	1,64
Cefepima	0,37	27,97	5,53	5,53
Ceftriazona	15,37	26,99	1,33	1,33

En las Figuras 3, 4, 5 y 6 se muestra la inhibición del crecimiento de la raíz y el hipocotilo para los antibióticos evaluados.

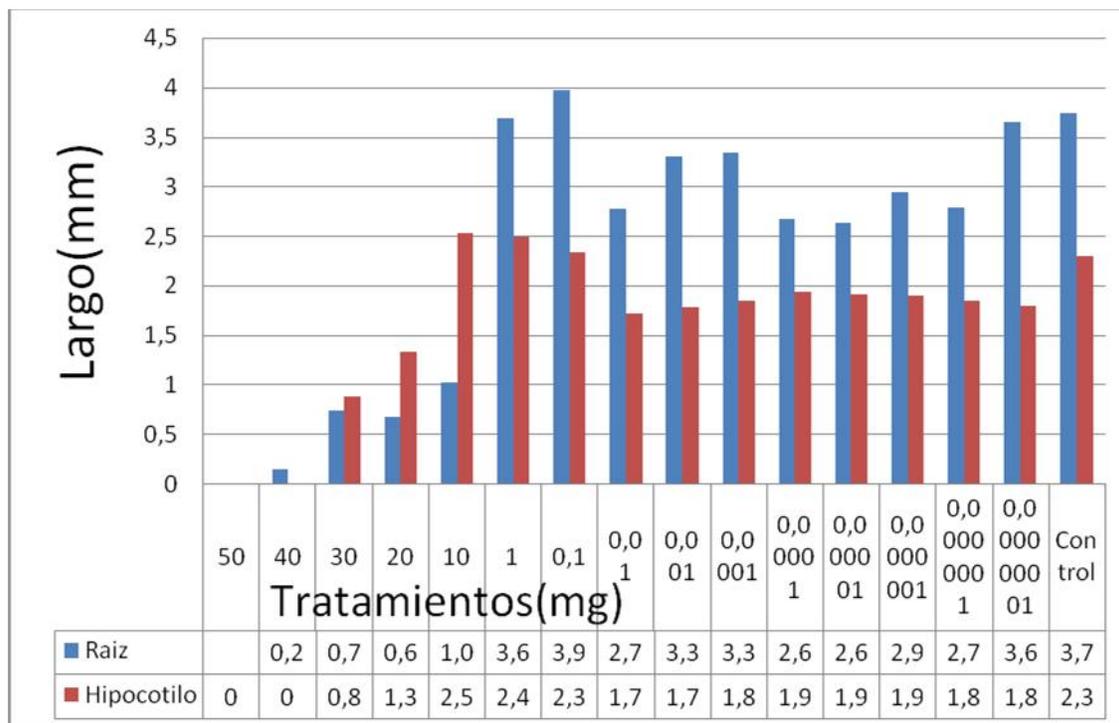


Figura 3. Evaluación de Trifamox en la inhibición del crecimiento sobre semillas de *L. sativa* L (lechuga).

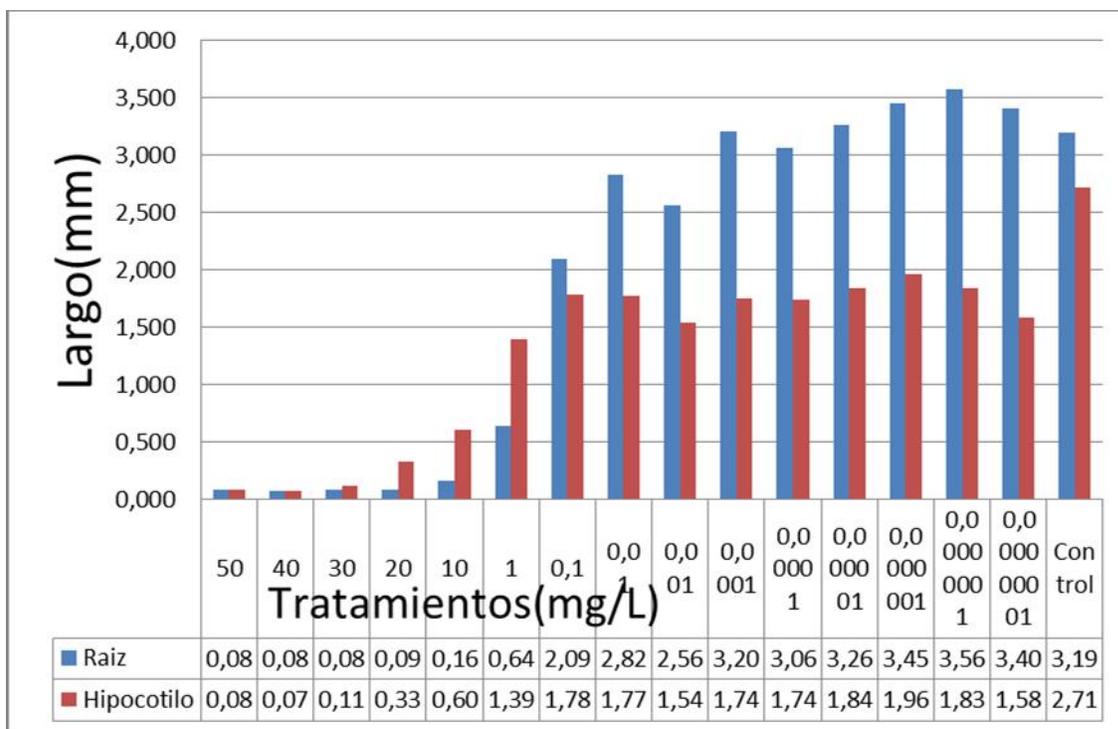


Figura 4. Evaluación de la Vancomicina en la inhibición del crecimiento sobre semillas de *L. sativa L* (lechuga).

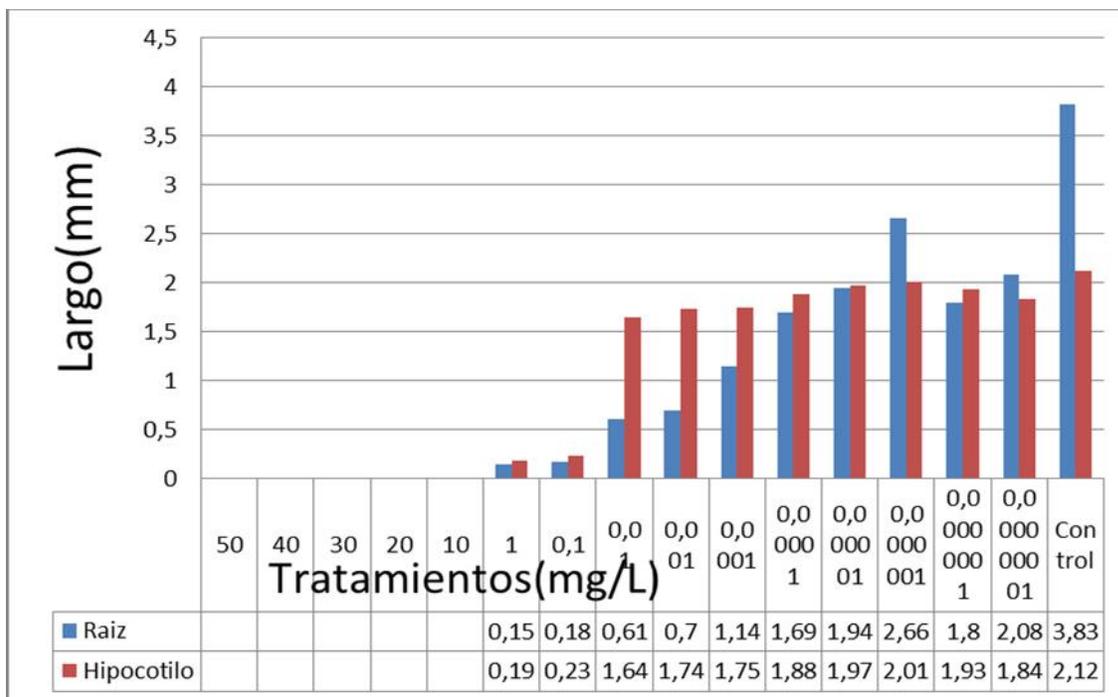


Figura 5. Evaluación del Sulfaprim en la inhibición del crecimiento sobre semillas de *L. sativa L* (lechuga).

4.3.2. Ensayo de toxicidad aguda en semilla de *Lactuca sativa* L. con la Mezcla de antibióticos

En la mezcla de antibióticos se observó inhibición de la germinación de la raíz y el hipocotilo de un 36,67 y 39,33 % respectivamente. La CL_{50} sobre la germinación fue de un 6.89 para la raíz y de un 0.01 para el hipocotilo; la CE_{50} sobre la elongación de la raíz y el hipocotilo no se pudo calcular al ser los porcentajes de inhibición del crecimiento menores que 50.

En la Figura 7 se muestra la inhibición del crecimiento de la raíz y el hipocotilo para la mezcla de antibióticos.

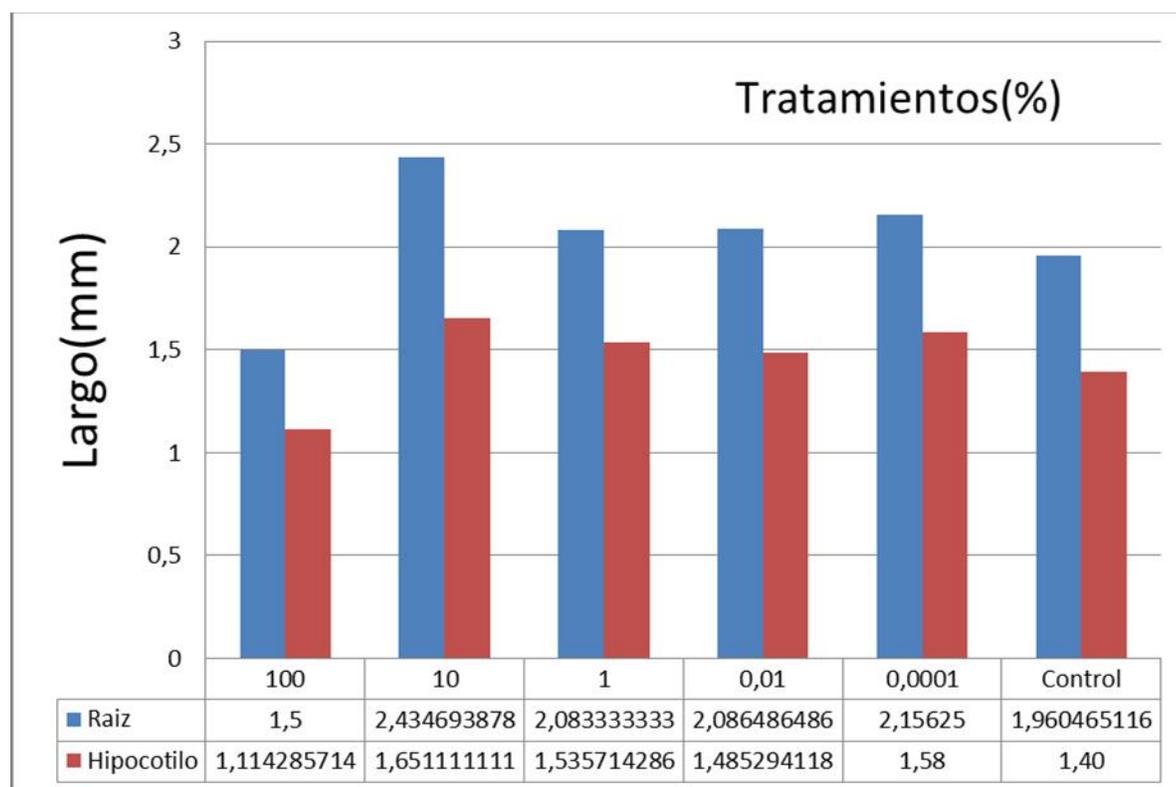


Figura 7. Evaluación de la mezcla en la inhibición del crecimiento sobre semillas de *L. sativa* L (Lechuga).

4.3.3. Concentración-Adición (CA)

En la Tabla XIII se muestran los cocientes concentración – adición (CA), señalando los que presentan antagonismo con respecto a la mezcla.

Tabla XIII Acción conjunta de los antibióticos y la mezcla.

Antibioticos	CA raíz	CA hipocotilo
Vancomicina	6,40	2431,00
Ceftazidima	1,55	823,88
Cefotaxima	5,06	2108,26
Sulfaprim	0,08	41,50
Trifamox	1,24	718,37
Cefuroxima	2,93	1651,52
Cefazolina	0,24	137,11
Cefepima	0,80	463,41
Ceftriazona	0,19	111,25

5. DISCUSION

5.1. Determinación del consumo de antibióticos

Para conocer la comercialización, distribución, prescripción y uso de medicamentos en una sociedad se utilizan los estudios de utilización de medicamentos, estos incluyen los estudios de consumo que describen las cantidades y el gasto de los medicamentos dispensados, comprados o financiados por el Sistema Nacional de Salud (SNS). Son útiles como sistemas de alerta, para detectar desviaciones de consumo, para comparar zonas de salud o médicos, tanto transversalmente como longitudinalmente y para aproximar la calidad del medicamento prescrito con datos agregados (Álvarez *et al.*, 2002). El consumo de fármacos se ha incrementado en las últimas dos décadas en los países industrializados de forma llamativa (Blasco *et al.*, 2008). Los antimicrobianos son un grupo de fármacos de amplia utilización en el medio hospitalario y generan un coste elevado. Concretamente, se calcula que un 30% de los pacientes ingresados en un hospital son tratados con antibióticos, y este grupo representa una cuarta parte del gasto global de medicamentos de un hospital (López *et al.*, 2002).

Es válido esclarecer, que el consumo de antibióticos es un indicador de la prescripción y puede modificarse por variaciones en la frecuencia de la enfermedad prevalente y en los hábitos de prescripción (Giachetto *et al.*, 2003). En investigaciones realizadas en diferentes hospitales se ha demostrado como un consumo irracional de antibióticos puede generar más gastos y susceptibilidad antimicrobiana y con ello verse fuertemente afectada la salud humana. Por ende, el uso indiscriminado de los medicamentos puede producir efectos desfavorables ocasionando consecuencias graves para los pacientes expuestos, además de determinar un incremento de los costos de salud (Lara *et al.*, 2003).

A pesar de los numerosos esfuerzos por lograr soluciones satisfactorias, una de las principales razones de esta situación radica en muchos países en la falta, de fuentes confiables de información sobre el uso de fármacos. Desde hace tiempo la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la necesidad de establecer una política nacional de medicamentos y la importancia de una estrategia asociada de

investigación que incluya estudios de utilización de medicamentos (Fernández-Vallín & Salas, 1997).

Existen algunas recomendaciones por parte del “Programa de control de la resistencia antimicrobiana” de la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). Estas recomendaciones incluyen:

- Crear comités terapéuticos que supervisen el uso de antibióticos
- Formular y actualizar periódicamente las guías de tratamiento y profilaxis antibiótica
- Observar el uso de antibióticos (cantidad y modalidad de uso)
- Realizar una vigilancia permanente de la susceptibilidad antimicrobiana

En la Tabla XVII se muestra los antiinfecciosos consumidos y el grupo químico al que pertenecen, así como su clasificación. En el período de estudio el antibiótico de mayor consumo fue la Ceftriaxona, seguido de Cefotaxima y Ceftazidima según su valor en DDD/100 camas-días (Tabla IX), lo que está en correspondencia con las características de los pacientes ingresados en la unidad. Los pacientes oncológicos sufren con frecuencia de complicaciones sépticas que deben ser tratadas con antibióticos bactericidas ya que la inmunodepresión que padecen no les permite lograr el control de las mismas por otros medios. El amplio espectro antimicrobiano de esta cefalosporina garantiza que el tratamiento a las afecciones más frecuentes que causan el ingreso hospitalario (bronconeumonías, sepsis quirúrgicas y abscesos tumorales) resulte efectivo en la mayoría de los casos (Lacy *et al.*, 2012 - 2013).

Los resultados del presente estudio arrojaron que la Cefepima y la Ceftriaxona poseen un No. de DDD mayor que el reportado por Stockholm County Council, 2012, no siendo así para el resto de los antibióticos. En un estudio de consumo realizado por Giachetto *et al.*, 2003 en un hospital pediátrico se obtuvo valores de DDD/100 camas-días mayores que los obtenidos en el estudio de consumo del HCHR. Por lo que sería recomendable realizar un estudio de utilización de Cefepima y Ceftriaxona que fundamente la propuesta de disminución de su uso.

La promoción y vigilancia del uso racional de los medicamentos constituye un componente esencial de la política farmacéutica de una institución. El uso inapropiado de los medicamentos es un problema complejo en el que intervienen múltiples factores

interrelacionados: creencias culturales y sociales, conocimientos y actitudes, infraestructura e intereses económicos. Su abordaje requiere el desarrollo de una combinación de estrategias (Laing *et al.*, 2001; Giachetto *et al.*, 2003).

Tabla XVII. Clasificación de los antiinfecciosos consumidos en el período de noviembre 2012- octubre 2013 en el Hospital Dr. “Celestino Hernández Robau” de Villa Clara, Cuba.

Clasificación	Grupos farmacológicos	Antibióticos	
Antibacterianos	Cefalosporinas	1ra generación	Cefazolina
		2da generación	Cefuroxima
		3ra generación	Cefotaxima
			Ceftriaxona
		4ta generación	Ceftazidima
	Carbapenémicos	Meropenem	
	Tetraciclinas	Doxicilina	
	Aminoglucósidos	Amikacina	
		Gentamicina	
	Macrólidos	Azitromicina	
	Sulfonamidas	Sulfaprim	
	Aminopenicilinas y -lactamasas	Trifamox	
	Quinolonas	Ciprofloxacina	
	Glucopéptidos	Vancomicina	
Antimicóticos	Imidazoles	Fluconazol	
	-	Anfotericin B	
Antiparasitarios	Nitroimidazoles	Metronidazol	
Antivirales	-	Aciclovir	

En el hospital objeto de estudio se consumieron todos los antibióticos disponibles teniendo en cuenta el uso racional de estos en cuanto a dosis, tratamiento, intervalo de dosificación e indicación-prescripción, esto se constata según los expedientes de antibióticos de la Farmacia Intrahospitalaria del HCHR validándose con lo estipulado en el Drug Information Handbook (Lacy *et al.*, 2012 - 2013).

5.2. Predicción de la concentración ambiental (PEC)

La gran capacidad del agua de disolver casi cualquier tipo de sustancia ha llevado a los seres humanos desde tiempos ancestrales a la creencia errónea de que el agua tiene la asombrosa capacidad de autodepurarse. Desde hace miles de años e incluso hoy en día en algunas partes del planeta, los seres humanos hemos resuelto nuestros problemas de contaminación tanto sólida como líquida de la manera más sencilla

imaginable, arrojándolo al agua, enterrándolo o quemándolo, pensando así que desaparecían (Gutiérrez, 2008). El agua residual de un establecimiento hospitalario es una mezcla compleja, capaz de generar serios problemas ambientales, pudiendo llegar a ser de cinco a 15 veces más tóxicas que las aguas residuales domésticas (Ramos, 2008).

Los valores de PEC obtenidos en la presente investigación representan las concentraciones máximas posibles que pueden ser encontradas en las aguas residuales del HCHR (Tabla X), lo cual estaría representando propiamente, las condiciones de extrema concentración. Es importante destacar que exceptuando el Anfotericin B, el Miconazol y la Doxiciclina todos los antibióticos consumidos presentaron valores por encima de 0,01 µg/L, por lo que representan un riesgo de contaminación ambiental. De ahí que, sería recomendable realizar estudios completos similares al presentado, en otros Centros de Salud y durante mayores períodos de tiempo, para obtener resultados más generalizadores. Sin embargo, un factor que puede afectar la toxicidad individual de un contaminante es la presencia de otros contaminantes, debido a las interacciones que ocurren en la mezcla (sinérgica, antagónica, aditiva). Es por esto que en los últimos años ha habido un creciente interés por el estudio de las interacciones entre los agentes químicos, que permita predecir su impacto sobre los organismos que habitan los ecosistemas acuáticos (Gaete & Chávez, 2008).

5.3. Evaluación ecotoxicológica del riesgo ambiental

5.3.1. Ensayo de toxicidad aguda en semilla de *Lactuca sativa* L.

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Indiscutiblemente, a pesar de sus obstáculos y sus limitaciones, los bioensayos ecotoxicológicos son métodos de elección, pues pueden ayudar a determinar si un efluente, o una sustancia vertida a un ecosistema representa un potencial riesgo tóxico para la flora y fauna, e incluso para el hombre.

Las plantas superiores son ampliamente utilizadas por ser organismos eucarióticos, y por lo tanto más comparables a la mayoría de las especies de la flora y la fauna

superiores, y constituyen una eficiente herramienta de trabajo para medir alarma de peligro ambiental por ser más sensibles que otros sistemas de ensayos disponibles, son de fácil manipulación, almacenaje y bajo costo, además de presentar buena correlación con otros sistemas de pruebas.

Es importante tener en cuenta que las investigaciones del efecto tóxico de los fármacos (en particular antibióticos) son limitadas, la mayoría de los estudios están enfocados en la evaluación de metales pesados, biocidas y detergentes de diferentes orígenes.

El ensayo utilizado es de toxicidad aguda por lo que en ensayos de toxicidad subcrónica y crónica pudieran obtenerse otros resultados. También debido a que las aguas residuales de los hospitales pueden contener diferentes compuestos químicos que afecten de manera indirecta a los ecosistemas acuáticos, es esperable que la mezcla compleja de compuestos farmacéuticos dentro de los cuales se pueden encontrar los antibióticos, pueda presentar efectos tóxicos y/o genotóxicos sobre el ambiente, aunque dichos compuestos se encuentren en pequeñas cantidades (Magdaleno *et al.*, 2012).

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*L. sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y el hipocotilo. Es importante destacar que durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es de gran importancia para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del

desarrollo de la radícula constituye un indicador representativo para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta. A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto.

Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas (Bowers et al, 1997; Cheung et al, 1989; Dutka, 1989). Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. Por otra parte, es de fácil y rápida germinación por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días. Este bioensayo de toxicidad ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros, además de la evaluación del efecto fitotóxico de plaguicidas sobre especies no blanco, necesarios para el registro de estos compuestos (OECD, 1984; Wang, 1987; USEPA, 1989).

De los seis antibióticos pertenecientes al grupo de las cefalosporinas, Ceftazidima y Cefepima mostraron inhibición en el crecimiento de la raíz y el hipocotilo para todas las concentraciones ensayadas (Figs. 6C y 6D), Cefazolina mostró inhibición en el crecimiento de la raíz a todas las concentraciones en estudio y para casi todas las concentraciones menores de 0,1 mg/L, se observó una estimulación estadísticamente significativa con respecto al control (Fig. 6A). La Cefuroxima solo mostró diferencias significativas estadísticamente con respecto al control en las concentraciones de 10 y 1 mg/L evidenciando una estimulación en el crecimiento de la raíz y en las

concentraciones 0,0001 y 0,00001 mg/L mostró estimulación en el crecimiento del hipocotilo (Fig. 6B). Sin embargo, la Cefotaxima estimuló el crecimiento de la raíz en todas las concentraciones por debajo de 10 mg/L y no evidenciando estimulación del hipocotilo (Fig. 6E). La Ceftriazona a la concentración de 10 mg/L estimuló significativamente la elongación del hipocotilo y en las restantes concentraciones evaluadas no se evidenciaron diferencias respecto al control (Fig. 6F).

El Trifamox que es una combinación de ingredientes activos pertenecientes al grupo de las aminopenicilinas e inhibidores de las β -lactamasas, mostró inhibición en la elongación de la raíz y el hipocotilo a todas las concentraciones probadas (Fig. 3).

La Vancomicina (glucopéptido) mostró una tendencia a la estimulación del crecimiento de la raíz a las concentraciones menores de 0,0001 mg/L e inhibición del crecimiento del hipocotilo a todas las concentraciones ensayadas (Fig. 4).

En el Sulfaprim perteneciente al grupo de las sulfonamidas, se observó una inhibición del crecimiento de la raíz y el hipocotilo en todas las concentraciones en estudio (Fig.5).

Aunque todos los antibióticos evaluados evidenciaron inhibición del crecimiento en raíz e hipocotilo, (con porcentajes mayores para Ceftriazona y Sulfaprim) en la investigación se evidenció una tendencia a la estimulación en la elongación de la raíz en las concentraciones más bajas, que puede estar asociada a que uno de los requisitos para estos ensayos es que las semillas no estén tratadas con ningún producto (OECD, 1984) por lo que se infiere que los antibióticos a bajas concentraciones inhiban el desarrollo de microorganismos que se encuentren como endófitos o epífitos.

Los resultados del presente estudio concuerdan con los obtenidos por Irahola & Gimenez, 2000. Existen reportes del uso de antibióticos en medios de cultivo para reducir la presencia de agentes contaminantes en el material vegetal usado como explante y lograr una mayor eficacia en los medios de propagación *in vitro* de plantas, siempre y cuando sean utilizados en bajas concentraciones pues en elevadas dosis puede causar efectos fitotóxicos y provocar inhibición en el crecimiento de la raíz (Pierik, 1987; Vargas-Castillo & Abdelnour-Esquivel, 2010).

Por otra parte, un mayor desarrollo en la elongación de la radícula le permite a la plántula explorar más terreno, por lo que esta estimulación pudiera aumentar la

supervivencia de la plántula en el ecosistema. Aunque es válido tener en cuenta que un estudio de más larga duración podría arrojar resultados más completos ya que estos miden otros parámetros como: largo de las raíces y tallo, número de hojas y peso (fresco y seco), los que indican el efecto tóxico de los productos sobre estos.

La totalidad de los antibióticos evaluados mostraron inhibición de la germinación sobre raíz e hipocotilo, siendo Sulfaprim, Ceftriazona y Cefazolina los que causaron mayor inhibición de la germinación de raíz e hipocotilo con respecto al control, coincidiendo con los menores valores de CL_{50} sobre la germinación (entre 0 y 2 mg/L). Vancomicina al contrario presentó una menor inhibición de la germinación y su CL_{50} fue entre 25 y 45 mg/L.

5.3.2. Ensayo de toxicidad aguda en semilla de *Lactuca sativa* L. en la mezcla de antibióticos.

El creciente desarrollo industrial y urbano ha traído consigo la aparición de una cantidad apreciable de sustancias químicas y mezclas complejas tóxicas, las cuales afectan tanto la salud humana como la ambiental. Un instrumento alternativo para la determinación de la toxicidad es la utilización de bioensayos sencillos y económicos, que son muy empleados en evaluaciones iniciales.

Aunque en casos específicos se ha probado que incluso los productos farmacéuticos individuales provocan daño ambiental, las concentraciones de los productos farmacéuticos individuales que se encuentran en el ambiente son a menudo demasiado bajas como para provocar efectos ecotoxicológicos directos. Sin embargo, toda una gama de diferentes productos farmacéuticos está presente en un compartimento ambiental determinado en un momento dado. Por consiguiente, la típica situación de exposición es por lo general una mezcla de múltiples componentes de concentraciones de bajo efecto de los productos farmacéuticos individuales.

La mezcla de antibióticos mostró una tendencia a la estimulación del crecimiento de la raíz y el hipocotilo a la mayoría de las concentraciones (%) evaluadas e inhibición del crecimiento de la raíz y el hipocotilo solo a la mayor concentración evaluada (Fig. 7). La inhibición de la germinación de la raíz y el hipocotilo con valores de 15,34 y 11,63 % con respecto al control muestran que a las concentraciones ensayadas la mezcla de

antibiótico no tuvo un comportamiento muy tóxico lo que puede deberse a que estas concentraciones estaban por debajo de la CL_{50} estimada para cada antibiótico. Sería recomendable en estudios posteriores la evaluación de la mezcla con concentraciones mayores de antibióticos.

5.3.3 Concentración-Adición (CA)

La evaluación por bioensayos de los efectos de las sustancias químicas combinadas o en mezcla resulta extremadamente importante. Dos conceptos clásicos de toxicidad de mezcla, la “Adición de Concentración” y la “Acción Independiente”, se han aplicado de manera exitosa a una gama de mezclas farmacéuticas. Su poder para predecir la acción conjunta de los productos farmacéuticos es casi siempre de bueno a excelente. Son raros los casos de toxicidades sinérgica o antagonística de las mezclas (una toxicidad más elevada o más baja de la que se esperaba).

El concepto de concentración adición es fácil de aplicar pero en algunos casos podría sobreestimar la toxicidad de mezclas. Sin embargo, desde la perspectiva regulatoria esta sobreestimación podría ser beneficiosa para la protección de los organismos acuáticos. Este modelo puede ser aplicable como herramienta de carácter predictivo para la protección de los ecosistemas acuáticos.

En relación al tipo de interacción de la mezcla, según el modelo de proporción-sinergia, para el caso de la inhibición de la germinación del hipocotilo todos los cocientes fueron superiores a uno, clasificándose la interacción como sinérgica. Los valores de cociente con respecto a la inhibición de la germinación de la raíz, fueron mayores a uno, indicando sinergismo, para Vancomicina, Ceftazidima, Cefotaxima, Trifamox y Cefuroxima. Para los restantes antibióticos el cociente fue menor que 1 indicando antagonismo. (Tabla XIII).

Una posible explicación de este antagonismo podría estar relacionado con la competencia entre estos agentes químicos por los sitios de acción en la interfase biológica (Gaete y Chávez, 2008).

6. CONCLUSIONES

1. Se determinaron los 22 antibióticos utilizados en el período de estudio, los que se corresponden con la disponibilidad total en la institución de salud. De estos Ceftriaxona y Cefepima superan la Dosis Diaria Definida 100/camas-días según criterios internacionales.
2. Según la predicción el vertimiento de residuos de estos antibióticos constituye un riesgo de contaminación ambiental para el ecosistema del río Bélico.
3. En todos los antibióticos evaluados se observó inhibición de la germinación e inhibición del crecimiento de la raíz y el hipocotilo, mayormente para Ceftriaxona y Sulfaprim. Se evidenció una tendencia a la estimulación en la elongación de la raíz en las concentraciones más bajas.
4. La mezcla de antibióticos mostró una tendencia a la estimulación del crecimiento de la raíz y el hipocotilo a la mayoría de las concentraciones evaluadas e inhibición del crecimiento de la raíz y el hipocotilo solo a la mayor concentración evaluada.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de utilización de Sulfaprim y Ceftriaxona que fundamente la propuesta de disminución de su uso.
- Evaluar la ecotoxicidad aguda de los restantes antibióticos que constituyeron riesgo ambiental según la predicción.
- Realizar un estudio de ecotoxicidad crónica que permita reafirmar o contradecir estos resultados

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alamo V. & V. Valdivieso (1997): Lista sistemática de moluscos del Perú. 2do Ed. IMARPE. Callao-Perú.
- Álvarez, A., C. Martínez, A. Vidal, M.D. Saavedra, A. Iglesias & X. Forga (2002): Prescripción de antibióticos en el paciente ambulatorio. *Aten Primaria*. 30(8): 490-495.
- Anderson, P.D., V.J. D'Aco, P. Shanahan, S.C. Chapra, M.E. Buzby, V.L. Cunningham, B.M. DuPlessie, E.P. Hayes, F. Mastrocco, N.J. Parke, J.C. Rader, J.H. Samuelian & B.W. Schwab (2004): Screening analysis of human pharmaceutical compounds in U.S. surface waters. ***Environ Sci Technol***. 38: 838–849.
- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Pollution Control Federation) (1995): Standard methods for examination of water and wastewater. 19th Ed. American Health Association. Washington D.C.
- Argemi, F., N. Cianni & A.Porta (2005): Disrupción endocrina: perspectivas ambientales y salud pública. ***Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana***. 39(3).
- Bailón, M.I. (2009): Uso de técnicas separativas miniaturizadas como alternativa a la determinación de antibiótico Beta-Lactámicos en fármacos, aguas y alimentos. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias. Universidad de Granada, Departamento de Química Analítica.
- Barceló, L. D., & M. J. López de Alda (2008): Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales_CSIC (Barcelona). Panel Científico-Técnico de Seguimiento de la Política de Aguas (11.03. 2008).
- Basilea, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. 1992. Convenio de Basilea sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación adoptado por la Conferencia de Plenipotenciarios del 22 de marzo 1989, Entró en vigor el 5 de mayo de 1992.
- Bila D.M. & Dezotti M. 2003. Fármacos no medioambiente. *Química Nova*. 26: 523-530.

- Blasco, F., R. Pérez, J. Martínez, A.I. Jiménez & M.J. García (2008): Study of the consumption of inappropriate medications in elder hospitalized in the Internal Medicine Service. **Anales de Medicina Interna (Madrid)**. 25(6).
- Bound, J.P. & N. Voulvoulis (2005): Household Disposal of Pharmaceuticals as a Pathway for Aquatic Contamination in the United Kingdom. **Environ. Health Perspect.** 113:1705-1711.
- Bowers, N., J.R. Pratt, D. Beeson & M. Lewis (1997): "Comparative Evaluation of Soil Toxicity using Lettuce Seeds and Soil Ciliates". **Environmental Toxicology and Chemistry** 16(2): 207-213.
- Burton, G. A. J. R. & Nordstrom, J. E., 2004, An *in situ* toxicity identification evaluation method Part I: Laboratory validation. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23:2844-2850. doi: 10.1897/03-409.1.
- Cabello, F. & D. Doren (2003): Antibióticos y acuicultura un análisis de sus potenciales impactos para el medio ambiente, la salud humana y animal en Chile. Análisis de Políticas Públicas. Serie APP; No. 17.
- Cheung, Y.H., M.H. Wong & N.F.Y Tam (1989): Root and Shoot Elongation as an Assessment of Heavy Metal Toxicity" and "Zn Equivalent Value' of Edible Crops. **Hydrobiologia**. 188/ 189: 377-383.
- Cleuvers, M. (2004): Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. **Ecotoxicol. Environ. Safe.** 59(3):309–315.
- Cleuvers, M. (2005): Initial risk assessment for three [beta]-blockers found in the aquatic environment. **Chemosphere**. 59(2):199–205.
- Colón, A.J. (2010): Determinación de la presencia de naproxeno, fluoxetina, atorvastatina, enalapril y acetaminofeno en el lago Guayo y el lago Lucchetti en el sur de Puerto Rico. Universidad Interamericana de Puerto Rico. Revista 360(5).
- Cuevas M.C., R. Ferrera, A. Roldán & R. Rodríguez (2008): Tercera parte: Ensayo de toxicidad aguda con la lombriz de tierra *Eisenia andrei* en: Ramírez, P. & A. Mendoza (copiladoras): Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. México: talleres de Impresora y Encuadernadora Progreso, S.A. de C.V. (iepsa): 115-126 pp.

- Daughton, C.G. (2001): 'Emerging' pollutants, and communicating the science of environmental chemistry and mass spectrometry--pharmaceuticals in the environment. **Journal of the American Society of Mass Spectrometry**. 12(10): 1067-1076.
- Daughton, C.G. & T.A. Ternes (1999): Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environ. Health Perspect.** 107: 907-942.
- Day, K.E., E.D. Ongley, R.P. Scroggins, & R.P. Eisenhauer, (1988): "Biology in the New Regulatory Framework for Aquatic Protection", Proceedings for the Alliston Workshop, National Water Research Institute (Burlington, Ontario) and Environment Canada (Ottawa).
- Díaz E. (2002): Guía de Lombricultura: Lombricultura una alternativa de producción. Agencia de Desarrollo Económico y Comercio Exterior Municipio Capital de La Rioja.
- Di Guardo, A., D. Mackay & C. Cowan (2001): Modelling the long-term fate of amended associated chemicals in soil with the FOCAS model. (in preparation).
- Di Guardo, A, D. Calamari, G. Zanin, A. Consalter & D. Mackay (1994): A fugacity model of pesticide runoff to surface water: development and validation. **Chemosphere**. 28:511–531.
- Dorn, P.B., T. E. Vipond, J.P. Salanitro & H.L. Wisniewski (1998: Assessment of the acute toxicity of crude oils in soil using earthworms, microtox and plants. **Chemosphere**. 37(5):845-860.
- Dutka, B. (1989): Short-Term Root Elongation Toxicity Bioassay. Methods for Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments, National Water Research Institute (NWRI), Environment Canada.
- Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101). EPA 712–C–96–154. April 1996.
- EMEA (2005): Note for Guidance on Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use, CMPC/SWP/4447/draft. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA), London. Disponible: (<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf>).
- Faust, a m., R. Altenburger, T. Backhaus, H. Blanck, W. Boedeker, P. Gramatica, V. Hamer, M. Scholze, M. Vighi & I. Grimme. 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly

acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology*, 63: 43-63.

- FDA (1998): Guidance for Industry – Environmental Assessment of Human Drug and Biologics. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), U. F. a. D. Administration, Rockville, Maryland. (<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.html>).
- Feijtel, T.C.J., G. Boeije, M. Matthies, A. Young, G. Morris, C. Gandolfi, B. Hansen, K. Fox, M. Holt, V. Koch, R. Schroder, G. Cassani, D. Schowanek, J. Rosenblom, H. Niessen (1997): Development of a geographyreferenced regional exposure assessment tool for European rivers – GREAT-ER. Contribution to GREAT-ER # 1. **Chemosphere**. 34: 2351–2373.
- Fernández-Vallín E. & L. Salas (1997): Algunas consideraciones sobre los estudios del uso de los medicamentos. **Rev. Cubana Invest Biomed**. 16(2): 156-158.
- Filho R.W.R., Barreiro J.C., Vieira E.M. & Cass Q.B. 2007. Fármacos, ETEs e corpos hídricos. *Revista Ambiente & Agua- An International Journal of Applied Science*.2: 54-61
- Fragoso, G.C. (2002): Las lombrices de tierra en México: diversidad, distribución y manejo. II Simposium Internacional y Reunión Nacional Lombricultura y abonos orgánicos.
- Galindo M. (2001): Normas de consumo que se aplicaran en los cálculos del balance de agua. Empresa Aprovechamiento Hidráulico de Villa Clara (Cuba), Grupo de Operación y Vigilancia Técnica.
- García-Gómez, C., P. Gortáres-Moroyoqui & P. Drogui (2011): Emerging contaminants: effects and removal treatments. **Rev. QcaViva**. 2.
- Gaete, H. & C. Chávez (2008): Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladocera, Crustacea. **Revista Limnetica**. 27(1): 1-10.
- Gaete, H., J. Silva, A. Riveros, E. Soto, L. Troncoso, E. Bay-Sehmidt & A. Larrain (1996): Efecto combinado y riesgo ecológico de las concentraciones de Zn, Cu y Cr presente en el Puerto de San Vicente, Chile. **Gayana Oceanológica**. 4: 99-107.

- Giachetto, G., A. Martínez & M.C. Pérez, G. Algorta, P. Banchemo & G. Camacho (2003): Vigilancia del uso de antibióticos en el Hospital Pediátrico del Centro Hospitalario Pereira Rossell: susceptibilidad antimicrobiana; gasto y consumo de antibióticos. **Revista Médica Uruguay**. 19:208-215.
- Giménez, R.A., J. Fuchs, L. Piola, N. Casabé, R. Massaro, J.C. Papa, M. Oneto, S. Basack, M. Pamparato & E. Kesten (2006): Impacto de Agroquímicos sobre la actividad biológica del suelo. 3º Congreso de Soja del MERCOSUR MERCOSOJA 2006.
- Gómez, C.V. (2011): Eliminación de tetraciclinas de las aguas mediante procesos avanzados de oxidación, carbones activados y adsorbentes obtenidos a partir de lodos de depuradora. Tesis para optar por el grado de Doctor. Universidad de Granada.
- Gómez, L.M. & Z. Ramírez (2004): Microalgas como biomonitores de contaminación. **Revista Cubana de Química**. 16(2): 34-48.
- Gros, M., M. Petrovic, A. Ginebreda & D. Barceló (2010): Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. **Environment International**. 36(1): 15-26.
- Gutiérrez, S., (2008): Development of new tools for the Agro-Industrial effluent control. Risk/Hazard Quantitation. Tesis para optar por el grado de Doctor. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Departamento de Edafología.
- Goldberg, R.J., M.S. Elliott, & R.L. Naylor (2001): Marine Aquaculture in the United States. Environmental Impacts and Policy Options. Pew Oceans Commission. Arlington, Virginia. pp. 1-33.
- Halling-Sørensen, B., S.N. Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten-Lützhøft & S.E. Jørgensen (1998): Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. **Chemosphere**. 36: 357–393.
- Heberer, T. (2002): Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic: a review of recent research data. **Toxicology Letters**. 131: 5-17.
- Hernández, M. (2011): Desarrollo de un método mekc para la determinación de 5-nitroimidazoles en aguas de río. Tesis para optar por el grado de Máster en Química. Universidad de Granada, Departamento de Química Analítica.

- Hoeger, B., B. Kollner, D. Dietrich y B. Hitzfeld (2005): Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*). **Aquat Toxicol.** 75:53-64.
- Huetos, O., (2004): Estudio comparative y evaluación de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de residuos de corticosteroides en muestras biológicas. Tesis para optar por al grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Toxicología y Farmacología.
- Iannacone J., L. Alvaríño & N. Mamani (2011): Estimación de la Toxicidad Combinada de Mezclas de Furadán 4F® y Monofos® sobre *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). **Revista J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** 6(1): 23-29.
- Iannacone, J. & L. Alvaríño (2009): Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*. **Ecología Aplicada.** 8(2).
- Iannacone, J. & L. Alvaríño (2007a): Aquatic ecotoxicity of two dyes and three antiparasitics of Importance in aquaculture on employing *Daphnia magna*. **Revista Ecología Aplicada.** 6(1-2).
- Iannacone J., R. Onofre & O. Huanqui (2007b): Ecotoxicological Effects of CARTAP on *Poecilia reticulata* “guppy” (Poeciliidae) and *Paracheirodon innesi* “neon tetra” (Characidae). **Gayana.** 71(2):170-177.
- Iannacone J. & L. Alvaríño (2003): Efecto ecotoxicológico agudo del mercurio sobre larvas del “muy muy” *Emerita analoga* (Stimpson) (Decapada: Hippidae) procedentes de cuatro localidades de Lima. **Ecología Aplicada.** 2: 111- 115.
- Iannacone, J., C. Caballero & L. Alvaríño (2002a): Empleo del caracol de agua dulce *Physa venustula* Gould como herramienta ecotoxicológica para la evaluación de riesgos ambientales por plaguicidas. **Agric. Téc.** 62: 212-225.
- Iannacone, J. & L. Alvaríño (2002b): Efectos del detergente doméstico alquil sulfonato de sodio lineal (LAS) sobre la mortalidad de tres caracoles dulceacuícolas en el Perú. **Ecología Aplicada.** 1(1): 81-87.
- Iannacone. J., J. García, H. Vela, C. Ticona, E. Torres, G. Quinte & K. Vidarte (2001): Toxicidad y bioacumulación de plomo en *Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1819) “chorito” (Bivalvia). **Bol. Soc. Quim.** 67: 89-98.

- Irahola P. & A. Gimenez (2000): Dos ensayos: Inhibición de Germinación de Semillas y Toxicidad en *Artemia salina*, como indicadores de actividad antitumoral. **Biofarbo**. 8.
- JICA-GTE (2004): Estudio del Desarrollo del Alcantarillado y el Drenaje Pluvial en la Bahía de La Habana. Informe Final del Proyecto. Resumen Ejecutivo. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA)- Grupo Estatal del Trabajo para el Saneamiento de la Bahía de La Habana, Cuba. 16p.
- Jiménez, C. (2011): Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos. **Revista Lasallista de Investigación**. 8(2):143-153.
- Jones, O.A., N. Voulvoulis & J.N. Lester (2001): Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. **Environ Technol**. 22:1383-1394.
- Kümmerer, K. (ed.) (2008): Sources, Fate, Effects and Risks Pharmaceuticals in the Environment. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 521 pp.
- Kümmerer, K., (2001): Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources—a review. **Chemosphere**. 45: 957–969.
- Kümmerer, K., A. Al-Ahmad & V. Mersch-Sundermann (2000): Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. **Chemosphere**. 40: 701-710.
- Küster, A. (2010): Capítulo 5: Evaluación del riesgo ambiental de los productos farmacéuticos – experiencias y perspectivas en: Productos Farmacéuticos en el Medio Ambiente. Resultados del taller de la Agencia Europea de Medio Ambiente. EFA Reporte técnico; No.1; 34 pp.
- Laboratory of Ecotoxicology and LCA Department of Environmental Chemistry, ICT. Prague. Acute toxicity test on brine shrimp (*Artemia salina*) [consultado en: http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/studijni_materialy/Ekotox-Labo/AJverze/6_Eng_Artemia.pdf].
- Lacy, C.F., L.L. Armstrong., M.P. Goldman & L.L. Lance (2012-2013): Drug Information Handbook. 21TH Edition. American Pharmaceutical Association (APHA). 1761 pp.
- Laing, R.O., H.V. Hogerzeil & D. Ross-Degnan (2001): Ten recommendations to improve use of medicines in developing countries. **Health Policy Plan**. 16(1):13-20.

- Lara M.C., M. Cires & A.J. García (2003): Consumo de antimicrobianos en APS. **Revista Cubana de Medicina Interna Integral**. 19(4).
- Lobo, M., M.T. Frejo, M.J. Díaz & J. García (2012): Valoración ecotoxicológica de algunos de los principales grupos terapéuticos encontrados en depositos SIGRE de oficinas de farmacia. **Rev. Salud Ambiental**. 12(2): 137-150.
- López de Alda, M.J. & D. Barceló (2003): Nuevos contaminantes orgánicos (emergentes) en el medio ambiente. Boletín de la Sociedad Española de Química Analítica, Nº 4.
- López M.C., E. Homs & M.T. Vitales (2002): Análisis sistemáticos de la utilización de antibióticos como estrategia útil para mejorar la calidad de la prescripción. **Farmacia Hospitalaria**. 26(4): 215-218.
- Lubick, N. (2011): Contaminación Ambiental. Herramientas para rastrear la resistencia a los antibióticos. **Revista Salud Pública de México**. 53(3): 270-276.
- Mackay, D., A. Di Guardo, S. Paterson, G. Kicsi & C.E. Cowan (1996a): Assessing the fate of new and existing chemicals: a five-stage process. **Environ Toxicol Chem**. 15:1618–1626.
- Mackay, D., A. Di Guardo, S. Paterson, G. Kicsi & C.E. Cowan (1996b): Evaluating the environmental fate of a variety of types of chemicals using the EQC model. **Environ Toxicol Chem**. 15:1627–1637.
- Mackay, D., A. Di Guardo, S. Paterson, G. Kicsi, C.E. Cowan & D.M. Kane (1996c): Assessment of chemical fate in the environment using evaluative, regional and local-scale models: illustrative application to chlorobenzene and linear alkylbenzene sulfonates. **Environ Toxicol Chem**. 15:1638–1648.
- Mackay, D. (1991): Multimedia environmental models. The fugacity approach. Lewis Publishers Inc., Chelsea, MI, USA.
- Magdaleno, A., A.B. Juárez, M. Paz, C. Tornello, L. Nuñez & J. Moretton (2012): Ecotoxicological and genotoxic evaluation of hospital wastewaters. **Acta toxicológica argentina**. 20(1).
- Márquez, D. (2008): Residuos químicos en alimentos de origen animal: problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia. **Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria**. 9(1): 124-135.

- La experiencia en México. México: talleres de Impresora y Encuadernadora Progreso, S.A. de C.V. (iepsa). Pág. 115-126.
- Medina, M. H. & R. Ramos-Jilberto (2009): Future directions of Chilean ecotoxicology: Implications for the environmental risk assessment of veterinary products used in aquaculture. **Revista Chilena de Historia Natural**. 82(3): 443-457.
- Miége, C., J.M. Choubert, L. Ribeiro, M. Eusèbe & M. Coquery (2009): Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and first results. **Environmental Pollution**.157: 1721-1726.
- Napán, K., C. Llanos & C. Paredes (2010): Acute toxicity of Methomylon on *Poecilia latipinna* (Lesueur 1821) (Poeciliidae). **The Biologist (Lima)**. 8(1): 21-28.
- Nikolaou, A., M. Sureya & D. Fatta (2007) : Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. **Anal Bioanal Chem**. 387: 1225-1234.
- Oetken, M, G. Nentwig, D. Lçffler, & T. Ternes & J. Oehlmann (2005): Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates. Part I. The Antiepileptic Drug Carbamazepine. Arch. **Environ. Contam. Toxicol**. 49:353–361.
- Ong E. & Z. Din (2001): Cadmium, copper and zinc toxicity to the clam, *Donax faba* C. and the cockle, *Anadara granosa* L. Bulletin of Environmental **Contamination and Toxicology**. 66: 86-93.
- Organization for Economic Cooperation and Development, 1992, Fish, Acute Toxicity Test. Guideline for testing of chemicals. No. 203.
- Organization for Economic Cooperation and Development, 1984, Earthworm, Acute Toxicity Test. Guideline for testing of chemicals No. 207.
- Organization for Economic Cooperation and Development, 1984, Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals N° 208, OECD Publications Service, Paris.
- Palacios, F., E. García & A.M. Borrego (2005): Gestión Integral de residuos hospitalarios en el Hospital Miguel Enríquez, Cuba. XV Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales, México.
- Peña, C.E., D.E. Carter & F. Ayala-Fierro (2001): Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program website at <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>.

- Petrovic, M, M. Solé, M.J. López de Alda & D. Barceló (2002): Endocrine Disrupters in Sewage Treatment Plants, Receiving River Waters and Sediments. Integration of Chemical Analysis and Biological Effect on Feral Carps. **Environ. Toxicol. Chem.** 21: 2146-2156.
- Pierik, R. L. (1987): In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands.
- Planificación Física (2012): Proyecto Demostrativo Mapeadores Ambientales Comunitarios, Circunscripción No 12, Consejo Popular Hospital, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
- Prieto, J.J. (2011): Los medicamentos como residuos patológicos son un verdadero peligro para la salud del hombre y del medio ambiente.
- Quesada, I., U.J. Jáurequi, A-M. Wilhelm & H. Delmas (2009): Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. **Rev. CENIC Ciencias Biológicas.** 40(3).
- Ramos, C. (2009): Medicamentos de consumo humano en el agua, propiedades físico-químicas. [artículo en Internet] [citado 12 diciembre 2011]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol47_2_09/hie08209.htm
- Ramos, C. (2008): Aguas residuales generadas en hospitales. **Ingeniería Hidráulica y Ambiental.** 19(2).
- Ramos, C. & A. Pellón (2006): Metodología empleada en el diseño de tecnologías de tratamiento de las aguas residuales de la producción de diversos medicamentos. **Revista CENIC Ciencias Biológicas.** 37(2).
- Reglamento (CE) 440/2008, de 30 de mayo, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH). DO L142, de 31 de mayo.
- Reglamento 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de Diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y se derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) no 1907/2006 DO L 353 de 31 de diciembre.
- Resolución No. 136/2009. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Cuba.

- Resolución No. 32/2005, Lineamientos Metodológicos para el Manejo y Disposición de los Desechos Compuestos por Medicamentos u otros generados por la atención médica.
- Rodríguez, E. (2007): Propuesta de estrategia para la Evaluación del Riesgo Ecotoxicológico en Efluentes Hospitalarios por la presencia de Compuestos Farmacéuticamente Activos. (Tesis de Maestría). Villa Clara. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- Ronco, A., M.C. Díaz & Y. Pica, 2004. Capítulo 1: Conceptos Generales en: Castillo, G. (ed.): Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México: IMTA. pág. 17-22.
- Sánchez R.G. & D.G. Vera (2001): Manual Introductorio de ecotoxicológica acuática. **Informe Instituto del Mar del Perú**. 161: 1-40.
- Santamaría, R.S. (1996): Aspectos biotecnológicos del proceso de vermicomposteo y su aplicación agronómica. Tesis para obtener el título de de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana, México.
- Silva, J., G. Torrejón, E. Bay-Schmith & A. Larrain (2003): Calibration of the acute toxicity bioassay with *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera) using a reference toxicant. **Revista Gayana**. 67(1): 87-96.
- StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- Stockholm County Council. 2012. Environmentally Classified Pharmaceuticals. [consultado en Internet] [citado 21 de abril 2013]. Disponible en: http://www.janusinfo.se/Global/Miljo_och_lakemedel/miljobroschyr_engelsk_2012_uppslag.pdf
- Sumpter, J.P. (2010): Capítulo 3: Efecto conocido actual de los productos farmacéuticos en: Productos Farmacéuticos en el Medio Ambiente. Resultados del taller de la Agencia Europea de Medio Ambiente. EFA Reporte técnico; No.1; 34 pp.
- Telechea, H., N. Speranza, L. Lucas, A. Santurio, G. Giachetto, G. Algorta, L. Nanni & C. Pérez, (2009): Evolución del consumo de antibióticos y de la susceptibilidad antimicrobiana en el Centro Hospitalario Pereira Rossell en la era de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. **Rev Chil Infect**. 26(5): 413-419.

- Ternes, T.A. (1998): Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. **Water Res.** 32(11):3245–3260.
- Tzoc, E., M.L. Arias & C. Valiente (2004): Efecto de las aguas residuales hospitalarias sobre los patrones de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Aeromonas sp.* **Rev. Biomed.** 15(3):165-172.
- US EPA, 1989, Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites, US Environmental Protection Agency, 600/3-88/029, Corvallis.
- Vargas-Castillo, M.P. & A. Abdelnour-Esquivel (2010): Cultivo *in vitro* de *Geophila macropoda* (Ruiz & Pav. DC) a partir de embriones cigóticos. *Agron. Mesoam.* 21(1).
- Wang, W. (1987): Root Elongation Method for Toxicity Testing of Organic and Inorganic Pollutants. **Environmental Toxicology & Chemistry.** 6: 409-414.
- Wilson, J.J., J. Hathcer & J.S. Goudey (2002): Ecotoxicological endpoints for contaminated site remediation. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità.* 38(2): 143-147.
- Wong, C.K. & Pak, A.P., 2004, Acute and subchronic toxicity of the heavy metals copper, chromium, nickel, and zinc, individually and in mixture, to the freshwater copepod *Mesocyclops pehpeiensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 73:190-196. doi: 10.1007/s00128-004-0412-2.
- World Health Organization. Containing Antimicrobial resistance: review of the Literature and Report of a WHO Workshop on the Development of a Global Strategy for the Containment of Antimicrobial Resistance. Geneva: WHO, 1999: 1-54.
- Young, WF, P. Whitehouse, I. Johnson & N. Sorokin (2002): Proposed predicted-no-effect-concentrations (PNECs) for natural and synthetic steroid estrogens in surface waters. Research and Development, Technical Report P2-T04/1. Environment Agency, Bristol, UK.

ANEXO

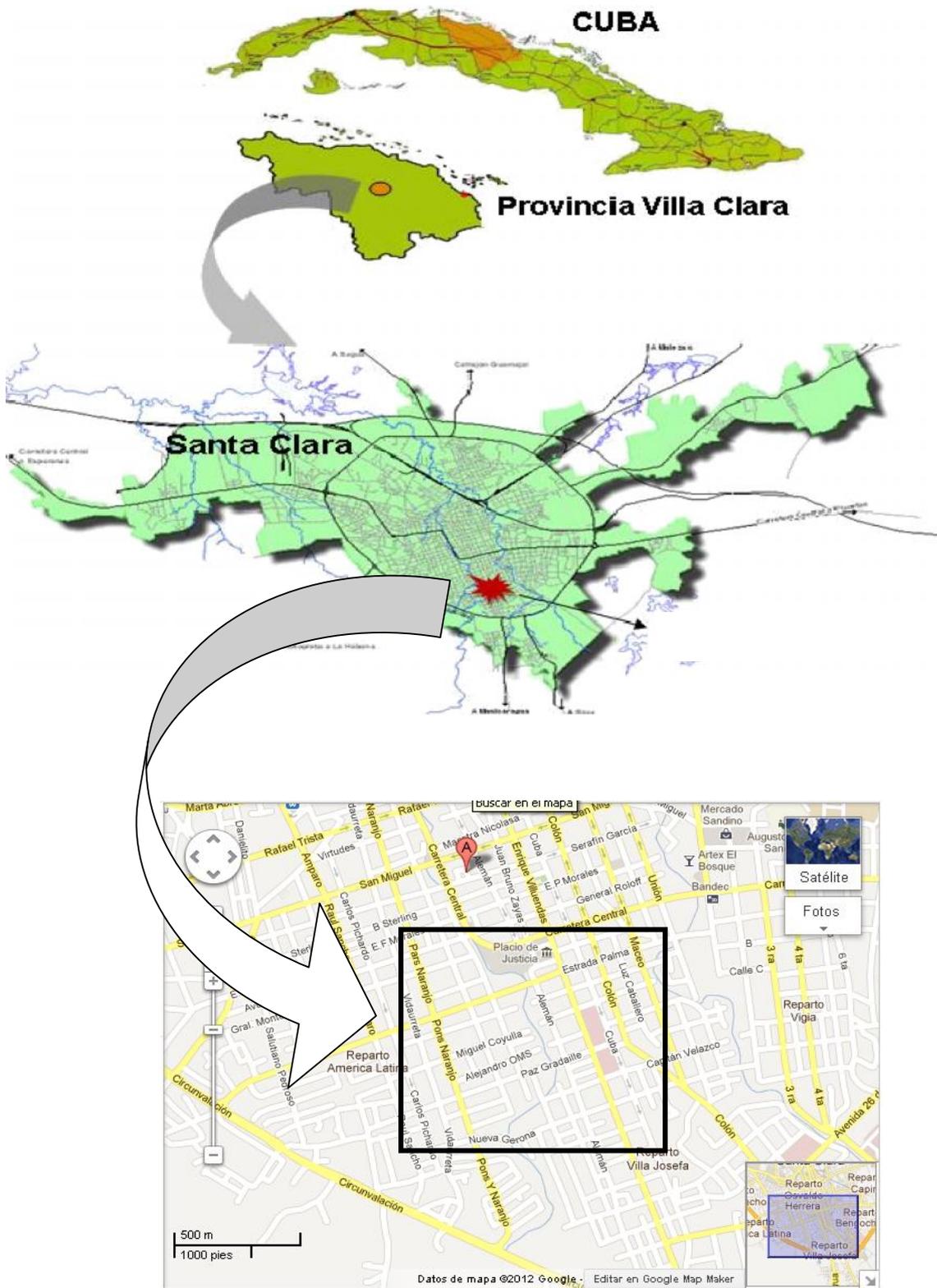


Figura 1. Área de estudio, río Bético, Santa Clara. Cuba.



Figura 2. Área de estudio donde se observan los vertederos cerca del margen del río.



Figura 3. Área de estudio donde se observa el agua residual saliente del hospital hacia el río.



Figura 4. Área de estudio donde se observa el punto de encuentro del agua residual saliente del hospital con el río.



Figura 5. Área de estudio donde se observa el deterioro ambiental producto de la fuerte antropización.

PENICILINAS				
Penicilinas Naturales	Penicilina G Sódica Penicilina G Potásica Penicilina G Procaína Penicilina G Clemizol Penicilina G Benzatínica Penicilina Potásica Fenoximetil Penicilina		Cefmetazol Cefminox Cefotetán	Sisomicina Isepamicina Tobramicina Kanamicina Espectinomina
Aminopenicilinas	Amoxicilina Ampicilina Hetacilina Bacampicilina Ciclacilina Epilina Metampicilina Pivampicilina Tampicilina	Cefalosporinas de Tercera Generación	Cefmenoxima Cefazidima Cefodizina Ceftizoxima Cefoperazona Ceftriaxona Cefotaxima Moxalactam Cefsulodina Cefetamet Cefixima Cefpodoxima Ceftibuteno	GLUCOPEPTIDOS Vancomicina Teicoplanina
Penicilinas Isoxazólicas	Cloxacilina Flucloxacilina Nafcilina Dicloxacilina Meticilina Oxacilina	Cefalosporinas de Cuarta Generación	Cefepima Cefpiroma	OXAZOLIDINONAS Linezolid
Carboxipenicilinas	Carbenicilina Ticarclina	CARBAPENEMICOS		RIFAMICINAS Rifampicina Rifabutina
Ureidopenicilinas	Apalcilina Azlocilina Furazlocilina Mezlocilina Piperacilina Sulbenicilina			HIDRACIDAS Isoniacida
INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS				POLIPÉPTIDOS Bacitracina Capreomicina Gramicidina Polimixina B y E
I. B. L.	Acido Clavulánico Sulbactam Tazobactam			QUINOLONAS
CEFALOSPORINAS				Primera Generación Acido nalidixico Acido oxalínico Acido pipemídico Cinoxacino Rosoxacino
Cefalosporina de Primera Generación	Cefadroxilo Cefalexina Cefaloglicina Cefradina Cefapirina Cefazolina Cefaloridina Cefalotina			Segunda Generación Ciprofloxacino Enoxacino Lomefloxacino Norfloxacino Ofloxacino Peфлоxacino Rufloxacino
Cefalosporinas de Segunda Generación	Cefuroxima Cefuroxima -Axetil Cefaclor Cefprozil Cefamandol Cefonicid Ceforonida Cefotiam Cefoxitina			Tercera Generación Gatifloxacino Esparfloxacino Grepfloxacino Pasufloxacino Temfloxacino
				Cuarta Generación Clinafloxacino Moxifloxacino Trovafloxacino
				SULFONAMIDAS
				Sulfas de uso sistémico Sulfadiazina Sulfadoxima Sulfisoxazol Sulfametoxazol
				Sulfas de uso tópico Sulfacetamida Sulfadiazina argéntica
				NITROFURANOS Furazolidona Nifurtimox Nitrofurantoina Nitrofurazona
				NITROIMIDAZOLES Metronidazol Secnidazol Tinidazol Ornidazol

Figura 6. Clasificación de los antibióticos según su grupo químico tomada de Hernández, 2011.



Figura 7. Semillas de *Lactuca sativa* L. (lechuga).