

*Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
Centro de Bioactivos Químicos.*



*Ecotoxicidad de antibacterianos
con riesgo ambiental*

*“Tesis Presentada en Opción al Título Académico de
Máster en Investigación y Desarrollo de
Medicamentos”*

Lic. Ester María Hernández Martínez



Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
Centro de Bioactivos Químicos.



Ecotoxicidad de antibacterianos con riesgo ambiental

“Tesis Presentada en Opción al Título Académico
de Máster en Investigación y Desarrollo de
Medicamentos”

Autora: Lic. Ester María Hernández Martínez

Tutora: Dra. C. Daymí Isabel Carrazana García

Facultad Química-Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

2015

Pensamiento

La ciencia no conoce país, porque el conocimiento pertenece a la humanidad, y es la antorcha que ilumina el mundo.

Louis Pasteur

Dedicatoria

*A mis princesas: Grace y Gaby, por ser mi
fuente de inspiración y mi razón de vivir.*

*A mis padres, porque me quieren tal como soy
y por enseñarme el camino correcto.*

A Titi por ser alguien especial.

*A mi hermana y cuñado por su apoyo en
los momentos difíciles.*

A mis sobrinos por estar siempre presentes.

Agradecimientos

A mi tutora Daymí por su dedicación y ayuda.

*A Edisleydis, Osmani, Alcides, Meneses, Giselle, Sifontes y Miriam:
sin ustedes no hubiera sido posible la culminación de este trabajo.*

*A Beatriz, William, Rayza y Tony por su granito de arena en la
realización de este trabajo.*

*A mis compañeros y amigos que han sabido brindarme siempre su
apoyo y aliento cuantas veces lo he necesitado, Mildrey, Yaima,
Lisetica, Namirys, Ida, Mailin, Abdel, Yisel, Tania y Linnet.*

*A todos mis compañeros de la Planta por estar
presentes y ayudarme en el día a día.*

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

A mis profesores todos, por contribuir a este logro.

A todos los que hicieron posible este trabajo.

A todos, ¡Muchas Gracias!

Resumen

RESUMEN

Últimamente existe una creciente preocupación por los efectos que los medicamentos producen en el medio ambiente. A pesar del gran uso de los antibacterianos no son muy investigados como contaminantes, prestándose mayor atención a antibioresistencia por lo que el objetivo de la investigación fue evaluar la ecotoxicidad aguda de antibacterianos. Para esto se realizó un estudio de consumo de los antibacterianos consumidos en el hospital en los años 2011 a 2013, se predijo sus concentraciones ambientales mediante un modelo matemático y se determinó su riesgo ecotoxicológico. En el período de estudio se utilizaron 17 antibacterianos, el de mayor consumo fue la Ceftriaxona y el menos consumido la Clindamicina. Todos constituyen un riesgo para el ambiente. Se observó inhibición de la germinación de *Lactuca sativa* L. en todos los antibacterianos resaltando el Cotrimoxazol con 38.78% ($CI_{50}=0.52\text{g/L}$) y Vancomicina la de menor efecto en la inhibición de la germinación con un 8.56% ($CI_{50}=44,14\text{g/L}$). En la mezcla solamente hubo inhibición de la germinación a la mayor concentración evaluada, mientras que en el resto de las concentraciones no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. El tipo de interacción de la mezcla se clasifica como sinérgica. En el ensayo de *Artemia salina* la Ceftazidima se clasifica como muy tóxico con valor de CL_{50} de 0,060773 g/L, la Cefepima y Cefotaxima con valores de 0,993731 y 0,928847g/L como moderadamente tóxicos y el resto de los antibacterianos evaluados se clasifican como no tóxicos. En los bioensayos en *Physa cubensis* Cefepima y Cefazolina ocasionaron la mayor mortalidad con CL_{50} de 0,000270 y 0,025684 g/L respectivamente y los que indujeron menor mortalidad fueron Vancomicina y Amoxicilina/Sulbactam con CL_{50} de 1,528440 y 1,055492 g/L. El vertimiento de residuos de antibacterianos puede ser causa de contaminación ambiental perjudicial para algunas especies.

Palabras claves: antibacterianos, ecotoxicidad aguda, *Lactuca sativa* L., *Physa cubensis* P., *Artemia salina* L.

Abstract

ABSTRACT

In recent years, there is growing concern about the effects that drugs produce in the environment. Despite the wide use of antibacterial, they are not very investigated as pollutants, paying greater attention to their antibiotic resistance, so the aim of this research was to evaluate the acute ecotoxicity of antibacterials. For this, an study of antibacterial consumption in the hospital during years 2011-2013 was carried out, their environmental concentrations were predicted by a mathematical model and its ecotoxicological risk was determined. In the study period they were used 17 antibacterials, the highest consumption was ceftriaxone and the less consumed was clindamycin. All they constitute a risk to the environment. Germination inhibition of *Lactuca sativa* L. was observed in all antibacterial highlighting the Cotrimoxazol with 38.78% ($IC_{50} = 0.52\text{g/L}$) and Vancomycin with minor effect on the germination inhibition with 8.56% ($IC_{50} = 44, 14\text{g/L}$). In the mixture there was only germination inhibition at the highest concentration tested, while in other concentrations no statistically significant differences were found, respect to control. The type of mixture interaction is classified as a synergistic. In the *Artemia salina* trial Ceftazidime is classified as very toxic with LC_{50} value of 0.060773 g/L, Cefepime and Cefotaxime with values of 0.993731 and 0,928847g/L are classified as moderately toxic and the rest of antibacterials evaluated are classified as non-toxic. In bio trials of *Physa cubensis*, Cefepime and Cefazolin caused the greatest mortality with LC_{50} 0.000270 0.025684 g/L respectively, and the ones that led lower mortality were Vancomycin and Amoxicillin/Sulbactam with LC_{50} of 1.528440 and 1.055492 g/L. The dumping of antibiotics residues can be the cause of environmental pollution, detrimental to some species.

Keywords: antibiotics, acute toxicity, *Lactuca sativa* L., *Physa cubensis* P., *Artemia salina* L.

Índice

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1 Contaminación por productos farmacéuticos.....	4
1.2 Antibacterianos.....	8
1.2.1 Clasificación.....	8
1.2.2 Efecto de los antibacterianos en el ambiente.....	10
1.3 Consumo de medicamentos.....	11
1.4 Modelos y métodos de exposición ambiental para el estudio de medicamentos como contaminantes ambientales.....	14
1.4.1. Fases para la evaluación ecotoxicológica de un fármaco en el ambiente.....	17
1.5 Ecotoxicología.....	20
1.5.1 Conceptos generales para comprender los estudios de ecotoxicidad.....	20
1.5.2 Ensayos utilizados en los estudios de riesgos ecotoxicológicos....	23
1.5.3 Consecuencias ecotoxicológicas.....	25
1.5.4 Ecotoxicología de mezclas farmacéuticas.....	26
1.6 Modelos biológicos.....	26
1.6.1 <i>Lactuca sativa</i> L.....	26
1.6.2 <i>Artemia salina</i> L.....	27
1.6.3 <i>Physa cubensis</i> P.....	29
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.1 Determinación del consumo de antibacterianos.....	30
2.2 Predicción de la concentración ambiental (PEC).....	31
2.3 Evaluación ecotoxicológica del riesgo ambiental.....	31
2.3.1 <i>Lactuca sativa</i> L.....	32
2.3.1.1 Ensayo de toxicidad aguda en semillas de <i>Lactuca sativa</i> L....	32
2.3.1.2 Ensayo de toxicidad aguda en semillas de <i>Lactuca sativa</i> L. con la mezcla de antibacterianos.....	35
2.3.1.3 Aplicación del modelo Concentración-Adición (CA).....	35

2.3.2 Ensayo de toxicidad aguda en larvas de <i>Artemia salina</i> L.....	36
2.3.3 Ensayo de toxicidad aguda en <i>Physa cubensis</i> P.....	38
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1 Determinación del consumo de antibacterianos.....	42
3.2 Predicción de la concentración ambiental (PEC).....	44
3.3 Evaluación ecotoxicológica del riesgo ambiental.....	46
3.3.1 <i>Lactuca sativa</i> L.....	47
3.3.1.1 Ensayo de toxicidad aguda en semilla de <i>Lactuca sativa</i> L.....	47
3.3.1.2 Ensayo de toxicidad aguda en semilla de <i>Lactuca sativa</i> L. con la mezcla de antibacterianos.....	54
3.3.1.3 Concentración-Adición (CA).....	55
3.3.2 Ensayo de toxicidad aguda en larvas de <i>Artemia salina</i> L.....	57
3.3.3 Ensayo de toxicidad aguda en <i>Physa cubensis</i> P.....	62
CONCLUSIONES.....	67
RECOMENDACIONES.....	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS.....	81

Introducción

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un creciente interés por los contaminantes emergentes, ya que son compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medioambiente, o las posibles consecuencias de la misma, han pasado en gran medida inadvertidas, causando problemas ambientales y de riesgo para la salud. Estos compuestos se encuentran diseminados en el ambiente y se han detectado en fuentes de abastecimiento de agua, aguas subterráneas e incluso en agua potabilizada.

Los productos farmacéuticos son compuestos complejos ampliamente utilizados en todo el planeta. Miles de moléculas activas diferentes se usan actualmente en el mundo para combatir o prevenir enfermedades, con cientos de nuevos productos que se sintetizan cada año (Quesada *et al.*, 2009). Investigaciones recientes han demostrado que los fármacos o medicamentos están ampliamente distribuidos en los ecosistemas acuáticos y que una de las principales fuentes de entrada es a partir de los centros asistenciales de salud, (Gil *et al.*, 2012; Carmona *et al.*, 2014; Pignato *et al.*, 2009; Esteban *et al.*, 2014; Kümmerer, 2001; Barceló & López de Alda, 2008; Teijón *et al.*, 2010, Kuster *et al.*, 2010; Baquero *et al.*, 2008). Sin embargo, 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 (Silva *et al.*, 2012; Jiménez, 2011).

En el caso particular de los antibacterianos no se conoce adecuadamente las consecuencias ecológicas del ingreso de estos a los cuerpos de agua, aunque hay evidencia de la presencia de residuos de antibacterianos en el ambiente y su implicación en los mecanismos de defensa propios de los organismos vivos (Jiménez, 2011). Es de esperar que los microorganismos puedan desarrollar resistencia y alteraciones enzimáticas por la presencia de nuevos compuestos, lo cual tiene repercusiones difíciles de cuantificar (Passos *et al.*, 2011; Jiménez, 2011). Entre los antibacterianos con mayor reporte en los cuerpos de agua están las tetraciclinas (Dang *et al.*, 2007), los aminoglucósidos (Shakil *et al.*, 2008), entre otros

(Akinbowale *et al.*, 2007) y son muy pocos los que hoy en día poseen algún estudio de ecotoxicidad (Stockholm County Council 2014).

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 antibacterianos, se emplean en cantidades similares a las de los pesticidas (Barceló & López de Alda 2008). 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 antibacterianos es ecológico y nunca antes se había visto que los organismos infecciosos fueran resistentes a tan alto número de antibacterianos (Márquez 2008). 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 & Alvariño 2009).

La ecotoxicología estudia el destino y los efectos de los contaminantes en los ecosistemas, intentando explicar las causas y prever los riesgos probables. 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 mortalidad, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Ronco *et al.*, 2004).

La Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos ha publicado guías de ensayos armonizadas (US-EPA, United States-Environmental Protection Agency; OCSP) para la investigación de nuevos productos o el impacto sobre los ecosistemas de químicos y residuales. Dentro de estas metodologías están los ensayos ecotoxicológicos que evalúan el riesgo por exposición en animales marinos y de estuarios.

Es importante continuar investigando esta problemática, 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 de esta investigación es: Evaluar la ecotoxicidad aguda de antibacterianos con riesgo ambiental.

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

1. Determinar consumo de antibacterianos en el Hospital Universitario Clínico Quirúrgico "Celestino Hernández Robau" en el período 2011-2013.
2. Predecir la concentración de los antibacterianos empleando un modelo matemático.
3. Determinar la ecotoxicidad aguda de antibacterianos empleando bioensayos ecotoxicológicos.

Revisión Bibliográfica

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Contaminación por productos farmacéuticos

Durante décadas, la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en el estudio de los contaminantes químicos cuya presencia en el medio ambiente ha estado o está regulada en las distintas legislaciones, contaminantes en su mayoría apolares, tóxicos, persistentes y bioacumulables. Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de nuevos y más sensibles métodos de análisis ha permitido alertar de la presencia de otros nuevos contaminantes, potencialmente peligrosos, denominados globalmente como Contaminantes Emergentes (Barceló & López de Alda, 2008).

Los contaminantes emergentes, cuyo estudio se encuentra entre las líneas de investigación prioritarias de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA), o la Comisión Europea, 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 (Barceló & López de Alda, 2008).

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. 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 (Gil *et al.*, 2012).

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).

El primer estudio sobre la contaminación por productos farmacéuticos tuvo lugar en una planta de tratamiento de residuos de Kansas City en 1976 (Jiménez, 2011), esos 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 y etofibrato). Ese mismo año, estudios que se realizaron en Alemania, Dinamarca y Suecia hallaron este compuesto en ríos, lagos y en el Mar del Norte (Quesada *et al.*, 2009).

Debido a las grandes cantidades de PPCPs consumidos en las sociedades desarrolladas, se han encontrado concentraciones significativas de éstos compuestos en aguas residuales (Miége *et al.*, 2009). 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 a 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, superficiales, subterráneas, e incluso la potable (Heberer, 2002; 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).

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 & Alvariño, 2009).

Cabe destacar que los productos farmacéuticos son formulaciones complejas y que sus coadyuvantes también generan 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.

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 & Alvarino 2009).

Recientemente se ha comprobado que determinados compuestos pueden alterar al sistema endocrino, bloqueando o perturbando las funciones hormonales. También pueden provocar 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). En especies animales 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, determinada mediante estudios experimentales, es un fallo renal provocada por el Diclofenaco (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.

1.2 Antibacterianos

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).

El descubrimiento e introducción de los antibacterianos en la práctica clínica supuso uno de los mayores avances de la medicina, tanto por sus efectos directos (curación de infecciones) como indirectos (permitiendo el desarrollo de procedimientos terapéuticos asociados a una alta probabilidad de aparición de infecciones graves, como los trasplantes, la ventilación mecánica, etc.) (Spellberg *et al.*, 2008).

La expresión más llamativa del efecto positivo de los antibacterianos se observa en los pacientes con infecciones graves (sepsis grave y shock séptico) en los que la utilización precoz de antiinfecciosos adecuados se asocia a un beneficio muy marcado en términos de reducción de la mortalidad; ninguna otra intervención terapéutica en medicina tiene un impacto semejante (Paul *et al.*, 2010; Rodríguez, 2012).

Sin embargo, desde la introducción de los antibacterianos se ha comprobado cómo los microorganismos pierden con el tiempo su sensibilidad natural a estos agentes a través de la selección y transmisión de diversos mecanismos de resistencia (Clatworthy *et al.*, 2007).

1.2.1 Clasificación

Aunque los antibacterianos están constituidos por diversas clases de compuestos, a menudo se ordenan basándose en disímiles criterios, lo que hace difícil determinar cuál es la clasificación ideal. Las más utilizadas son las que se mencionan a continuación (Clatworthy *et al.*, 2007):

1. **Según su estructura química:** Esta clasificación es la más utilizada, se fundamenta en la similitud química de algunos antibacterianos, según los núcleos base de sus estructuras, los cuales les confieren cierta semejanza en

sus propiedades físico-químicas y farmacológicas; también de las adiciones de grupos químicos que posean en dichos núcleos base (Anexo 1).

2. **Según espectro antimicrobiano:** Por su actividad frente a ellos pueden dividirse en tres grupos: de espectro amplio, intermedio o reducido. A la hora de utilizarse se debe tener en cuenta que mientras más amplio es el espectro mayor es la afectación de la microflora normal, lo que incrementa la posibilidad de suprainfección intestinal. Pueden ser:

- Contra bacterias Gram-positivas: Bencilpenicilinas, Cefalosporinas 1ra generación, Glicopéptidos, Macrólidos, Lincosamida, Rifampicina, Bacitracina, ácido fusídico.
- Contra bacterias Gram-negativas: Aminoglucósidos, Monobactámicos, Aminociclitolos, Polipéptidos.
- De amplio espectro: Amino, carboxi y ureido-penicilinas, Cefalosporinas 2da, 3ra y 4ta generación, Carbapenémicos, Anfenicoles, Quinolonas, Cotrimoxazol y Tetraciclinas.
- Contra anaerobios: Penicilinas, Carbapenémicos, Anfenicoles, Macrólidos, Lincosamida, Metronidazol.

3. **Según el efecto de su acción:** Pueden ser bactericidas o bacteriostáticos. Los primeros poseen la propiedad de destruir la bacteria, su acción es terapéutica *irreversible*: β -lactámicos, Aminoglucósidos, Rifampicina, Quinolonas, Polimixinas, Glicopéptidos. Los segundos inhiben la multiplicación bacteriana, la cual se reanuda una vez que se suspende el tratamiento: Tetraciclinas, Macrólidos, Sulfonamida, Novobiocina, Anfenicoles, Lincosamidas. El efecto varía en dependencia del tipo de germen y de la concentración del antibiótico.

4. **Según su mecanismo de acción:** En dependencia de la vía que utilizan para actuar sobre los microorganismos, los antibacterianos se clasifican en:

- Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana y afectan la formación del polímero péptido glicano que conforma la estructura de dicha pared.
- 1ra fase: Vancomicina, Bacitracina
- 2da fase: Cicloserina
- 3ra fase: Penicilinas, Cefalosporinas y otros antibacterianos β -lactámicos
- Agentes que afectan la síntesis de proteínas a nivel ribosomal entre los cuales se encuentran los que actúan
 - Sobre la subunidad 30s (Aminoglucósidos, Aminociclitoles y tetraciclinas)
 - Sobre la subunidad 50s (Macrólidos, Lincosamidas y Amfenicoles)
- Agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos (Quinolonas, Rifamicinas, Novobiocina y Antivirales)
- Agentes antimetabolitos que antagonizan los pasos metabólicos en la síntesis de ácido fólico (Sulfonamidas y Trimetoprima)
- Agentes que actúan en forma directa sobre la membrana celular del microorganismo: Polimixina B, Colistina, Colistimetato, detergentes y antimicóticos poliénicos, como nistatina y Anfotericina B, que se unen a los esteroides de la pared celular.

1.2.2 Efecto de los antibacterianos en el ambiente

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 antibacterianos (Colón, 2010).

Entre los antibacterianos con mayor reporte en los cuerpos de agua están las Tetraciclinas, los Aminoglucósidos, los Macrólidos, los Betalactámicos y la Vancomicina (Jiménez, 2011).

Los antibacterianos 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 antibacterianos es ecológico y nunca antes se había visto que los organismos infecciosos fueran resistentes a tan alto número de antibacterianos (Márquez, 2008).

La aplicación indiscriminada y el uso irracional de antibacterianos 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.

1.3 Consumo de medicamentos

A partir de 1980, la OMS ha promovido el uso racional de medicamentos y ha recomendado que este aspecto sea integrado en las políticas farmacéuticas nacionales. Ante la creciente epidemia de resistencia bacteriana y sus graves consecuencias para la salud pública, la Asamblea Mundial de la Salud de 1998 instó a los países miembros a desarrollar acciones dirigidas a mejorar el uso de los antibacterianos (OMS, 1999).

En el año 2001, la OMS dio a conocer la Estrategia Global para Contener la Resistencia Antimicrobiana, la cual incluye diversas intervenciones educativas, regulatorias y de gestión (OMS, 2001). En 2005, 2007 y 2009 se realizaron una serie de reuniones de expertos para categorizar a los antibacterianos según su importancia crítica. La lista se elaboró como una estrategia para salvaguardar aquellos antibacterianos indispensables en el tratamiento de infecciones humanas graves para las cuales, debido al problema de resistencia que ya existe, quedan pocas alternativas de tratamiento disponibles (OMS, 2009). A partir de la década pasada, varios países de la Unión Europea, Estados Unidos, Chile y Perú, han desarrollado diversas intervenciones dirigidas a controlar la resistencia bacteriana y mejorar el uso de antibacterianos. Estados Unidos es el país con la mayor industria

farmacéutica a nivel mundial, seguido de Reino Unido y España (Dreser, *et al.*, 2008).

Los antibacterianos son un grupo de fármacos de amplia utilización en el medio hospitalario y generan un costo elevado. Además, un uso inadecuado puede plantear graves repercusiones sobre la modulación de la flora microbiana en el hospital, con un aumento de las resistencias microbianas y la aparición de sobreinfecciones. Por este motivo, las estrategias que permitan incidir sobre la calidad de la prescripción de este grupo de fármacos tienen un gran potencial terapéutico, y en definitiva, pueden aportar grandes beneficios al paciente.

En los últimos años, la terapia secuencial se ha erigido como una práctica muy útil para racionalizar la utilización de antibacterianos. Según indican algunos estudios, la terapia secuencial sería aplicable hasta en un 40% de los pacientes que inician tratamiento antibiótico endovenoso. Por otro lado, otros autores han demostrado que es capaz de acortar los días de hospitalización, manteniendo un alto grado de satisfacción en los pacientes.

El consumo exagerado de antibacterianos en atención primaria está condicionado por un déficit de racionalidad en la prescripción médica, en la dispensación farmacéuticas en receta, el uso indiscriminado que realizan los pacientes y la falta de iniciativas claras de la administración sanitaria para el desarrollo de una política de antibacterianos en atención primaria que mejore su utilización.

Para el cálculo del consumo se ha definido una unidad denominada Dosis Diaria Definida (DDD), utilizada por el *Nordic Council on Medicines* y posteriormente recomendada por el grupo europeo DURG.

La DDD es la dosis media diaria supuesta de un fármaco, cuando se usa en su indicación principal. Las directrices para establecer la DDD son las siguientes (Capella & Laporte, 1993):

- Siempre que sea posible, se expresará en forma de peso de sustancia activa.
- Por razones prácticas la DDD se basa en el uso en adultos, excepto para ciertos fármacos utilizados exclusivamente en niños.

- Cuando la dosis inicial del fármaco administrado es distinta de la dosis de mantenimiento, la DDD corresponde a esta última.
- Para fármacos administrados para profilaxis y para tratamiento, la DDD se refiere a la dosis terapéutica; sin embargo, si la administración profiláctica es la principal indicación del medicamento, la DDD corresponde a esta última.
- Para fármacos administrados en dosis distintas según la vía de administración, se establecen distintas DDD: una para la vía oral, otra para la vía parenteral, etc.

En general, el número de DDD consumidas en un país o en una región o en un centro determinado se expresa por 1.000 habitantes y por día. Este parámetro proporciona una idea aproximada del volumen de población tratada diariamente con una dosis habitual de un determinado fármaco.

El cálculo del consumo utilizando esta unidad permite:

- Describir el consumo de medicamentos en un área determinada.
- Detectar desviaciones en el consumo.
- Detectar diferencias nacionales e internacionales en el consumo.
- Evaluar programas de intervención (acciones reguladoras, acciones Informativas).
- Poner de manifiesto diferencias en los hábitos terapéuticos de un país a otro, pero no identifica las causas específicas de estas diferencias.

Para su utilización en hospitales se aplican las mismas reglas pero se expresa como DDD/100 camas-día. La cifra resultante es una estimación cruda de la probabilidad de que un paciente sea tratado con un determinado medicamento durante su estancia hospitalaria, o del porcentaje de pacientes tratados con un fármaco determinado durante un cierto período de tiempo.

1.4 Modelos y métodos de exposición ambiental 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).

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, 2001).

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™* (*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 *PhATETM* (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.

1.4.1. 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. (Küster, 2010).

En la Figura 1 se presenta un esquema de las diferentes fases que comprenden la evaluación del riesgo medioambiental de un medicamento de acuerdo con el documento guía de la EMEA y el Reglamento 1272/2008.

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 noctanol/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 [$H=C(\text{gas})/C(\text{agua})$] 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).

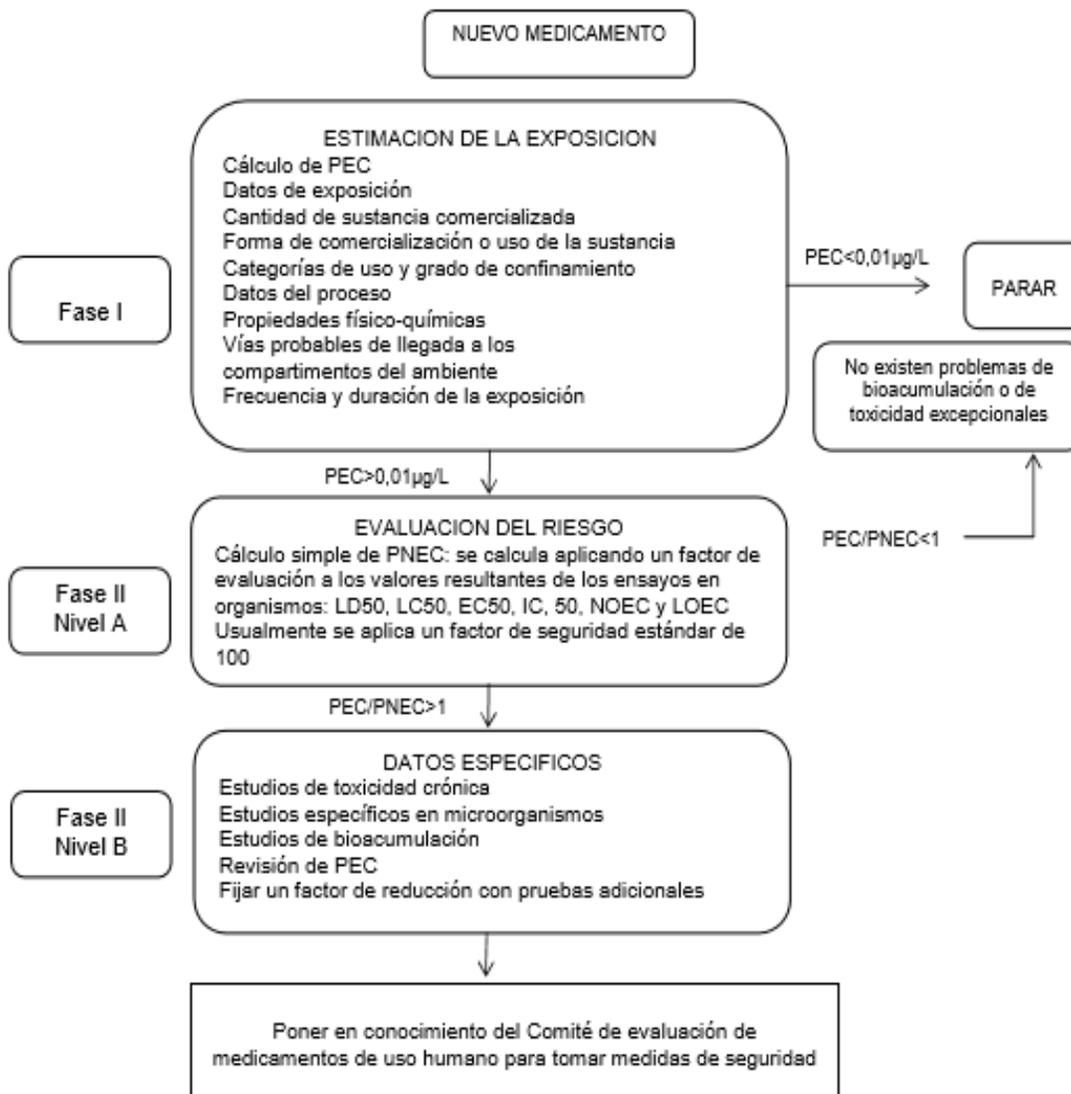


Figura 1. Esquema de las diferentes fases que se deben realizar para la evaluación del riesgo medioambiental de medicamentos de uso humano según EMEA. (PEC: Concentración ambiental en el agua en mg/L, PNEC: Concentración ambiental de toxicidad en agua en mg/L usando el peor escenario sin degradación, 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)

Fuente: Tomada de Lobo *et al.*, 2002.

El valor del coeficiente de partición octanol-aire (Koa) 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 1), 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).

Tabla 1. Afinidad de los medicamentos por los compartimentos medioambientales según sus propiedades físico-químicas.

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

Fuente: Tomada de Lobo *et al.*, 2002.

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, 2014). 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

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).

1.5 Ecotoxicología

1.5.1 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 cuantitativo) 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 período 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).

1.5.2 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).

1.5.3 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 propranolol, 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 estudiados 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 debajo 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 antibacterianos 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).

1.5.4 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).

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).

1.6 Modelos biológicos

1.6.1 *Lactuca sativa* L.

Lactuca sativa L. (lechuga) (Anexo 2) es una planta al parecer originaria de Asia Menor que procede de la especie silvestre *Lactuca scariola* L., que se encuentra muy difundida en la Europa Central y del Sur y en la mayor parte de las áreas templadas.

El bioensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa* L. es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en el que se pueden evaluar los efectos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas. Como puntos finales para la evaluación, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación en la raíz e 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 (Bagur *et al.* 2011).

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 los 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 (Sobrero & Ronco, 2008)

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).

En la incorporación de esta prueba en una batería de bioensayos es importante considerar el compromiso entre la sensibilidad de la especie *L. sativa*, el reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas, los bajos costos asociados y que no requiere equipamiento sofisticado, en particular en la aplicación a muestras ambientales .

1.6.2 *Artemia salina* L.

Artemia salina (Anexo 3) son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparente a la luz; pertenecen al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda (Pino & Jorge, 2010). Las hembras producen huevos que, en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm. Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más. Las artemias se convierten en adultos transcurridas 6 a 8 semanas, alcanzando un tamaño promedio de 7mm. (Pino & Jorge, 2010).

Esta especie de crustáceo branquiópodo está universalmente distribuida y, es hasta la fecha, el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente, como fuente de alimentos para peces y crustáceos en acuicultura. Esto ha constituido un elemento clave en su utilización en ensayos biológicos (Vanhaecke & Persoone, 1984). Por razones prácticas, las especies con un estado criptobiótico (pueden permanecer metabólicamente inactivos durante largos períodos en condiciones de total ausencia de agua y oxígeno), son más adecuadas para el desarrollo de un bioensayo estándar. La disponibilidad permanente de huevos (quistes) a partir de los cuales pueden ser obtenidas las larvas ofrece las siguientes ventajas: no hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente, las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario, se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica (Pino & Jorge, 2010).

Las larvas de *Artemia salina* se han utilizado por más de 40 años en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos (Torokne *et al.*, 2007; Pino & Jorge, 2010) y se ha estudiado su biología y usos potenciales en diversos campos como un método práctico y económico para la determinación de bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales (Lhullier *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007).

El ensayo de *Artemia salina* tiene las ventajas de ser más rápido (24 horas), barato y sencillo (no se requieren técnicas asépticas). Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, no necesita equipamiento especial y se emplean pequeñas cantidades de muestras (2-20mg o menos). Además, no se requiere suero animal que si es necesario para las citotoxicidades. Este sistema de bioensayo puede ser utilizado fácilmente por farmacólogos y químicos de productos naturales; cada técnico de laboratorio conduce sus propias pruebas biológicas, y obtiene de una manera rápida y reproducible los resultados estadísticos confiables del bioensayo. De esta manera, los compuestos bioactivos novedosos se pueden detectar y aislar rápidamente mediante un fraccionamiento biodirigido de los extractos de las plantas. Por último, los defensores de los derechos de los animales no han objetado el uso de estos invertebrados para el trabajo experimental (Pino & Jorge, 2010).

1.6.3 *Physa cubensis* P.

Physa cubensis P. pertenece a la clase Gastrópoda, de la familia *physidae* del género *Physa*. Esta especie de caracol se coloniza rápidamente en cursos de agua, lo que les permite distribuirse fácilmente y ser abundantes en diferentes regiones de América. Esta especie está representada en aguas lénticas dulceacuícolas, por lo que habitan en lugares susceptibles a contaminación. Además por su forma de vida y comportamiento interactúan directamente o indirectamente con ecosistemas terrestres y acuáticos contribuyendo a la importancia en la dinámica de los ecosistemas acuícolas y terrestres (Vera-Ardila, 2005) (Anexo 4).

El empleo del género *Physa* en ensayos ecotoxicológico para la evaluación de riesgos ambientales por sustancias químicas ofrece ventajas que otros organismos no presentan como organismo bioindicador, entre ellas tenemos amplia distribución, diversidad, alta sensibilidad, bajo costo, fácil crianza, fácil manipulación, movilidad limitada, y fáciles colección e identificación. La evaluación del riesgo juega un papel crucial en el planeamiento estratégico y ayuda a la sociedad en su determinación de las prioridades ambientales, a través de los ensayos ecotoxicológico se obtienen valores finales como la concentración letal media (CL₅₀), y a partir de estos valores se puede determinar el nivel de riesgo ó posibles efectos potenciales de los plaguicidas en organismos no destinatarios del ecosistema acuático

El ensayo ecotoxicológico con estos gasterópodos posibilita alta sensibilidad relativa y eficiencia en la detección del daño ecotoxicológico por lo que es altamente sensible y eficiente para detectar toxicidad. El ensayo con *Physa* puede ser considerado dentro de una batería multitrófica para evaluar el impacto ambiental de residuos tóxicos en los ecosistemas dulceacuícolas de una manera global y más acertada por las ventajas que se mencionan para ensayos con moluscos, principalmente sensibilidad y repetibilidad para moluscos gasterópodos como organismos bioindicadores de perturbación medio ambiental. (Iannacone & Alvarino, 2002).

Materiales y Métodos

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Determinación del consumo de antibacterianos.

El estudio de consumo se llevó a cabo en el período comprendido entre el año 2011 y el año 2013. Para la obtención del consumo de los antibacterianos se revisaron los expedientes de antibacterianos ubicados en la farmacia del Hospital Universitario Clínico Quirúrgico “Celestino Hernández Robau”.

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

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

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

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. Los valores de DDD se encuentran disponibles en el Centro de Colaboración de la OMS (WHOCC, 2015). (Anexo 5)

Porcentaje de ocupación: es el número promedio de camas que estuvieron ocupadas diariamente durante un período, expresado en porcentaje. El índice ocupacional proporcionado por el Departamento de Estadística del Hospital fue de 83, 8 para el 2011; 85,4 para el año 2012 y de 85,8 para el 2013.

Las camas-día disponibles, período de 24 horas durante el cual una cama de hospital se mantiene a disposición para el uso de pacientes internados, en la fecha son 214 para los años 2011 y 2012, y 213 para el año 2013.

2.2 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 antibacterianos.

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

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

Dónde:

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

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

Se predijo un valor de concentración de fármacos en aguas superficiales (PEC_w) considerando el factor de dilución en los cuerpos receptores de 10 según se indica en European Commission, 2003.

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 (Máquinas diseñadas para generar vapor saturado).

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

2.3 Evaluación ecotoxicológica del riesgo ambiental.

Los bioensayos toxicológicos agudos de exposición de los antibacterianos se realizaron en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), ubicado en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas y 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 Cooperation and Development).

Se realizaron los siguientes ensayos: toxicidad aguda en semilla de *Lactuca sativa* Linnaeus, 1758 (EPA, 1996), toxicidad aguda en *Artemia salina* Linnaeus, 1758 (Laboratory of Ecotoxicology, ICT. Prague), y toxicidad aguda en *Physa cubensis* Pfeiffer, 1839 (Iannacone & Alvaríño, 2002).

Según la predicción y teniendo en cuenta el elevado número de antibacterianos 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.

2.3.1 *Lactuca sativa* L.

2.3.1.1 Ensayo de toxicidad aguda en semillas de *Lactuca sativa* L.

Diseño del ensayo:

Se conformaron 16 grupos experimentales para cada antibacteriano estudiado, 15 se correspondieron con tratamientos de la sustancia de ensayo a concentraciones decrecientes, y el correspondiente grupo control no tratado con tres réplicas cada uno. La finalidad del ensayo es lograr calcular la CI_{50} de todos los antibacterianos para poder evaluar la mezcla de estos.

Reactivos y materiales:

- Material biológico: semillas de *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.
- 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

Sustancias de ensayo:

Cefazolina, Ceftriaxona, Cefuroxima, Ceftazidima, Cefepima, Cefotaxima, Amoxicilina más Sulbactam bulbo, Cotrimoxazol y Vancomicina.

Preparación de las diluciones:

Se prepararon diluciones (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 (incluyendo las PECs estimadas y mayores) 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 fue:

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

- Se taparon las placas y se colocaron en bolsas plásticas (negras) para evitar la pérdida de humedad y proporcionar oscuridad. Se incubó durante 120 horas a una temperatura de 22 ± 2 °C.

En la Tabla 2 se resumen las condiciones recomendadas.

Tabla 2. 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 evaluado	Efecto en la elongación. Se utiliza una regla para medir cuidadosamente la longitud de la radícula e hipocotilo de cada una de las plántulas correspondientes a cada concentración y a los controles. Efecto en la germinación: Se registra el número de semillas que germinan normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.
Resultado final	CE ₅₀ o CI ₅₀
Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90% para el control negativo
Control	Agua destilada

Fuente: Sobrero & Ronco, 2008.

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 y porcentaje de inhibición en la germinación corregido respecto al control negativo.

Se elaboró una hoja de cálculo en Microsoft Excel (2007) y se utilizó el programa StatSoft, Inc. (2007) versión 8.0 realizando ajustes de modelos de curvas sigmoides para estimar la CE₅₀ 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 radícula y el hipocotilo (mm) y en la abscisa, la concentración del producto.

Interpretación de los resultados:

Los efectos cuantificados sobre la elongación de la radícula e hipocotilo se consideraron como subletales y la inhibición en la germinación como letal.

2.3.1.2 Ensayo de toxicidad aguda en semillas de *Lactuca sativa* L. con la mezcla de antibacterianos.

Se realizó según se describe en acápite 2.3.1.1 utilizando diluciones seriadas en escala logarítmicas 100; 10; 1; 0,01; 0,0001%, partiendo de una solución de la mezcla de antibacterianos (concentraciones que no alcanzaran la CL_{50} previamente calculada para cada antibacteriano).

2.3.1.3 Aplicación del modelo Concentración-Adición (CA).

Normalmente los compuestos químicos se encuentran mezclados en el ambiente por lo que la evaluación por bioensayos de los efectos de estas sustancias químicas combinadas o en mezcla resultan extremadamente importantes. La toxicidad de una mezcla depende de la toxicidad de cada componente y como estos componentes interaccionan entre sí. 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 CL_{50} estimada se obtiene sumando los valores de CL_{50} de los antibacterianos obtenidos experimentalmente de forma individual según su contribución en la mezcla. Luego estos valores de CL_{50} 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 $CA < 1$ que hay antagonismo.

2.3.2 Ensayo de toxicidad aguda en larvas de *Artemia salina* L.

La prueba se basa en la determinación de los efectos tóxicos producidos en larvas del crustáceo *Artemia salina* tras una exposición de 24-48 horas al compuesto de prueba. Los datos de mortalidad permitieron construir la gráfica concentración-efecto, para la determinación de la Concentración Letal Media (CL_{50}).

Diseño del ensayo:

Se conformaron 6 grupos experimentales para cada antibacteriano, 5 se correspondieron con tratamientos de la sustancia de ensayo a concentraciones decrecientes, y el correspondiente grupo control no tratado. A cada grupo se le asignó al azar 30 larvas, distribuidas en 3 réplicas de 10 individuos cada uno.

Reactivos y materiales:

- Material biológico: Huevos de *Artemia salina* L. provenientes de la Empresa para el Cultivo del Camarón UEB Yaguacán.
- Agua de mar artificial (AMA) pH =9. (Cloruro de sodio 23g, Cloruro de magnesio hexahidratado 11g, Sulfato de sodio 4g, Cloruro de calcio dihidratado 1.3g, Cloruro de potasio 0.7 g en 1L agua destilada)
- Placas de Petri de vidrio.
- Pipeta de 1000,100 y 10 μ l.
- Matraces aforados de 100 mL.
- Probetas de cristal de 50 mL.

Sustancias de ensayo:

Cefazolina, Ceftriaxona, Cefuroxima, Ceftazidima, Cefepima, Cefotaxima, Amoxicilina más Sulbactam bulbo, Meropenem y Vancomicina.

Preparación de las diluciones:

Se prepararon diluciones logarítmicas (10; 1; 0.1; 0.01, 0.001 g/L) que permitieron establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0% necesarios para calcular la CL₅₀.

Protocolo de ensayo:

El procedimiento a seguir fue:

- Se preparó el AMA.
- Se desenquistó adicionando 45 mg de quistes en 450 mL de AMA.
- Se preparó la muestra en ensayo para su utilización.
- Se añadió alícuota de 100µL conteniendo al menos 10 larvas en las placas del ensayo que contenían 4,95 mL de AMA.
- Se añadió el volumen necesario de cada dilución (4,95 mL).
- Se incubó 48 horas en oscuridad.
- Se evaluó a las 24h y a las 48h determinando mortalidad.

En la Tabla 3 se resumen las condiciones recomendadas.

Tabla 3. Condiciones para las pruebas de toxicidad con *Artemia salina* L.

Tipo de ensayo	Estático.
Temperatura	25 ± 2 °C
Iluminación	Artificial durante la eclosión, y oscuridad durante el ensayo
Volumen de solución de prueba	10 mL
Agua de dilución	Agua de mar artificial
Número de organismos por réplicas	10 o más
Número de réplicas	3
Duración de la prueba	48 horas
Efecto medido	Mortalidad
Resultado final	CL ₅₀
Aceptabilidad de los resultados	Mortalidad < 90% para el control
Control	Agua destilada

Fuente: Vanhaecke & Persoone, 1984

Observaciones clínicas

Las larvas se observaron mediante lupa a las 24 y 48 horas, registrándose las muertes. Se consideró muerto el individuo incapaz de moverse por 10 segundos. Se realizó el cálculo del porcentaje de mortalidad a partir del total de individuos expuestos.

La variable de respuesta que se midió fue mortalidad.

Análisis estadístico y expresión de los resultados

Se elaboró una hoja de cálculo en Microsoft Excel (2007) y se determinó el porcentaje de mortalidad para cada producto. Se calculó el porcentaje de letalidad para cada grupo mediante la ecuación: %Letalidad = Total Muertos/ Total x 100.

Al disponer de datos a diferentes concentraciones se confeccionó la curva dosis-respuesta. La CL₅₀ se determinó por ajuste no lineal a una curva sigmoide utilizando el paquete estadístico StatSoft, Inc. (2007) versión 8.0.

La toxicidad se interpretó en función del porcentaje de letalidad: 0-10 % no tóxico, 11-50 % moderadamente tóxico, 51-90 % altamente tóxico y 100 % extremadamente tóxico. El grado de toxicidad se definió en función del rango en que se encontraron los valores de CL₅₀ de acuerdo con las categorías siguientes: extremadamente tóxico (CL₅₀< 10 µg/mL), muy tóxico (10< CL₅₀<100), moderadamente tóxico (100< CL₅₀<1 000) y no tóxico (CL₅₀> 1 000 µg/mL) (Valdés *et al.*, 2003).

2.3.3 Ensayo de toxicidad aguda en *Physa cubensis* P.

Se realizó ensayo de toxicidad aguda de antibacterianos en *Physa cubensis*, en régimen estático, durante 96 horas, tomando como puntos finales del ensayo inmovilización o mortalidad. Los datos de mortalidad permitieron construir la gráfica concentración-efecto, que es la base para la determinación de la CL₅₀.

Diseño del ensayo

Se conformaron 6 grupos experimentales para cada antibacteriano, 5 se correspondieron con tratamientos de la sustancia de ensayo a concentraciones decrecientes, y el correspondiente grupo control no tratado. Se identificaron con un

código que permitió realizar las observaciones a ciegas. A cada grupo se le asignó aleatoriamente 10 moluscos, distribuidos en 3 réplicas de 10 individuos cada uno.

Reactivos y materiales:

- Material biológico: *Physa cubensis* P. (Moluscos) obtenidos de la cría artificial bajo estándares de calidad procedentes del CBQ.
- Matraces aforados de 50 mL y de 100 mL.
- Estereoscopio.
- Pipetas volumétricas de 5 y 10 mL.
- Pinzas.
- Vaso de precipitado de 100 mL.
- Magentas de 15 mL.

Sustancias de ensayo:

Cefazolina, Ceftriaxona, Cefuroxima, Ceftazidima, Cefepima, Amoxicilina más Sulbactam bulbo, Meropenem y Vancomicina.

Preparación de las diluciones:

Se prepararon diluciones logarítmicas (10; 1; 0.1; 0.01, 0.001 g/L) que permitan establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0% necesarios para calcular la CL₅₀.

Protocolo de ensayo:

El procedimiento seguido fue:

- Se seleccionaron y aleatorizaron los moluscos.
- Se colocaron 10 moluscos en cada frasco (magenta).
- Se verificó que los moluscos colocados estaban en movimiento continuo.
- Se agregó 15 mL del producto a evaluar en el frasco de ensayo.

- Se observó a las 24, 48 y 96 horas, determinando la mortalidad en cada concentración del producto evaluado.
- Se alimentaron diariamente los moluscos hasta terminar el ensayo.
- Se desinfectaron y esterilizaron los materiales utilizados

En la Tabla 4 se resumen las condiciones recomendadas para este tipo de ensayo.

Tabla 4. Condiciones para los ensayos de toxicidad aguda en *Physa cubensis*.

Tipo de bioensayo	Estático
Tiempo de exposición	24, 48 y 96 horas
Temperatura	22± 2 °C
Intensidad luminosa	ambiental de laboratorio
Fotoperíodo	12 horas luz, 12 horas oscuridad
Tamaño envase	90 mL
Volumen de solución de prueba	15 mL
Edad de organismos	Juveniles < 72 h
Número de moluscos por réplicas	10
Número de réplicas	3
Número de concentraciones más control	6
Régimen de alimentación	diaria
Agua de control y dilución	Agua destilada
Efecto medido	Mortalidad (ausencia del movimiento)
Respuesta subletal	Desadherencia (suspendido en el medio, no se desliza sobre las paredes del frasco); desprendimiento cefálico (porción cefálica desprendida).
Tiempo de observación en la placa de recuento	15 segundos de observación bajo el microscopio estereoscopio
Aceptabilidad de los resultados	Supervivencia > 90% para el control.
Control negativo	Agua destilada
Resultado final	CL ₅₀

Fuente: Iannacone & Alvaríño, 2002

Expresión de los resultados

Los resultados se obtuvieron de manera independiente para cada producto a evaluar, elaborándose una hoja de cálculo individual en Microsoft Excel (2007), determinándose el porcentaje de mortalidad para cada concentración mediante la ecuación:
%Mortalidad = Total Muertos/ Total x 100.

En el caso de disponer de datos a diferentes concentraciones se confeccionó la curva dosis-respuesta. La CL_{50} se determinó por ajuste no lineal a una curva sigmoide utilizando el paquete estadístico StatSoft, Inc. (2007) versión 8.0.

La toxicidad se interpretó en función del porcentaje de letalidad: 0-10 % no tóxico, 11-50 % moderadamente tóxico, 51-90 % altamente tóxico y 100 % extremadamente tóxico. El grado de toxicidad se definió en función del rango en que se encontraron los valores de CL_{50} de acuerdo con las categorías siguientes: extremadamente tóxico ($CL_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), muy tóxico ($10 < CL_{50} < 100$), moderadamente tóxico ($100 < CL_{50} < 1000$) y no tóxico ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) (Valdés *et al.*, 2003).

Resultados y Discusión

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación del consumo de antibacterianos.

En el período de estudio se emplearon 17 antibacterianos. De estos, 15 son inyectables y 2 de administración oral. Los antibacterianos consumidos en el período de estudio y los valores del No. de DDD y DDD/100 camas-días se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Consumo de antibacterianos en pacientes hospitalizados.

Hospital Universitario Clínico Quirúrgico Celestino Hernández Robau. Santa Clara. 2011-2013

Antibacterianos	2011		2012		2013	
	No de DDD	DDD/ 100 camas - días	No de DDD	DDD/ 100 camas - días	No de DDD	DDD/ 100 camas - días
Amikacina 500 mg bbo	887,50	0,013558689	1185,00	0,017764535	1284,00	0,019248871
Gentamicina 80 mg amp	510,00	0,007791472	732,00	0,010973535	793,67	0,011898121
Cefazolina 1000 mg bbo	2058,67	0,031451066	2922,67	0,043814189	2423,00	0,036323999
Cefuroxima 750 mg bbo	136,75	0,002089184	279,75	0,004193779	1010,50	0,015148742
Ceftazidima 1000 mg bbo	1079,00	0,016484311	1230,25	0,018442885	871,00	0,013057451
Cefepima 1000 mg bbo	96,50	0,001474269	104,00	0,001559082	285,50	0,004280026
Cefotaxima 1000 mg bbo	993,00	0,015170454	1389,75	0,020833977	1395,75	0,020924153
Ceftriaxona 1000 mg bbo	6041,50	0,092298390	6313,50	0,094646744	5728,50	0,085877850
Ciprofloxacina 200 mg fco	650,40	0,009936419	1023,20	0,015338964	1153,60	0,017294001
Metronidazol 500 mg fco	2184,67	0,033376018	3066,67	0,045972917	3474,00	0,052079890
Meropenem 1000 mg bbo	505,00	0,007715085	500,00	0,007495584	360,00	0,005396880
Vancomicina 500 mg bbo	149,00	0,002276332	258,50	0,003875217	292,50	0,004384965
Cotrimoxazol 480 mg amp	169,38	0,002587609	96,25	0,001442900	606,25	0,009088495
Azitromicina 500mg tab	1602,00	0,024474389	1935,00	0,029007911	1269,00	0,019024001
Amoxicilina/Sulbactam 500mg tab	305,00	0,004659606	55,00	0,000824514	435,00	0,006521230
Amoxicilina/Sulbactam 750 mg bbo	116,00	0,001772178	190,25	0,002852070	311,25	0,004666052
Clindamicina 600mg amp	0	0	19,33	0,000289829	14,00	0,000209879

Fuente: Datos adquiridos de los expedientes de antibacterianos de la Farmacia.

Para conocer el uso de cualquier medicamento deben realizarse los llamados estudios de utilización de medicamentos dentro de los que se encuentran los estudios de consumo (aquellos que describen qué medicamentos se consumen y en qué cantidades (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 antibacterianos, y este grupo representa una cuarta parte del gasto global de medicamentos de un hospital (López *et al.*, 2002).

En un estudio de prevalencia nacional de infección nosocomial realizado en el año 2004 en Cuba se evidenció el uso irracional de los agentes antimicrobianos en los hospitales cubanos (Guanche *et al.*, 2009; Acosta *et al.*, 2015). En los servicios clínicos, los agentes antimicrobianos son ampliamente utilizados, y, según reportes, entre 20 y 50 % de los casos la indicación es cuestionable o inapropiada, por lo que la prescripción indiscriminada hace inefectivo, y de un costo muy elevado, el tratamiento de estos pacientes (Paudel *et al.*, 2008; Fiterre *et al.*, 2011).

En el estudio realizado el antibacteriano de mayor consumo fue la Ceftriaxona según su valor en DDD/100 camas-días, como se observa en la tabla 5, coincidiendo con lo reportado en varios hospitales del país (Mengana *et al.*, 2012, Pérez *et al.*, 2014). 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).

La Cefotaxima, Ceftazidima y Cefazolina, cefalosporinas de tercera y primera generación respectivamente, presentan un alto consumo pero en menor proporción que la Ceftriaxona. Sin embargo la Cefuroxima cefalosporina de segunda generación, con amplio espectro antibacteriano, fue menos consumida en el período en estudio.

Según López y colaboradores (2002) en un hospital de 225 camas se observó un aumento progresivo y no justificado en la prescripción de Ceftriaxona. Proponiendo una potenciación de la terapia secuencial, que se refleja en la disminución de la prescripción de Ceftriaxona, acompañada de un aumento en la prescripción de Cefuroxima.

En el caso de la Cefepima, de cuarta generación, se evidencia un consumo acorde a su amplio espectro antimicrobiano ya que su utilización se reserva para casos graves.

De cualquier modo el consumo de este grupo de antibacterianos es muy elevado, pero en una investigación realizada durante los meses de enero a abril del 2014, en los servicios de Oncología y Medicina Interna en el mismo hospital objeto de estudio, con 168 pacientes; arrojó que casi la totalidad de los pacientes recibieron pautas terapéuticas adecuadas en cuanto a dosis, intervalo y tiempo de tratamiento. Los antibacterianos más utilizados fueron Ceftriaxona, Metronidazol y Cefotaxima con 46,43; 15,48 y 13,1 % respectivamente, coincidiendo con la tendencia general del consumo hospitalario.

De un año a otro se evidenció un aumento en el consumo de la Cefuroxima en mayor grado y de la Gentamicina en menor grado, en sustitución de otros antibacterianos cuyo consumo disminuyó. La Ciprofloxacina mantuvo un consumo estable. El antibacteriano menos consumido en los años en estudio fue la Clindamicina por ser específico en el tratamiento de las infecciones por anaerobios, provocar colitis pseudomembranosa, no contar de forma permanente con el mismo, entre otros elementos a tener en consideración, desde el punto de vista terapéutico y económico.

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).

3.2 Predicción de la concentración ambiental (PEC).

En el Hospital Universitario Clínico Quirúrgico “Celestino Hernández Robau” el volumen de agua por día, necesario para el funcionamiento del hospital, 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.

Los resultados obtenidos de la predicción de la concentración ambiental (PEC) se muestran en la Tabla 6. De los 17 antibacterianos analizados, todos constituyen un riesgo para el ambiente.

Tabla 6. Predicción de la Concentración Ambiental de los antibacterianos

Antibacterianos	2011 PEC _w (µg/L)	2012 PEC _w (µg/L)	2013 PEC _w (µg/L)
Amikacina 500 mg bbo	0,827043146	1,10427733	1,196533408
Gentamicina 80 mg amp	0,114062063	0,16371261	0,177504426
Cefazolina 1000 mg bbo	5,755288420	8,17072034	6,773832820
Cefuroxima 750 mg bbo	0,382303606	0,78207996	2,824993011
Ceftazidima 1000 mg bbo	4,021992360	4,58577952	3,246668530
Cefepima 1000 mg bbo	0,179852763	0,19383096	0,532103252
Cefotaxima 1000 mg bbo	3,701425776	5,18031870	5,202683813
Ceftriaxona 1000 mg bbo	11,25990120	11,7668437	10,67654460
Ciprofloxacina 200 mg fco	0,303047250	0,47674960	0,537508150
Metronidazol 500 mg fco	3,053769450	4,28664617	4,856024600
Meropenem 1000 mg bbo	0,941198400	0,93187960	0,670953310
Vancomicina 500 mg bbo	0,277700120	0,48178175	0,545149570
Cotrimoxazol 480 mg amp	0,303047250	0,17221135	1,084707860
Azitromicina 500mg tab	0,746435560	0,90159351	0,591277610
Amoxicilina/Sulbactam 500mg tab	0,284223280	0,05125338	0,405367630
Amoxicilina/Sulbactam 750 mg bbo	0,324294100	0,53187028	0,870142580
Clindamicina 600mg amp	0	0,03242941	0,023483370

Los antibacterianos con valores de $PEC \geq 0,01 \mu\text{g/L}$ se consideraron riesgosos para el ambiente (Kümmerer 2008).

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 auto depurarse. 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 5 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 hospital objeto de estudio (Tabla 6). El escenario de exposición incluida en todos los cálculos PEC es la liberación de productos farmacéuticos en las aguas receptoras como consecuencia de los vertidos de aguas residuales en las aguas superficiales, en este caso, del Río Bélico próximo a la institución hospitalaria. Este cálculo supone que la totalidad de la dosis diaria de los fármacos en estudio se excretan sin cambios en la orina y las heces ya que se debe considerar siempre el “peor caso posible” para cada estimación.

Es importante destacar que todos los antibacterianos consumidos presentaron valores por encima de 0,01 $\mu\text{g/L}$, 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 mayor período 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).

3.3 Evaluación ecotoxicológica del riesgo ambiental.

Los resultados de los antibacterianos que mostraron un efecto tóxico frente a los bioensayos se muestran en la Tabla 7, en los subacápites se desglosan estos resultados.

Tabla 7. Antibacterianos con mayor efecto tóxico sobre las especies estudiadas.

Antibacterianos	Especies
Cefazolina	<i>Physa cubensis</i> y <i>Lactuca sativa</i>
Ceftazidima	<i>Physa cubensis</i> y <i>Artemia salina</i>
Cefepima	<i>Physa cubensis</i> , <i>Artemia salina</i> y <i>Lactuca sativa</i>

Según lo que se muestra en la Tabla 7 el antibacteriano que provocó más efecto tóxico fue la Cefepima pues sus efectos se observaron en todos los bioensayos.

Es importante tener en cuenta que las investigaciones del efecto tóxico de los fármacos (en particular antibacterianos) 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 antibacterianos, pueda presentar efectos tóxicos y/o genotóxicos sobre el ambiente, aunque dichos compuestos se encuentren en pequeñas cantidades (Magdaleno *et al.*, 2012).

3.3.1 *Lactuca sativa* L.

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

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.

El bioensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa* L. 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 (Sobrero & Ronco, 2008). 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; US EPA, 1989).

En las Figuras 2, 3, 4 y 5 se muestra la elongación de la radícula y el hipocotilo para los antibacterianos evaluados.

De los seis antibacterianos pertenecientes al grupo de las cefalosporinas (Fig. 2), Cefazolina y Cefepima mostraron inhibición en el crecimiento de la radícula a todas las concentraciones en estudio con diferencias significativas con respecto al control y en el caso del hipocotilo para todas las concentraciones mayores que 1 g/L, se observó inhibición del crecimiento estadísticamente significativo con respecto al control. La Cefuroxima solo mostró diferencias significativas con respecto al control en la concentración de 10 g/L y en las mayores de 20 g/L evidenciando una inhibición en el crecimiento del hipocotilo, en el crecimiento de la radícula mostró diferencias significativas con respecto al control en casi todas las concentraciones con excepción de 0,0001, 0,001, 1 y 10 g/L. Ceftazidima mostró inhibición en el crecimiento del hipocotilo a todas las concentraciones en estudio con diferencias significativas con respecto al control y para la radícula para casi todas las concentraciones mayores que 0.01 g/L se observó inhibición del crecimiento estadísticamente significativo con respecto al control. Sin embargo, la Cefotaxima estimuló el crecimiento de la radícula en todas las concentraciones por debajo de 0,1 g/L e inhibió el crecimiento de la misma para las mayores de 10 g/L; inhibiendo el crecimiento del hipocotilo para la mayoría de las concentraciones. La Ceftriaxona mostró inhibición en el crecimiento de la radícula a la mayoría de las concentraciones en estudio con diferencias significativas con respecto al control y

Resultados y Discusión

para el hipocotilo no se evidenciaron diferencias respecto al control para la mayoría de las concentraciones evaluadas con excepción de las comprendidas entre 0.001 y 0.000001 g/L que se evidenció inhibición del crecimiento.

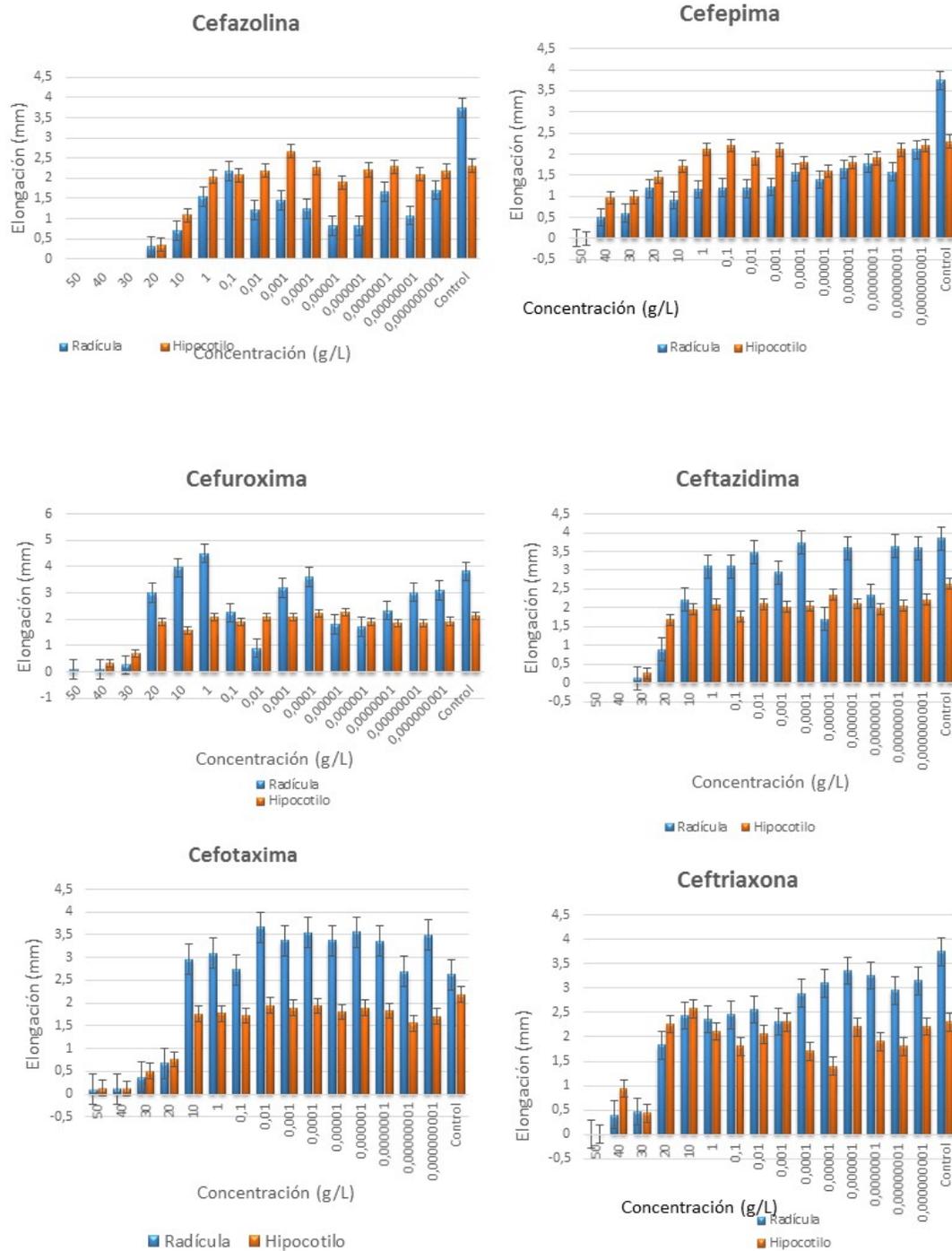


Figura 2. Evaluación de seis antibacterianos pertenecientes al grupo de las cefalosporinas en la elongación del crecimiento sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

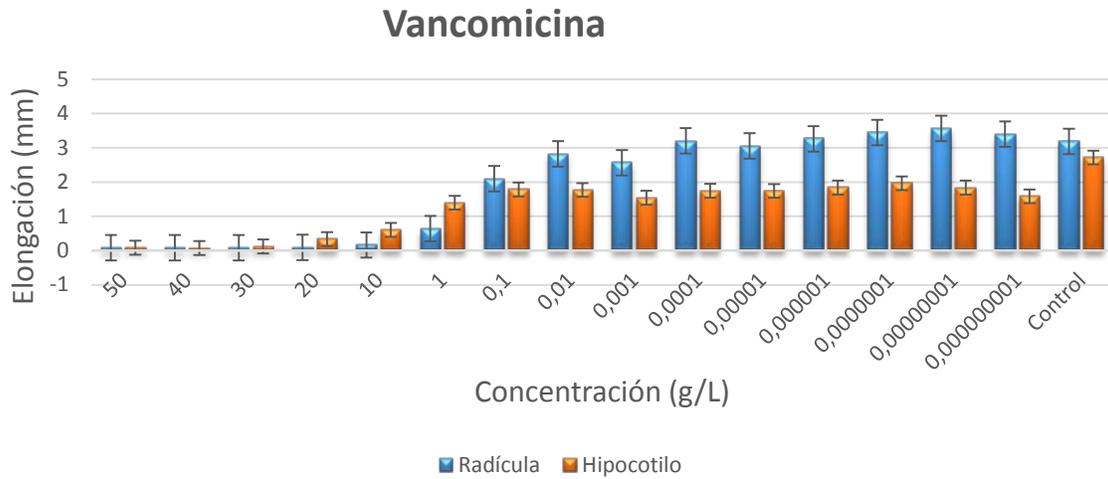


Figura 3. Evaluación de la Vancomicina en la elongación del crecimiento sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

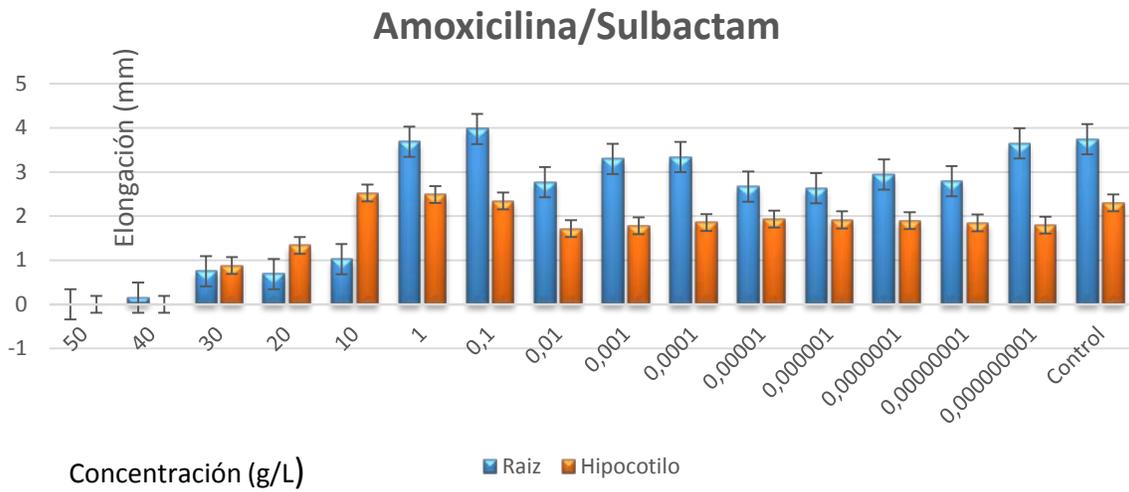


Figura 4. Evaluación de Amoxicilina más Sulbactam en la elongación del crecimiento sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

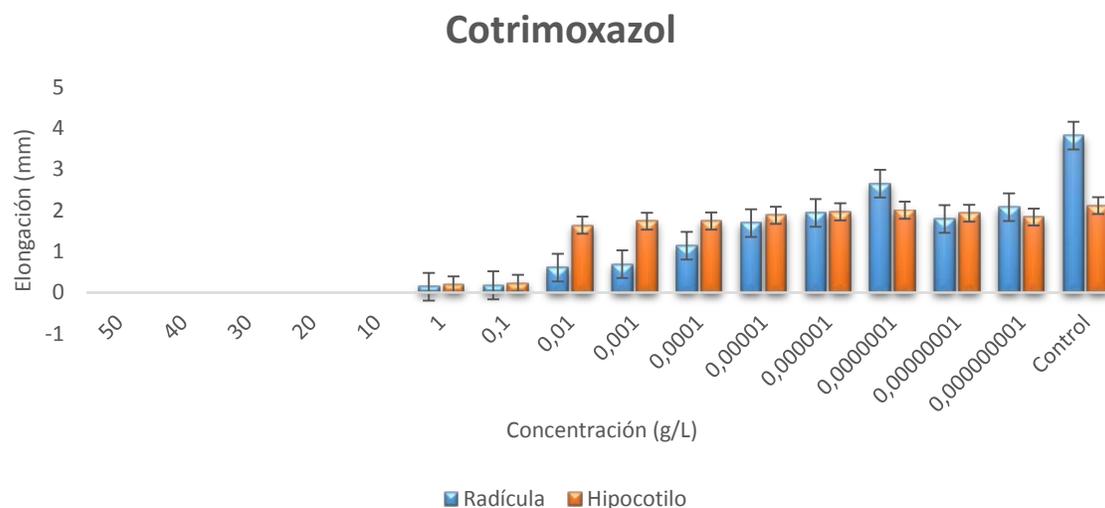


Figura 5. Evaluación de Cotrimoxazol en la elongación del crecimiento sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

La Vancomicina (glucopéptido) mostró inhibición en el crecimiento del hipocotilo a todas las concentraciones en estudio con diferencias significativas con respecto al control e inhibición del crecimiento de la radícula a las concentraciones mayores que 0,1 g/L, las restantes no mostraron diferencias con respecto al control (Fig. 3).

La Amoxicilina más Sulbactam 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 radícula y el hipocotilo a la mayoría de las concentraciones probadas (Fig. 4).

En el Cotrimoxazol perteneciente al grupo de las sulfonamidas, se observó una inhibición del crecimiento de la radícula a todas las concentraciones ensayadas y en el hipocotilo solo mostraron diferencias con respecto al control las concentraciones entre 0.001 y 1 g/L (Fig.5).

En el ambiente es improbable que nos encontremos con concentraciones superiores a 1g/L pero es objetivo de nuestro trabajo poder calcular la CI_{50} que nos permitirá realizar el ensayo a la mezcla de antibacterianos.

Tabla 8. Inhibición en la germinación de semillas de *Lactuca sativa* L. (lechuga).

Antibacteriano	% Ig	% Ig corr
Cefazolina	38	34,74
Cefuroxima	21,89	21,89
Ceftazidima	30,44	28,04
Cefepima	35,5	33,28
Cefotaxima	18,78	14,51
Ceftriaxona	52	49,47
Amoxicilina/Sulbactam	22,11	22,11
Vancomicina	8,56	8,56
Cotrimoxazol	38,67	38,67

En todos los antibacterianos evaluados se observó inhibición en la germinación de las semillas, en la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos.

El efecto de los antibacterianos estudiados sobre la germinación y la elongación de la radícula y el hipocotilo se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9 Efecto sobre la germinación y la elongación de radícula e hipocotilo.

Antibacteriano	CE ₅₀ Radícula (g/L)	CE ₅₀ Hipocotilo (g/L)	CI ₅₀ (g/L)
Cefazolina	0,28	7,42	1,64
Cefuroxima	22,91	27,27	20,20
Ceftazidima	11,38	22,16	10,70
Cefepima	0,37	27,97	5,53
Cefotaxima	17,83	16,64	25,14
Ceftriaxona	15,37	26,99	1,33
Vancomicina	0,20	0,63	44,14
Amoxicilina/Sulbactam	6,09	24,41	8,57
Cotrimoxazol	0,000024	0,02	0,52

La totalidad de los antibacterianos evaluados mostraron inhibición de la germinación sobre raíz e hipocotilo, siendo Cotrimoxazol, Ceftriaxona y Cefazolina los que causaron mayor inhibición de la germinación de raíz e hipocotilo con respecto al control, coincidiendo con los menores valores de CI₅₀ sobre la germinación (entre 0 y 2 g/L). Vancomicina al contrario presentó una menor inhibición de la germinación y su CI₅₀ fue entre 25 y 45 mg/L.

La cuantificación del riesgo medioambiental expresada por el cociente PEC/PNEC dio valores inferiores a 0,1 (insignificante) para todos los antibacterianos, indicando que no presentan riesgo de bioacumulación o toxicidad. Esto no coincide con lo reportado en la literatura científica ya que Ceftriaxona, Cefotaxima, Cefuroxima y Vancomicina no se logran clasificar por datos insuficientes, mientras que la Amoxicilina un componente de Amoxicilina más Sulbactam se clasifica como de acción moderada para los ecosistemas, la Cefatzidima y el Cotrimoxazol se clasifican de bajo riesgo y el resto de los antibacterianos investigados con riesgo insignificante (Stockholm County Council, 2014)

3.3.1.2 Ensayo de toxicidad aguda en semilla de *Lactuca sativa* L. con la mezcla de antibacterianos.

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.

En la mezcla de antibacterianos se observó inhibición de la germinación de las semillas de un 36,67 %. La CI_{50} sobre la germinación fue de un 6.89; la CI_{50} sobre la elongación de la radícula y el hipocotilo no se pudo calcular al ser los porcentajes de inhibición del crecimiento menores que 50.

En la Figura 6 se muestra la inhibición del crecimiento de la radícula y el hipocotilo para la mezcla de antibacterianos.

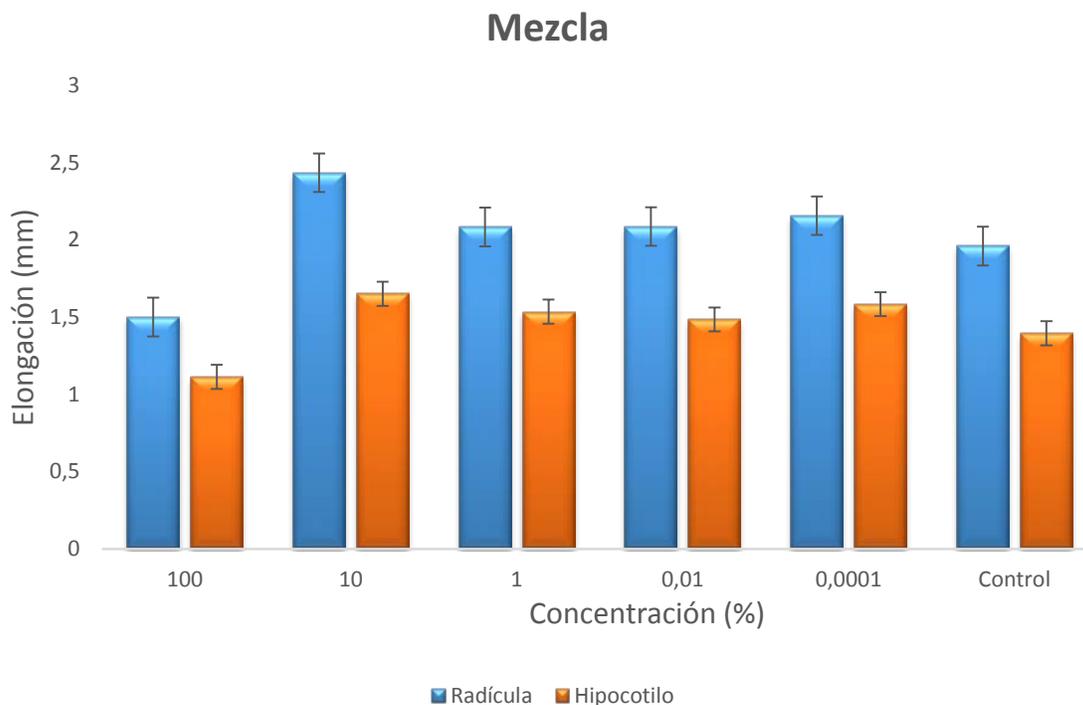


Figura 6 Evaluación de la mezcla en la inhibición del crecimiento sobre semillas de *Lactuca sativa* L.

La mezcla de antibacterianos mostró estimulación del crecimiento de la radícula y el hipocotilo a la concentración de 10% e inhibición del crecimiento a la concentración de 100%, para el resto de las concentraciones no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Fig. 6). La inhibición de la germinación con valor de 34,29 % con respecto al control muestra que a las concentraciones ensayadas la mezcla de antibacteriano no tuvo un comportamiento muy tóxico lo que puede deberse a que estas concentraciones estaban por debajo de la CI_{50} estimada para cada antibacteriano. Sería recomendable en estudios posteriores la evaluación de la mezcla con concentraciones mayores de antibacterianos.

3.3.1.3 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.

Los efectos de la mezcla son de especial preocupación ya que la ecotoxicidad de una mezcla es casi siempre superior a los efectos de sus componentes individuales y puede tener una ecotoxicidad considerable, incluso si todos los componentes están presentes sólo en bajas concentraciones que no provocan efectos tóxicos significativos en caso de actuar por separado en los organismos expuestos.

En la Figura 7 se muestra la toxicidad individual de cada antibacteriano, la toxicidad de la mezcla y el cociente concentración – adición (CA).

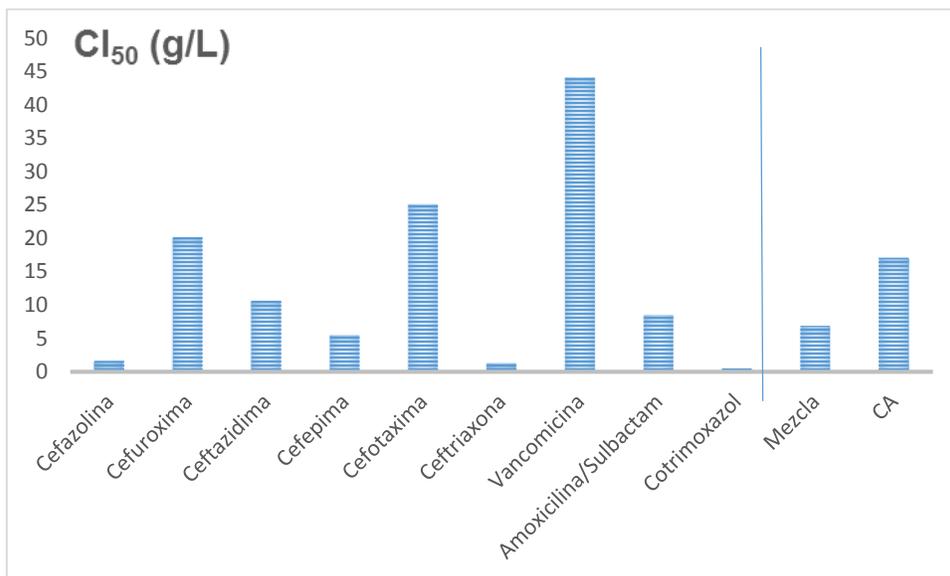


Figura 7 Toxicidad de los antibacterianos y la mezcla.

En relación al tipo de interacción de la mezcla, según el modelo de proporción-sinergia, para la inhibición de la germinación el cociente fue superior a

uno, clasificándose la interacción como sinérgica, el efecto de la combinación es mayor que el esperado de la suma de sus efectos individuales.

3.3.2 Ensayo de toxicidad aguda en larvas de *Artemia salina* L.

Artemia salina es un invertebrado que forma parte de la fauna de los ecosistemas de aguas salobres. Este organismo posee una importante función dentro de la cadena alimenticia pues son fuente de alimentación para otras especies (Singh, 2007).

Actualmente, *Artemia salina* se utiliza como especie de bioensayo para: investigación de la fuente de toxicidad en mezclas de sustancias químicas y muestras ambientales, tamizaje de toxicidad aguda de sustancias químicas, detección de toxinas naturales en comestibles y farmacéuticos, estudios de modelos de acción tóxica de sustancias, y estudios de la transferencia trófica de contaminantes. Este ha probado ser un organismo versátil y valioso en pruebas de toxicidad, particularmente si es estudiado con otras especies endémicas (Pino & Jorge, 2010).

Los resultados del ensayo se muestran en las Figuras 8, 9, 10 y 11.

De los seis antibacterianos pertenecientes al grupo de las cefalosporinas (Fig. 8), Ceftriaxona y Cefazolina presentaron la menor toxicidad con valores por debajo del 50%, Ceftazidima y Cefuroxima mostraron 100% de mortalidad a las 48h a la mayor concentración evaluada, manteniéndose Ceftazidima como altamente tóxico a la concentración de 1g/L obteniendo la menor CL_{50} de todas las sustancias ensayadas y siendo así el más tóxico de los nueve antibacterianos evaluados (Tabla 8), Cefepima y Cefotaxima tuvieron alta toxicidad a la concentración más alta y de moderada a no tóxica en las demás.

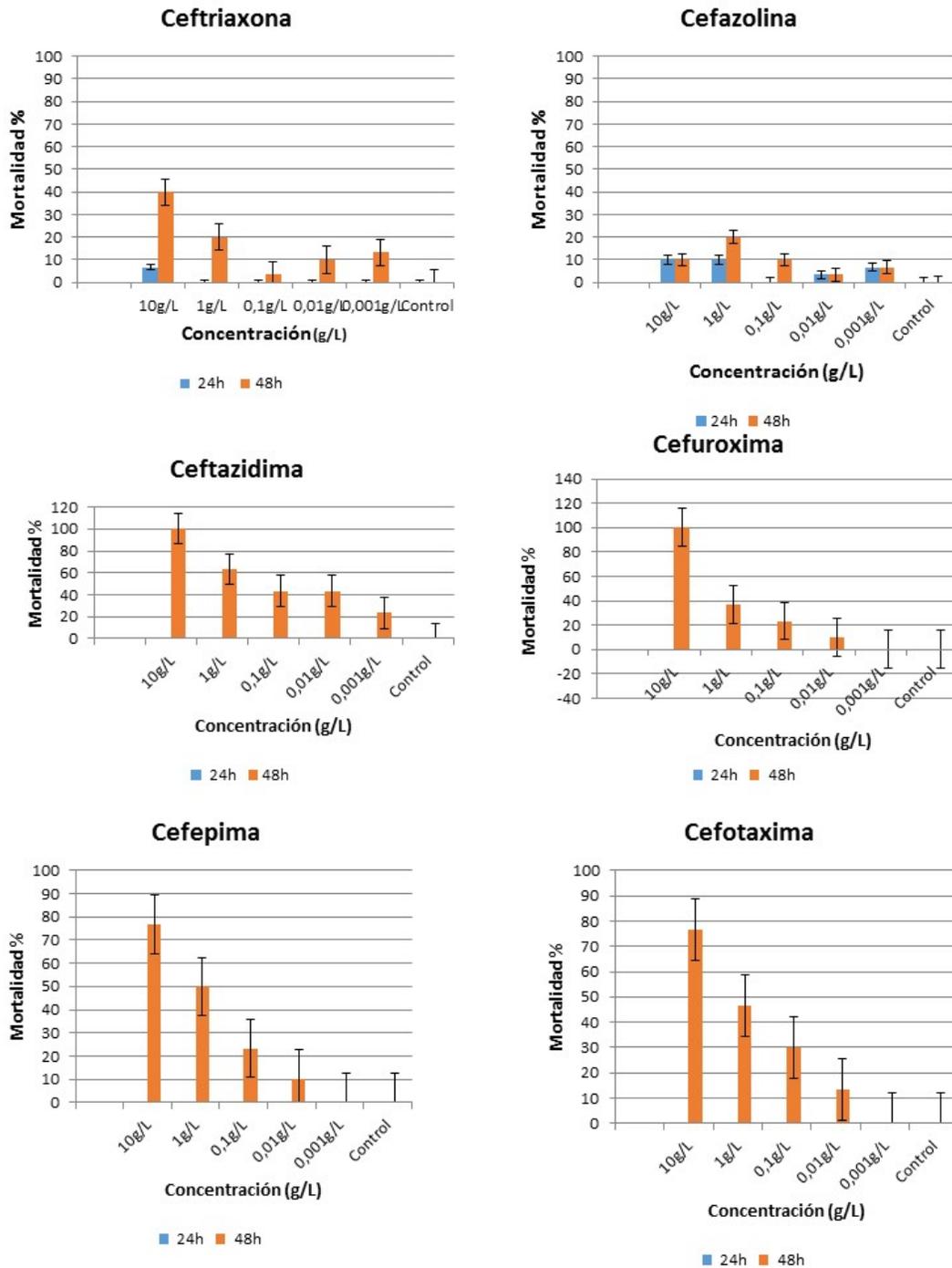


Figura 8. Evaluación de seis antibacterianos pertenecientes al grupo de las cefalosporinas sobre *Artemia salina* L.

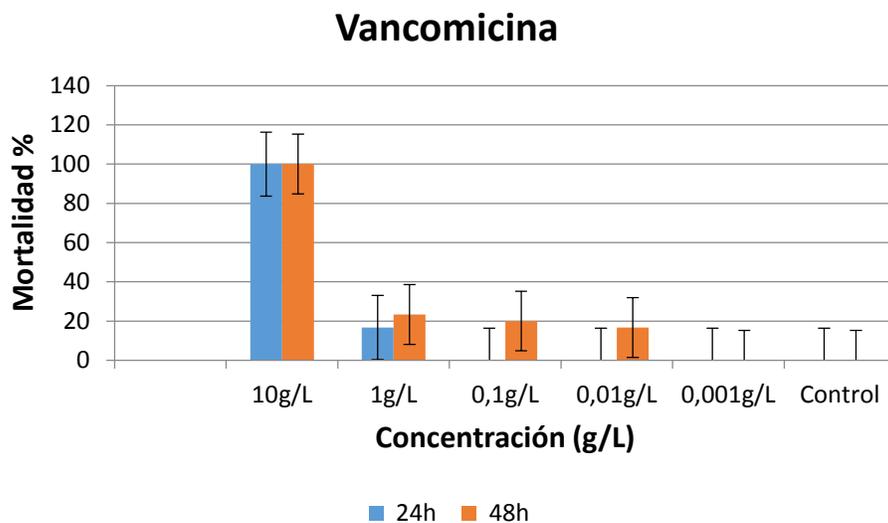


Figura 9. Evaluación de la toxicidad aguda de Vancomicina sobre *Artemia salina* L.

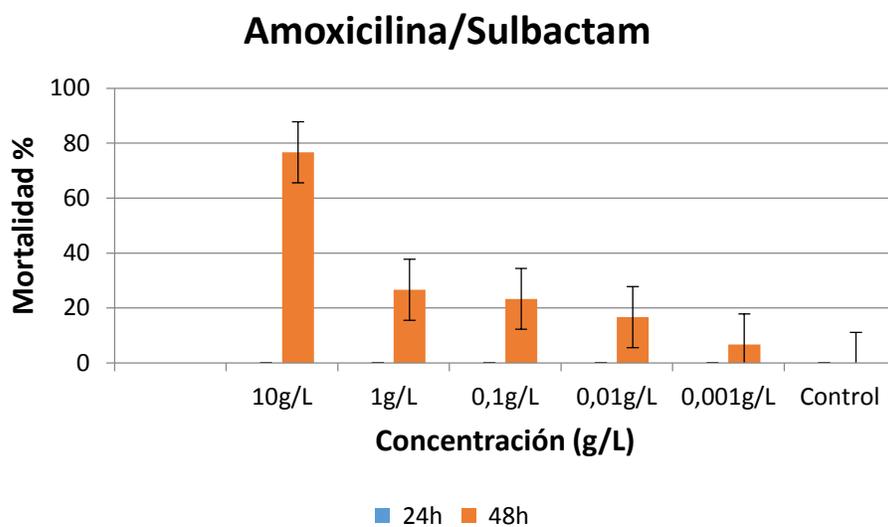


Figura 10. Evaluación de la toxicidad aguda de Amoxicilina más Sulbactam sobre *Artemia salina* L.

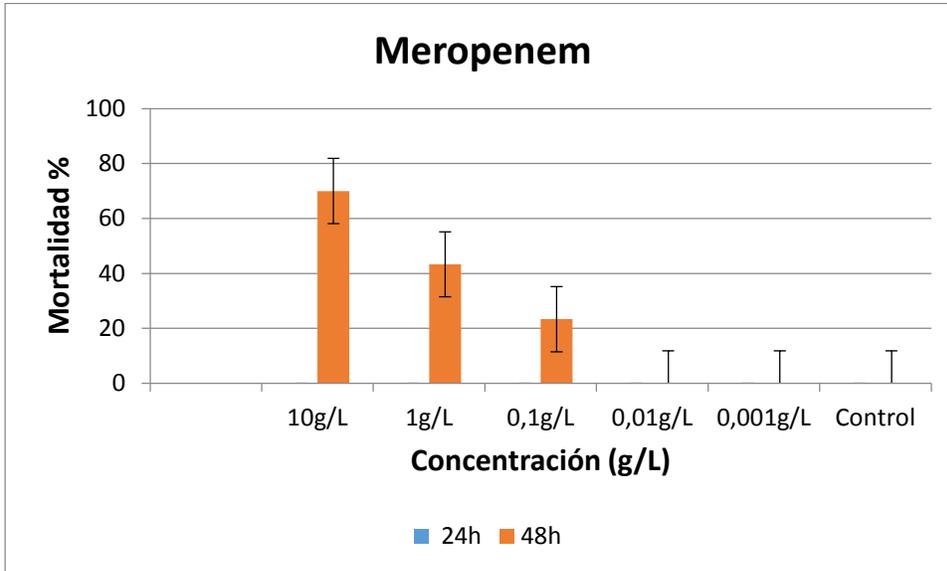


Figura 11. Evaluación de la toxicidad aguda de Meropenem sobre *Artemia salina* L.

La Vancomicina (glucopéptido) mostró ser extremadamente tóxico a la concentración de 10g/L con un 100% de mortalidad tanto a las 24 como a las 48 horas, en las concentraciones decrecientes se comporta como moderadamente tóxico a no tóxico (Fig. 9).

La Amoxicilina más Sulbactam que es una combinación de ingredientes activos pertenecientes al grupo de las Aminopenicilinas e inhibidores de las β -lactamasas, mostró alta toxicidad en la concentración de 10g/L y de moderada a no tóxica en las otras concentraciones ensayadas (Fig. 10). El Meropenem tuvo un comportamiento similar al Amoxicilina más Sulbactam (Fig. 11).

Estos resultados coinciden con los reportados en un estudio preliminar (Hernández *et al.*, 2013) donde se evaluaron los mismos compuestos a las concentraciones de 10 y 100 mg/L a las 24 horas, y encontraron que estos se comportan como no tóxicos.

Los valores de la CL_{50} calculada para los antibacterianos que mostraron una mortalidad por encima del 50% se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Concentración Letal Media de los 9 antibacterianos estudiados

Antibacterianos	CL₅₀ 24h (g/L)	CL₅₀ 48h (g/L)
Cefazolina	-	-
Cefuroxima	-	1,097360
Ceftazidima	-	0,060773
Cefepima	-	0,993731
Cefotaxima	-	0,928847
Ceftriaxona	-	-
Vancomicina	1,326802	1,701808
Amoxicilina/Sulbactam	-	2,173923
Meropenem	-	1,702266

Teniendo en cuenta la clasificación de toxicidad seis de los antibacterianos evaluados se clasifican como no tóxicos, solo Cefepima y Cefotaxima como moderadamente tóxicos y la Ceftazidima como muy tóxico. Aunque estas clasificaciones poseen variaciones entre sí, todas coinciden en agrupar las sustancias con CL₅₀ inferiores a 100 µg/mL en las categorías de mayor toxicidad, mientras, los que muestran valores superiores a 1 000 µg/mL se clasifican como no tóxicos (Valdés *et al.*, 2003).

Estos resultados coinciden con los reportados por Irahola y Giménez, 2000 donde evaluaron un grupo de fármacos dentro de los que se encuentran antibacterianos como: Cloranfenicol, Estreptomicina, Ampicilina, Eritromicina, Rifampicina y Amoxicilina (componente de Amoxicilina más Sulbactam) con muy baja toxicidad (valor de CL₅₀ por encima de 1000 mg/L), excepto para la Tetraciclina que mostró una CL₅₀ de 26 mg/L. En otro estudio los resultados de la CL₅₀ para Cefalexina y Amoxicilina se encuentran por encima de 1000 mg/L corroborando nuestros resultados (Pérez, 2003).

Todos los antibacterianos presentaron valores de PEC/PNEC inferiores a 0,1 (riesgo insignificante) con excepción de Ceftazidima cuyo valor fue de 0,5 (riesgo bajo), coincidiendo con lo reportado internacionalmente (Stockholm County Council,

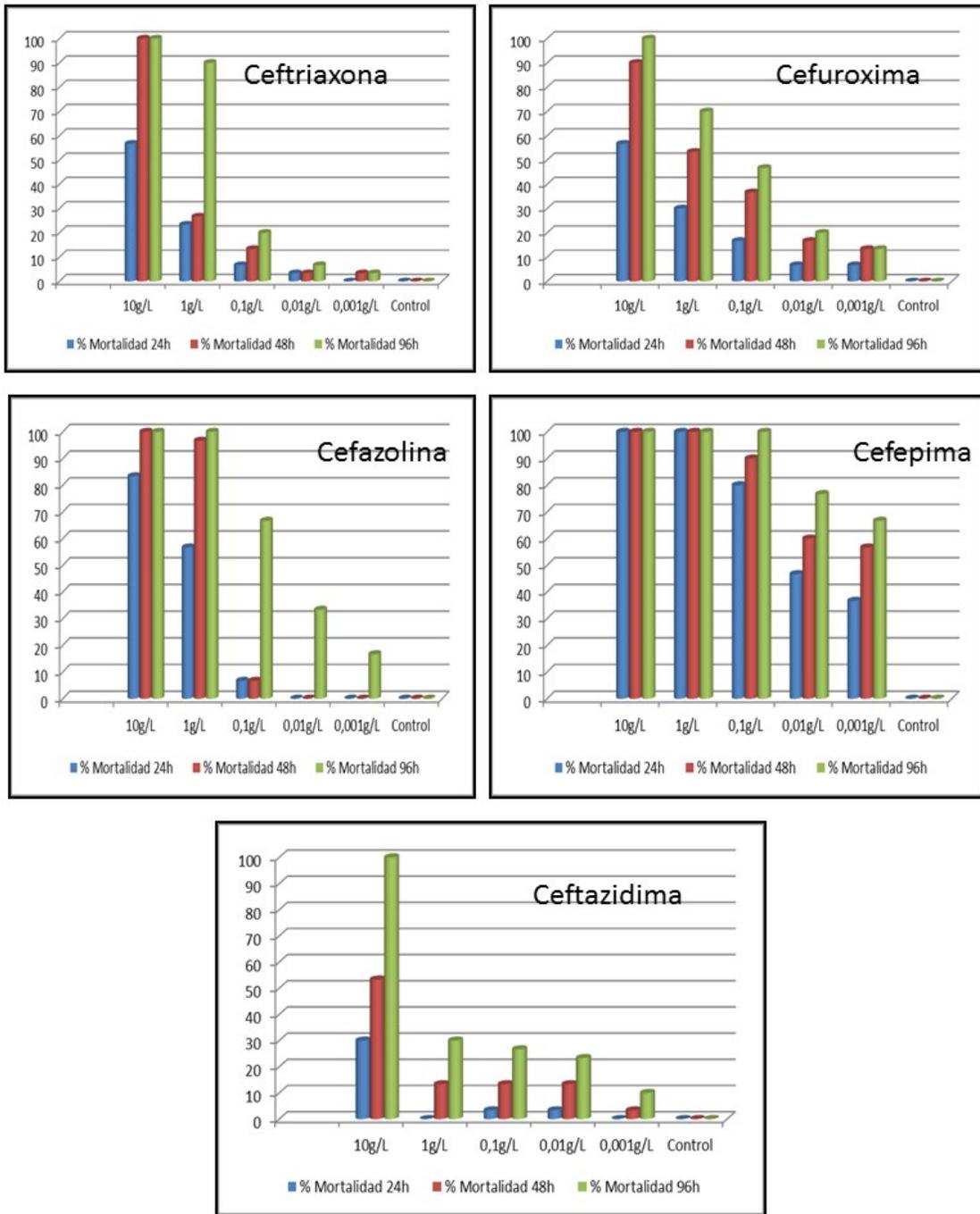
2014) para este antibacteriano, no obstante todos los valores inferiores a 1 indican que el medicamento no presenta riesgo de bioacumulación o toxicidad.

3.3.3 Ensayo de toxicidad aguda en *Physa cubensis* P.

Los organismos acuáticos como los moluscos tienen una función trófica de importancia en la dinámica de los ecosistemas acuáticos, además son herramientas biológicas esenciales para evaluar la respuesta a contaminantes (Iannacone *et al.*, 2001). Los moluscos están ampliamente distribuidos en todo el planeta y tienen un gran valor alimenticio y ecológico (Sánchez & Vera, 2001) y constituyen eslabones en las cadenas alimenticias de los vertebrados (Álamo & Valdivieso, 1997). *Physa cubensis* P. modelo de prueba empleado en la investigación es adecuado para evaluar la toxicidad en pruebas a corto y largo plazo por las características antes expuestas. La información sobre la toxicidad sirve de base para la evaluación del riesgo ecológico, esto es, la probabilidad de ocurrencia de efectos negativos en el ecosistema marino (Gaete *et al.*, 1996; Ong & Din, 2001; Iannacone & Alvaríño, 2003).

Los resultados del ensayo se muestran en las Figuras 12, 13, 14 y 15.

De los seis antibacterianos pertenecientes al grupo de las cefalosporinas (Fig. 12), Ceftriaxona y Cefuroxima se comportaron de manera similar con alta y extrema toxicidad a las concentraciones de 10g/L y 1 g/L, Cefazolina mostró toxicidad extrema a 48 h y 96 h en las mayores concentraciones, siendo altamente tóxico a las 96 h con la concentración de 0,1 g/L, Cefepima mostró 100% de mortalidad en todas las lecturas a 1g/L y 10g/L, a la concentración de 0,1g/L se comportó como altamente tóxico a las 24 y 48 h y a las 96 h como extremadamente tóxico; en el resto de las concentraciones a las 48 y 96h mostró alta toxicidad. Ceftazidima solo tuvo 100% de mortalidad a la mayor concentración a las 96h y de moderada a no tóxica en las restantes concentraciones ensayadas.



.Figura 12. Evaluación de cinco antibacterianos pertenecientes al grupo de las cefalosporinas sobre *Physa cubensis* P.

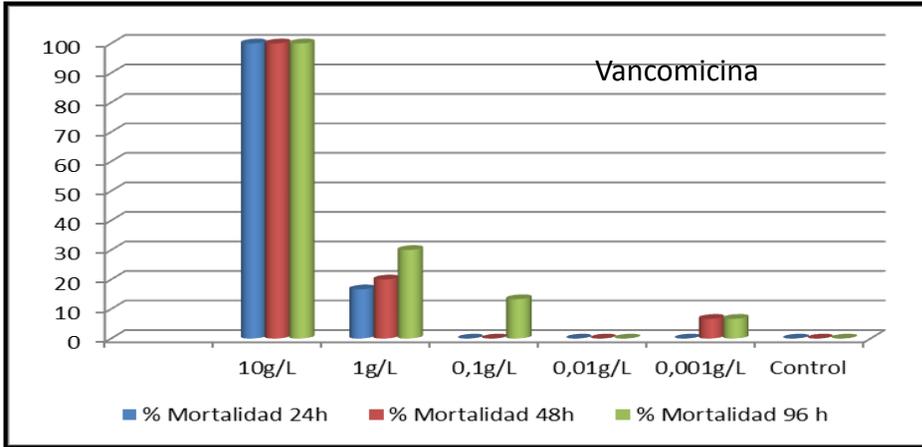


Figura 13. Evaluación de la toxicidad aguda de Vancomicina sobre *Physa cubensis* P.

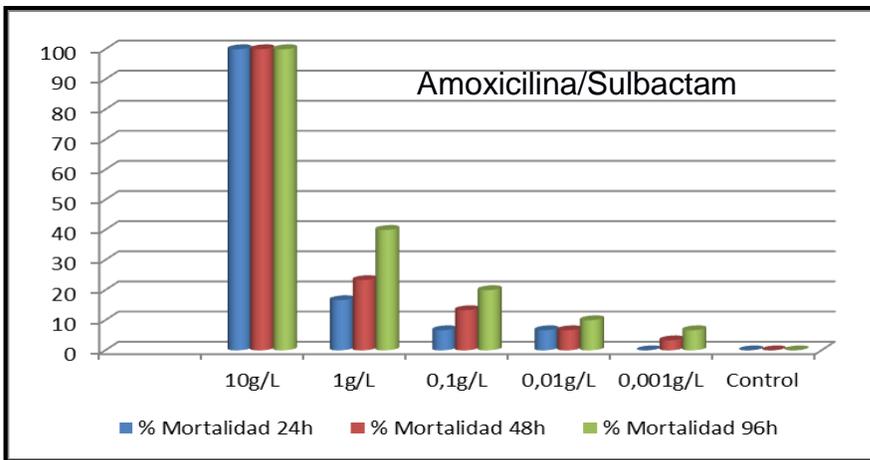


Figura 14. Evaluación de la toxicidad aguda de Amoxicilina más Sulbactam sobre *Physa cubensis* P.

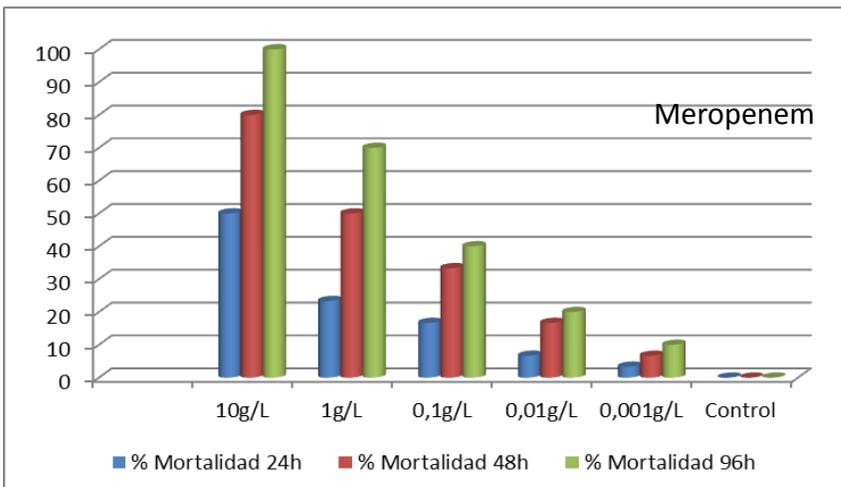


Figura 15. Evaluación de la toxicidad aguda de Meropenem sobre *Physa cubensis* P.

La Vancomicina mostró ser extremadamente tóxico a la concentración de 10g/L con un 100% de mortalidad tanto a las 24, 48 como a las 96 horas, en las concentraciones decrecientes se comporta como moderadamente tóxico a no tóxico (Fig. 13).

La Amoxicilina más Sulbactam mostró toxicidad extrema en la concentración de 10g/L en todas las lecturas y de moderada a no tóxica en las otras concentraciones ensayadas (Fig. 14).

El Meropenem a la concentración de 10 g/L a las 24h se comportó como moderadamente tóxico, a las 48h altamente tóxico y en las 96h como extremadamente tóxico, al ir disminuyendo las concentraciones ensayadas su toxicidad también disminuyó (Fig. 15).

Estos resultados coinciden con los reportados en un estudio preliminar donde se evaluaron los mismos compuestos a la concentración de 1g/L a las 24 y 96 h, y encontraron que estos se comportan como moderadamente tóxicos, solo Cefepima y Cefazolina se comportaron como altamente tóxicos a las 96 horas con mortalidad superior al 50% (Hernández *et al.*, 2013).

Los valores de CL₅₀ calculados para todos los antibacterianos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Valores de Concentración Letal Media de los antibacterianos estudiados.

Antibacterianos	CL₅₀ 24h (g/L)	CL₅₀ 48h (g/L)	CL₅₀ 96h (g/L)
Cefazolina	0,914167	0,275027	0,025684
Cefuroxima	6,015467	0,362968	0,125221
Ceftazidima	-	10,52863	0,900942
Cefepima	0,006134	0,000909	0,000270
Ceftriaxona	6,568923	1,586198	0,243479
Vancomicina	1,314643	1,199507	1,528440
Amoxicilina/Sulbactam	1,635832	1,635289	1,055492
Meropenem	12,16852	0,619982	0,165002

Teniendo en cuenta la clasificación de toxicidad la mayoría de los antibacterianos evaluados se clasifican como no tóxicos y moderadamente tóxicos, solo Cefepima

como extremadamente tóxico tanto a las 24, 48 como 96 h y Cefazolina como altamente tóxico a las 96 h de exposición. Aunque estas clasificaciones poseen variaciones entre sí, todas coinciden en agrupar las sustancias con CL_{50} inferiores a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en las categorías de mayor toxicidad, mientras, los que muestran valores superiores a 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se clasifican como no tóxicos (Valdés *et al.*, 2003).

Todos los antibacterianos presentaron valores de PEC/PNEC inferiores a 0,1 (riesgo insignificante) a las 24 horas de exposición con excepción de Cefepima cuyo valor fue de 0,9 (riesgo bajo) y a las 48 horas Cefazolina con valor de 0,2 presentó riesgo bajo mientras que Cefepima riesgo moderado con 5,8. A las 96 horas de exposición Cefuroxima y Ceftriaxona con valores de 0,2 y 0,4 se clasificaron de riesgo bajo mientras que Cefazolina y Cefepima con valores de 2,6 y 19,7 de riesgo moderado y alto respectivamente. Lo reportado internacionalmente por Stockholm County Council, 2014 no concuerda con los resultados obtenidos en la investigación como vemos para Cefepima que en la literatura aparece con riesgo insignificante.

En el caso de Cefepima como el valor es superior a 1 se recomienda pasar a la Fase II nivel B y obtener dato específicos sobre toxicidad crónica, en microorganismos, y estudios de bioacumulación (Lobo *et al.*, 2012) (Fig. 1).

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Se determinaron 17 antibacterianos en el Hospital Universitario Clínico Quirúrgico “Dr. Celestino Hernández Robau”. El de mayor consumo fue la Ceftriaxona y el menos consumido la Clindamicina.
2. Según la predicción los antibacterianos constituyen un riesgo de contaminación ambiental.
3. En *Lactuca sativa* L. se determinó que el Cotrimoxazol se clasifica como muy tóxico, mientras que Cefepima, Cefazolina y Vancomicina se clasifican como moderadamente tóxicos. La mezcla de antibacterianos resultó ser no tóxica y la interacción con los antibacterianos se clasifica como sinérgica.
4. En *Artemia salina* L. se determinó que la Ceftazidima se clasifica como muy tóxico, la Cefepima y Cefotaxima como moderadamente tóxicos y el resto de los antibacterianos evaluados como no tóxicos.
5. En *Physa cubensis* P. se determinó que Cefepima y Cefazolina se clasifican como muy tóxicos y Vancomicina y Amoxicilina más Sulbactam como no tóxicos.

Recomendaciones

RECOMENDACIONES

- Evaluar la ecotoxicidad aguda de los restantes antibacterianos que constituyeron riesgo ambiental según la predicción.
- Realizar los bioensayos a las concentraciones predichas para *Artemia salina* L. y *Physa cubensis* P.
- Evaluar la ecotoxicidad aguda de las mezclas de estos fármacos para *Artemia salina* L. y *Physa cubensis* P.
- Realizar estudios completos similares al presentado, en otros Centros de Salud y durante mayor período de tiempo, para obtener resultados más generalizadores.

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA ED, DM CALVO, G VIÑA & L BROCHE. 2015. Prescripción de antibacterianos de uso estratégico en hospitales seleccionados del país, por una terapéutica razonada y racional. Convención Internacional de Salud, Cuba "Salud 2015". Disponible en:

<http://www.convencionsalud2015.sld.cu/index.php/convencionsalud/2015/paper/view/915/308>

AKINBOWALE O, H PENG & M BARTON. 2007. P514 Class 1 integron mediates antibiotic resistance in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 29:113.

ALAMO V & V VALDIVIESO. 1997. Lista sistemática de moluscos del Perú. 2do Ed. IMARPE. Callao-Perú.

ÁLVAREZ A, C MARTÍNEZ, A VIDAL, MD SAAVEDRA, A IGLESIAS & X FORGA. 2002. Prescripción de antibióticos en el paciente ambulatorio. *Aten Primaria*. 30(8): 490-495.

ANDERSON PD, VJ D'ACO, P SHANAHAN, SC CHAPRA, ME BUZBY, VL CUNNINGHAM, *et al.* 2004. Screening analysis of human pharmaceutical compounds in U.S. surface waters. *Environ Sci Technol*. 38: 838–849.

ARGEMI F, N CIANNI & A PORTA. 2005. Disrupción endocrina: perspectivas ambientales y salud pública. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 39(3).

BAILÓN MI. 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.

BAQUERO F, J MARTINEZ & R CANTÓN. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*. 19(3): 260-265.

BAGUR MG, ESTEPA C, MARTÍN F. & MORALES S. 2011. Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in

soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *J. Soil. Sediment.* 11, 281-289.

BARCELÓ D & M LÓPEZ DE ALDA. 2008. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. (Panel Científico-Técnico de Seguimiento de la Política de Aguas). Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona.

BLASCO F, R PÉREZ, J MARTÍNEZ, AI JIMENÉZ & MJ GARCÍA. 2008. Study of the consumption of inappropriate medicaments in elder hospitalized in the Internal Medicine Service. *Anales de Medicina Interna* (Madrid). 25(6).

BOUND JP & N VOULVOULIS. 2005. Household Disposal of Pharmaceuticals as a Pathway for Aquatic Contamination in the United Kingdom. *Environ. Health Perspect.* 113: 1705-1711.

BURTON GAJR & NORDSTROM JE. 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.*

CAPELLÀ D & JR LAPORTE. 1993. Métodos aplicados en estudios descriptivos de utilización de medicamentos. En: Laporte JR & G Tognoni. Principios de epidemiología del medicamento. 2da Edición. Barcelona: Masson-Salvat.

CARMONA E, V ANDREU & Y Picó. 2014. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Sci Total Environ.* 484: 53-63.

CLATWORTHY AE, E PIERSON & DT HUNGET. 2007. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol.* 3(8):541.

CLEUVERS M. 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 59(3):309-315.

COLÓN AJ. 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).

DANG H, X ZHANG, L SONG, Y CHANG & G Yang. 2007. Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. *Journal of applied microbiology*. 103(6):2580-2592.

DAY KE, ED ONGLEY, RP SCROGGINS & RP 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).

DRESER A, VF WIRTZ, KK CORBETT & G ECHÁNIZ. 2008. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud pública de México*. 50(4):480-6.

EPA. 1996. ECOLOGICAL EFFECTS TEST GUIDELINES. OPPTS 850.4200. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101). 712-C-96-154. April 1996.

EMA. 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 (EMA), London. Disponible en: <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf>.

ESTEBAN S, M GORGA, M PETROVIC, S GONZÁLEZ, D BARCELÓ & Y VALCÁRCEL. 2014. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. *Science of the Total Environment*. 466-467: 939-951.

EUROPEAN COMMISSION. 2003. Technical guidance document on risk assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk

assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Disponible: <http://jrc.ecb.eu.it/>

FAUST AM, R ALTENBURGER, T BACKHAUS, H BLANCK, W BOEDEKER, P GRAMATICA, *et al.* 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. Disponible en: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.html>.

FEIJTEL TCJ, G. BOEIJE, M. MATTHIES, A. YOUNG, G. MORRIS, C. GANDOLFI, *et al.* 1997. Development of a geographyreferenced regional exposure assessment tool for European rivers – GREAT-ER. Contribution to GREAT-ER # 1. *Chemosphere*. 34: 2351–2373.

FITERRE I, I MIR, R ENSEÑAT, J PISONERO, G PARDO & H GUANCHE. 2011. Calidad de prescripción de agentes antimicrobianos en pacientes hospitalizados en servicios clínicos. *Rev cubana med* 50(1):49-56.

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, *et al.* 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.

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.

GIACHETTO G, A MARTÍNEZ, MC PÍREZ, G ALGORTA, P BANCHERO & 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

GIL M, A SOTO, J USMA & O GUTIERREZ. 2012. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*. 7(2):52-73.

GÓMEZ CV. 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 LM & Z RAMÍREZ. 2004. Microalgas como biomonitores de contaminación. *Revista Cubana de Química*. 16(2): 34-48.

GUANCHE GH, CF IZQUIERDO, A ZAMBRANO, I FRÓMETA, PM BASTANZURI & DJ MALPICA. 2009. Uso de agentes antimicrobianos en instituciones de salud de Cuba. *MEDICRIT*; 6:24-30.

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.

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 E, MARTINEZ B, CARRAZANA D, ÁGUILA E, MARRERO O, ALONSO G, *et al.* 2013. A RISK OF ENVIRONMENTAL DAMAGE DUE TO ANTIBIOTIC RESIDUES IN THE BELICO RIVER AREA IN SANTA CLARA, CUBA. LATINFARMA. 20mo Congreso Latinoamericano de Farmacología y Terapéutica. 5to Congreso Iberoamericano de Farmacología. 5to Congreso Internacional y 11no Congreso Nacional de la Sociedad Cubana de Farmacología. La Habana, Cuba.

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 & 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 comparativo 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 ALVARIÑO. 2009. Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*. *Ecología Aplicada.* 8(2).

IANNACONE J & L ALVARIÑO. 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 & L ALVARIÑO. 2002. 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, J GARCÍA, H VELA, C TICONA, E TORRES, G QUINTE, *et al.* 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.

KÜMMERER K. 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.

KUSTER M, A DE LA CAL, E ELJARRAT, M LÓPEZ DE ALDA & D BARCELÓ. 2010. Evaluation of two aquatic passive sampling configurations for their suitability in the analysis of estrogens in water. *Talanta*. 83(2): 493-499. 23.

LACY CF, LL ARMSTRONG, MP GOLDMAN & LL LANCE. 2012-2013. Drug Information Handbook. American Pharmaceutical Association. 21:1761.

LAING RO, HV HOGERZEIL & D ROSS-DEGNAN. 2001. Ten recommendations to improve use of medicines in developing countries. *Health Policy Plan*. 16(1):13-20.

LHULLIER C, HORTA PA & FALKENBERG M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Braz J Pharmacogn*. 2006; 16:158-163.

LOBO M, MT FREJO, MJ 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 MC, E HOMS & MT VITALES. 2002. Análisis sistemático 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.

MAGDALENO A, AB 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.

MENGANA E, E GALANO, E PÉREZ, B SAVIGNE & M MENÉNDEZ. 2012. Uso de antimicrobianos de amplio espectro en un hospital pediátrico de Santiago de Cuba. *MEDISAN*. 16(9).

MIÉGE C, JM 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.

NIKOLAOU A, M SUREYA & D FATTA. 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal Bioanal Chem*. 387: 1225-1234.

OETKEN MG, D NENTWIG, 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.

OMS. Organización Mundial de la Salud. 2009. Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials. Disponible en: http://www.who.int/foodborne-disease/resources/Report_CIA_Meeting.pdf

OMS. Organización Mundial de La Salud. 2001. Prevención y control de la resistencia a los antimicrobianos en Las Américas. Plan estratégico de vigilancia de la resistencia a los antibióticos .Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/PlanRegionalParaguay.pdf>

OMS. Organización Mundial de La Salud. 1999. Estrategia mundial OMS de contención de la resistencia a los antimicrobianos. Disponible en: http://www.antibioticos.msc.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_resumen.pdf

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. 1984. Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals N° 208, OECD Publications Service, Paris.

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.

PALACIOS F, E GARCÍA & AM BORREGO (2005): Gestión Integral de residuos hospitalarios en el Hospital Miguel Enríquez, Cuba. XV Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales, México.

PASSOS J, F DE SOUSA, I LULA, E BARRETO, J LOPES, W DE ALMEIDA, *et al.* 2011. Multi-Equilibrium System Based on Sertraline and B-Cyclodextrin Supramolecular Complex in Aqueous Solution. *International Journal of Pharmaceutics*. 421(1): 24-33.

PAUDEL R, M SHARMA & B PRASAD. 2008. Prevalence of antimicrobial chemotherapy in hospitalized patients in the department of internal medicine in a tertiary care center. *Nepal Med Coll J*. 10(2):91-95.

PAUL MV, E SHANI, G MUCHTAR, E KARIV, ROBENSHTOK & LEIBOVICI. 2010. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empirical antibiotic therapy for sepsis. *Antimicrob Agents Chemother*. 54 (63):4851.

PEÑA CE, DE CARTER & F AYALA-FIERRO. 2001. Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental.

PÉREZ KR. 2003. Comparación de la Actividad Biológica de 10 extractos Vegetales y 5 Fármacos utilizando Tres Bioensayos Toxicológicos.

PÉREZ L, AJ GARCÍA, L ALONSO & S RODRÍGUEZ. 2014. Consumo de antimicrobianos de uso exclusivo hospitalario. Holguín 2008-2012. *Revista Salud Quintana Roo*. 7(29): 21-25.

PINO O & F JORGE. 2010. Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev. Protección Veg*. 25(1).

PETROVIC M, M SOLÉ, MJ 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.

PIGNATO S, MA CONIGLIO, G FARO, FX WEILL & G GIAMMANCO. 2009. Plasmid-mediated multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* in crude and treated wastewater used in agriculture. *Journal of Water and Health*. 7(3):251–258.

QUESADA I, UJ JÁUREQUI, AM WILHELM & H DELMAS. 2009. Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas*. 40(3).

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).

RAMOS C. 2008. Aguas residuales generadas en hospitales. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*. 19(2).

RODRÍGUEZ BJ. 2012. Programas de optimización de uso de antimicrobianos (PROA) en hospitales españoles: documento de consenso GEIH-SEIMC, SEFH y SEMPSPH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 30(1)

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, MC DÍAZ & Y PICA. 2004. Capítulo 1: Conceptos Generales. In: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones G. Castillo (ed.): 17-22. México: IMTA.

SÁNCHEZ RG & DG VERA. 2001. Manual Introductorio de ecotoxicológica acuática. Informe Instituto del Mar del Perú. 161: 1-40.

SHAKIL S, R KHAN, R ZARRILLI & AU KHAN. 2008. Aminoglycosides versus bacteria-a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *Journal of biomedical science*. 15(1):5-14.

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.

SILVA L, C LINO, L MEISEL & A PENA. 2012. Selective Serotonin Re-Uptake Inhibitors (SSRIs) in the Aquatic Environment: An Ecopharmacovigilance Approach. *Science of the Total Environment*, 437: 185-195.

SILVA TMS, RJB NASCIMENTO, MM BATISTA, MF AGRA, CA CAMARA. 2007. Brine shrimp bioassay of some species of Solanum from Northeastern Brazil. *Braz J Pharmacogn.* 17(1):35-38.

SINGH A. 2007. Brine shrimp (*Artemia salina*) – a marine animal for simple and rapid biological assays. *Journal of Chinese Clinical Medicine.* 2(4).

SOBRERO MC & RONCO A. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en México Patricia Ramírez Romero, Ania Mendoza Cantú Instituto Nacional de Ecología, 2008 Editorial: Sermanat México; p. 55 – 67

SPELLBERG BR, D GUIDOS, J GILBERT, HW BRADLEY, M BOUCHER & SCHELDET. 2008. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 46 (64):155.

STATSOFT INC. 2007. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.

STOCKHOLM COUNTY COUNCIL. 2014-2015. Environmentally Classified Pharmaceuticals. Disponible en:

http://www.janusinfo.se/Global/Miljo_och_lakemedel/Miljobroschyr_2014_engelsk_webb.pdf

SUMPTER JP. 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.

TEIJÓN G, L CANDELA, K TAMOH, A MOLINA & AR FERNÁNDEZ. 2010. Occurrence of emerging contaminant, priority substances (2008/105/CE) and

heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Science of the Total Environment*. 408: 3584-3595.

TELECHEA H, N SPERANZA, L LUCAS, A SANTURIO, G GIACHETTO, G ALGORTA, L NANNI & C PÍREZ. 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.

TOROKNE A, R VASDINNYEI & BM ASZTALOS. 2007. A Rapid Microbiotest for the Detection of Cyanobacterial Toxins. *Environ Toxicol*. 64-68.

US EPA. 1989. Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites, US Environmental Protection Agency, 600/3-88/029, Corvallis.

VALDÉS O, N DÍAZ, Y CABRANES, ME ACEVEDO, AJ ARECES, L GRAÑA, *et al*. 2003. Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivo. *Avicennia*. 16: 36-45.

VANHAECKE P & G PERSOONE. 1984. The ARC-Test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. *Methodology and evaluation. Ecotoxicological Testing for the Marine Environ*. 143-157.

VERA-ARDILA ML & EL LINARES. 2005. Gastrópodos de la región subxerófitica de La Herrera, Mosquera, Cundinamarca, Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 29(112): p. 439-456.

WANG W. 1987. Root Elongation Method for Toxicity Testing of Organic and Inorganic Pollutants. *Environmental Toxicology & Chemistry*. 6: 409-414.

WHOCC. World-Health-Organization Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. 2015. Disponible en: <http://www.whooc.no/atc-ddd-index>

WONG CK & PAK AP. 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.

YOUNG WF, P WHITEHOUSE, I JOHNSON & N SOROKIN. 2002. Proposed predictednoeffect-concentrations (PNECs) for natural and synthetic steroid estrogens in surface waters. Research and Development, Technical Report P2-T04/1. Environment Agency, Bristol, UK.

ANEXO 1. Clasificación de los antibióticos según su grupo químico tomada de Hernández, 2011.

PENICILINAS					
Penicilinas Naturales	Penicilina G Sódica Penicilina G Potásica Penicilina G Procaínica Penicilina G Clemizol Penicilina G Benzatínica Penicilina Potásica Fenoximetil Penicilina			Cefmetazol Cefminox Cefotetán	Sisomicina Isepamicina Tobramicina Kanamicina Espectinomocina
Aminopenicilinas	Amoxicilina Ampicilina Hetacilina Bacampicilina Ciclocilina Epicilina Metampicilina Pivampicilina Tampicilina	Cefalosporinas de Tercera Generación		Cefmenoxima Ceftazidima 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 Ticarcilina	CARBAPENEMICOS			RIFAMICINAS Rifampicina Rifabulina
Ureidopenicilinas	Apalcilina Azlocilina Furazlocilina Mezlocilina Piperacilina Sulbenicilina	Imipenem Meropenem Ertapenem			HIDRACIDAS Isoniacida
INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS		MONOBACTAMICOS			POLIPÉPTIDOS Bacitracina Capreomicina Gramicidina Palimixina B y E
I. B. L.	Acido Clavulánico Sulbactam Tazobactam	ANFENICOLES			QUINOLONAS
CEFALOSPORINAS		TETRACICLINAS			Primera Generación
Cefalosporina de Primera Generación	Cefadroxilo Cefalexina Cefalotina Cefradina Cefapirina Cefazolina Cefaloridina Cefalotina	Cloranfenicol Tiamfenicol			Acido nalidixico Acido oxolínico Acido pipemídico Cinoxacino Rosoxacino
Cefalosporinas de Segunda Generación	Cefuroxima Cefuroxima -Axetil Cefaclor Cefprozil Cefamandol Cefonicid Ceforanida Cefotiam Cefoxitina	LINCOSAMINAS			Segunda Generación
		Clorhidrato de Tetraciclina Demeclociclina Doxiciclina Minociclina Oxitetraciclina			Ciprofloxacino Enoxacino Lomefloxacino Norfloxacino Ofloxacino Pefloxacino Rufloxacino
		MACROLIDOS			Tercera Generación
		14 átomos	Clarithromicina Diritromicina Eritromicina Roxitromicina		Gatifloxacino Espirfloxacino Grepfloxacino Pasufloxacino Temafloxacino
		15 átomos (Azólidos)	Azitromicina		Cuarta Generación
		16 átomos	Diacetil-midecamicina Espiramicina Josamicina		Cinafloxacino Moxifloxacino Trovafloracino
		Cetólidos	Telitromicina		SULFONAMIDAS
		ESTREPTOGRAMINAS			Sulfas de uso sistémico
		Quinupristina -Dalpofristina			Sulfadiazina Sulfadoxima Sulfisoxazol Sulfametoxazol
		AMINOGLUCOSIDOS			Sulfas de uso tópico
		Amikacina Neomicina Estreptomocina Netilmicina Gentamicina			Sulfacetamida Sulfadiazina argéntica
		NITROFURANOS			NITROIMIDAZOLES
		Furazolidona Nifurtimox Nitrofurantoina Nitrofurazona			Metronidazol Secnidazol Tinidazol Ornidazol

ANEXO 2. Semillas de *Lactuca sativa* L.



ANEXO 3. Ejemplar de *Artemia salina* L.





ANEXO 5. Valores de DDD de los 17 antibacterianos en estudio.

Antibacterianos	DDD	(g)
Ceftriaxona 1000 mg (bbo)	2	
Metronidazol 500 mg (fco)	1.5	
Ciprofloxacina 200 mg (fco)	1	
Cefotaxima 1000 mg (bbo)	4	
Amikacina 500 mg (bbo)	1	
Ceftazidima 1000 mg (bbo)	4	
Cefazolina 1000 mg (bbo)	3	
Gentamicina 80 mg (amp)	0.24	
Meropenem 1000 mg (bbo)	2	
Cefuroxima 750 mg (bbo)	3	
Cotrimoxazol 480 mg (amp)	1.92	
Azitromicina 500mg (tab)	0.3	
Amoxicilina/Sulbactam 500mg (tab)	1	
Cefepima 1000 mg (bbo)	2	
Vancomicina 500 mg (bbo)	2	
Amoxicilina/Sulbactam 750 mg (bbo)	3	
Clindamicina 600mg (amp)	1.8	