



**Determinación del efecto de la disrupción endocrina causada por la exposición a diferentes concentraciones de ibuprofeno y diclofenaco suministrados a Bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum* del Magdalena**

Sara Elisa Gallego Ríos

Tesis doctoral presentada para optar al título de Doctor en Ingeniería Ambiental

Tutor

Gustavo A. Peñuela Mesa, Doctor (PhD) en Química Ambiental

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Doctorado en Ingeniería Ambiental

Medellín, Antioquia, Colombia

2022

Cita	Gallego Ríos (1)
Referencia	(1) Gallego Ríos, S. Determinación del efecto de la disrupción endocrina causada por la exposición a diferentes concentraciones de ibuprofeno y diclofenaco suministrados a Bagre rayado <i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i> del Magdalena [ Tesis doctoral]. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia; 2022.
Estilo Vancouver/ICMJE (2018)	



Doctorado en Ingeniería Ambiental, Cohorte X.

Grupo de Investigación Diagnóstico y Control de la Contaminación.



Centro de Documentación Ingeniería (CENDOI)

**Repositorio Institucional:** <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - [www.udea.edu.co](http://www.udea.edu.co)

**Rector:** John Jairo Arboleda Céspedes.

**Decano/Director:** Jesús Francisco Vargas Bonilla.

**Jefe departamento:** Sara Cristina Vieira Agudelo.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.



# Agradecimientos

Mi especial gratitud al Profesor Gustavo A Peñuela Mesa, quien me permitió seguir por el camino de la investigación en temas relacionados con peces, dejándome proponer, desarrollar e investigar en los temas relacionados con el Proyecto del Bagre. Por su disposición y colaboración en todo el proceso de formación. Por ser una guía en cada una de las etapas de este proyecto y ser un apoyo incondicional para alcanzar los resultados que buscaba.

Al Profesor Víctor Atencio García, Coordinador del Grupo de investigación CINPIC de la Universidad de Córdoba, ya que sin él y sus amplios conocimientos en el Bagre rayado, no hubiera sido posible realizar una parte de la experimentación. Por su generosidad con el conocimiento, así como la dedicación y atención en todo momento.

A los Profesores Mauricio Rojas López y Beatriz Peña Arboleda, que pusieron a disposición todo su conocimiento en la realización de la citometría y ELISA, y su interpretación.

A la Profesora Emma Martínez López del Grupo de Investigación de Toxicología y evaluación del riesgo de la Universidad de Murcia, España, por permitirme realizar la pasantía en su grupo de Investigación y ser más que una Profesora durante la pandemia, a ella toda mi gratitud por hacerme sentir de parte de su familia, por su dedicación en mi aprendizaje y su invaluable amistad.

A mi familia, mi mamá, mi papá y mi hermanito por estar siempre haciéndome barra y recordándome que yo era capaz con esto y con muchísimo más.

A mis profesores, compañeras del Proyecto de Bagre y amigos, especialmente a Juliana Bermúdez, Luisa Caly, Claudia Quiroz, Mary Alejandra Cardona y María Fernanda Guerra por todo su cariño y amistad.

A Colciencias y la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto de investigación; adicionalmente a Sapiencia, de la Alcaldía de Medellín, en sus programas de Fondo Sapiencia Posgrados Nacionales y Posgrados Internacionales por el apoyo económico.

Al Grupo de Investigación Diagnóstico y Control de la Contaminación (GDCON) y a la Universidad de Antioquia por permitirme realizar mi programa Doctoral.



---

## Resumen

Los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs), son un grupo de contaminantes emergentes capaces de causar alteraciones tanto en humanos como en animales. Dentro de los PPCPs se encuentra el ibuprofeno y diclofenaco, medicamentos de mayor consumo a nivel mundial y considerados como medicamentos esenciales, siendo los principales ingresos al medio acuático los efluentes de las plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) y las aguas residuales sin tratar. Desafortunadamente las PTAR no están diseñadas para la eliminación de la mayoría de estos compuestos, por tanto, estos compuestos o sus metabolitos se mantienen en el efluente.

En Colombia, la principal cuenca hidrográfica que recibe gran parte de las descargas de aguas residuales de origen doméstico, industrial y agropecuario, es la conformada por el río Magdalena y el Cauca. En estos ríos habita el Bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, siendo el segundo producto pesquero dulceacuícola de importancia comercial en el país, sin embargo, este pez ya que se encuentra en peligro crítico de extinción, debido a la disminución en las capturas en las últimas décadas; afectando de manera directa a la seguridad alimentaria de las poblaciones que dependen de él como su única fuente de trabajo, ingresos y alimentación.

Se han planteado diversas causas sobre su posible disminución en las capturas, como el embalsamiento de los ríos, la sobrepesca, el cambio climático, deterioro del hábitat y la contaminación. Con el presente estudio se pretende esclarecer si los contaminantes emergentes, como el ibuprofeno y diclofenaco son otra causa de la disminución de la población del Bagre rayado del Magdalena. La primera fase de este estudio se realizó en tres períodos climáticos diferentes (lluvia, transición y seca), para determinar la incidencia de ambos medicamentos en los principales ríos de Colombia y sus efectos en el Bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum*. Los analitos fueron obtenidos mediante la extracción en fase sólida (SPE) y los de tejido muscular mediante QuEChERS; ambas matrices se cuantificaron por Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplado a masas – masas (UHPLC-MS/MS). En esta primera etapa no se encontraron niveles por encima del límite de cuantificación (20 ng/g) de ibuprofeno ni diclofenaco en el tejido muscular de *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, en ninguna estación o sitio de muestreo. En cambio, en el agua, en algunos sitios de muestreo se detectaron concentraciones de hasta 75 µg/L de diclofenaco, en período seco, siendo el más alto reportado hasta el momento en aguas superficiales. Para el ibuprofeno, no se encontraron concentraciones superiores al límite de cuantificación (0.50 µg/L) en las aguas de los ríos Cauca y Magdalena, en ninguna temporada climática ni sitio de muestreo.

En la segunda etapa se determinó en condiciones de laboratorio el efecto del ibuprofeno y diclofenaco como disruptores endocrinos en el Bagre. Para esto se dividieron en tres grupos los peces, exponiéndolos a concentraciones de 0 (control), 25, y 50 µg/L de ibuprofeno y diclofenaco, respectivamente, durante cuatro meses. Muestras de sangre y semen, fueron recogidas después del periodo de aclimatación y a los cuatro meses de exposición. Los parámetros analizados para determinar las posibles alteraciones fueron: calidad espermática, niveles de vitelogenina, daños en el ADN y marcadores enzimáticos (lactato deshidrogenasa, alanina aminotransferasa,

aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamilttransferasa, acetilcolinesterasa, creatina quinasa, peroxidación lipídica, albúmina, globulinas, creatinina y úrea).

Los análisis realizados para determinar la calidad del esperma se realizaron tanto *in vivo* como *in vitro*. Para el análisis de la calidad del esperma de cada tratamiento (*in vivo*), los machos fueron seleccionados en la fase de espermiación. El semen del grupo de control se utilizó para pruebas *in vitro* y se activó con soluciones acuosas que contenían 0.25 y 50 µg/L de ibuprofeno. La exposición a concentraciones de 50 µg/L de ibuprofeno en ambas pruebas, evidenció que la calidad de los espermatozoides del Bagre rayado disminuyó estadísticamente al compararla con los otros tratamientos, lo cual puede representar una amenaza en la reproducción de este pez si las concentraciones de ibuprofeno en los principales ríos de Colombia fueran  $\geq 50$  µg/L.

Tanto los daños en el ADN como los niveles de vitelogenina en machos y hembras, se realizaron con muestras de sangre. Para la determinación de la integridad del ADN y el potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ M) se utilizó sangre completa y se analizó por citometría de flujo. Los resultados indican que no hubo alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial y los porcentajes de daño en el ADN estuvieron por debajo de 0.39%, en las dos concentraciones de ibuprofeno durante los cuatro meses. Del mismo modo, los niveles de vitelogenina medidos a través de Kit de ELISA se mantuvieron en promedio  $124.8 \pm 16.7$  ng/mL en machos y hembras, sin diferencias estadísticas después de los cuatro meses de exposición a ibuprofeno, indicando que para ninguno de estos parámetros hubo una alteración por exposición a concentraciones de 25 y 50 µg/L de ibuprofeno.

Los diferentes marcadores enzimáticos se realizaron en muestras de sangre luego de la exposición a ibuprofeno y triclosán por cuatro meses. Los resultados establecieron que tanto el ibuprofeno como el triclosán a concentraciones de 25 y 50 µg/L pueden causar alteraciones en *P. magdaleniatum*, interfiriendo con la actividad de ciertas enzimas asociadas con la producción de energía, la respuesta inmune, la arquitectura y la fisiología celular.

La intervención humana en la naturaleza ha producido impactos negativos en los ecosistemas. Es por esto que la ciencia y la tecnología se han puesto a la tarea de buscar soluciones a los diferentes problemas ambientales. La Ingeniería ambiental se enlaza con disciplinas complementarias, como biología, ecología, y conocimiento tradicional, en la búsqueda de las fuentes, y posibles tecnologías para prever y mitigar los impactos ambientales, además de poder orientar al gobierno y sector privado sobre las alternativas que permitan la conservación de la biodiversidad. Este estudio se enfocó en la búsqueda de las fuentes y sus posibles soluciones como es el tratamiento exhaustivo de todas las aguas, en los que se realice un proceso de remoción o disminución eficiente de los contaminantes, asegurando aguas seguras tanto para el consumo humano como para los animales que viven en ellas, todo esto es posible con la creación de nuevos lineamientos y normas sobre los límites máximos de los contaminantes presentes en las aguas.

**Palabras clave:** Pez neotropical; antiinflamatorio no esteroideo; contaminación; alteración; ríos.

# Abstract

Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) are a group of emerging contaminants capable of causing alterations in both humans and animals. Among the PPCPs are ibuprofen and diclofenac, the most widely consumed drugs worldwide and considered essential medicines. The main inputs to the aquatic environment are effluents from wastewater treatment plants (WWTPs) and untreated wastewater. Unfortunately, WWTPs are not designed to remove most of these compounds, so these compounds or their metabolites remain in the effluent.

In Colombia, the main river basin that receives most of the wastewater discharges from domestic, industrial, and agricultural sources is the Magdalena and Cauca rivers. The striped catfish long-whiskered magdalenean catfish *Pseudoplatystoma magdaleniatum* lives in these rivers, which is the second most important commercial freshwater fishery product in the country. However, this fish is in critical danger of extinction due to the decrease in catches in recent decades, directly affecting the food security of the populations that depend on it as their only source of work, income, and food.

Several causes have been suggested for the possible decline in catches, such as river damming, overfishing, climate change, habitat deterioration, and pollution. The present study aims to clarify whether emerging contaminants, such as ibuprofen and diclofenac, are another cause of the decline in the catfish long-whiskered magdalenean population. The first phase of this study was carried out in three different climatic periods (rainy, transition, and dry), to determine the incidence of rainfall on the concentrations of both medicines in the main rivers of Colombia and their effects on the catfish long-whiskered magdalenean catfish *Pseudoplatystoma magdaleniatum*. The analytes were obtained by solid-phase extraction (SPE) and those from muscle tissue by QuEChERS; both matrices were quantified by Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer (UHPLC-MS/MS). In this first stage, neither ibuprofen nor diclofenac levels were found in *Pseudoplatystoma magdaleniatum* muscle tissue above the limit of quantification (20 µg/kg), at any station or sampling site. On the other hand, in water, concentrations of up to 75 µg/L of diclofenac were detected in some sampling sites, in the dry period, being the highest reported so far in surface waters. For ibuprofen, no concentrations above the limit of quantification (0.50 µg/L) were found in the waters of the Cauca and Magdalena rivers, in any climatic season or sampling site.

In the second stage, the effect of ibuprofen and diclofenac as endocrine disruptors in catfish was determined under laboratory conditions. For this purpose, fish were divided into three groups and exposed to concentrations of 0 (control), 25, and 50 µg/L of ibuprofen and diclofenac, respectively, for four months. Blood and semen samples were collected after the acclimatization period and after four months of exposure. The parameters analyzed to determine possible alterations were sperm quality, vitellogenin levels, DNA damage, and enzyme markers (lactate dehydrogenase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase,

gamma-glutamyltransferase, acetylcholinesterase, creatine kinase, lipid peroxidation, albumin, globulins, creatinine, and urea).

Analyses to determine sperm quality were performed both *in vivo* and *in vitro*. For the analysis of sperm quality of each treatment (*in vivo*), males were selected at the spermiation stage. Semen from the control group was used for *in vitro* testing and activated with aqueous solutions containing 0, 25, and 50 µg/L ibuprofen. Exposure to concentrations of 50 µg/L ibuprofen in both tests showed that the sperm quality of the catfish long-whiskered magdalenean decreased statistically when compared to the other treatments, which could represent a threat to the reproduction of this fish if the concentrations of ibuprofen in the main rivers of Colombia were  $\geq 50$  µg/L.

Both DNA damage and vitellogenin levels in males and females were performed on blood samples. For the determination of DNA integrity and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi M$ ), whole blood was used and analyzed by flow cytometry. The results indicate that there were no alterations in mitochondrial membrane potential and the percentages of DNA damage were below 0.39%, at the two concentrations of ibuprofen during the four months. Similarly, vitellogenin levels measured by ELISA kit were maintained at an average of  $124.8 \pm 16.7$  ng/mL in males and females, with no statistical differences after the four months of ibuprofen exposure, indicating that none of these parameters were altered by exposure to 25 and 50 µg/L ibuprofen concentrations.

The different enzyme markers were performed on blood samples after exposure to ibuprofen and triclosan for four months. The results established that both ibuprofen and triclosan at concentrations of 25 and 50 µg/L can cause alterations in *P. magdaleniatum*, interfering with the activity of certain enzymes associated with energy production, immune response, cellular architecture, and physiology.

Human intervention in nature has produced negative impacts on ecosystems. Therefore, science and technology have set themselves the task of searching for solutions to different environmental problems. Environmental engineering is linked to complimentary disciplines, such as biology, ecology, and traditional knowledge, in the search for sources and possible technologies to foresee and mitigate environmental impacts, in addition to being able to guide the government and the private sector on alternatives that allow the conservation of biodiversity. This study focused on the search for sources and possible solutions such as the exhaustive treatment of all waters, in which an efficient process of removal or reduction of contaminants is carried out, ensuring safe waters for both human consumption and for the animals that live in them, all this is possible with the creation of new guidelines and norms on the maximum limits of contaminants present in the waters.

**Keywords: Neotropical fish; nonsteroidal anti-inflammatory; contamination; alteration; rivers.**

# Contenido

Agradecimientos .....	4
Resumen .....	6
Abstract.....	8
Abreviaturas .....	15
1. Introducción.....	18
2. Objetivo .....	22
2.1. General .....	22
2.2. Específicos.....	22
3. Marco teórico .....	23
3.1. Productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs).....	23
3.1.1. Persistencia .....	24
3.1.2. Bioacumulación.....	24
3.1.3. Toxicidad .....	25
3.1.4. Fuentes y transporte .....	27
3.1.5. Transformación y degradación ambiental.....	28
3.1.6. PPCPs en el agua dulce .....	29
3.2. Cuenca del Magdalena, área de estudio .....	30
3.2.1. Desarrollo de la pesca en la cuenca .....	32
3.2.2. Pérdida o cambios en el hábitat .....	34
3.2.3. Extracción de metales preciosos y otros productos mineros .....	34
3.2.4. Sobrepesca.....	35
3.2.5. Calentamiento global .....	35
3.2.6. Contaminación .....	35
3.3. Bagre rayado de Magdalena, <i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i> .....	36
3.3.1. Taxonomía.....	36
3.3.2. Alimentación y reproducción.....	37
3.3.3. Normatividad .....	38
3.3.4. Extracción de Bagre rayado del Magdalena .....	39
3.4. Disrupción endocrina en peces de agua dulce .....	40
3.4.1. Características y modos de acción .....	41
3.4.2. Afección de DEs en peces de agua dulce respecto a animales terrestres .....	43
3.5. Métodos de análisis.....	45
3.5.1. Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (UHPLC QqQ-MS/MS).....	45

3.5.2.	Técnicas de extracción .....	47
3.5.3.	Análisis de espermatozoides asistido por computadora (CASA por sus siglas en inglés Computer Assisted Sperm Analysis) .....	51
3.5.4.	Citometría de flujo .....	54
3.5.5.	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) .....	59
4.	Capítulo 1. Implementación de un método analítico para la determinación de ibuprofeno, diclofenaco y triclosán en muestras de aguas ambientales, mediante SPE UHPLC-QqQ-MS/MS	63
4.1.	Materiales y métodos .....	66
4.1.1.	Reactivos, solventes y materiales.....	66
4.1.2.	Extracción en fase sólida (SPE) .....	67
4.1.3.	Equipo y condiciones cromatográficas .....	68
4.2.	Análisis estadístico.....	69
4.3.	Implementación del método analítico.....	69
4.3.1.	Confirmación de identidad .....	69
4.3.2.	Selectividad .....	72
4.3.3.	Linealidad.....	73
4.3.4.	Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).....	75
4.3.5.	Veracidad.....	75
4.3.6.	Precisión y exactitud .....	76
4.3.7.	Incertidumbre .....	77
4.4.	Conclusión.....	78
	Resumen gráfico .....	79
5.	Capítulo 2. Extracción por QuEChERS para la determinación de ibuprofeno y diclofenaco en muestras de tejido muscular de peces, mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.....	80
5.1.	Materiales y métodos .....	81
5.1.1.	Reactivos, solventes y materiales.....	81
5.1.2.	Extracción por QuEChERS .....	81
5.2.	Análisis estadístico.....	82
5.3.	Aplicación del método analítico .....	82
5.3.1.	Linealidad.....	82
5.3.2.	Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).....	84
5.3.3.	Veracidad.....	84
5.4.	Conclusión.....	86
	Resumen gráfico .....	87

6. Capítulo 3. Estado actual de contaminación por ibuprofeno y diclofenaco en <i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i> proveniente de los ríos Cauca y Magdalena, determinado en tres períodos climáticos.....	88
6.1. Materiales y métodos .....	92
6.1.1. Reactivos, solventes y materiales.....	92
6.1.2. Recolección de muestras.....	92
6.1.3. Preparación de muestras de agua y músculo.....	94
6.2. Análisis estadístico.....	94
6.3. Resultados.....	94
6.4. Discusión.....	97
6.5. Conclusión.....	103
Resumen gráfico .....	104
7. Fase experimental .....	105
7.1. Determinación de las concentraciones de experimentación.....	107
8. Capítulo 4. Efecto <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> sobre la calidad espermática del Bagre rayado <i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i> sometido a diferentes concentraciones de ibuprofeno. ....	108
8.1. Materiales y métodos .....	110
8.1.1. Peces .....	110
8.1.2. Extracción de la muestra.....	110
8.1.3. Motilidad total, tipos de motilidad, progresividad total y velocidad de los espermatozoides <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	111
8.1.4. Duración de la motilidad .....	111
8.1.5. Concentración espermática.....	111
8.2. Análisis estadístico.....	111
8.3. Resultados.....	112
8.4. Discusión.....	114
8.5. Conclusión.....	116
Resumen gráfico .....	118
9. Capítulo 5. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial y la integridad del ADN en <i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i> , cuando se expone durante períodos prolongados a diferentes concentraciones de ibuprofeno. ....	119
9.1. Materiales y métodos .....	121
9.1.1. Peces .....	121
9.1.2. Extracción de la muestra.....	121
9.1.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_M$ ) .....	121
9.1.4. Determinación de la integridad del ADN .....	122
9.1.5. Análisis de citometría de flujo .....	122

9.2.	Análisis estadístico.....	124
9.3.	Resultados y discusión.....	124
9.4.	Conclusión.....	128
	Resumen gráfico .....	130
10.	Capítulo 6. Determinación de vitelogenina en machos y hembras de <i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i> , expuestos a diferentes concentraciones de ibuprofeno.....	131
10.1.	Materiales y métodos.....	133
10.1.1.	Peces.....	133
10.1.2.	Extracción de la muestra .....	133
10.1.3.	Preparación y análisis de muestras de vitelogenina mediante Kit ELISA.....	133
10.2.	Análisis estadístico .....	134
10.3.	Resultados y discusión .....	134
10.4.	Conclusión .....	136
	Resumen gráfico .....	138
11.	Hepatotoxicidad en peces causada por diclofenaco .....	139
11.1.	Caso de estudio .....	140
12.	Capítulo 8. Cambios en la actividad enzimática del Bagre <i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i> inducidos por la exposición a diferentes concentraciones de ibuprofeno y triclosán .....	147
12.1.	Materiales y métodos.....	148
12.1.1.	Peces.....	148
12.1.2.	Extracción de la muestra .....	149
12.1.3.	Análisis bioquímico .....	149
12.1.4.	Análisis de proteína, creatinina, úrea, albúmina, globulinas, creatina quinasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutaminotransferasa, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa y lactato deshidrogenasa .....	149
12.1.5.	Acetilcolinesterasa .....	149
12.1.6.	Peroxidación lipídica .....	150
12.2.	Análisis estadístico .....	150
12.3.	Resultados y discusión .....	150
12.3.1.	Estado actual de la contaminación por ibuprofeno y triclosán en <i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i> de los ríos Magdalena y Cauca.....	150
12.3.2.	Membrana mitocondrial.....	151
12.3.3.	Daño hepático .....	156
12.3.4.	Neurotoxicidad .....	158
12.3.5.	Daño muscular.....	159
12.3.6.	Estrés oxidativo .....	159

12.4.	Conclusión .....	162
	Resumen gráfico .....	163
13.	Conclusiones.....	164
14.	Productos asociados .....	166
14.1.	Publicaciones científicas.....	166
14.2.	Sometidos .....	166
14.3.	Participación en congresos / foros .....	166
	Bibliografía .....	168

## Abreviaturas

### Abreviatura Término

---

AChE	Acetilcolinesterasa
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
ALH	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza
ALT	Aminotransferasa
ANLA	Autoridad Colombiana de Licencias Ambientales
ANOVA	Análisis de varianza
AST	Aminotransferasa
ATP	Adenosina-trifosfato
BCF	Frecuencia de batimento
BCF	Factor de bioconcentración
BCFk	Factor cinético de bioconcentración
BFCOD	Benciloxi-4-trifluorometilcumarina-O-desbenciloxilasa
CAT	Catalasa
CINPIC Córdoba	Instituto de Investigaciones en Cultivo de Peces de la Universidad de
CK	Creatina quinasa
CL 50	Concentración media letal
COX	Ciclooxygenasa
CYP450	Citocromos P450
DE	Disruptores endocrinos
DTNB	5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato
EA	Agencia de Medio Ambiente
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
EQS	un Environmental Quality Standards
ESI	Ionización por electrospray
EU	Unión Europea
ev	Energía de colisión
FDA	Agencia de Medicamentos y Alimentación
GA	Ácido glucurónico

GDCON	Grupo de Diagnóstico y Control de la Contaminación
GGT	Glutaminotransferasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación-S-transferasas
Hb	Hemoglobina
Hct	Hematocrito
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
LDH	Lactato deshidrogenasa
LIN	linealidad de la motilidad de los espermatozoides
LOAEL	Nivel más bajo de efectos adversos observados
LoD	Límite de detección
LoQ	Límite de cuantificación
LPOX	Peroxidación lipídica
m/z	Masa/carga
MCH	Hemoglobina celular media
MCV	Volumen celular medio
MDA	Malondialdehído
MeOH	Metanol
MetHb	Metahemoglobina
OD	Densidad óptica
PCP	Productos de cuidado personal
PI	Yoduro de propidio
PPCP	Productos farmacéuticos y de cuidado personal
PTAR	Planta de tratamiento de agua residual
QqQ	Triplecuadrupo
RIA	Radioinmunoensayo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SD	Desviación estándar
sGnRH	Hormona análoga del salmón
SIU	Sede de Investigación Universitaria

SOD	Superóxido dismutasa
SPE	Extracción en fase sólida
SRID	Inmunodifusión radial simple
STR	Rectitud
TBA	2-tiobarbitúrico
TOSC	Oxirradicales
U	Incertidumbre
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta rendimiento
VAP	Velocidad de trayectoria media
VCL	Velocidad curvilínea
VSL	Velocidad en línea recta
VTG	Vitelogenina
WBC	Leucocitos
WOB	Oscilación espermática
ZCIT	Zona de convergencia intertropical

# 1. Introducción

Actualmente, la calidad de los ambientes acuáticos se ve comprometida por la entrada de contaminantes principalmente de actividades antropogénicas (1). La mayoría de los productos farmacéuticos están diseñados para modular la fisiología y el comportamiento humano, provocando respuestas biológicas a dosis relativamente bajas y conservando relativamente bien sus efectos biológicos entre las especies de vertebrados (2). Estos compuestos comprenden una amplia diversidad de compuestos no regulados de preocupación emergente, que se encuentran en todo tipo de aguas, así como en la biota acuática, y pueden causar efectos adversos en el ecosistema, los organismos no objetivo y la salud humana (3–5).

En todo el mundo, se utilizan diariamente miles de productos farmacéuticos para el consumo humano, incluidos antibióticos, antidepresivos, hormonas y medicamentos antiinflamatorios no esteroides. Por lo tanto, se pueden esperar alteraciones en el comportamiento, el sistema endocrino, la flora bacteriana intestinal, así como composición alterada de ácidos grasos en algunos animales acuáticos, como los peces, que están expuestos a un ambiente contaminado por productos farmacéuticos (6). Los residuos de estos medicamentos son vertidos al medio acuático, ya sea por vertidos directos de efluentes domésticos y hospitalarios o por procesos hidrológicos y atmosféricos (7,8). Por lo tanto, se pueden encontrar en aguas residuales, aguas residuales tratadas, aguas superficiales y aguas subterráneas, en concentraciones generalmente bajas en ng/L o µg/L, pero que tienen efectos debido a su descarga continua en el medio acuático (5,9–11).

Es importante tener en cuenta que las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) no están diseñadas para la eliminación productos farmacéuticos y su eliminación es incompleta o nula (12). Por esta razón, se usan las tecnologías de oxidación avanzada, para eliminar este tipo de compuestos (2,6,7,13).

Actualmente existen diferentes normativas, según el país o la región, las cuales establecen los requisitos los vertimientos de las PTAR, en general estos corresponden a demanda química de oxígeno, demanda bioquímica de oxígeno y sólidos totales en suspensión. Sin embargo, con estos parámetros no es posible evaluar el aspecto toxicológico, siendo el enfoque más adecuado para su evaluación del uso de bioindicadores (7).

Los bioindicadores sirven como indicadores medibles relativamente simples de un proceso o función bioquímica, fisiológica, toxicológica o ecológica que se ha correlacionado con los efectos sobre organismos, poblaciones, comunidades o ecosistemas (14,15). Uno de los bioindicadores más utilizados en el ecosistema acuático son los peces, ya que pueden encontrarse en casi todos los lugares del medio acuático y tiene una función ecológica importante en todos los niveles tróficos (8,16). Además, los peces pueden reflejar sensiblemente las concentraciones de contaminantes en el ambiente en el que se encuentran (3,8,16) y convertirse en una herramienta para detectar los efectos de fármacos generando de forma temprana una visión general del estado del ecosistema acuático (8,16,17).

La cuenca del Magdalena es la principal de Colombia en términos de desarrollo y economía, esta sustenta aproximadamente el 80% de la población colombiana (18–20). El río Magdalena es su principal afluente seguido por el río Cauca. Ambos se originan en el Macizo Colombiano donde se encuentran los ramales oriental y central de los Andes colombianos (19). En los principales ríos de Colombia, habita el bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum* (Buitrago-Suárez y Burr 2007), el más grande de toda la cuenca del Magdalena; alcanzando los 1.5 m de longitud y pesos hasta de 75 kg (21). Este pez es el segundo producto pesquero dulceacuícola de importancia comercial en el país, además es de amplio consumo humano por su carne magra y sin espinas intramusculares (21). El hábitat de estos Bagres son los canales de los grandes ríos, lagunas y ciénagas, con preferencias por sitios con troncos, ramas sumergidas o vegetación acuática (21). El *P. magdaleniatum* presenta dos periodos de migración anuales, el primero ocurre en época de "subienda", con fines de reproducción y el segundo en "bajanza" cuando los peces regresan de sus zonas de desove, río arriba, hacia las ciénagas y lagunas (21).

De acuerdo al libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia, el *P. magdaleniatum* se encuentra en peligro crítico de extinción, dicha declaratoria obedece a la disminución en más del 80% de las capturas en las últimas décadas (22). Esta disminución puede ser causada por diferentes razones: pérdida o cambios en el hábitat, extracción de oro de sedimentos y minería de oro, sobrepesca, cambio climático, embalsamientos de los ríos y contaminación (18,23–25).

La contaminación de la cuenca del Magdalena es el resultado de su mal manejo, el uso inadecuado de la tierra, la deforestación como resultado de la agricultura insostenible, la actividad minera, los cultivos ilícitos y el aumento de la urbanización (26). Cerca del 80% de la población colombiana está asentada en esta cuenca incluyendo las ciudades principales Bogotá, Medellín, Cali, Barranquilla y varios municipios, las cuales vierten sus desechos directamente a los ríos, al no contar con plantas de tratamiento de aguas residuales (18,26,27).

Dentro de los contaminantes presentes en algunos ríos del mundo (28,29,38,30–37) se encuentran los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs). Estos son un grupo de contaminantes emergentes con características fisicoquímicas que los distinguen de otros contaminantes (34). Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), el término "contaminante emergente" o "contaminante de preocupación emergente", se refiere a productos químicos y otras sustancias que no tienen regulación, que han sido "descubiertos" recientemente en corrientes naturales de agua, y que potencialmente causan efectos nocivos en la vida acuática en concentraciones ambientalmente relevantes, además son contaminantes que no se incluyen actualmente en los programas de control rutinarios y pueden ser candidatos a una futura regulación en función de su (eco)toxicidad, sus posibles efectos sobre la salud, la percepción del público y la frecuencia de aparición en los medios ambientales (39).

Las características que presentan la mayoría de PPCPs son su potencial de bioacumulación (40–42), persistencia en el medio acuático (10,41), poder de transformación (10,43,44) y capacidad de generar disrupción endocrina (10,32,34,41,45–49). Se entiende como disruptores endocrinos, aquellas sustancias capaces del alterar el equilibrio hormonal y la regulación del desarrollo embrionario, y como consecuencia producen efectos negativos sobre la salud de un organismo o de su descendencia (50). Para determinar dichas alteraciones en los animales acuáticos, específicamente en peces se ha contrastado el uso de diferentes biomarcadores de exposición, susceptibilidad o efecto que ponen de manifiesto cambios fisiológicos y biológicos a diferentes niveles (6,6,57,45,50–56).

El ibuprofeno y el diclofenaco se seleccionaron para su análisis ya que estos medicamentos son los más consumidos a nivel mundial (58,59). El ibuprofeno (ácido 2-(4-isobutilfenil) propiónico) ha sido catalogado con base a su importancia en la vida humana diaria como "medicamento esencial", ocupando el segundo lugar en ventas en Colombia [8]. Por su parte, el diclofenaco (ácido 2-[2-(2,6-dicloroanilino) fenil] acético) es el medicamento con el mayor número de registros sanitarios otorgados en Colombia (60). Tanto el diclofenaco como el ibuprofeno interfieren con la vía de la ciclooxigenasa, disminuyendo la catálisis de la biosíntesis de la prostaglandina a partir de ácido araquidónico, siendo las prostaglandinas responsables de funciones fisiológicas importantes, actuando como hormonas "locales" en procesos de reproducción, transporte de agua y la osmorregulación (52,61–63).

Ambos medicamentos tienen una alta disponibilidad en los cuerpos de agua, detectados con facilidad en ríos (49,64) y en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (65). Estos medicamentos están diseñados para ser biológicamente activos y una vez entran en las aguas pueden causar alteraciones en los peces (66,67), modificando las reacciones celulares en el hígado, riñón y branquias, entre otros

órganos (63,68). Estos también pueden causar alteraciones a diferentes niveles en peces (p.ej., cambios en la expresión génica, alteraciones bioquímicas y endocrinas, efectos citológicos e histológicos, entre otros) (69).

Para la determinación de las posibles alteraciones endocrinas en el bagre rayado del Magdalena, este estudio se dividió en 2 etapas: la primera en la que se cuantificaron en tres épocas climáticas los niveles de concentración de ibuprofeno y diclofenaco en agua a lo largo de los ríos Cauca y Magdalena, y en muestras de músculo de esta especie; la segunda etapa, 12 individuos fueron sometidos a dos concentraciones diferentes (25 y 50 µg/L) de cada uno de los medicamentos, durante cuatro meses de exposición. Las concentraciones a las que se sometieron los peces se determinaron teniendo en cuenta el LC50 (70). Los análisis de los diferentes parámetros se llevaron a cabo en el tiempo cero (después del periodo de aclimatación de los peces) y a los cuatro meses de exposición de ibuprofeno y diclofenaco. Los parámetros analizados fueron calidad espermática *in vivo* e *in vitro*, concentración de vitelogenina en machos y hembras, alteración en el ADN y biomarcadores enzimáticos.

Por lo tanto, el presente estudio pretende determinar si algunos productos farmacéuticos, como el ibuprofeno y el diclofenaco, suministrados en diferentes concentraciones en especímenes Bagre rayado de Magdalena pueden causar disrupción endocrina y ser una de las causas de su disminución en la cuenca del Magdalena. Es necesario determinar cómo los productos farmacéuticos presentes en las aguas, los cuales no se pudieron eliminar en las PTAR, pueden afectar seriamente la reproducción y por ende la decencia de esta especie. Siendo necesaria la información sobre los posibles factores que poder estar afectando la especie, para establecer estrategias para la conservación de la fauna acuática y los organismos que dependen de ella.

## 2. Objetivo

### 2.1. General

Determinar el impacto del ibuprofeno y diclofenaco en la capacidad reproductora del Bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum*.

### 2.2. Específicos

- Evaluar la concentración de ibuprofeno y diclofenaco en el Bagre *P. magdaleniatum* tomados en cuatro puntos del río Magdalena y el río Cauca en tres períodos climáticos: seca, transición y lluvia.
- Determinar la concentración de ibuprofeno y diclofenaco en agua tomada en cuatro puntos del río Magdalena y río Cauca en tres períodos climáticos: seco, transición y lluvia.
- Evaluar la calidad seminal del Bagre *P. magdaleniatum*, tras experimentar a diferentes concentraciones de ibuprofeno y diclofenaco como biomarcador de la disrupción endocrina con condiciones de control.
- Determinar el daño del ADN del Bagre *P. magdaleniatum*, después de haber experimentado a diferentes concentraciones de ibuprofeno y diclofenaco con condiciones de control.
- Cuantificar la vitelogenina del Bagre *P. magdaleniatum*, tras experimentar a diferentes concentraciones de ibuprofeno y diclofenaco como biomarcador de la disrupción endocrina con condiciones de control.
- Identificar los cambios en la actividad enzimática *del Pseudoplatystoma magdaleniatum*, inducidos por la exposición a diferentes concentraciones de ibuprofeno y triclosán.

## **3. Marco teórico**

### **3.1. Productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs)**

Los productos farmacéuticos son todos los medicamentos de prescripción o de venta libre, así como medicamentos terapéuticos veterinarios, para el tratamiento tanto de enfermedades humanas como animales. Dentro de estos, los productos de cuidado personal (PCP), se utilizan para el mejoramiento de la calidad de vida diaria. En los últimos años, ha aumentado la preocupación por la presencia de los PPCPs en los diferentes compartimentos del medio acuático, como el agua, sedimentos y la biota, en concentraciones que son capaces de generar efectos perjudiciales tanto para los animales acuáticos como los humanos. Este tipo de contaminantes se han convertido en una preocupación, ya que estos han aumentado tanto en la medicina humana como en la veterinaria, suponiendo una liberación constante al medio ambiente (34,71–73).

La Unión Europea (EU) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), han desarrollado una lista de contaminantes prioritarios, en la que se identifica una gran variedad de productos presentes en las aguas residuales, los cuales representa una amenaza para la biota. Por su parte la Agencia de Medio Ambiente (EA) de Inglaterra y Gales, propuso un sistema de clasificación de acuerdo con su riesgo relativo percibido de los PPCPs debido a su gran número y diversa naturaleza química (34). El sistema de clasificación utilizado fue una combinación de procedimientos para la evaluación de riesgos, criterios de persistencia, bioacumulación y toxicidad, así como ocurrencia en diferentes países, disponibilidad de métodos analíticos y la inclusión de compuestos representativos de diferentes clases terapéuticas (8,34,74,75).

La detección de compuestos químicos en cualquier matriz ambiental no siempre indica que puedan causar daño o alteraciones. Sin embargo, cuando estas sustancias se ha identificado que afectan negativamente la vida acuática y humana, estas requieren mayor atención. Dentro de las características que presentan estas sustancias se pueden destacar las siguientes:

### **3.1.1. Persistencia**

Por las características de la mayoría de los PPCPs hace que su eliminación no pueda llevarse a cabo en los procesos convencionales de tratamiento de agua residual, siendo un riesgo potencial para los organismos acuáticos y la salud pública. Aunque no todos los PPCPs son persistentes, su uso continuo y su liberación al ambiente hace que sean considerados como pseudo-persistentes (10,34). Los productos farmacéuticos denominados como pseudo-persistentes tienen un mayor potencial de persistencia en el medio ambiente comparados con otros contaminantes orgánicos, como pesticidas, ya que estos se renuevan continuamente, incluso cuando han sufrido procesos ambientales como biodegradación, fotodegradación y absorción (76–78). Se han establecido diferentes categorizaciones para los productos farmacéuticos: los de persistencia baja como ibuprofeno, acetaminofén, 2-hidroxiibuprofeno, carbamazepina-diol (entre 3.1-7 días de disipación) (34), los moderadamente persistentes como diclofenaco, oxazepam, iopromida e ivermectina (entre 15-54 días de disipación) y los de persistencia alta como el ácido clofibrico, diazepam, carbamazepina (entre 119-328 días de disipación) (34,79).

### **3.1.2. Bioacumulación**

Las concentraciones en las que se encuentran los PPCPs en el ambiente son generalmente bajas, sin embargo, sus metabolitos siguen siendo biológicamente activos y pueden afectar a organismos acuáticos (32,71,72,74). Muchos de los estudios en peces se han centrado en las posibles alteraciones causadas por la bioacumulación. Por ejemplo, un estudio realizado en carpines *Carassius auratus* expuestos a concentraciones ambientales de gemfibrozil durante 14 días, obtuvo un factor de bioconcentración plasmática de 113.

El factor de bioacumulación es la división de una sustancia química entre el agua y los organismos acuáticos en condiciones de equilibrio, cuando el factor es  $> 1$  indica que la acumulación en el organismo es mayor que la del medio (80). Los factores de bioacumulación en pez mosquito *Gambusia holbrooki* expuestos a cafeína, difenhidramina, diltiazem, carbamazepina e ibuprofeno fueron 2, 16, 16, 1.4 y 28, respectivamente. Similarmente, en la *Perca fluviatilis* se detectó un factor de bioacumulación de 12 por exposición a oxazepam (34), por lo tanto, los resultados anteriores representan una alta bioacumulación en los peces.

Los productos de cuidado personal (PCP), han sido detectados en algas, las cuales constituyen la mayor biomasa vegetal en el medio acuático. Al tener un alto contenido de lípidos, las algas constituyen un punto de entrada en la transferencia trófica de contaminantes lipofílicos. Agentes antimicrobianos como triclocarbán, triclosán y su metabolito metil-triclosán, se detectaron en algas recolectadas cercana a una planta de tratamiento de agua residual (PTAR) en Texas, las concentraciones de estos PCPs fueron bajas en muestras de agua entre 50 y 200 ng/L, mientras las concentraciones en las algas fueron entre 50 a 400 ng/g de peso fresco. Estas

muestras tuvieron factores de bioacumulación entre 700–1500, 900–2100 y 1600–2700 para para triclocarbán, triclosán y metil-triclosán, respectivamente (34).

### **3.1.3. Toxicidad**

Una de las principales preocupaciones de los PPCPs son las implicaciones tóxicas ya que algunos de estos compuestos fueron diseñados específicamente para maximizar su actividad biológica en dosis bajas e interferir con ciertos mecanismos metabólicos, enzimáticos o de señalización celular (34). Por esta razón, existe una gran posibilidad de que estos productos farmacéuticos sean activos en organismos no objetivo, dejando a la biota acuática expuesta involuntariamente a productos farmacéuticos en su medio natural, aumentando el riesgo de efectos ecotoxicológicos (34,43,81–83).

Ya que muchos PPCPs ingresan al medio acuático luego del uso humano o veterinario, la presencia de algunos metabolitos formados en humanos o animales pueden ser más peligrosos que las de los compuestos originales (34). Dentro de las preocupaciones planteadas por la presencia de estos PPCPs en el medio acuático se destaca la capacidad para interferir con el sistema endocrino (por medio de disruptores) y producir efectos no deseados (34). La OMS define un disruptores endocrinos (DE) como "sustancia o mezcla exógena que altera la función o funciones del sistema endocrino y, en consecuencia, causa efectos adversos para la salud en un organismo, su progenie o subpoblación" (84). Los disruptores pueden ser tanto naturales como sintéticos. Entre los más comunes se incluyen hormonas sexuales, glucocorticoides, hormonas de crecimiento veterinarias y algunas sustancias farmacéuticas no esteroideas entre otros, incluidos en los PPCPs (34).

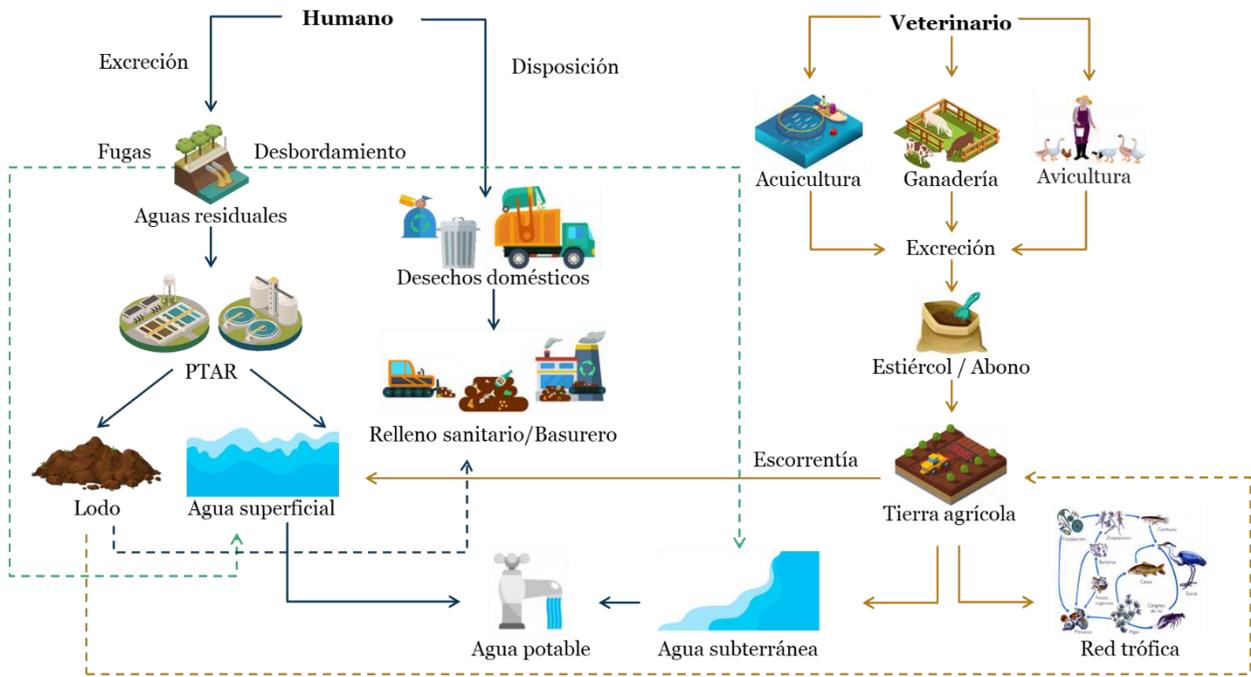
La presencia de PPCPs en el medio ambiente también podría generar la creación de cepas resistentes a los antibióticos en poblaciones bacterianas naturales, debido al uso excesivo de antibióticos tanto en la medicina humana como en la veterinaria, esta da como resultado la aparición y propagación de bacterias resistentes a los antibióticos (85). Investigaciones han encontrado correlaciones positivas entre microorganismos resistentes a los antibióticos y trazas de concentraciones de contaminantes antibióticos acuáticos (86), incluso en concentraciones sub-inhedoras, los antibióticos tiene la capacidad de generar un impacto biológico en las comunidades microbianas naturales influyendo en la transcripción en microorganismos (87).

En la actualidad se ha demostrado que la toxicidad de los PPCPs en el medio acuático vas más allá de los efectos observados cuando se superan los niveles terapéuticos. La toxicidad puede variar según el organismo expuesto, duración de la exposición, la concentración de contaminantes y la etapa de desarrollo en la que se produce la exposición (59,88–91). Algunas anomalías determinadas en etapas de desarrollo en

organismos no objetivo expuestos a PPCPs, pueden ser el resultado de exposiciones crónicas a niveles traza y no necesariamente a exposiciones agudas a dosis altas (92).

### 3.1.4. Fuentes y transporte

El ingreso de los PPCPs al medio ambiente se da a través de diferentes rutas (Figura 3-1). Las principales fuentes de PPCPs al medio ambiente son las PTAR y los vertimientos de aguas residuales sin tratar, este tipo de compuestos no se eliminan de forma completa durante los procesos convencionales de tratamiento de aguas, y son detectados incluso en aguas superficiales que han sido tratadas (10,34).



**Figura 3-1.** Fuentes de contaminación ambiental de los PPCPs. Ilustración modificada de (34).

Las vías de contaminación por PPCPs en el agua son diversas: después de ser ingeridos, la absorción en el cuerpo no es completa, y parte de estos o sus metabolitos son liberados a través de la excreción en el sistema alcantarillado o tanque séptico (93). Los PPCPs pueden descargarse a través de los desechos de la ducha, el baño, lavamanos y la natación (10,34).

En el tratamiento de las aguas residuales, los PPCPs pueden acumularse en los biosólidos, que posteriormente son aplicados como fertilizantes en tierras agrícolas; llegando en algunas ocasiones al agua subterránea a través de procesos de lixiviación (35,71,93,94) o a través de la escorrentía a las aguas superficiales. Otra vía de liberación de estos contaminantes, son las fábricas dedicadas a la producción de PPCPs, ya que las aguas residuales van directamente a la PTAR. Los medicamentos veterinarios por su parte se liberan al medio ambiente a través de los desechos de animales. Parte de estos, pueden ser utilizados como fertilizantes, contaminando el suelo e ingresando a la cadena alimentaria (10,34).

Algunos PPCPs tienen baja volatilidad y son de naturaleza altamente polar e hidrofílica, por esto su distribución en el ambiente se producirá principalmente a través del transporte acuoso y la dispersión de la cadena alimentaria (34,43,95). Los PPCPs pueden ser transportados a través de la sorción en el sedimento y de allí al medio acuático. El sedimento actúa como sumidero y los acumula, liberándolos al medio acuático (34,35,71,93,94). Se ha encontrado que algunos PPCPs (por ejemplo, sulfametoxazol, carbamazepina, triclosán y ciprofloxacina) son más persistentes en el sedimento que en el agua (34).

Aunque hay una disminución en la concentración de los PPCPs en el agua receptora por una adsorción a sedimentos o sólidos en suspensión, no significa que haya una reducción en la biodisponibilidad ni en la toxicidad de los PPCPs (34). Por esto, es posible que haya una liberación continua de estos compuestos de los sedimentos al agua suprayacente (34). Es difícil establecer los impactos toxicológicos de los PPCPs en los sedimentos de agua dulce, ya que los sedimentos actúan como sumideros de estos productos químicos (34).

### **3.1.5. Transformación y degradación ambiental**

Entre los procesos más comunes para la degradación de PPCPs, se encuentran la biodegradación, fotodegradación y la hidrólisis, los cuales pueden ayudar a reducir, eliminar o mineralizar estos contaminantes en el medio ambiente (10,34,81,96,97). La fotodegradación del compuesto dependerá de diferentes factores como la intensidad de la irradiación solar, profundidad del agua, composición de la materia orgánica, condiciones eutróficas, latitud y estacionalidad. Algunos compuestos como el diclofenaco pueden degradarse mediante fotólisis directa con un tiempo de vida media de <1 h, dependiendo de su concentración en el medio; el ibuprofeno, metronidazol y acetaminofén también se pueden degradar por fotólisis en aguas superficiales (34).

Algunos microorganismos utilizan sustratos de PPCPs a cierta concentración, ya sea como fuente de carbono o de energía (9,34,43). Estos microorganismos son capaces de degradarlos, sin embargo, cuando hay un aumento en las concentraciones de PPCPs es posible esta biodegradación se pueda inhibir ya que el compuesto se puede volver tóxico para los microorganismos (9,34,43).

En las PTAR, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de los PPCPs y de las condiciones del tratamiento, puede haber una eliminación completa, transformarse parcialmente en sus metabolitos o permanecer sin cambios (71,98–100). Por ejemplo, se ha comprobado que el uso de ibuprofeno en tratamientos biológicos en condiciones anóxicas es transformado a ácido carboxiiratrópico (34) y en condiciones óxicas, es transformado a hidroxibuprofeno y carboxibuprofeno, siendo el hidroxibuprofeno el metabolito con mayor toxicidad (101,102). En contraste, el diclofenaco tiene como principal mecanismo de degradación en el ambiente, la fotodegradación (103). En ensayos en condiciones controladas, utilizando luz

artificial simulando la radiación solar, pH 8 ( $pK_a = 4.15$ ), se obtuvo una fotólisis en 24 h, lo que representa una vida media calculada de  $0.40 \text{ días} \pm 0.05$ ; identificándose dos productos principales de degradación: ácido 8-clorocarbazol-1-acético ( $C_{14}H_{10}ClNO_2$ ) y ácido 2-(benzoilamino) benzoico ( $C_{14}H_{11}NO_3$ ), con un tiempo de degradación por completo de 4 días (103). El diclofenaco y sus fotoproductos pueden absorberse en sedimento y/o ser metabolizado por las plantas, invertebrados y peces (104).

### **3.1.6. PPCPs en el agua dulce**

Los primeros informes sobre PPCPs en el medio ambiente fueron en 1976, detectándose ácido clofibrico en concentraciones entre  $0.8$  y  $2 \mu\text{g/L}$ , en aguas tratadas de Kansas City, Estados Unidos (34). En 1981, se investigó la presencia de 25 productos farmacéuticos en el río Lee, norte de Londres, encontrándose concentraciones de hasta  $1 \mu\text{g/L}$  (34). A partir de ese momento, se han encontrado diversos PPCPs en todos los compartimentos ambientales de todo el mundo (34).

Aunque las concentraciones encontradas de PPCPs generalmente son bajas, hay una preocupación por su presencia y las implicaciones toxicas que pueden generar en los ambientes acuáticos (34). Algunos de estos contaminantes están diseñados para maximizar su actividad biológica en concentraciones bajas e interferir con ciertos mecanismos metabólicos, enzimáticos o de señalización celular (34), los cuales en organismos no objetivos pueden causar diversas alteraciones en la salud (13,100,105,106). Muchos de estos PPCPs tienen el potencial de persistir en el medio natural durante meses e incluso años (107), y en la mayoría de los casos sus metabolitos siguen siendo biológicamente activos y pueden afectar a los organismos (32,71,72,74). La detección de estos compuestos en el ambiente puede variar tanto entre países, así como en las diferentes regiones del mismo país, debido a interacciones fisicoquímicas y biológicas lo que dificulta las comparaciones en diferentes zonas (10,38,71,73,107).

### **3.2. Cuenca del Magdalena, área de estudio**

El río Magdalena nace en el extremo suroccidental del Colombia, ubicada en la planicie del Páramo de las Papas (Macizo colombiano), en el Departamento del Huila (108,109). Vierte sus aguas en el mar Caribe, en el sitio conocido como Bocas de Ceniza. El canal del Dique también es tributario de sus aguas, que llegan al mar en la bahía de Cartagena. En su recorrido recibe más de 500 ríos y muchas quebradas (18,108,110) (Figura 3-2).

El mayor afluente del río Magdalena es el Cauca, que comprende los departamentos del Cauca, Valle del Cauca, Quindío, Risaralda, Caldas, Antioquia, Córdoba, Sucre y Bolívar. Este nace el nudo de Almaguer (Macizo colombiano), en la laguna del Buey, en el páramo de Sotará. Este fluye entre las cordilleras Central y Occidental de los Andes, al seguir su curso sur-norte forma el valle, el cual tiene su nombre, hasta desembocar en la boca Guamal, municipio de Pinillos, Departamento de Bolívar, en la parte baja del río Magdalena (108).

El Magdalena, junto con su afluente principal, el río Cauca, conforman una cuenca con un área aproximada de 257438 km<sup>2</sup>, lo que representa casi la cuarta parte del territorio colombiano (18,110). La cuenca Magdalena-Cauca tiene un sistema fluvial de características únicas en todo el mundo, principalmente por su localización en el trópico y sus particulares propiedades de producción hídrica y sedimentológica (18,110). Además se destaca por su biodiversidad y producción ecosistémica, y por sus condiciones culturales, sociales y económicas (110).

El Magdalena recorre de sur a norte toda Colombia tocando 22 de los 32 departamentos y 728 de sus 1100 municipios (110). La cuenca enlaza 20 departamentos: Antioquia, Atlántico, Bolívar, Boyacá, Caldas, Cauca, Cesar, Chocó, Córdoba, Cundinamarca, Huila, La Guajira, Magdalena, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Santander, Sucre, Tolima y Valle del Cauca, de los cuales 8 quedan dentro de la cuenca. En sus orillas están asentados 129 municipios, 23 corporaciones autónomas regionales, 46 resguardos indígenas, 2 áreas de reserva campesina (110). El Magdalena es el principal punto de desarrollo del país, en términos de desarrollo y economía, sustentando aproximadamente el 80% de la población (18–20,111).

Su cuenca es drenada por el propio Magdalena y los ríos Cauca, Sogamoso y San Jorge (18,109). La parte inferior de la cuenca tiene un área aproximada de 22000 km<sup>2</sup>, que cuenta con una extensa llanura aluvial con diversas lagunas y marismas. El

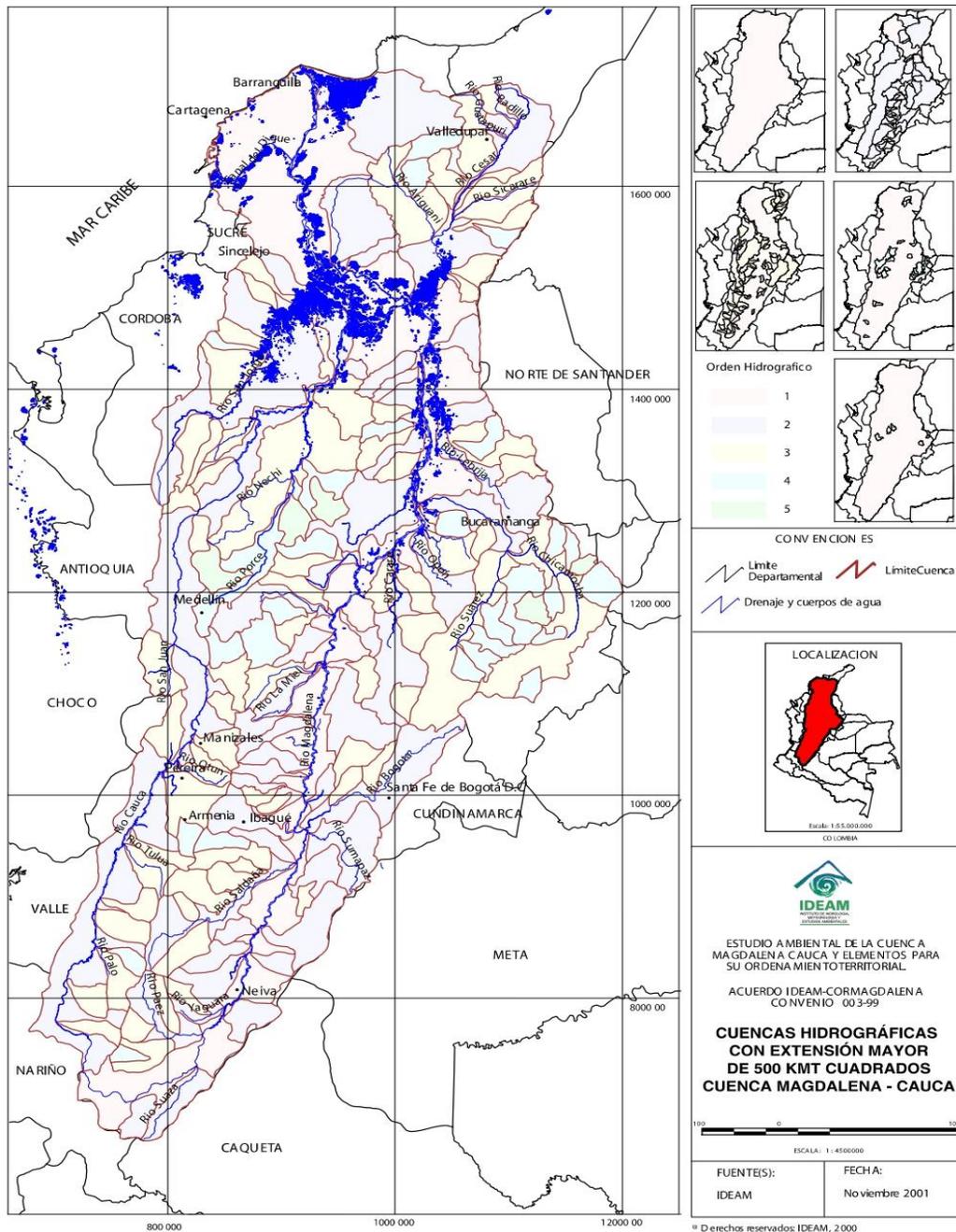
caudal medio en la desembocadura de este río alcanza los 7100 m<sup>3</sup>/s (18). En todo su recorrido, el río y sus afluentes forman humedales, ciénagas y lagunas costeras de valor hidrológico, geomorfológico, estético y productivo, siendo la base de una de las mayores ecodiversidades del mundo (110).

El régimen climático del área está regido por la Zona de Convergencia Intertropical (ZCIT), esta zona marca la convergencia entre el aire del hemisferio Norte y el hemisferio Sur (112). Por su flujo convergente, es la región de mayor nubosidad y lluvias. Presenta un período seco desde finales de diciembre hasta abril y una temporada de lluvias que comienza en mayo (112,113). La precipitación máxima se da en los meses de mayo, junio y octubre, y la temperatura media diaria fluctúa entre 26 y 28°C, pero es habitual que se superen los 35°C (112,113).

Colombia por estar dentro de la banda Tropical y Ecuatorial, genera ciertas condiciones que domina su clima y su hidrología, produciendo la más alta pluviosidad del planeta, el país más húmedo de Sur América y uno de los más húmedos del mundo (promedio de lluvias de 3000 mm de lluvia anual), y hacen del Magdalena uno de los ríos más caudalosos del mundo (18,109,110). Por estas condiciones apenas el 12% del país es tierra cultivable debido a la lixiviación del suelo, por lo que la población se concentra en los valles, mesetas andinas o en la costa Caribeña, donde la tierra es más fértil (18,110).

Las lluvias abundantes tampoco son buenas para los peces, ya que los suelos lixiviados generan escasez de sales minerales y ríos de baja productividad pesquera (18,114). La cuenca del Magdalena tiene menos precipitaciones, y por esto tiene pesquerías más productivas comparadas con el Orinoco colombiano, la Amazonia o las tierras bajas del Pacífico (18).

Estratégicamente la cuenca está dividida en tres regiones que son el alto, medio y bajo Magdalena. El alto Magdalena tiene su origen en el departamento del Huila y se desarrolla hasta el municipio de Honda (300 km<sup>2</sup>), el medio Magdalena comprende todo el sur del Cesar (551 km<sup>2</sup>) y el bajo Magdalena es la ampliación de los valles inundables hasta la desembocadura del río Magdalena (19).



**Figura 3-2.** Cuencas hidrográficas de la Cuenca Magdalena-Cauca. Tomado de (109).

### 3.2.1. Desarrollo de la pesca en la cuenca

La cuenca tiene una riqueza íctica de 179 especies, de las cuales 40 son de interés comercial y varias especies introducidas como las cachamas, tilapias, carpas y truchas tienen un amplio potencial para la acuicultura (19).

Según los registros multianuales, la cuenca presenta un ciclo hidrológico con cuatro periodos, asociados con los movimientos de los peces migradores (reofilicos o potamódromos), subienda en los meses de diciembre a marzo, bajanza de abril a junio, mitaca de julio a agosto y bajanza de mitaca de septiembre a noviembre, estas temporadas pueden variar cada año (19). Estos periodos determinan las dinámicas biológicas y pesqueras de la cuenca (19,115).

En las últimas décadas, las pesquerías en la cuenca del Magdalena han una reducción acelerada en las capturas, así como una inclusión de especies de menor calidad, que no se capturaban antes. En su mejor época la cuenca produjo más del 60% del pescado consumido en el país, en el que se destaca el *Prochilodus magdalenae* (bocachico), *P. magdaleniatus* (Bagre rayado) y *Pimelodus clarias* (blanquillo). De una producción de aproximadamente 80000 toneladas métricas de pescado al año, correspondiente a los años 70 (18), en la actualidad (último reporte 2016) solo se produce 16% de la producción total histórica (19).

En los años 1940's, las pesquerías capturaban los peces de mayor tamaño, como el *P. magdaleniatus* y *Tarpon atlanticus*. Para ese entonces con 12 millones de habitantes, la cuenca media y baja del Magdalena consumía todo el pescado capturado de manera local, ya que no había medio para transportar el pescado a otras ciudades del país (18).

A finales de 1960, con casi el doble de la población y con mejores medios de transporte, hubo un aumento en las pesquerías, capturando principalmente *P. magdalenae*. Para este año comenzó la Alianza del Programa Estadounidense para el Progreso (Revolución Verde), en que se promovía la pesca fluvial y la piscicultura (18).

En 1978, se realizaron estimaciones con rendimientos entre 60000 y 80000 toneladas/año y sólo 12 años después, las capturas solo fueron una décima parte de este valor (18). Una vez que se redujeron las capturas de las especies comerciales, se comenzó a capturar especies de menor calidad como *Pimelodus clarias* (nicuro), *Sorubim cuspicaudus* (blanquillo), *Ageneiosus pardalis* (doncella), *Brycon moorei* (dorada) y *Plagioscion magdalenae* (pacora). Posteriormente, se comenzó a capturar y consumir peces de baja calidad y menor tamaño como *Cyphocharax magdalenae* (yalúa), *Centrochir crocodilii* (dorada), *Trachycorystes insignis* (chivo) y *Hoplosternum magdalenae* (chipe), estas especies pequeñas tiene una menor fecundidad comparadas con las especies reófilas de las que se componen la mayor parte de las pesquerías y son mucho más sensibles a la sobrepesca (18,19).

En los años 1990, se registraron capturas inferiores a las 10000 toneladas/año, las cuales se les atribuyó no solo a la sobrepesca sino por las intensas sequías causadas por el fenómeno del Niño (18). En los siguientes dos- tres años, las capturas comenzaron a subir a 15000 toneladas/año, lo que demuestra la capacidad de los diferentes Bagres para proliferar después de períodos críticos (18).

Dentro de las razones causantes de la disminución de las capturas se pueden destacar:

### **3.2.2. Pérdida o cambios en el hábitat**

Se refiere a las modificaciones del ambiente en el que viven las especies, ya sea por su completa eliminación, fragmentación o disminución de la calidad o las características esenciales del hábitat (23). Dentro de las causas más comunes de este deterioro se encuentran la agricultura y la ganadería intensiva, la tala, el desarrollo urbano e industrial, la producción de energía no renovable y la minería. En ambientes de agua dulce, como la cuenca del Magdalena, las mayores problemáticas que conllevan cambios en el hábitat son la fragmentación de los cuerpos de agua y el mal uso del recursos (23).

Las condiciones ambientales de la cuenca del Magdalena han sufrido cambios radicales principalmente en las últimas décadas. Entre los eventos más representativos se destacan la transformación de grandes extensiones de bosques de montaña en plantaciones de café en la primera mitad del siglo XX; la expansión de la ganadería que destruyó aproximadamente 40000 km<sup>2</sup> de selva tropical en el Valle Medio del Magdalena, entre los años 1950 a 1980; la ganadería intensiva que aumentó el transporte de sedimentos los cuales obstruyeron canales y lagunas en el valle inferior, afectando las pesquerías del Magdalena (18).

### **3.2.3. Extracción de metales preciosos y otros productos mineros**

La extracción de oro ha eliminado grandes extensiones de las llanuras aluviales, además de aumentar la cantidad de sedimentos que se transportan por los ríos, causando la obstrucción de canales y lagunas. Por otra parte, la minería ilegal de oro utiliza mercurio para su amalgamación el oro, generando bioacumulación de este metal pesado en los ecosistemas (18).

Por otra parte, la extracción de yeso genera contaminación a las fuentes hídricas por sus vertimientos puntuales del suelo a las aguas sin tratar utilizadas para el lavado del mineral, generando contaminación por las impurezas presentes en el yeso extraído. En algunos casos esta contaminación puede ser imperceptibles, sin embargo, se deben considerar que ya su extracción es permanente y puede afectar irreversiblemente a los acuíferos a través de las zonas de recarga, por infiltración o procesos kársticos producto de la disolución del yeso [1].

La producción de cemento genera residuos rocosos y cambios en las propiedades de la vegetación y del suelo, provenientes de la extracción de materias primas. Paralelamente la fabricación genera partículas suspendidas, dióxidos de azufre, dióxidos de nitrógeno y en menor proporción otros tipos de gases (116).

### **3.2.4. Sobrepesca**

La sobrepesca se refiere a la captura de ejemplares cada vez más pequeños, que aún no han entrado a su etapa reproductiva o no se han reproducido por primera vez, llevando al empobrecimiento genético y una posible extinción de la especie (23). Esta situación se potencia por el uso de métodos de pesca ilegales como trasmallos, barbasco, taponamiento de ciénagas durante la subienda y dinamita (23).

De acuerdo con el censo realizado a pescadores en el 2015, existen cerca de 32800 personas dedicadas a la captura de productos pesqueros en la cuenca Magdalena-Cauca (111). A pesar de que este número se ha mantenido casi constante en las últimas 4 décadas (ver (111)), hay un exceso de pescadores debido a la falta de oportunidades laborales en la región, lo cual ha generado sobrepesca y un impacto negativo en las capturas (las cuales oscilan entre 5991 y 17000 toneladas/año en el mejor de los casos). La sobrepesca se vuelve más evidente en los periodos de migración, cuando hay desove río arriba de la mayoría de peces, al comienzo de periodo seco, donde se extrae el 60% de la captura total del año en la cuenca (18).

### **3.2.5. Calentamiento global**

A medida que aumenta la temperatura, las especies deberán adaptarse, modificando sus rangos de hábitat para poder establecerse en zonas con climas más aptos. Los cambios en la temperatura pueden provocar en peces cambios en fenómenos biológicos como la migración y la reproducción (23).

### **3.2.6. Contaminación**

La contaminación afecta de manera directa a las especies cuando se vuelve insostenible para la supervivencia, e indirectamente cuando altera la disponibilidad de alimentos y la reproducción, causando una disminución de la población (23). La mayor parte de núcleos urbanos asentados a lo largo de la cuenca no tienen plantas de tratamiento de aguas residuales, por lo que se vierten sus aguas residuales directamente a los ríos. Entre los principales contaminantes vertidos directamente a los cuerpos de agua se encuentran organoclorados relacionados con escorrentía agrícola, metales pesados procedentes principalmente de actividades industriales y minería, desechos de actividades relacionadas con el petróleo y residuos de fármacos (18,26,27).

### **3.3. Bagre rayado de Magdalena, *Pseudoplatystoma magdaleniatum***

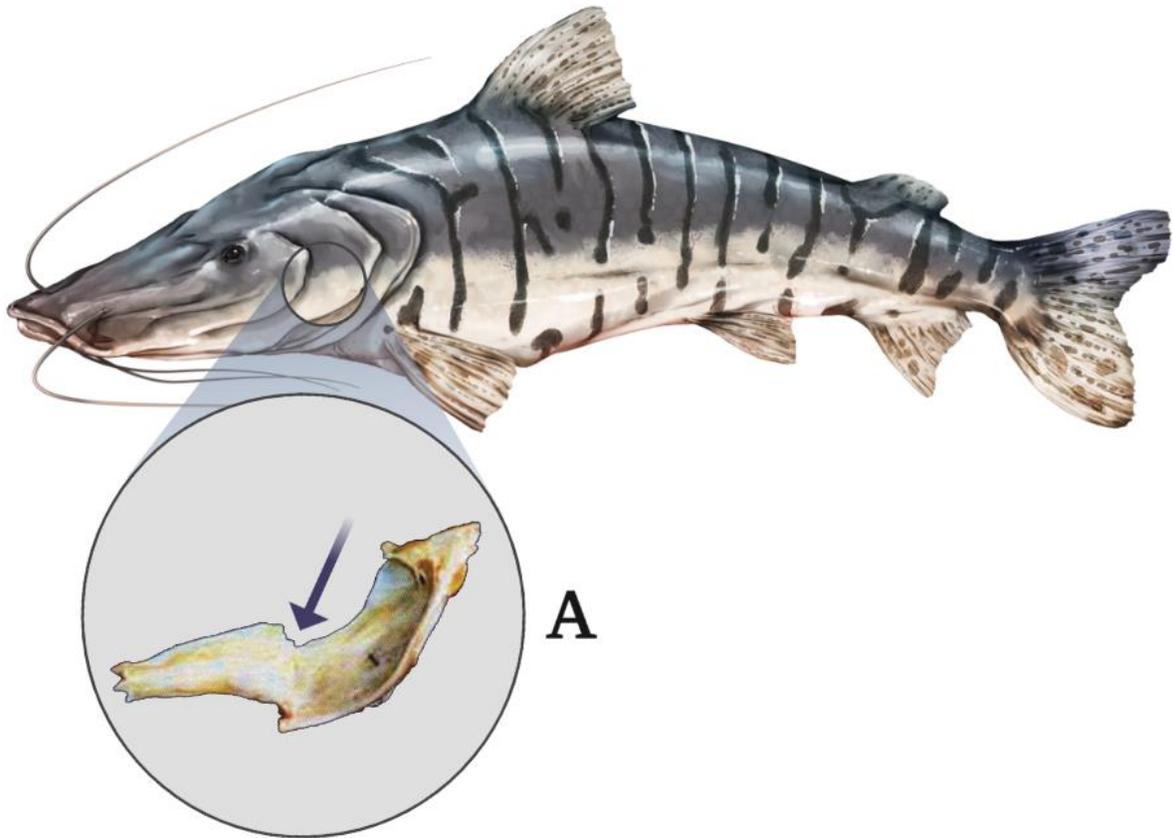
#### **3.3.1. Taxonomía**

En la actualidad la familia Pimelodidae está compuesta por 30 géneros y 90 especies reconocidas, todas ubicadas en aguas dulces de Sur América (117). El *Pseudoplatystoma*, es un conjunto monofilético de poblaciones de Bagres con rayas o manchas pertenecientes a la familia Pimelodidae (117). En el río Magdalena, se consideraba a todos los Bagres como *P. fasciatum*, pero fue posible diferenciarlos de otras especies por tener radios no ramificados en la aleta caudal y una muesca distintiva en el suspensorio (características desde el levantamiento de la Cordillera Oriental, 13–11.5 millones de años), Figura 3-3; por esto el *Pseudoplatystoma magdaleniatum* antes era conocido como *P. fasciatum* del río Magdalena (117).

*P. magdaleniatum* se caracteriza por presentar radios en los lóbulos dorsal y ventral de la aleta caudal con ramas fusionadas o no separadas como en otras especies de *Pseudoplatystoma*; líneas verticales anchas, rectas y oscuras en los lados; sin bucles en el cuello y su alrededor; región dorsal y ventral de la aleta pectoral pálidas sin manchas; aleta dorsal con pocas o ninguna mancha; 43 vértebras; aleta adiposa con pocas manchas grandes; áreas que rodean los radios procurrentes de la aleta dorsal sin manchas; región posterior del metapterigoide más ancha que en otras especies, formando una depresión o muesca en el margen dorsal del suspensorio (117), Figura 3-3A.

Asimismo, presenta el cuerpo alargado y delgado, con un margen anterior de la cabeza redondeada (117). Su región dorsal posterior de la cabeza es rugosa y con surcos distintivos (117). También presenta proceso supraoccipital con una cresta, fontanela mediana corta, que se extiende desde la longitud media del mesetmoides hasta la conexión de los frontales al supraoccipital, pero sin piel áspera en la fontanela y fosas nasales anteriores cortas (117). Posee una pigmentación corporal oscura en lados dorsal y lateral sin delimitación clara entre áreas pálidas y oscuras, además tiene barras oscuras que se extienden más allá de la línea lateral con barras pálidas, con barras que conectan dorsalmente con las del lado opuesto (117). La región posterior a la aleta dorsal con algunas barras oscuras medianas, la aleta caudal tiene lóbulos redondeados o terminados en punta y la aleta adiposa tiene igual longitud a la base de la aleta anal (117). El cuerpo presenta una coloración gris oscura en la región dorsal con 10 a 11 bandas verticales claras y oscuras, las aletas tienen

pequeñas manchas oscuras, la zona ventral es blanca; las aletas dorsales y pectorales presentan una espina dura, punzante y aserrada que inyecta una ictiotoxina (21,117), Figura 3-3.



**Figura 3-3.** Taxonomía *Pseudoplatystoma magdaleniatum*. A, suspensorio, la flecha apunta a la muesca en el margen dorsal del suspensorio. Ilustración modificada de (117).

Esta especie puede alcanzar los 150 cm de longitud y 75 kilogramos de peso (21). Este pez habita en la cuenca del río Magdalena, con la excepción de algunas zonas como el bajo Magdalena, el canal del Dique ya que no tolera aguas salobres; el alto Cauca, ni en la cuenca del río Sinú (21). El bagre de Magdalena se distribuye en los canales de los grandes ríos, lagunas y ciénagas, con preferencias por sitios con troncos, ramas sumergidas o vegetación acuática (21).

### **3.3.2. Alimentación y reproducción**

El *P. magdaleniatum* es un pez carnívoro, prefiriendo peces de las familias Characidae y Curimatidae y en algunas ocasiones camarones (21). Cuando son alevinos (menores a 10 cm), se alimentan de insectos (21).

El Bagre rayado migra en dos épocas del año, la primera ocurre en época de "subienda", desde las ciénagas localizadas en las zonas medias y bajas de las cuencas, hacia las partes altas de los ríos donde se reproduce. Durante esta migración, sus gónadas terminan de madurar (21). La segunda se da en "bajanza", cuando los peces adultos y delgados regresan de sus zonas de desove, río arriba, hacia las ciénagas y lagunas (21). Estas migraciones están relacionadas con los patrones de las lluvias y los movimientos de los peces de los que ellos se alimentan (21).

La reproducción se realiza sin cuidado parental, los huevos semiflotantes son depositados en el canal de río, quedando en la corriente del río para que se incuben y logren su desarrollo larval. Después de tres meses aproximadamente, los alevinos ocupan las zonas de las ciénagas donde se lleva a cabo su crecimiento y maduración (21).

El Bagre rayado del Magdalena presenta dimorfismo sexual, las hembras pueden alcanzar mayores longitudes que los machos y únicamente en época de reproducción presentan el abdomen abultado, papila genital enrojecida y en algunos casos protuberante (21). El dimorfismo sexual se puede observar claramente cuando están maduros o listos para la reproducción (21).

### **3.3.3. Normatividad**

De acuerdo con la Resolución 0595 de 1978 y 88 de 1987 del INDERENA, la talla mínima de captura es de 80 cm (118). La pesca se encuentra reglamentada a través de la Ley 13 de 1990 y el Decreto Reglamentario 2256 de 1991. Para evitar las capturas antes de la talla media de madurez sexual, se establecieron vedas selectivas para la conservación de la especie, a través del Acuerdo No 009 de 1996 y Resolución No 0242 de 1996, la cual prohíbe la pesca, almacenamiento, comercialización y consumo de este Bagre en las ciénagas y ríos las cuencas del Magdalena, Cauca y San Jorge, de mayo 1 a mayo 30 y de septiembre 14 a octubre 15 de cada año, correspondientes a los periodos de migración y reproducción.

### **3.3.4. Extracción de Bagre rayado del Magdalena**

La extracción estimada del *P. magdaleniatum* corresponde al 16% de la pesca total histórica. Los años 1975, 1976, 1978, 1979 y 1983 fueron los de mayores capturas por encima de las 10000 toneladas, en 1977, 1991, 1993, 1999, 2000-2005, 2008, 2009 y 2013- 2016, no superaron las 5000 toneladas (19,115).

Para el 2000 y 2005 hay picos de alto rendimiento entre los ocho recursos más importantes (Bagre rayado, bocachico, capaz y nicuro), que corresponde a los años de mayor agotamiento de los recursos. A partir de esta fecha la producción disminuye y vuelve a aumentar entre 2009-2015.

Por lo anterior se puede inferir que la cuenca del río Magdalena pone en peligro la seguridad de las familias que dependen de la pesca, ya que este es su principal fuente de trabajo, ingreso y alimentación. Teniendo en cuenta los 35000 pescadores, al inicio las pesquerías tendrían una captura de 6.5 kg/día/pescador, mientras que en la actualidad se estima una captura diaria de 2.4 kg/día/pescador (19).

### **3.4. Disrupción endocrina en peces de agua dulce**

A nivel mundial se han realizado diversos estudios sobre alteraciones endocrinas en peces de agua dulce. Estas alteraciones van desde cambios sutiles en la fisiología y etología de los peces hasta la diferenciación sexual alterada permanentemente y el deterioro de la fertilidad (50,119). Para que una sustancia sea reconocida como Disruptor endocrino (DE), la exposición al factor estresante tiene que resultar en un evento mediado por el sistema endocrino (106,120).

Los efectos biológicos más reportados de disrupción endocrina en peces silvestres, son los relacionados con la inapropiada producción de la proteína sanguínea vitelogenina en peces machos y juveniles (50). La vitelogenina es una proteína específica de las hembras y dependiente de estrógenos (50). Las alteraciones de esa proteína se evidencian con la inhibición de ovarios o desarrollo testicular, concentraciones anormales de esteroides en sangre, intersexualidad y/o masculinización o feminización de los genitales internos o externos (47,50,88,121–123). También se han reportado disminución del rendimiento reproductivo, maduración precoz en ambos sexos, aumento de la atresia ovárica (en hembras), menor éxito de desove, menor éxito de eclosión y/o supervivencia larvaria, (47,50,88,121–123).

De acuerdo a la evidencia en los últimos años, se ha determinado que algunos efectos en peces de agua dulce pueden atribuirse a mezclas de sustancias químicas que imitan y/o alteran la función/equilibrio hormonal (47,50,88,121–123). Aproximadamente 60000 productos químicos sintéticos se utilizan en todo el mundo de forma habitual y la mayoría de ellos entran al medio acuático; por esto la identificación de sustancias químicas responsables de alteraciones se hace difícil y se requieren investigaciones extensas para soportar las hipótesis extraídas de estudios de campo (50).

Estudios recientes han demostrado que las combinaciones de diferentes sustancias tienen un efecto aditivo, por lo cual es necesario seguir teniendo en cuenta aquellas sustancias que causan efectos leves en el sistema endocrino en peces de agua dulce (66,124–126). No ha sido posible identificar todas las sustancias a las cuales están expuestos los peces de agua dulce, ni los valores exactos para determinar los niveles “altos”, utilizados generalmente en los estudios de laboratorio, y los niveles “bajos”, encontrados en el medio acuático. (66,124–126).

Aunque se han realizado múltiples investigaciones sobre las alteraciones endocrinas en peces de agua dulce, ha sido difícil establecer la relación causal entre la presencia de disruptores endocrinos y la alteración en las poblaciones de los peces expuestos. Para determinar la causalidad, se debe establecer una relación entre la exposición y el efecto (disminución de la población o reducción de la fertilidad, entre otras) (50).

### **3.4.1. Características y modos de acción**

A lo largo de los años se han determinado diferentes alteraciones endocrinas generadas por los DEs en los organismos acuáticos. Aunque estos contaminantes son un grupo heterogéneo de sustancias, ya sean naturales o sintéticas, comparten las siguientes características:

- Imitar hormonas esteroides sexuales (femeninas, estrógenos y masculinas, andrógenos), uniéndose a receptores hormonales o interfiriendo en las vías de señalización celular.
- Bloquear, prevenir y alterar la unión a los receptores hormonales.
- Alterar la producción y degradación de hormonas naturales.
- Modificar los niveles y la función de los receptores hormonales (106,120).

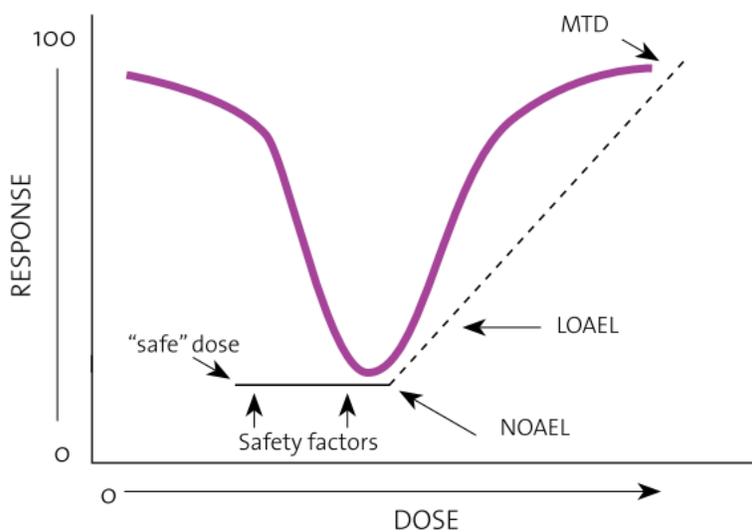
Entre los mecanismos de acción más estudiados se encuentran:

- Estrogenicidad / anti-estrogenicidad.
- Androgenicidad / anti-androgenicidad.
- Alteración tiroidea.
- Alteración de receptores hormonales.
- Alteración de las rutas del ácido retinoico, PPAR y de la vitamina D.
- Alteración de tejidos diana en el sistema reproductor, cerebro y sistema cardiovascular.
- Disfunción de células beta pancreáticas.
- Inhibición endógena de la producción hormonal o metabolismo.
- Múltiples efectos modificadores hormonales (106).

Otra característica importante de los DEs es que no siguen un patrón lineal, lo que quiere decir que a mayores dosis - mayores efectos adversos, con relación a la dosis respuesta (126–128). Para los cálculos de dosis de exposición seguras en ensayos de toxicidad, se realizan dosis decrecientes de compuestos químicos, hasta llegar a un nivel en el que no se produce efecto tóxico (NOAEL). Estos ensayos de toxicidad no detectan los efectos adversos que se producen a dosis bajas, ya que cuando no se encuentran efectos adversos a dosis altas, no se sigue investigando efectos negativos a dosis más bajas (17,106,128).

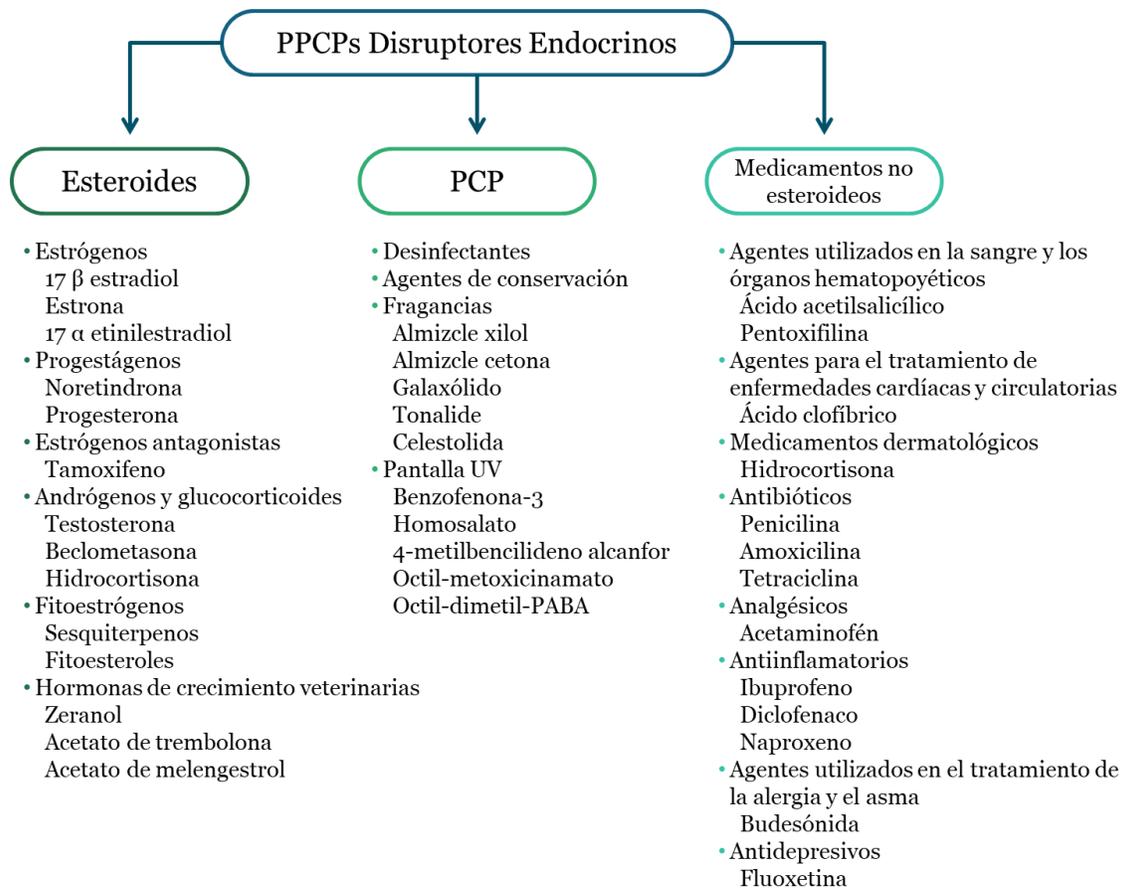
Muchas sustancias químicas con actividad endocrina no siguen este tipo de patrón, sino que presentan curvas dosis respuestas no lineales, denominadas no monotónicas, con forma de U o de U invertida, lo que indica que pueden causar efectos tóxicos a dosis alta, sin efectos a dosis intermedias y efectos adversos en

concentraciones bajas o viceversa. Por tanto, no es posible establecer un nivel seguro de exposición para los DEs que presentan curvas dosis-respuesta no lineales (Figura 3-4). Los DEs son considerados “sustancias camaleónicas”, ya que una sustancia tiene diferentes modos de acción dependiendo de la concentración en la que se encuentre. Además, los niveles seguros de exposición no son los mismos respecto al efecto de la disrupción endocrina (106).



**Figura 3-4.** Efectos de dosis bajas y respuestas a dosis no monotónicas. Ilustración tomada de (106).

Varios de los DEs hacen parte de los PPCPs, entre ellos se pueden destacar algunos como los esteroides, los productos de cuidado personal (PCP) y los medicamentos no esteroideos, como se observa en la Figura 3-5. Estos contaminantes que comparte tanto las características de emergentes como DE pueden ser causantes de alteraciones mucho más graves.



**Figura 3-5.** Ejemplos de disruptores endocrinos de PPCPs. Ilustración modificada de (34).

### 3.4.2. Afcción de DEs en peces de agua dulce respecto a animales terrestres

Aunque las alteraciones endocrinas se han determinado en diferentes poblaciones de peces de agua dulce, no hay evidencia que indique que los peces son más susceptibles comparados con otros animales silvestres (50). Las alteraciones como la unión del receptor por sustancias químicas que imitan a los receptores de hormonas esteroides sexuales, tiroides y ácido retinoico sugieren que es probable que los vertebrados sean igualmente sensibles a los DEs ambientales (50). Además, hay muchas semejanzas entre los sistemas endocrinos de los peces y otros vertebrados superiores, con relación a la naturaleza de las hormonas, receptores y regulación del sistema endocrino (50,128–131). Sin embargo, hay que tener en cuenta, que hay más de 10000 especies de peces de agua dulce en todo el mundo, y con diferencias notables en cuanto a su fisiología, anatomía, reproducción, comportamiento y ecología, y otras características de la fisiología endocrina que los pueden hacer particularmente sensibles a los efectos de los DEs (50).

Una de las desventajas que tienen los peces respecto a los otros animales, es que ellos viven en el medio acuático, en el que están constantemente en una solución con contaminantes químicos. La absorción de estas sustancias puede producirse de manera fácil a través de las branquias y la piel, así como a través de la dieta (siendo la vía principal de exposición a este tipo de contaminantes, en los animales terrestres) (50). La absorción de los diferentes compuestos en el agua es facilitada por las branquias, así como membranas epiteliales delgadas y una gran superficie de contacto, permitiendo su transferencia al torrente sanguíneo. Adicionalmente, los peces se encuentran distribuidos en diferentes niveles tróficos pudiéndose observar fenómenos de bioacumulación y biomagnificación los cuales se incrementan a medida que se aumenta la posición trófica (14,71,132–135).

En peces una de las principales vías de exposición a los DEs durante los primeros estadios de desarrollo son los contaminantes que se han acumulado en las reservas de lípidos dentro del huevo, esto como resultado de la transferencia materna durante el desarrollo del huevo (50). Estos contaminantes que se han acumulado se movilizan cuando las reservas de lípidos se metabolizan para impulsar el desarrollo del embrión, exponiendo durante los primeros estadios de desarrollo a concentraciones altas de estos compuestos en un momento vulnerable en el que se está desarrollando su sistema endocrino (50). Siendo estas primeras etapas limitadas para metabolizar y excretar contaminantes, incluidos los EDC (50).

La determinación de la relación causa-efecto por disrupción endocrina en peces se dificulta por la desincronización entre el momento de la exposición y la respuesta biológica (50). Peces que viven cerca de efluentes de aguas residuales, acumulan estos contaminantes en tejidos, pudiendo no causar efecto inmediato pero manifestando alteraciones por ejemplo, en el desarrollo embrionario de su descendencia (50). Las respuestas biológicas de los contaminantes en peces dependen de diversos factores biológicos (p.ej., especies, sexo, edad) o fisicoquímicos (p.ej., temperatura, pH, oxígeno disuelto) haciendo que los efectos no siempre siguen un patrón establecido (50).

## **3.5. Métodos de análisis**

### **3.5.1. Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (UHPLC QqQ-MS/MS)**

La cromatografía líquida es la técnica más utilizada para identificar, cuantificar y separar los componentes de una mezcla (136). Esta técnica utiliza una presión alta para arrastrar los solventes a través de una columna. Ha sido utilizada con buenos resultados en la separación e identificación de antihipertensivos, anticoagulantes, antibióticos, antipsicóticos, esteroides entre otros compuestos orgánicos e inorgánicos (136).

Por su parte los métodos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tiene ventajas sobre las técnicas de cromatografía líquida (LC) utilizadas anteriormente. Estas permiten una mayor resolución, mejor forma de pico, respuestas reproducibles y velocidad de análisis (136). Las columnas de HPLC se pueden usar nuevamente, sin necesidad de reempaquetar o regenerar, además permite automatización del funcionamiento del instrumento, análisis de datos, y adaptabilidad a procedimientos a gran escala. Otra ventaja es que los tamaños de partículas son muy pequeños y tienen grandes áreas de superficie, la cual permite la aplicación de altas presiones al flujo de solvente (136).

El principio de HPLC depende de la adsorción, partición, exclusión e intercambio iónico, según el tipo de sorbente cromatográfico (136). Comparadas con otras técnicas la principal limitación de la HPLC es la falta de eficiencia. Debido a los bajos coeficientes de difusión en la fase móvil dan como resultado un tiempo de análisis más largo; por este motivo se ha disminuido el tamaño del material de empaque de las columnas. A medida que disminuye el tamaño, aumenta la eficiencia, resolución y capacidad para trabajar en tiempos más cortos, y así se generó una nueva técnica denominada Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (UHPLC) (136).

Este principio de UHPLC está basado en el principio de la ecuación de Van Deemter, que relaciona la velocidad lineal (caudal) y la altura de la placa (eficiencia de la columna). Esta ecuación depende del tamaño de partícula: a medida que el tamaño de las partículas disminuye a menos de 2.0  $\mu\text{m}$ , hay una ganancia significativa en la eficiencia, resolución, sensibilidad, tiempo de análisis y capacidad máxima, comparada con las columnas de HPLC que generalmente están empaquetadas con partículas de 3 - 5  $\mu\text{m}$  (136).

En UHPLC con la utilización de columnas más cortas y partículas de empaque de menor tamaño (a medida que disminuye el tamaño de partícula del relleno de la columna, aumenta la eficiencia y la resolución), conduce a tasas de flujo más altas a alta presión (de hasta 1000 bar comparado con el HPLC que alcanza únicamente los 400 bar) (136), lo que genera un aumento en la cantidad de picos resueltos por unidad de tiempo, mejorando la calidad de los datos y obteniendo mayor resolución (137). Otra de las ventajas del UHPLC es la disminución de casi diez veces el volumen de inyección, que da como resultado formas más definidas de los picos cromatográficos (137). Las desventajas es el precio más alto y la contrapresión que reduce la vida útil de la columna (137).

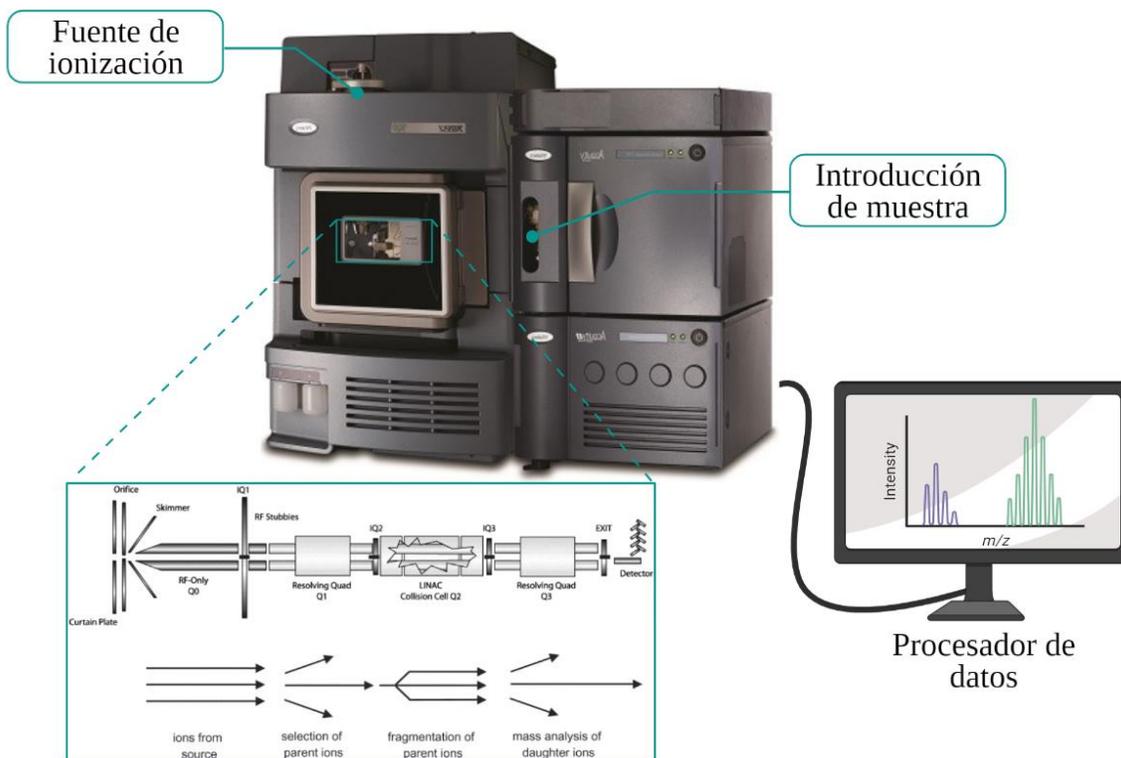
Para la cuantificación de los compuestos se utiliza un espectrómetro de masas, el cual permite la separación, identificación y cuantificación de moléculas, basado en su relación masa/carga ( $m/z$ ), en diferentes matrices (líquidas y sólidas), después de su ionización (138). Un equipo de espectrometría de masas consta de cinco módulos fundamentales: 1) sistema de introducción de muestra, 2) fuente de ionización, 3) analizador de masas, 4) detector y 5) procesador de datos (138).

- 1) El sistema de introducción de muestra, es el UHPLC.
- 2) La fuente de ionización en un MS, tiene como función aplicar energía a la muestra para generar moléculas cargadas positiva o negativamente (según lo requiera el compuesto), ya que para medir las moléculas por MS es necesario que estén eléctricamente cargadas (iones).
- 3) Los iones pasan al analizador de masas, su función es separarlos y ordenarlos de acuerdo a su  $m/z$ .
- 4) El detector reconoce y amplifica la señal proveniente del analizador de masas y la envía al procesador de datos, donde se registra esta información en forma de espectro de masas, que representa gráficamente los iones separados por su valor de  $m/z$  y ajustados de acuerdo al porcentaje de las especies más abundantes en la muestra (138).

El detector en tándem MS/MS es utilizado comúnmente ya que tiene mayor sensibilidad para detectar trazas de compuestos, alta selectividad para identificar moléculas separadas en una mezcla, alta resolución de tiempo y larga vida útil (136). Un equipo de MS/MS está constituido de seis componentes básicos: 1) sistema de introducción de muestra, 2) fuente de ionización, 3) primer analizador de masas (MS1), 4) cámara o celda de colisión, 5) segundo analizador de masas (MS2), 6) detector.

En la Figura 3-6 se ilustra un analizador de masas un triplecuadrupo (QqQ), acoplado a una fuente de ionización por electrospray (ESI). Una vez ingresa la muestra, sufre una ionización suave por ESI para adquirir carga, luego pasa al primer analizador de masas (MS1) en donde los iones formados se separan y ordenan de acuerdo a su masa/carga ( $m/z$ ). Los iones pasan por la celda de colisión en donde se generan fragmentos como producto de su colisión con un gas inerte, estos

fragmentos generados pasan por el segundo analizador de masas (MS2), los cuales se pueden correlacionar con las moléculas intactas producidas en el MS1. Finalmente se generan un espectro de masas, con lo cual es posible identificar y cuantificar diversos analitos dentro de una familia de compuestos (138).



**Figura 3-6.** Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (UHPLC QqQ-MS/MS.) Ilustración QqQ, modificada de (139).

### 3.5.2. Técnicas de extracción

#### 3.5.2.1. Extracción en fase sólida (SPE)

Como parte integral de un análisis, la preparación de muestras, ha evolucionado considerablemente en los últimos años, siendo este el paso más importante del proceso analítico (140). Los orígenes de la SPE son casi tan antiguos como la cromatografía. En sus inicios, se utilizó para la separación de compuestos que se encontraban en mezclas mediante la interacción selectiva de los compuestos con una fase estacionaria sólida, seguida de la recuperación del analito retenido en la fase sólida por elución con una fase móvil, la cual se analiza por cromatografía (141).

La SPE se utiliza para la separación, purificación, concentración, simplificación de la matriz o el intercambio de solventes antes del análisis por cromatografía. La cual tiene como principio la modificación de las propiedades de una muestra para facilitar la separación y detección de los compuestos, siendo considerada como una alternativa adecuada a la extracción líquido-líquido (140,141).

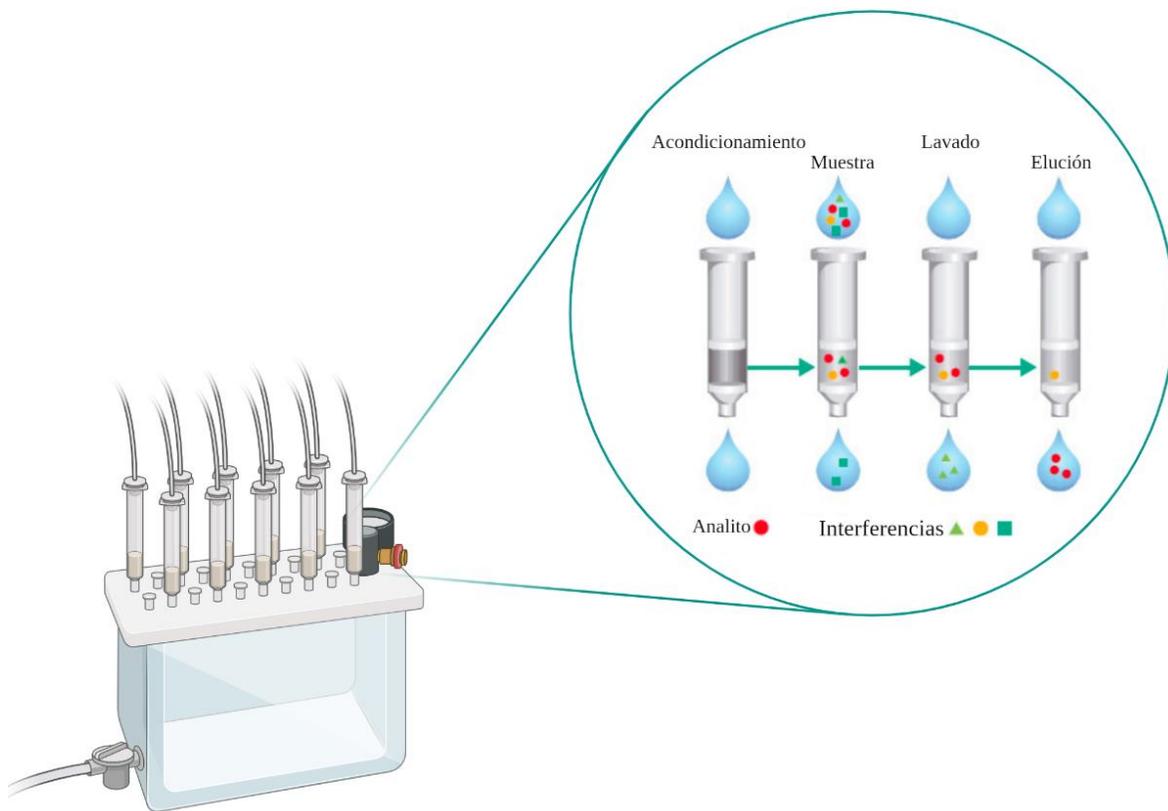
El sistema SPE utiliza un cartucho que contiene un sorbente con un tamaño de partícula nominal entre 20 y 60  $\mu\text{m}$  empacado entre fritas de plástico o metal poroso (141). Dependiendo de la aplicación las columnas están empacadas de diferentes materiales químicos absorbentes, denominados soportes o fase estacionaria (141). En sus inicios, la sílice fue el soporte más utilizado en la fase estacionaria. Después de la sílice, aparecieron los soportes poliméricos, que permitieron ampliar la gama y corregir dificultades encontradas durante el procesamiento(140). También se cuenta con diferentes cantidades de fase estacionaria adecuadas para diferentes volúmenes de muestra (140).

Los volúmenes de los cartuchos más utilizados están entre 1 y 5 mL, donde la cantidad de fase es muy variable. La aplicación de fluidos se puede realizar de acuerdo a dos principios:

- Presión positiva: es un sistema que se encaja en la parte superior del cartucho, permitiendo que los líquidos pasen por una jeringa facilitando el ajuste de los caudales. Este procedimiento no es tan práctico, incluso en series pequeñas.
- Presión negativa: este es más común, generalmente se utiliza tanque de vidrio con tapa adaptable perforada con 6 a 24 orificios equipado con una válvula de ajuste y una bomba de vacío creando un vacío dentro del sistema (140).

El procedimiento de extracción consiste generalmente en cuatro etapas (Figura 3-7):

- 1) Acondicionar la fase estacionaria (hidrófobo): se humedece el cartucho con un solvente orgánico (generalmente metanol) con el fin de activar los sitios de retención. Seguidamente con un solvente con características (iónicas y pH) cercano al solvente de la muestra (generalmente agua).
- 2) Hacer pasar la muestra por la columna/cartucho, con el objetivo de retener de forma cuantitativa los analitos de interés en la fase estacionaria mientras se eliminan interferencias por simple no retención, las tasas de flujo deben ser moderadas para mayor eficiencia.
- 3) Lavar el cartucho con el fin de eliminar las interferencias débilmente retenidas.
- 4) Eluir con un solvente con fuerza de elución baja que sea capaz de arrastrar todas las moléculas de interés evitando eluir los interferentes fuertemente retenidos. La elección de este solvente está relacionada con su facilidad de evaporación o su compatibilidad con la siguiente técnica analítica. El volumen debe ser lo más pequeño posible para obtener un factor de concentración muy alto (140).



**Figura 3-7.** Procedimiento de extracción en fase sólida (SPE).  
Ilustración modificada de (140).

### 3.5.2.2. QuEChERS

QuEChERS se refiere a sus siglas en inglés (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe) rápido, fácil, económico, efectivo, robusto y seguro. En sus inicios se desarrolló para la extracción y determinación de una amplia gama de plaguicidas en frutas y verduras. Esta extracción proporciona altas eficiencias de extracción y un mejor rango dinámico lineal y sensibilidad que la extracción líquido-líquido o SPE para matrices sólidas (142).

QuEChERS se basa en una extracción líquido-líquido, donde se utiliza un solvente polar generalmente acetonitrilo para matrices que contienen agua con la adición de sales (incluye sulfato de magnesio y acetato de sodio o cloruro de sodio) para obtener la separación de fases (143–145). Luego se realiza una agitación vigorosa y una centrifugación para eliminar interferencias y por último, si es necesario, se realiza una extracción en fase sólida dispersiva o limpieza (143–145). Esta metodología se ha utilizado para la identificación de diversas matrices como tierra, aceite vegetal, aceitunas, huevos, cereales en grano, cereales y tejido de pescado (145).

Dentro de las ventajas de utilizar este método de extracción es que no se necesitan grandes cantidades de muestra, su extracción es rápida, por lo cual consume menos tiempo, ya que no requiere evaporación de la muestra. Además, se utilizan un mínimo de solventes y bajo volumen de residuos, y que no se requieren equipos especiales para su extracción (143,145).

### **3.5.3. Análisis de esperma asistido por computadora (CASA por sus siglas en inglés Computer Assisted Sperm Analysis)**

#### **3.5.3.1. Evaluación de la calidad espermática en peces**

Los espermatozoides de la mayoría de los peces teleósteos están inactivos en los testículos y en el líquido del plasma seminal (146). La motilidad mecánica se alcanza solo después de la eyaculación en el agua circundante, cuya osmolaridad y concentración iónica son adecuadas para cada especie en particular (146,147). La esperma de la mayoría de los peces teleósteos tiene grandes diferencias comparados con los mamíferos, se destacan principalmente cuatro: 1) es inmóvil al eyacular; 2) la motilidad se induce al contacto con el agua; 3) permanece completamente móvil durante menos de 2 min; 4) no tiene acrosoma (147). Sin embargo, hay excepciones en algunas especies; los peces teleósteos tienen una gran diversidad de estrategias reproductivas, desde desoves masivos en aguas abiertas hasta apareamientos en espacios cerrados, así como fertilización interna. Por tanto, las características de los espermatozoides de los peces teleósteos son diversas (146,147).

Los parámetros más útiles para evaluar la calidad espermática son la motilidad y la duración del movimiento (147). En los peces, comparados con los mamíferos la trayectoria de los espermatozoides es generalmente más curva y pueden moverse en tres dimensiones en el medio acuoso; ya que la velocidad de estos espermatozoides disminuye rápidamente con el tiempo, la duración del movimiento progresivo tendrá una gran influencia en la capacidad de los espermatozoides para ingresar al óvulo (147).

Debido a que los espermatozoides no tienen acrosoma, estos deben encontrarse con el óvulo, entrar a él a través de una reacción acrosómica y además deben encontrar el único punto de entrada, el micrópilo en la superficie del óvulo (147). Aun no se tiene claro cuáles son las señales que utilizan los espermatozoides de los peces para localizar el micrópilo (147).

Anteriormente el método para evaluar la calidad espermática era mezclar óvulos y espermatozoides y medir la fertilización o la tasa de eclosión, pero estos métodos no discriminan entre los espermatozoides de diferente calidad, a menos que la proporción espermatozoides / óvulos esté estrictamente controlada. Estas comparaciones de diferentes muestras de esperma, deben realizarse con la misma

hembra para cada determinación para evitar variaciones entre hembras, lo que limita el número de óvulos disponibles para su uso (146,147).

Estos parámetros son difíciles de evaluar ya que requieren de hembras maduras, pero estas solo están disponibles en periodos cortos y requieren inducción, contrario a los machos que suelen estar disponibles por más tiempo. Por esto, tener métodos que no dependan de los óvulos para evaluar la calidad espermática es una gran ventaja (146,147).

Otra metodología utilizada era evaluar la calidad de los espermatozoides por medio de la observación, ya sea directamente en el portaobjetos del microscopio o a través de una grabación, categorizando el movimiento en comparación con una escala de puntos rígidos, sin embargo, esta era una medida arbitraria y subjetiva ya que los puntos dados no daban información clara. Se han utilizado diferentes escalas, pero ninguna es clara en cuanto al periodo después del inicio de la motilidad. Todos estos métodos por escala pueden dar una clasificación aproximada de diferentes motilidades, pero no es posible realizar análisis estadísticos cuantitativos (146,147).

### **3.5.3.2. Análisis de esperma asistido por computadora (CASA)**

Dada la necesidad de mejorar la metodología para evaluar la calidad de los espermatozoides, hacerla objetiva y cuantitativa, es necesario medir la velocidad real de los espermatozoides de forma manual o automática (147,148). En su forma más simple, es posible grabar en video el movimiento de los espermatozoides a través de un microscopio y luego reproducir cuadro por cuadro mientras se marca la posición de cada espermatozoide en una película de acetato fijada al monitor de video. Sin embargo, estos métodos consumen mucho tiempo y también pueden ser subjetivos al momento de escoger cual esperma individual se va a rastrear (147).

El análisis de esperma asistido por computadora se introdujo durante la década de 1980 para analizar las características del movimiento de los espermatozoides y se utilizó en varios centros para humanos y veterinarios (147). A través de este análisis CASA, se ha logrado evaluar de forma rápida y objetiva de la motilidad de los espermatozoides de los peces, con ciertas adaptaciones (146,147).

Entre los parámetros más útiles para la evaluación automática están:

- VCL, velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), correspondiente a la suma de las distancias incrementales movidas en cada cuadro a lo largo de la trayectoria muestreada, dividida por el tiempo que tardan los espermatozoides en cubrir la trayectoria (147,149).
- VSL, velocidad en línea recta ( $\mu\text{m/s}$ ), es la distancia en línea recta entre los puntos inicial y final de la trayectoria, dividida por el tiempo que tarda el esperma en cubrir la trayectoria (147,149).

- LIN, la linealidad (%): es la distancia en línea recta entre los puntos inicial y final de la trayectoria dividida por la suma de las distancias incrementales a lo largo de la ruta real ( $LIN = VSL / VCL * 100$ ) (147,149).
- % MOT-% móvil = el número de espermatozoides móviles dentro del campo de análisis dividido por la suma de los espermatozoides móviles más inmóviles dentro del campo de análisis (147,149).

Ya que la motilidad de los espermatozoides de los peces disminuye rápidamente después de activarse con agua, es necesario obtener una imagen estabilizada completamente lo más pronto posible, idealmente aproximadamente 5 s después de la inducción de la motilidad, siendo los primeros 5-20 segundos los tiempos que proporcionan los datos más útiles (147).

### **3.5.3.3. Técnica CASA**

Para iniciar se debe realizar dos diluciones, la primera dilución se realiza con una osmolaridad similar al líquido seminal en el que el esperma permanece inmóvil durante varias horas, seguido por la segunda dilución con agua, que induce la motilidad (activación) (147). Después de esta última dilución, los espermatozoides activados se transfieren al portaobjetos de microscopio, en menos de 10 segundos. Es importante evitar la deriva de líquido en el portaobjetos, ya que esta podría interpretarse como motilidad incluso de células inmóviles. La estabilización de la deriva es uno de los problemas técnicos más difíciles de resolver, ya que es máxima precisamente en el período de motilidad mayor justo después de la activación (147).

El semen se recolecta en una jeringa, tubo capilar o cánula, asegurando siempre que esté libre de agua u orina que induce la motilidad (147). Si se va a almacenar se debe diluir en un solvente adecuado y conservar entre 1 y 4 °C; para algunas especies como el Bagre, el semen puede conservarse en diluyente hasta por 24 h sin mucho deterioro. La grabación debe realizarse a la temperatura adecuada para cada especie. Se pipetea una cantidad de semen diluida, la cual dependerá de la especie, y se añade agua destilada o agua de mar para especies marinas, mezclándose rápidamente con una varita plástica. Por último, se pipetea inmediatamente un volumen de esta dilución en un portaobjetos, se coloca suavemente un cubreobjetos y se coloca en el microscopio enfocado. El análisis se realiza en el software CASA ajustando las variables para cada especie (147).

### **3.5.4. Citometría de flujo**

La primera persona en observar y describir la célula viva a través de microscopio fue Anton Van Leeuwenhoek (150). Por esta técnica es posible saber que los seres vivos están constituidos por diferentes tipos celulares con funciones específicas que trabajan en conjunto para mantener una homeóstasis (150). Esto es posible debido a los microscopios los cuales permiten observar, reconocer y clasificar el comportamiento de cada una de las células. Los microscopios permiten identificar las células de acuerdo a su morfología, pero hay células que son morfológicamente idénticas, aunque funcionalmente diferentes, como es el caso de los linfocitos (150). Por medio de un microscopio óptico y una tinción de Wright es posible identificar los linfocitos, sin embargo, no es posible diferenciar entre un linfocito T y un linfocito B, en consecuencia la citometría de flujo está diseñada para esto (150).

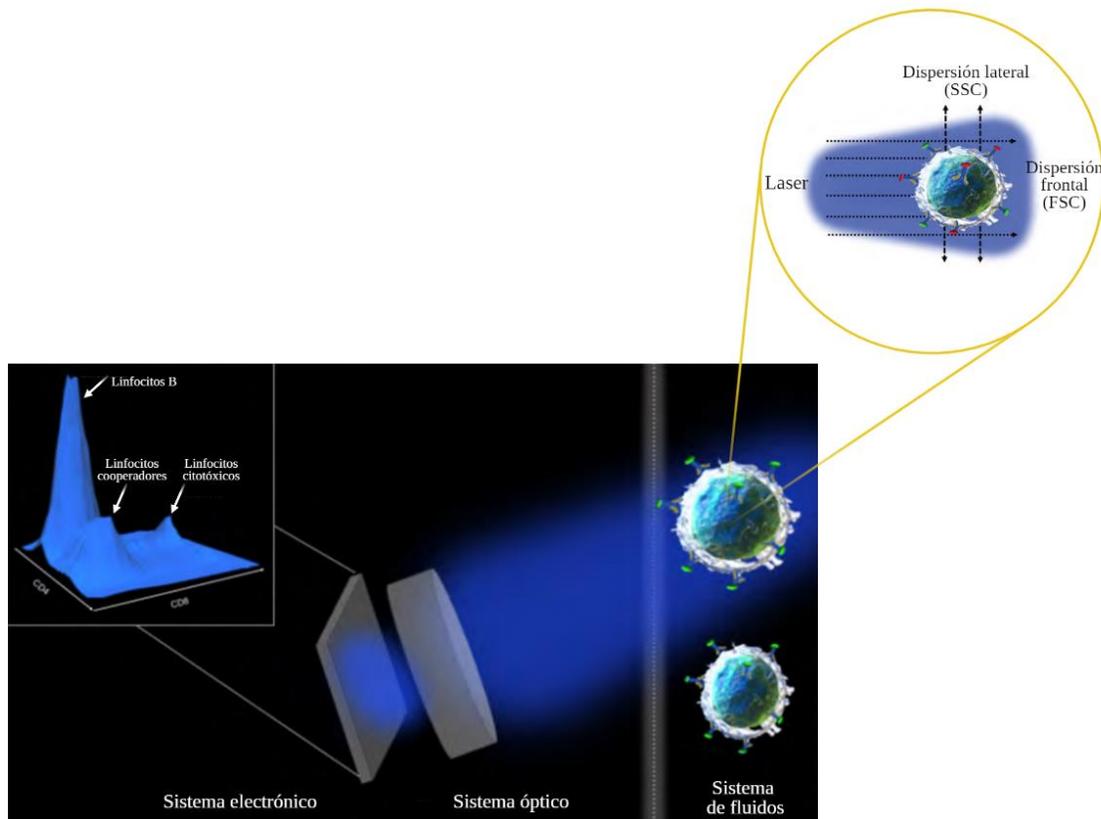
La citometría de flujo es una tecnología que permite analizar y cuantificar de manera sincrónica diversas características celulares a medida que son transportadas en un fluido e incididas por un haz de luz (150,151). La citometría de flujo es capaz de medir el tamaño y la granularidad de la célula, así como la fluorescencia relativa de la misma (150,151). Esto es posible debido a un sistema óptico acoplado a un procedimiento electrónico que graba la manera en que la célula dispersa el haz de luz y emite fluorescencia (150,151).

El citómetro de flujo consta de tres sistemas:

- El sistema de fluidos tiene como función alinear y transportar a las células dentro de una cámara de flujo hacia el haz de luz, por tanto, se necesita que la muestra esté suspendida en un fluido, inyectando la muestra en el centro de una corriente de fluido envolvente (propiedad hidrodinámica) que puede ser agua o buffer de fosfato. Esto es posible ya que la presión de la muestra es mayor que la presión del líquido envolvente y las células quedan alineadas en un orden de tamaño para asegurar que el haz de luz incida sobre una célula a la vez (150,152).
- El sistema óptico está compuesto por láseres y filtros, que iluminan las células y dirigen las señales resultantes hacia los detectores apropiados (150,152). Una vez que las células son incididas por el láser son capaces de dispersar la luz de acuerdo con su tamaño y su granularidad (150,152). Cuando la luz se dispersa frontalmente se denomina FSC (forward scatter), que indica el tamaño de la célula, mientras que la dispersión lateral determina la complejidad denominada SSC (side scatter) (Figura 3-8). Las células marcadas con fluorocromos son excitadas por el láser y la luz es dirigida hacia un detector, el cual recibirá la longitud de onda emitida por la

excitación del fluorocromo (150,152). Por medio de este sistema, es posible determinar el tamaño y granularidad de las células, así como las proteínas que se expresan (marcadores), siendo posible la identificación de diferentes tipos celulares.

- En el sistema electrónico una vez la señal luminosa es generada, debe traducirse en señales electrónicas (150,152). Este sistema consiste en sensores luminosos como fotodiodos y fotomultiplicadores, los cuales convierten los fotones en electrones y éstos a una corriente eléctrica y así la señal eléctrica es recibida por la computadora y traducida en gráficos e histogramas (150,152).



**Figura 3-8.** Componentes del citómetro de flujo. Ilustración modificada de (150).

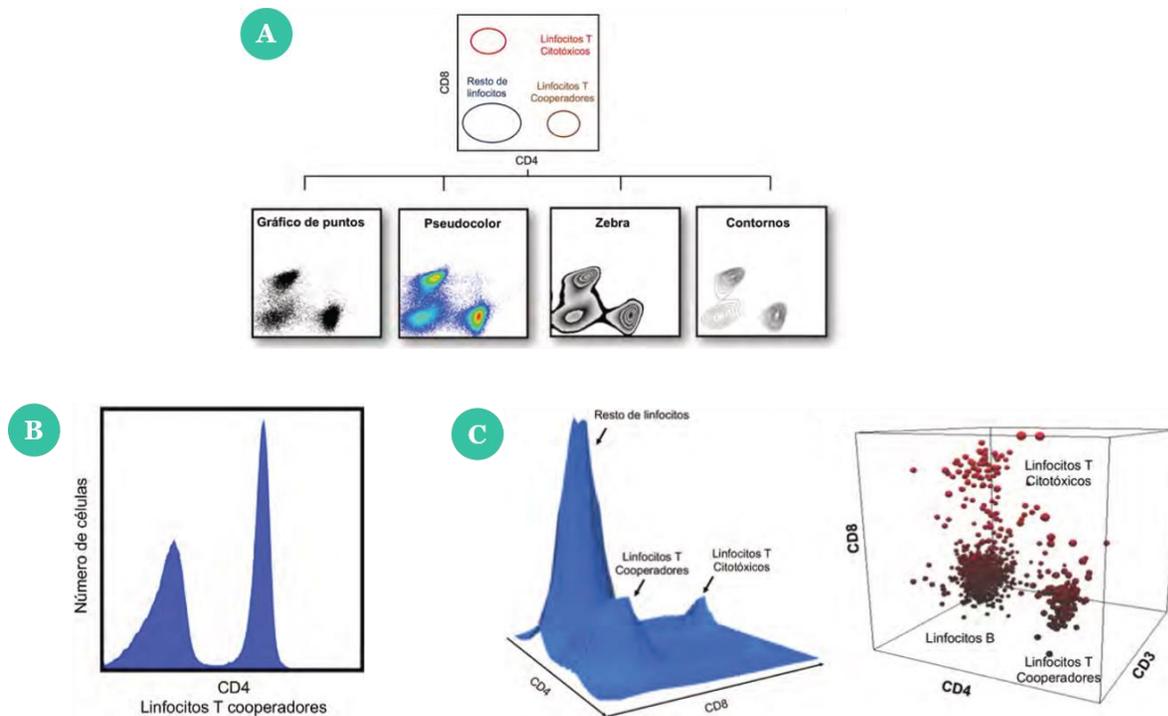
Para la identificación de subtipos celulares, es necesario un marcaje celular con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromo (150). Estos anticuerpos monoclonales sirven para detectar e identificar poblaciones específicas de células. Consiste en la creación de un anticuerpo que sea capaz de unirse a una estructura específica (antígeno), el cual se expresa en el tipo celular que se requiere identificar (150). Además, el anticuerpo debe contener una unión covalente a un fluorocromo, que emitirá luz fluorescente cuando sea excitado por el láser, así, la célula se tiñe y

facilitará la identificación de las células que se unieron al anticuerpo o marcador (150).

En la actualidad existen diferentes anticuerpos acoplados a fluorocromos que cuando son excitados emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda. Algunas moléculas emitirán luz verde, naranja, azul, roja o amarilla, dependiendo del fluorocromo seleccionado, lo que permite identificar diversas poblaciones celulares a la vez (150).

Los resultados obtenidos pueden ser representados de formas diferentes, desde gráficas de puntos hasta figuras tridimensionales. Dentro de las más utilizadas se pueden destacar las siguientes:

- Gráfico de puntos: indica la relación entre dos marcadores diferentes y muestra a cada punto como un evento, entendiendo como evento cualquier partícula que haya sido excitada por el láser. El desplazamiento de los puntos hacia la derecha indica la expresión de un marcador en X, mientras que el desplazamiento de los puntos hacia arriba muestra la expresión de un marcador en Y (Figura 3-9 A).
- Gráfico de densidad: representan las poblaciones teniendo en cuenta la expresión de dos marcadores y muestran la frecuencia relativa (densidad) de las poblaciones. Cuando se utiliza un gráfico de cebra, las poblaciones con mayor número de eventos se representan mediante tonos de gris más intenso. Con un gráfico pseudocolor, se representan con colores cercanos al naranja y con gráfico de contornos, mediante líneas (Figura 3-9 A).
- Histogramas: muestran la intensidad de expresión de un marcador versus el número de eventos. Los desplazamientos hacia la derecha de la curva indica mayor expresión del marcador y la altura del pico indica la frecuencia de las células capturadas. Así, el área bajo la curva contiene a las células que se están analizando (Figura 3-9 B).
- Gráficos 3D: por medio de estos gráficos se pueden comparar poblaciones con respecto a la expresión de tres marcadores diferentes y la frecuencia relativa. Los histogramas también pueden ser graficados en 3D, permitiendo de esta manera la expresión de dos marcadores diferentes versus el número de eventos (Figura 3-9 C).



**Figura 3-9.** Tipos de gráficos interpretación citometría de flujo. A, Gráficos de puntos y de densidad. B, Histogramas, el pico de la derecha representa a las células positivas para el marcador de linfocitos T cooperadores CD4, el de la izquierda muestra las células negativas para este marcador. Se observa que el pico de la derecha es más alto que el de la izquierda; por tanto, existe un mayor número de linfocitos que expresan al marcador CD4 (T cooperadores), con respecto a aquellos que no lo expresan. C, Gráficos 3D, a la izquierda Histograma 3D, identifica las poblaciones de linfocitos T cooperadores y linfocitos T Citotóxicos, de acuerdo con la expresión de CD4 y CD8; la altura de los picos indica el número de células registradas. A la derecha del gráfico Dot plot 3D, poblaciones de linfocitos B (por exclusión), linfocitos T Cooperadores y linfocitos T Citotóxicos, de acuerdo con la expresión de CD3, CD4 y CD8. Ilustración modificada de (150).

La citometría de flujo es una técnica de identificación y cuantificación específica de células, por lo cual facilita el diagnóstico o seguimiento de patologías como leucemias, linfoma, inmunodeficiencia primaria, monitoreo del estado hematológico de pacientes con infección de VIH, e incluso detección de células cancerosas o tumorales (150). Además, esta técnica permite analizar funciones celulares como

proliferación, fagocitosis y apoptosis. Sin embargo, la citometría no se limita únicamente al estudio de células, por esta técnica es posible determinar la cantidad de ARN o ADN que posee una célula y sus posibles alteraciones (150,152,153).

### **3.5.5. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)**

La configuración de inmunoensayo más utilizada es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). El ELISA incluye cualquier inmunoensayo en fase sólida recubierto de anticuerpo o antígeno con una enzima involucrada en el proceso de generación de señales (154). Las ventajas que tiene el ELISA es que una sola molécula de enzima puede convertir muchas moléculas de sustrato, por lo que la generación de señales es muy amplificada (154).

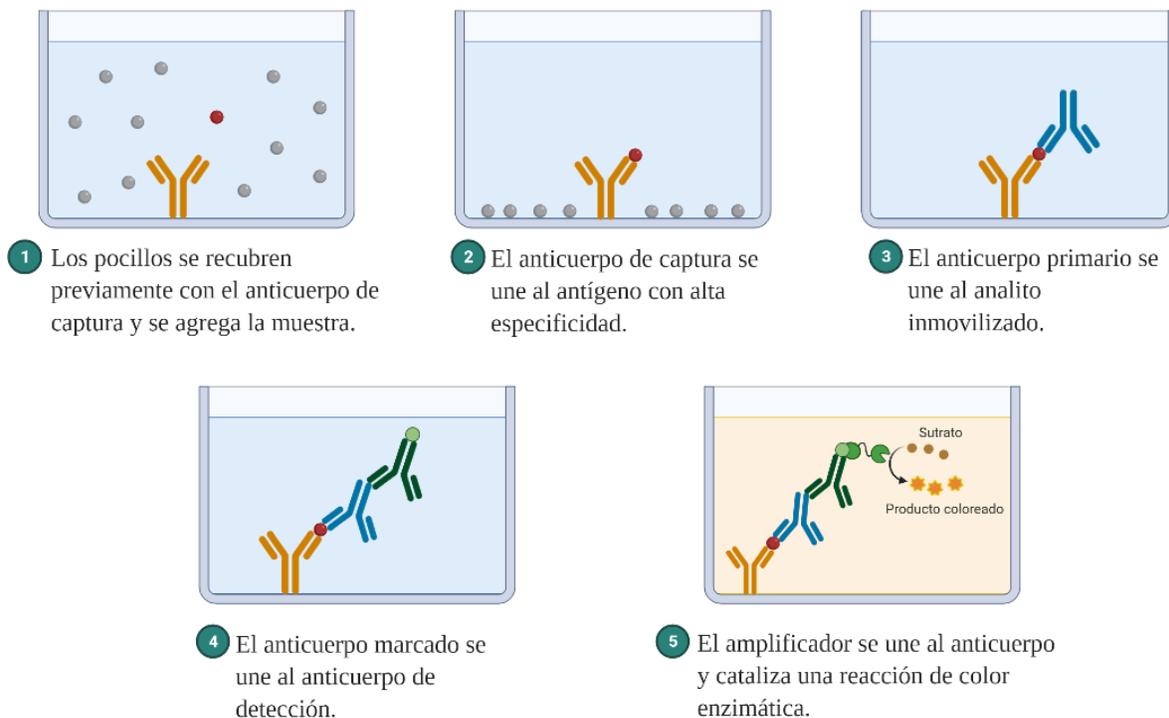
Generalmente este inmunoensayo se ha realizado para la detección y cuantificación de antígenos, anticuerpos, hormonas y otras moléculas. Además, se ha utilizado en investigación para caracterización de nuevas proteínas y el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas (154).

El procedimiento de ELISA se basa principalmente en un recubrimiento, bloqueo, lavado, generación y medición de señales de la placa. Usualmente los pocillos están hechos de poliestireno, los cuales se unirán pasivamente a las proteínas (154). En el ELISA los anticuerpos se unen directamente al poliestireno, a menos que los antígenos estén unidos para detectar anticuerpos en la muestra, el área restante de cada pocillo que esta sin recubrimiento se satura con una proteína inerte (como BSA) para evitar cualquier unión inespecífica de los reactivos. Posteriormente, se agregan las muestras a los pocillos y se incuban para que el analito, ya sea antígeno o anticuerpo de las muestras, se una a los anticuerpos recubiertos. El paso siguiente es eliminar los materiales unidos de forma inespecífica, mediante el lavado de los pocillos. Por último, la reacción se cuantifica con un anticuerpo específico conjugado a una enzima que junto con un sustrato induce un cambio proporcional en una reacción de color, esto se realiza mediante comparación con las curvas estándar construidas utilizando cantidades fijas del analito en el ensayo realizado en paralelo (154,155). Este ELISA se llama sándwich, ya que a medida que avanza el ensayo se van acumulando capas y el analito es retenido entre los anticuerpos inmovilizados y conjugados con enzima (154) (Figura 3-10).

Además del formato inmunométrico (sándwich), se han desarrollado diferentes formatos de ELISA, en los que se destacan el competitivo, indirecto e inmunocaptura (154,155). La elección de estos dependerá de la disponibilidad de los reactivos, la sensibilidad del ensayo y el rango dinámico requeridos para la aplicación (154,155).

- Inmunométrico: usa generalmente dos anticuerpos que preferiblemente se unen a diferentes sitios del antígeno. El anticuerpo primario, muy específico para el

antígeno, se adhiere a las placas de microvaloración (154). Luego se añaden las muestras que contienen el analito, seguido de la adición del anticuerpo de detección, que se conjuga con una enzima. Como resultado, el analito está en medio de los dos anticuerpos (154). En algunas ocasiones, cuando es necesario aumentar la sensibilidad se pueden unir múltiples anticuerpos a las placas de microvaloración para su captura. Comparado con otros formatos, el inmunométrico es más sensible, preciso y robusto, sin embargo, es necesario que la molécula de analito debe ser lo suficientemente grande (con un peso molecular superior a 6000 Da) para tener dos sitios antigénicos separados (154).

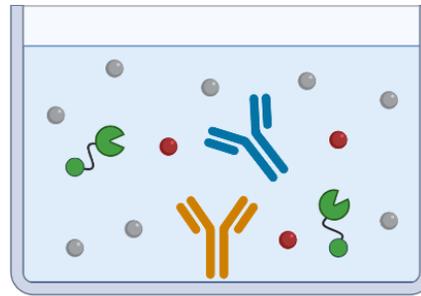


**Figura 3-10.** ELISA inmunométrico (sándwich). Fuente Ilustración propia, creada con BioRender.com.

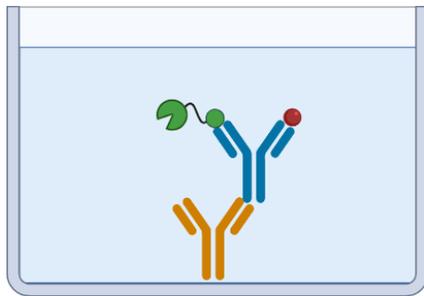
- Competitivo: es utilizado para analitos de bajo peso molecular, en el que se utiliza un único anticuerpo específico para el analito, por lo que se prefieren los anticuerpos purificados por afinidad (154). La sensibilidad de este formato está determinada por la constante de equilibrio de los anticuerpos, la precisión de la medición de la señal y el nivel de unión no específica (154). Este formato no es tan sensible como el ELISA Inmunométrico, su rango de concentración es más estrecho, es más susceptible a los efectos de la matriz y se requiere experiencia considerable en el desarrollo y la validación de un ELISA de esta clase (Figura 3-11).



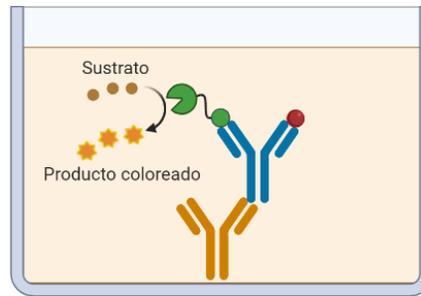
1 Los pocillos están prerrecubiertos con anticuerpo secundario.



2 Se agregan el anticuerpo de captura, el analito conjugado con enzima y la muestra.



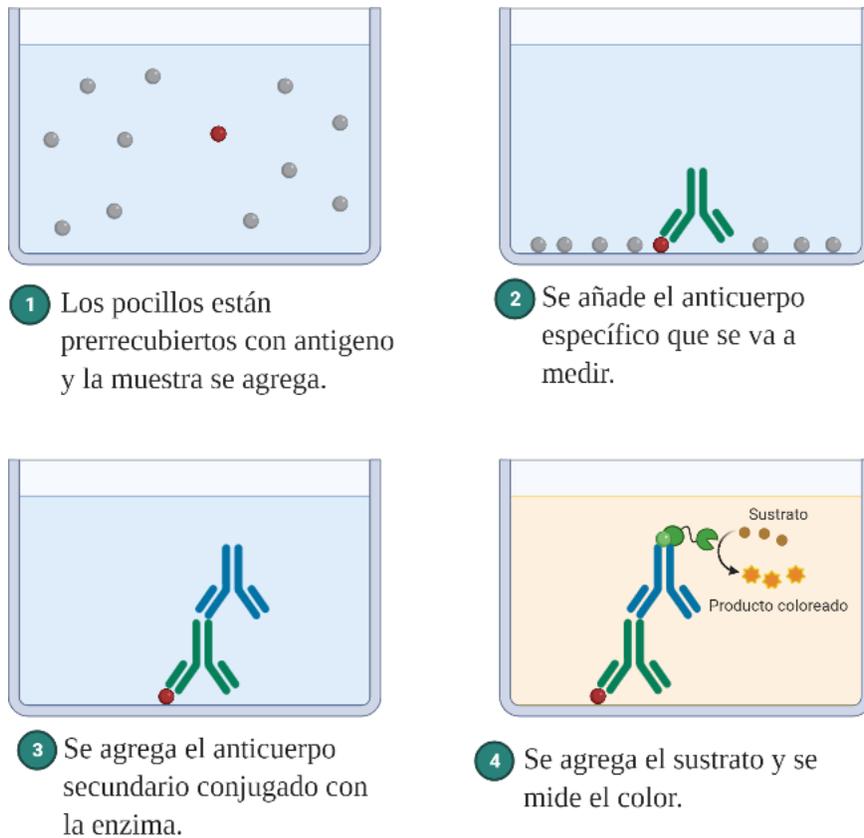
3 El analito y el analito conjugado con enzima compiten por unirse.



4 La reacción de color enzimática es proporcional al conjugado unido.

**Figura 3-11.** ELISA competitivo. Fuente Ilustración propia, creada con BioRender.com.

- Indirecto: se emplea para la detección de anticuerpos específicos, utilizando un antígeno recubierto en la placa para capturar anticuerpos, y luego los anticuerpos capturados son detectados por anti-IgG o IgM específicos de la especie (154). La pureza y la especificidad del antígeno que se recubrirá en las placas de microvaloración son muy críticas para la especificidad del método ELISA, además este formato es susceptible de una unión inespecífica (Figura 3-12).



**Figura 3-12.** ELISA indirecto. Fuente Ilustración propia, creada con BioRender.com.

- Inmuncaptura: así como el indirecto, está diseñado para la detección de anticuerpos específicos, generalmente anticuerpos IgM (154). Este formato usa anti-IgM animal para capturar la IgM en la muestra, luego se emplea un antígeno específico marcado con enzima o un antígeno emparejado con un anticuerpo específico marcado con enzima para detectar la IgM de interés (154). Es necesario un antígeno específico con alta pureza para marcar o establecer un puente con el anticuerpo marcado con enzima (154).

## **4. Capítulo 1. Implementación de un método analítico para la determinación de ibuprofeno, diclofenaco y triclosán en muestras de aguas ambientales, mediante SPE UHPLC-QqQ-MS/MS**

El agua es un recurso fundamental para todos los organismos vivos, especialmente para la realización de las actividades humanas en las que se requiere el suministro de aguas seguras (100). Sin embargo, la calidad de las aguas puede verse comprometida por la entrada de contaminantes procedentes principalmente de actividades antropogénicas (1).

Los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) son esenciales para la salud y el bienestar humano y animal, pero una vez en las aguas residuales son considerados como contaminantes, que por sus posibles efectos en los ecosistemas acuáticos han sido motivo de preocupación y atención científica (6,17,33,105), ya que la mayoría de PPCPs están diseñados para modular la fisiología y el comportamiento humano, causando respuestas biológicas a dosis relativamente bajas, y conservando relativamente bien sus efectos biológicos entre las especies de vertebrados (2). Estos PPCPs comprenden una amplia diversidad de compuestos no regulados de interés emergente, que se encuentran en todos los tipos de aguas, así como en la biota acuática, y pueden causar efectos adversos en el ecosistema, los organismos no objetivo y la salud humana (3–5).

Estos PPCPs en ocasiones no se manejan apropiadamente y se descargan directamente a los desagües y otras veces no son metabolizados completamente por el cuerpo humano y se excretan a través de la orina y las heces (33), teniendo todos como destino final el medio acuático, ya sea por descargas directas de efluentes domésticos y hospitalarios o por procesos hidrológicos y atmosféricos (7,8).

Debido a que las PTAR no eliminan por completo los PPCPs en las aguas (12,105), se han utilizado diferentes mecanismos, como las tecnologías de oxidación avanzada,

biodegradación, fotodegradación y la hidrólisis (2,7). Sin embargo, algunas de estas no son eficientes, dejando las aguas con residuos de PPCPs (2,6,7,13), exponiendo de manera crónica sus efectos tóxicos tanto a los humanos como a las especies acuáticas (64,71,162–166,100,105,156–161). En la actualidad no existen límites de descargas para la mayoría de PPCPs en el medio ambiente (100,156–158,162–164), lo que causa una alerta en la población ya que algunos de estos contaminantes pueden causar alteraciones en la salud incluso en bajas concentraciones como la disminución de la fertilidad masculina, defectos de nacimiento, cáncer de mama y testicular (13,100,106).

Entre los PPCPs se destaca el grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), muy utilizados en la atención primaria de la salud, y por tanto, de alto consumo a nivel mundial (58,59). El ibuprofeno (ácido 2-(4-isobutilfenil) propiónico) y el diclofenaco (Ácido 2- [2- (2,6-dicloroanilino) fenil] acético) son los AINEs más usados a nivel mundial, su consumo global puede superar las 10000 toneladas ibuprofeno / año y 14000 toneladas diclofenaco / año (59,65). El ibuprofeno ha sido catalogado con base a su importancia en la vida humana diaria como "droga esencial", en Colombia, ocupa el segundo lugar en registros sanitarios otorgados, en el que el 57% son vendidos con fórmula médica y el restante de venta sin prescripción facultativa [8]. El diclofenaco es el medicamento con el mayor número de registros sanitarios otorgados en Colombia donde el 89% corresponden a venta con fórmula médica y el restante para venta libre (60).

Por otra parte, el triclosán (5-cloro-2- (2,4-diclorofenoxi) fenol) es un compuesto que se agrega a productos como jabones, desodorantes, desinfectantes para manos, talcos y productos dentales como agente conservante o antiséptico (167,168). A nivel mundial su producción ha superado las 1500 toneladas anuales, siendo Europa el mayor productor (350 toneladas) (167). Debido a la preocupación por sus posibles efectos en la salud humana, en el 2014, las Directivas de la Unión Europea, a través del Reglamento (UE) N° 358/2014 consideró que el uso continuo de este compuesto como conservante a una concentración máxima de 0.3% en productos cosméticos no es seguro, sin embargo, se restringen el uso de triclosán a una concentración máxima de 0.3% en cremas dentales, pastillas de jabón, jabones líquidos, geles de ducha, desodorantes, polvos faciales y cremas correctoras (169). Para el 2016, la Agencia de Medicamentos y Alimentación (FDA) lo eliminó de la lista de sustancias permitidas para el uso en jabones antibacteriales y geles de ducha (167), ya que no se demostró que su uso fuera seguro y eficaz como agente antimicrobiano. La Secretaria General de la Comunidad Andina en la Resolución N° 2025/2018 (170) restringió el uso del triclosán en productos cosméticos de conformidad a los lineamientos de la Unión Europea en el Reglamento (UE) N° 358/2014 y prohibió el uso en jabones y geles para el aseo e higiene corporal de acuerdo al reglamento CFR 310 / 2016 de la FDA. Por estos motivos el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

(INVIMA) de Colombia a partir de la fecha de publicación de la Resolución N°1953 / 2017 (171) no acepta solicitudes de asignación, reconocimiento y renovación de códigos de Notificación Sanitaria Obligatoria para este tipo de productos (171).

Tanto el diclofenaco como el ibuprofeno interfieren con la vía de la ciclooxigenasa, disminuyendo la catálisis de la biosíntesis de la prostaglandina a partir de ácido araquidónico (52,61–63). Las prostaglandinas son responsables de funciones fisiológicas importantes, actuando como hormonas "locales" en procesos de reproducción, transporte de agua y la osmorregulación (52,61–63). Estos medicamentos están diseñados para ser biológicamente activos y una vez entran en las aguas pueden causar afectaciones en organismos acuáticos (66,67), en los que pueden modificar las reacciones celulares en el hígado, riñón y branquias principalmente (63,68), así como disrupción del sistema endocrino por la alteración de la actividad de la aromatasa, alterando el equilibrio de hormonas sexuales, así como efectos citológicos e histológicos y cambios de expresión génica en peces (69). El triclosán ha demostrado tener efectos adversos en algunas especies de peces, y efectos androgénicos potencialmente débiles que pueden alterar la velocidad de natación en *Oryzias latipes* (167,168), natación errática en *Oncorhynchus mykiss* y *Danio rerio*, alteraciones patrones de actividad diurna en *Gambusia holbrooki* (167).

Dada la creciente preocupación sobre los efectos negativos de los PPCPs para los seres vivos, las autoridades competentes han comenzado a reconocer esta situación como un problema. Es el caso de la Comisión Europea que a través de la Directiva 2013/39/UE (172), que modifica la Directiva Marco del Agua 2000/60/CE (173) y la Directiva 2008/105/CE (174). Estas buscan proteger y mejorar la calidad del agua, para lo cual especifican en el Anexo X algunos productos químicos que se han considerado como sustancias prioritarias para su identificación y control.

El desarrollo de metodologías analíticas sensibles y confiables para cuantificar simultáneamente trazas de PPCPs en matrices ambientales han permitido la recopilación de información sobre la entrada de estos productos al medio ambiente, así como la evaluación el impacto y la distribución en el medio ambiente acuático (175,176). Sin embargo, se requiere establecer reglamentación de vertimientos de los PPCPS, con lo que se hace necesario plantear estrategias de mitigación y mejoramiento de la eficiencia de remoción de los PPCPs por las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas (33,175).

Para esta investigación se implementó un método analítico de acuerdo al método EPA 1694 (177) (modificado) de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, para la determinación de ibuprofeno, diclofenaco y triclosán, en aguas mediante la extracción en fase sólida (SPE) y cuantificación por cromatografía de ultra alto rendimiento (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo (QqQ-MS / MS), con la fuente de ionización de electrospray (ESI).

## 4.1. Materiales y métodos

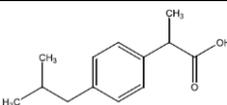
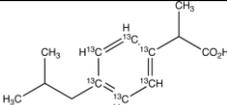
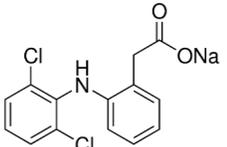
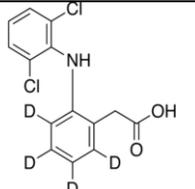
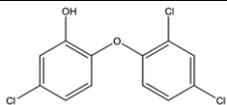
### 4.1.1. Reactivos, solventes y materiales

Los estándares de ibuprofeno y diclofenaco utilizados fueron de USP (Rockville, Estados Unidos) y el triclosán de Sigma-Aldrich (San Luis, Estados Unidos). Los estándares marcados isotópicamente Ibuprofeno  $^{13}\text{C}_6$  y Diclofenaco-d<sub>4</sub> de Toronto Research Chemicals (Ontario, Canadá) (Tabla 4-1).

Los solventes y reactivos utilizados en la extracción y para las fases móviles fueron: acetonitrilo de grado LC-MS, metanol de grado LC-MS y ácido clorhídrico al 37% fueron de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania), el ácido acético glacial LC-MS de PanReac AppliChem (Castellar del Vallés, Barcelona). Para toda la extracción y procesamiento de las muestras se utilizó agua desionizada: tipo I (resistividad de 18.2 M $\Omega$  cm) utilizando un sistema UV Simplicity (Millipore, Francia). El Nitrógeno 99.999% de Linde (Bogotá, Colombia) fue utilizado para secar las muestras.

Las soluciones estándar (a una concentración de 1000 mg/L) y los estándares marcados isotópicamente se prepararon en metanol LC-MS (MeOH), Tabla 4-1. Todas las soluciones se almacenaron a -20 °C, con un tiempo de caducidad de tres meses. La mezcla de soluciones de trabajo estándar que contenía todos los PPCPs se realizó en MeOH grado LC-MS. Se preparó una mezcla con los patrones marcados isotópicamente para la calibración de estándar interno.

**Tabla 4-1.** Estándares e isótopos usados en el trabajo.

PPCP	CAS	Molécula	Estándar interno correspondiente	CAS	Molécula
Ibuprofeno	15687-27-1	 C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	Ibuprofen- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	1216459-54-9	 C <sub>7</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
Diclofenaco de sodio	15307-79-6	 C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> NNaO <sub>2</sub>	Diclofenac-d <sub>4</sub>	153466-65-0	 C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> D <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>
Triclosán	3380-34-5	 C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-

PPCP: Productos farmacéuticos y de cuidado personal

CAS: Servicio de Resúmenes Químicos de los Estados Unidos

#### 4.1.2. Extracción en fase sólida (SPE)

La preconcentración antes del análisis cromatográficos fue necesario, por lo cual se empleó la extracción en fase sólida (SPE), para concentrar los analitos y eliminar interferencias (68,176,178). Las muestras de agua se sacaron de refrigeración (4-6 °C) para llevarlas a temperatura ambiente (≈24°C). Como las muestras tenían sólidos suspendidos se tomaron 50 mL de muestra y se diluyeron con agua tipo I, hasta completar un volumen de 200 mL (1:4). Las muestras fueron filtradas con lana de vidrio (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos) y se ajustó a pH=2 con HCl y se agregaron los estándares internos (Ibuprofen <sup>13</sup>C<sub>6</sub> y Diclofenac-d<sub>4</sub>).

Los cartuchos utilizados para la extracción en fase sólida (SPE) fueron OASIS HLB (3 ccs, 60 mg) de Waters (Milford, Massachusetts, EE. UU.), los cuales se acondicionaron con 12 mL de MeOH grado HPLC y 3 mL de agua tipo I en el sistema Visiprep™ SPE Vacuum Manifold de SUPLECO (Darmstadt, Alemania). Luego se agregaron 3 mL de H<sub>2</sub>O a pH=2 y posteriormente, se pasaron las muestras a un flujo de 5-10 mL/min, enjuagándose con 10 mL de agua tipo I, y dejando secar los cartuchos a vacío por 5 minutos. Adicionalmente, se eluyeron los analitos en tubos de vidrio con 12 mL de MeOH grado HPLC y se concentraron los extractos bajo corriente de nitrógeno 99.999% con sistema Visidry™ Drying Attachment system de SUPLECO (Darmstadt, Alemania), hasta aproximadamente 1 mL. Finalmente, se reconstituyó en balón volumétrico de 5mL con H<sub>2</sub>O: MeOH (90:10 v/v) y se analizó inmediatamente por UHPLC-QqQ-MS / MS.

### 4.1.3. Equipo y condiciones cromatográficas

La cromatografía se realizó en el sistema ACQUITY UHPLC H-Class equipado con Binary Solvent Manager, un inyector automático de muestras Acquity, calentador de columna de Waters (Waters Inc., Bedford, Estados Unidos) y columna UHPLC KINETEX Core-Shell C18 (1.7  $\mu\text{m}$  C18 100Å, 50 x 2.1 mm) de Phenomenex. Los métodos de UHPLC utilizan columnas de diámetro corto y estrecho, rellenas de partículas con un diámetro más bajo (sub- 2  $\mu\text{m}$ ), lo que permite un análisis más rápido, menor consumo de solventes, una mejor resolución y picos más estrechos en comparación con las metodologías de HPLC convencionales (68,179). Este sistema simplemente puede soportar la alta presión del sistema durante el análisis cromatográfico sin influir negativamente en la columna analítica (68,179).

El equipo estaba acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Waters XEVO TQD (Manchester, Reino Unido), con una fuente de ionización por electrospray (ESI). El control del equipo y la adquisición de datos se realizaron con el software Masslynx v. 4.1 (Waters, Estados Unidos).

La fase móvil se usó por gradiente de fase inversa, como se muestra en la Tabla 4-2, para un tiempo de análisis total de 7 min. La fase móvil consistió en 0.05% de ácido acético (A) y acetonitrilo: MeOH (50:50 v/v) (B), con un flujo de inyección de 0.3 mL/min y un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ . La temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C y la temperatura de la muestra se mantuvo a 15 °C. El voltaje capilar de Waters Xevo TQD se ajustó a 3.5 kV para ESI<sup>-</sup>. La temperatura de la fuente se ajustó a 130 °C, gas de desolvatación a 350 °C a un flujo de 1000 L/h y un flujo de gas cónico de 100 L/h. La Tabla 4-3 muestra las transiciones empleadas para los PPCPs analizados.

**Tabla 4-2.** Gradiente de las fases móviles A y B usados en los análisis de los PCPS por UHPLC-QqQ-MS/MS.

Tiempo (min)	Flujo	A	B
0.0	0.30	90	10
0.5	0.30	90	10
3.0	0.30	0	100
4.5	0.30	0	100
4.6	0.30	90	10
7.0	0.30	90	10

**Tabla 4-3.** Condiciones del UHPLC-QqQ-MS/MS en los análisis de los PPCPs.

PPCP	Transición	Ion precursor (m/z)	Tiempo de retención (min)	Voltaje del cono (V)	Energía de colisión (ev)	Proporción de los iones
Ibuprofeno	1 (Q)	205.12 > 161.1	4.04	20	5	N. A
Diclofenaco	1 (Q)	294.10 > 249.98	3.99	20	10	N. A
	2 (q1)	295.81 > 252	3.99	20	10	1.46 (Q/q1)
Triclosán	1 (Q)	286.90 > 35	4.24	25	10	N. A
	2 (q1)	288.90 > 35	4.25	25	10	1.66 (Q/q1)
	3 (q2)	288.90 > 37	4.23	25	10	2.91 (Q/q2)

Q: transición de cuantificación.

q1 y q2: transición de confirmación.

N.A: No Aplica.

## 4.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando Statgraphics Centurion XVII. El criterio de significancia se estableció con un  $p < 0.05$ , para la evaluación de la normalidad de las variables continuas se realizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La independencia de residuales por Durbin-Watson y la homocedasticidad de residuales de acuerdo a Breusch-Pagan. Las medias homogéneas se realizaron con la prueba de t-Student, la varianza homogénea mediante F-Snedecor y la inexistencia de valores atípicos por Grubbs.

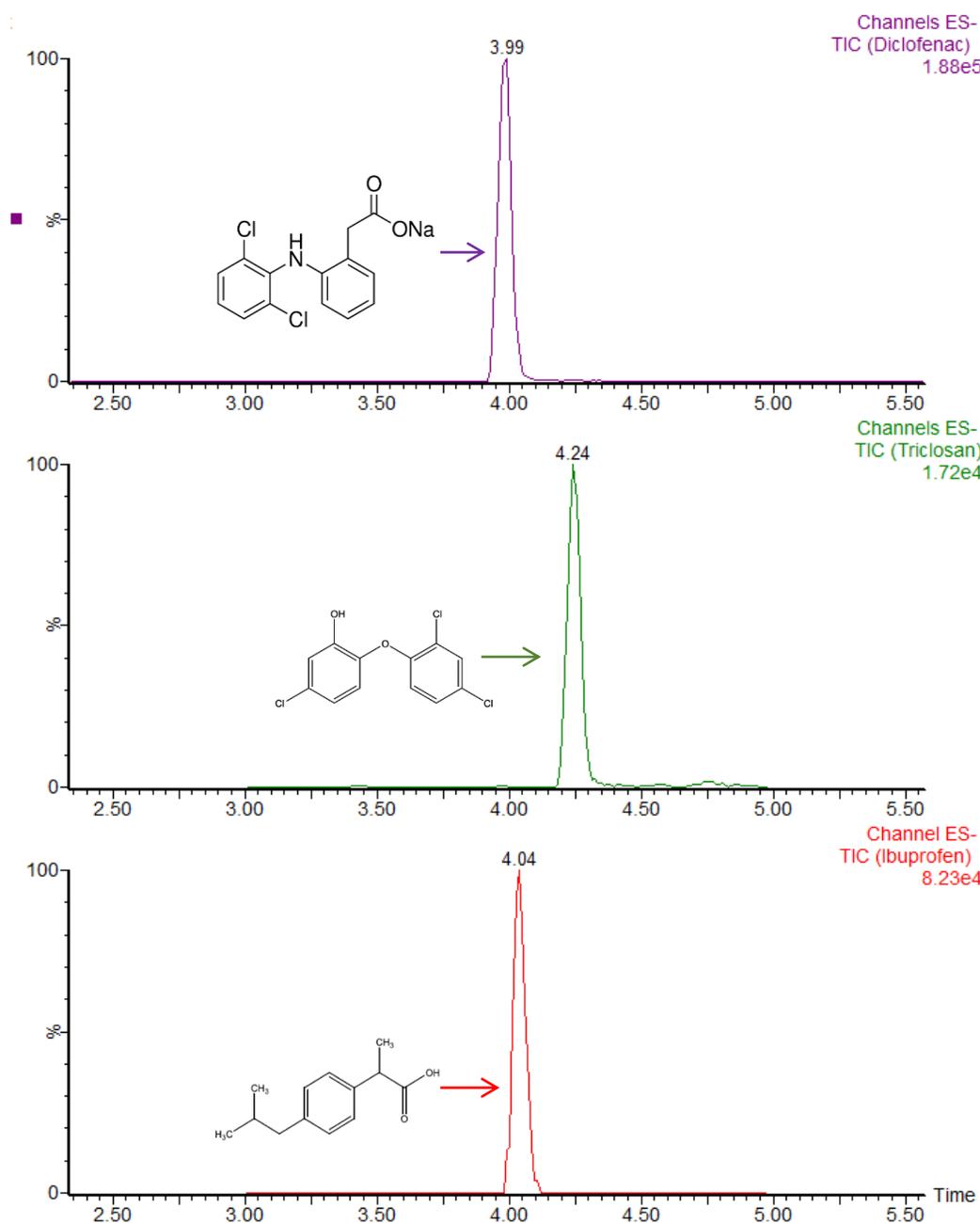
## 4.3. Implementación del método analítico

El propósito de las mediciones analíticas es obtener datos confiables, precisos y consistentes y para ello se realizó la verificación de un método analítico, basado en la EPA 1694 Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS (177), con algunas modificaciones (volúmenes de elución, volúmenes de muestra, configuración del equipo, entre otras). En este caso, se realizó de acuerdo con los requisitos de Eurachem (180,181), la Directiva 96/23 / EC (182) y los Métodos Oficiales de Análisis de AOAC (183). Los parámetros de verificación considerados fueron: confirmación de identidad, selectividad, linealidad, límite de detección (LoD), límite de cuantificación (LoQ), veracidad, precisión, exactitud e incertidumbre.

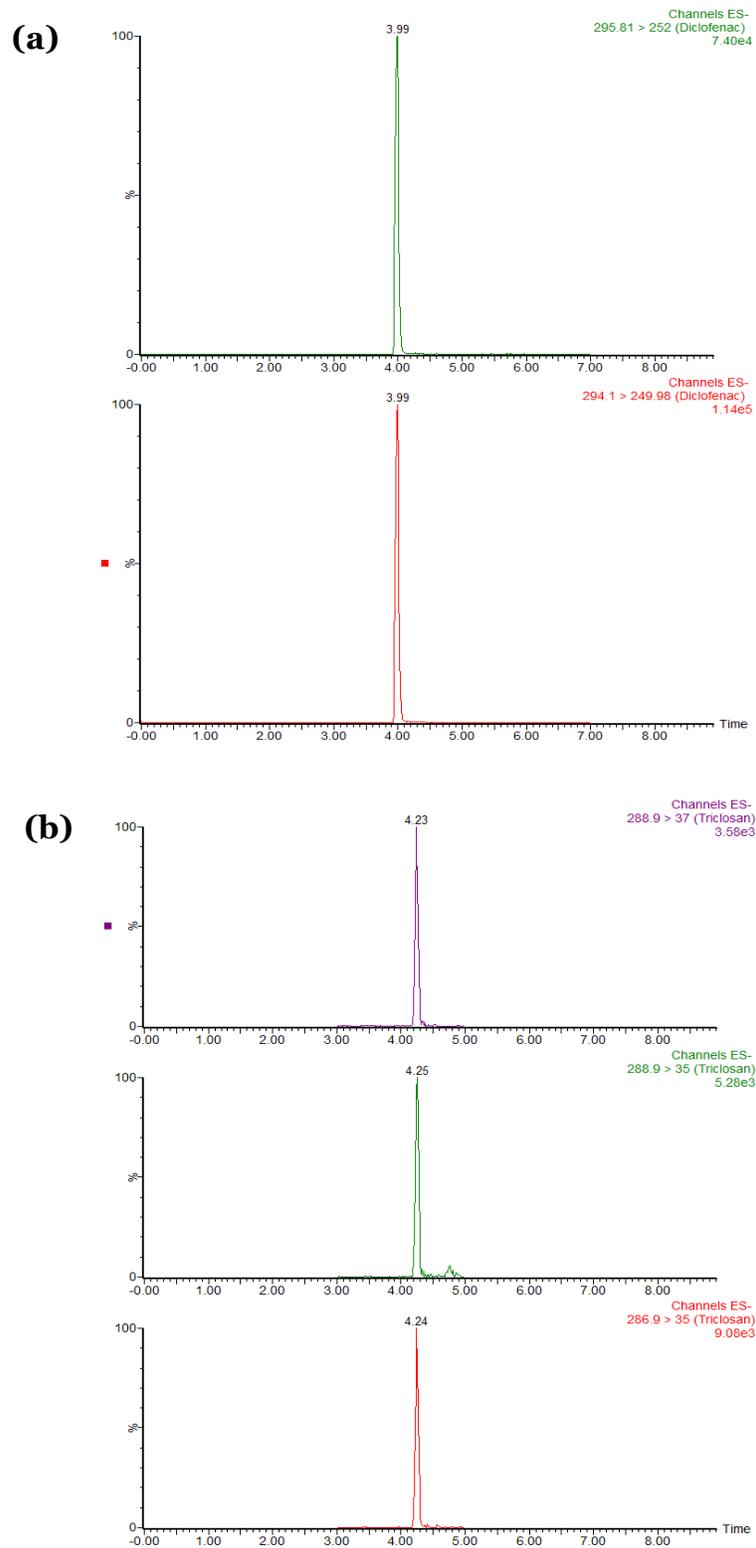
### 4.3.1. Confirmación de identidad

El análisis se realizó por espectrometría de masas para confirmar su identidad en función de su relación m/z. La mezcla contenía 100 mg/L de ibuprofeno, diclofenaco y triclosán, los cuales se inyectaron en el XEVO TQD del espectrómetro de masas de ionización electrospray (64). Durante el proceso de optimización se observó que las

señales obtenidas en el modo de ionización negativa eran considerablemente mejores que las del modo de ionización positiva. De los espectros obtenidos se pudo ver que el componente principal de ibuprofeno, diclofenaco y triclosán presentó 205.12, 294.10 y 286.90 m/z, respectivamente. En la Figura 4-1 se observa la separación cromatográfica para cada uno de los compuestos. Las transiciones 1 para cuantificación (Q) y 2 para confirmación (q1 y q2) se obtuvieron automáticamente en la inyección de los PPCPs analizados (Figura 4-2).



**Figura 4-1.** Separación cromatográfica de diclofenaco, triclosán e ibuprofeno en los UHPLC-QqQ-MS/MS.



**Figura 4-2.** Transiciones diclofenaco (a) y triclosán (b) en los UHPLC-QqQ-MS/MS del presente trabajo.

### 4.3.2. Selectividad

La selectividad se refiere a la medida en que el método puede usarse para determinar analitos de interés en mezclas o matrices sin interferencia de otros compuestos con comportamiento similar (179,184). Es una forma de medir la eficiencia de una separación cromatográfica, teniendo en cuenta variables que pueden afectarla, como la temperatura, la fase móvil y la fase estacionaria (185). Para la determinación de este parámetro, se llevó a cabo la optimización de las condiciones, como la proporción adecuada de la fase orgánica y acuosa, el modo de ionización del tiempo de ejecución (ES -/+), el voltaje del cono, el voltaje capilar, la temperatura de desolvatación, la temperatura de la fuente y el flujo de gas de desolvatación, para lograr la mejor separación posible de los PPCPs. La Figura 4-1 muestra un cromatograma con ibuprofeno, diclofenaco y triclosán, que eluyen con un buen pico a los 4.02, 3.99 y 4.24 minutos, respectivamente.

La separación entre dos picos se puede estudiar en función de dos parámetros, la retención relativa que se refiere al cociente entre los tiempos de retención corregidos de dos picos, que se determina mediante la ecuación 1:

$$\alpha = \frac{R'_{t(B)}}{R'_{t(A)}} = \frac{k_B}{k_A} \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde,

$\alpha$ : factor de selectividad.

$t'_R$ : tiempo de retención de cada PPCP analizado.

$K$ : coeficiente de distribución de cada PPCP analizado.

La resolución se define como la relación de la distancia entre los centros de dos picos y el valor promedio de su ancho (186,187):

$$R_s = \frac{\Delta t}{\frac{w_B + w_A}{2}} = \frac{2\Delta t}{w_B + w_A} \text{ (Ecuación 2)}$$

Donde,

$R_s$ : resolución.

$\Delta t$ : tiempo de retención de cada PPCP analizado.

$w$ : ancho en la línea de base de los picos A y B

Se puede determinar una separación correcta de los PPCPs analizados evaluando el factor de selectividad y la resolución. El método es altamente selectivo indicado por un factor mayor que 1. Mientras que la separación completa entre dos picos se logra

cuando el valor de resolución es mayor que 1.5. En este caso, se obtuvo una buena resolución ( $R > 5.057$ ) y una alta selectividad ( $\alpha > 1$ ) (187) del método para medir los niveles de los dos PPCPs analizados (tabla 4-4).

**Tabla 4-4.** Selectividad y resolución para las mediciones de ibuprofeno, diclofenaco y triclosán por UHPLC-QqQ-MS/MS

Selectividad (n=20) $\alpha \pm SD$ ; %RSD	Resolución (n=20) $R_s \pm SD$ ; %RSD
1.013 $\pm$ 0.003; 0.268	5.057 $\pm$ 0.078; 7.48

SD: Desviación estándar.

RSD: Desviación estándar relativa.

### 4.3.3. Linealidad

Con el fin de proporcionar resultados directamente proporcionales a la concentración del PPCP en la muestra en un rango establecido (188), se prepararon curvas de calibración de siete puntos a través de una dilución de la mezcla de la solución estándar, utilizando análisis de regresión lineal con concentraciones en el rango de 0.5–10  $\mu\text{g/L}$ . La cuantificación de los analitos se realizó mediante estándar externo y comprobación por estándar interno. Se utilizó como blanco, agua tipo I ya que las muestras de aguas ambientales pueden contener algunos de estos PPCPs.

Los criterios de aceptación de linealidad fueron:

- ( $R^2$ ) > 0.995 coeficiente de determinación.
- Shapiro-Wilk test: p calculada > 0.05, normalidad de residuales.
- Durbin-Watson: DW > 1.5 y p calculada > 0.05, independencia de residuales.
- Breusch-Pagan test: p calculada > 0.05, homocedasticidad en residuales.

Los resultados de los criterios de aceptación se indican en la Tabla 4-5. De acuerdo con el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), indican que el modelo ajustado explica para cada compuesto entre 99.85 y 99.98% de variabilidad en Y. Los coeficientes de correlación (R) de los compuestos fueron iguales a 0.999, lo que indica una correlación positiva. Las dos variables están directamente correlacionadas.

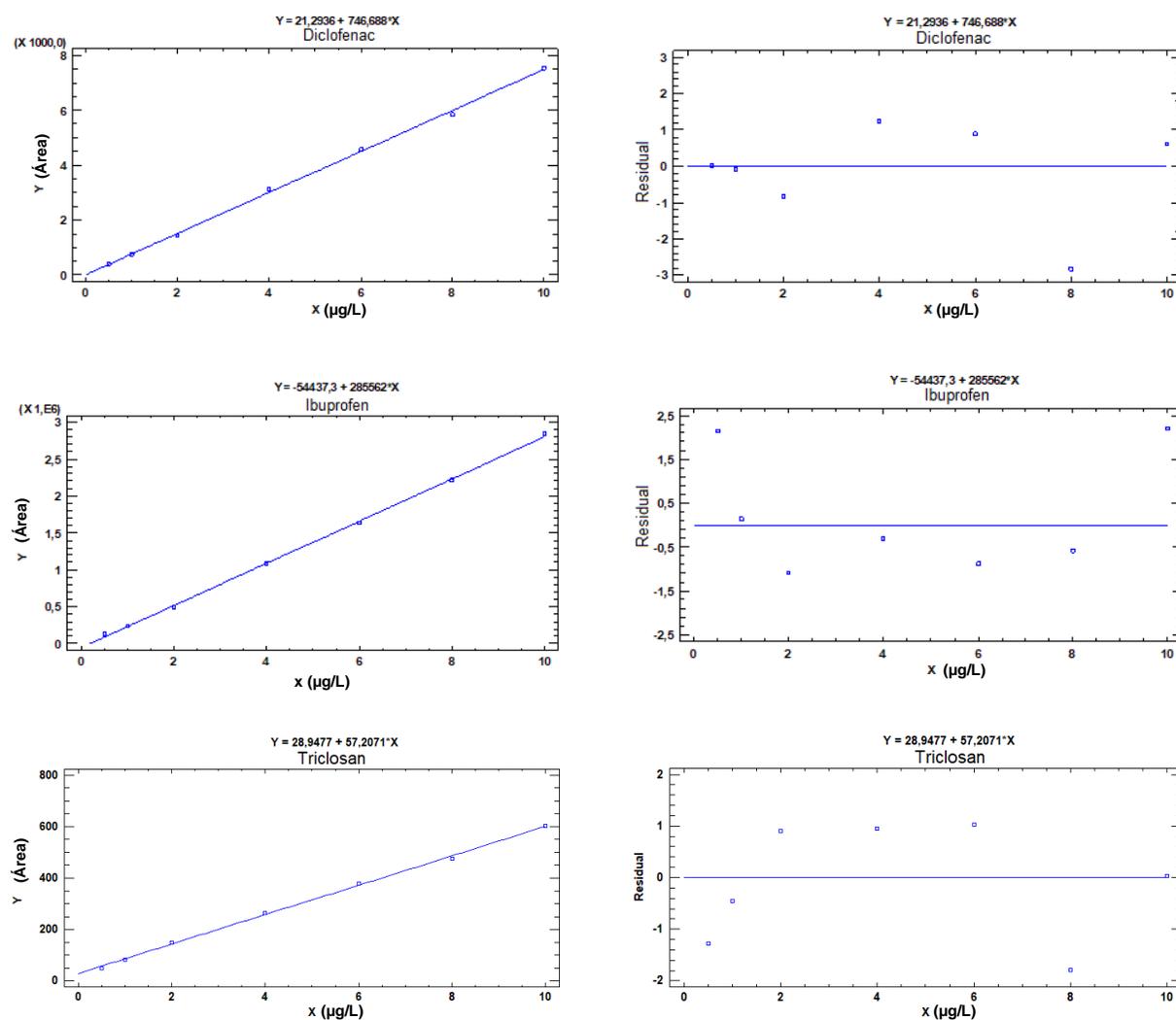
La independencia de los residuales se determinó mediante la estadística de Durbin-Watson que mostró valores significativos ( $p > 0.05$ ), lo que indica que no hubo autocorrelación residual, con un nivel de confianza del 95%. La prueba de Shapiro-Wilk se realizó para determinar la normalidad residual, con valores de p significativos para cada compuesto, por lo cual se puede afirmar que los residuos provienen de una distribución normal. Para determinar si la varianza residual era constante, se realizó la prueba de Breusch-Pagan, considerando que el valor p calculado para cada compuesto fue > 0.05. Por lo tanto, se concluyó que las

variaciones eran constantes (homocedasticidad) en cada concentración para cada compuesto.

**Tabla 4-5.** Resultados de linealidad estadística para analitos.

PPCP	n	Coeficiente de correlación (R <sup>2</sup> )	Test		
			Shapiro-Wilk (p-valor)	Durbin-Watson (p-valor)	Breusch-Pagan (p-valor)
Ibuprofeno	6	0.999	0.519	0.366	0.364
Diclofenaco	6	0.999	0.555	0.399	0.304
Triclosán	6	0.999	0.612	0.260	0.507

La regresión lineal de las curvas de calibración para cada PPCP y el gráfico de los residuos se muestran en la Figura 4-3.



**Figura 4-3.** Curva de calibración promedio y gráfico residual para ibuprofeno, diclofenaco y triclosán.

#### 4.3.4. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

Los límites se calcularon usando muestras de agua tipo I y se determinaron de acuerdo con las ecuaciones 3 y 4 con la relación señal-ruido (33,68,177)

$$\text{LOD} = 3 \text{ S/N} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\text{LOQ} = 10 \text{ S/N} \quad (\text{Ecuación 4})$$

El LOD y el LOQ para los compuestos se calcularon como una relación señal / ruido (S/N) de 3: 1 y 10: 1, respectivamente (33,68,177). Se calcularon utilizando diez muestras diferentes de un blanco y diez muestras de un blanco enriquecido con el nivel bajo de cada PPCP (Tabla 4-6).

**Tabla 4-6.** Límites de detección y cuantificación.

Límites (µg/L)	Ibuprofeno	Diclofenaco	Triclosán
LOD	0.164	0.162	0.110
LOQ	0.492	0.486	0.331

#### 4.3.5. Veracidad

La presencia de interferencias se evaluó a través de muestras enriquecidas con los PPCPs en dos niveles de concentración (bajo y alto): 0.5 µg/L y 7. 0 µg/L.

Se realizaron las pruebas de T-Student y F-Snedecor para comparar la homogeneidad media y la variación de la solución del patrón con respecto a la muestra enriquecida en cada PPCP. Para la identificación de los valores atípicos en las muestras fortificadas, se realizó la prueba de Grubbs.

Para estas pruebas, los siguientes criterios de aceptación fueron tomados en cuenta:

- t-Student:  $p_{\text{calculada}} > 0.05$ , medias homogéneas.
- F-Snedecor:  $p_{\text{calculada}} > 0.05$ , varianza homogénea.
- Grubbs:  $p_{\text{calculada}} > 0.05$ , inexistencia de valor atípico.

Los resultados de las pruebas de Student, Snedecor y Grubbs para cada PPCP se pueden observar en la Tabla 4-7. El análisis no mostró diferencias entre los valores obtenidos de las muestras enriquecidas. Esto confirma que no hay efecto de matriz, lo que demuestra la homogeneidad de la media y la varianza de acuerdo con las pruebas Student y Snedecor. No se encontraron valores atípicos para ningún PPCP, lo que fue confirmado por la prueba de Grubbs.

**Tabla 4-7.** Resultados de veracidad de la matriz para los PPCPs.

PPCP	n	Test		
		t-Student (p-valor)	F-Snedecor (p-valor)	Grubbs (p-valor)
Ibuprofeno	24	0.261	0.987	1.0
Diclofenaco	24	0.082	0.310	1.0
Triclosán	24	0.084	0.233	1.0

### 4.3.6. Precisión y exactitud

La exactitud se midió en términos de sesgo (diferencia entre el promedio de las muestras y el valor verdadero) y recuperación (1-sesgo) (189,190). La precisión se midió para determinar la variabilidad de una serie de resultados de las pruebas independientes obtenidos con el mismo método, operador y equipo en una serie de análisis en la misma muestra mediante el análisis intra e inter-día, en condiciones de precisión intermedia en términos de repetibilidad (% RSD). Para los análisis se utilizaron 7 muestras por analista que contenían todos los PPCPs a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) 0.5, 5.0 y 10 µg/L, en 3 días diferentes (p=3) y dos analistas (190–192).

La determinación de la desviación estándar relativa de reproducibilidad prevista (PRSD<sub>R</sub>) se calculó para cada nivel de concentración utilizando la fórmula de Horwitz, con las siguientes ecuaciones:

$$\text{PRSD}_R = 2C \exp^{-0.15} \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$\text{HorRat}_r = \text{RSD}_r / \text{PRSD}_R \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde,

C: fracción de masa.

RSD<sub>r</sub>: desviación estándar relativa debido a la repetibilidad.

Tendiendo como criterios de aceptación de acuerdo al Apéndice F de AOAC (183) son:

- Recuperación entre 49-118%.
- Porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD) < 26%.
- HorRat<sub>r</sub> <1.3.

La Tabla 4-8 muestra que los valores para sesgo estaban entre -24.51 y 7.38 %, con recuperaciones del 75.50 a 102.13%, cumpliendo los criterios de aceptación. El RSD<sub>r</sub> de la precisión intermedia fue <13%, mucho menor al límite de aceptación. El

HorRat<sub>r</sub> fueron menores al 1.3, lo que indica que el método tiene valores de repetibilidad y reproducibilidad aceptables. Algunos valores de HorRat<sub>r</sub> que estuvieron por debajo de 0.3, indican una excelente experiencia y entrenamiento por parte del personal que realizó el procedimiento (193).

**Tabla 4-8.** Resultados de precisión y exactitud para cada PPCP en cada nivel de concentración.

Parámetro	Ibuprofeno			Diclofenaco			Triclosán		
	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto
Veracidad (n=21)									
Sesgo (%)	7.379	-9.488	-8.977	-0.500	-12.094	-13.771	-24.505	-17.056	-7.349
Recuperación (%)	102.125	90.513	91.023	99.500	87.906	86.229	75.495	82.944	92.651
Precisión (n=21, p=3)									
RSD <sub>r</sub> (%)	7.379	11.765	11.707	12.860	10.649	6.331	6.299	12.195	8.355
PRSD <sub>R</sub>	49.680	35.171	31.698	49.680	35.171	31.689	49.680	35.171	31.689
HorRat <sub>r</sub>	0.1	0.3	0.4	0.3	0.3	0.2	0.1	0.3	0.3

#### 4.3.7. Incertidumbre

Este parámetro se asoció con el resultado de una medición que caracteriza la dispersión de valores que pueden atribuirse al proceso de medición (194). Para obtener la incertidumbre expandida de la medición (U), las incertidumbres estándar combinadas (u) se multiplicaron por el factor de cobertura K=2.

Se calcula teniendo en cuenta todas las contribuciones durante la verificación de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$U = k \sqrt{u_{\text{tratamiento}}^2 + u_{\text{calibración}}^2 + u_{\text{matriz}}^2 + u_{\text{estándar}}^2 + u_{FD}^2 + u_{FC}^2} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde,

U: incertidumbre expandida.

K: factor de cobertura = 2.

u<sub>tratamiento</sub>: incertidumbre estándar relativa con respecto al tratamiento de la muestra.

u<sub>calibración</sub>: incertidumbre estándar relativa con respecto a la curva de calibración.

u<sub>matriz</sub>: incertidumbre estándar relativa con respecto al efecto de matriz.

u<sub>estándar</sub>: incertidumbre estándar relativa con respecto al estándar.

u<sub>FD</sub>: estimación de veracidad para el factor de dilución estándar relativo.

u<sub>FC</sub>: estimación de veracidad para el factor de concentración estándar relativo.

La Tabla 4-9 describe la contribución de las fuentes de incertidumbre para cada PPCP y la incertidumbre expandida sobre el valor final. La principal causa de

incertidumbre es la determinación de los PPCPs por medio de la curva de calibración. Sin embargo, cada causa de incertidumbre cumple con los criterios del método de análisis establecido en la Norma 2009/90 / CE, <50% (195).

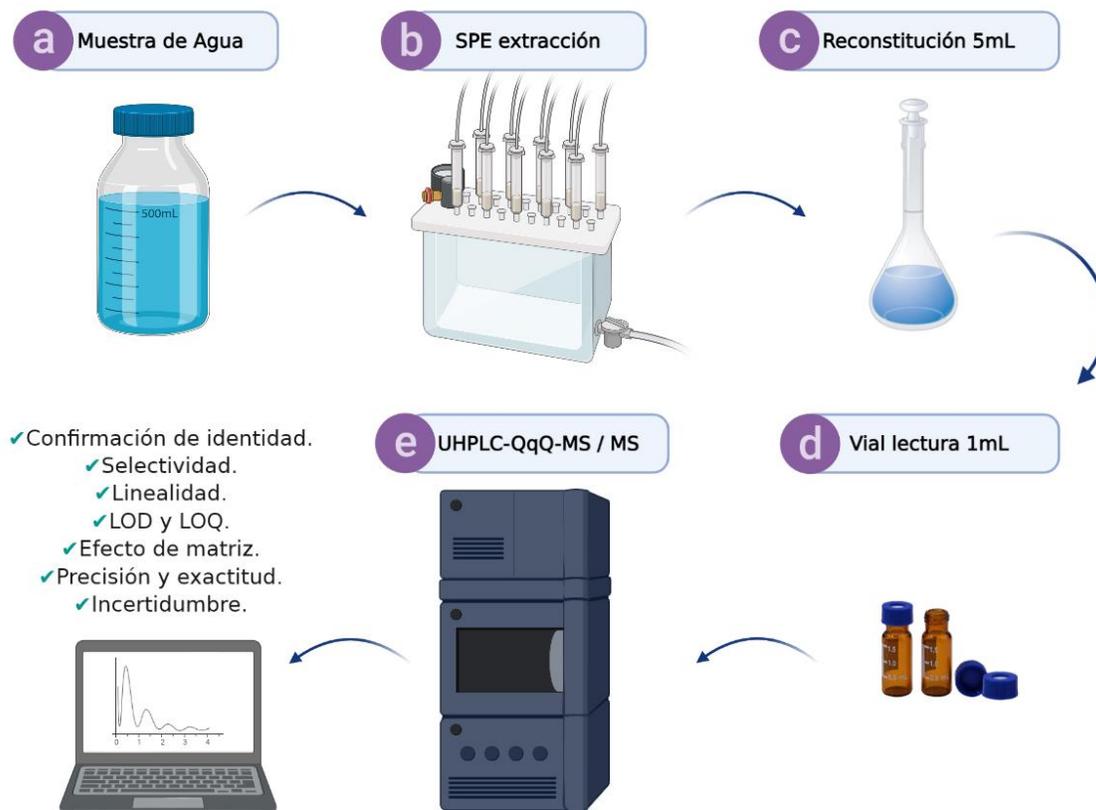
**Tabla 4-9.** Contribución de las fuentes de incertidumbre para cada PPCP a la incertidumbre expandida (%).

PPCP	u tratamiento	u calibración	u matriz	u estándar	u FD	u FC	U (k=2)
Ibuprofeno	2.563	91.492	2.605	0.483	2.550	0.309	22.2
Diclofenaco	2.717	93.217	1.854	0.319	1.688	0.205	27.3
Triclosán	2.561	95.761	0.521	0.165	0.885	0.107	37.7

## 4.4. Conclusión

Se confirmó un método analítico simple, rápido y preciso basado en SPE- UHPLC- QqQ-MS/MS para la determinación simultánea de la presencia de algunos PPCPs en aguas ambientales. Se utilizó la tecnología UHPLC para obtener un análisis más rápido, una reducción en el consumo de solventes, sin uso de sales, para un mayor rendimiento. La detección MS/MS se aplicó para obtener una mayor sensibilidad, identificación más precisa y confiable de los PPCPs analizados, haciendo posible dos transiciones para la mayoría de los compuestos. El presente método permitió alcanzar límites de cuantificación bajos, demostrando ser un método selectivo, exacto, preciso, robusto y confiable para monitorear PPCPs en muestras ambientales. Además, podría ser una herramienta útil para ser utilizada en los estudios de monitoreo con el fin de evaluar la aparición y el destino de los PPCPs en las aguas ambientales, así como para ayudar en la identificación de posibles fuentes de contaminación del medio acuático.

## Resumen gráfico



## **5. Capítulo 2. Extracción por QuEChERS para la determinación de ibuprofeno y diclofenaco en muestras de tejido muscular de peces, mediante UHPLC-QqQ-MS/MS**

La presencia de PPCPs y sus efectos toxicológicos se pueden determinar a través de especies bioindicadoras (7). Este grupo de vertebrados presenta características idóneas para discernir alteraciones bioquímicas, fisiológicas, toxicológicas o ecológicas, debido a sus ciclos de vida relativamente longevos frente a otros grupos animales, son fáciles de manipular y a que ocupan diferentes niveles tróficos en los ecosistemas (14,15).

Algunos PPCPs como los productos farmacéuticos, una vez en las aguas pueden afectar a los peces, produciendo feminización en machos, alteraciones en la capacidad reproductivas, reducción en la producción de gametos, cambios citológicos en el hígado, riñón y branquias en peces expuestos a diclofenaco y afectaciones en el proceso de desove por exposición a ibuprofeno (68,100,105,123,196–199).

Por esto es necesario métodos confiables que permitan la extracción de este tipo de compuestos de tejidos animales para su posterior cuantificación. La extracción por QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe), permite una alta eficiencia en la extracción para este tipo de matrices (142), proporciona resultados similares a los métodos tradicionales para el análisis de alimentos, piensos, pesticidas y micotoxinas, además consume menos tiempo que otros métodos tradicionales (143,145). Esta extracción cuenta con sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) como desecante, cloruro de sodio ( $NaCl$ ) y un solvente polar, acetonitrilo (143,145). Este método se basa en la separación líquido-líquido entre el agua y el acetonitrilo utilizando sales ( $MgSO_4 + NaCl$ ) (144). Para transferir los analitos de interés a la capa orgánica (acetonitrilo), el  $MgSO_4$  reduce el contenido de agua en la muestra y el  $NaCl$  es útil para compuestos sensibles a pH alcalinos, ambas sales producen la separación de fase entre el agua de la muestra y la capa de acetonitrilo (200).

En este trabajo no fue necesario la utilización de una segunda etapa de dispersión posterior a la utilización de QUEChERS, ya que los resultados de recuperación eran muy similares ( $CV < 7\%$ ); la cuantificación se realizó por UHPLC-QqQ-MS/MS, como se explica en el Capítulo 1. El rendimiento del método desarrollado se presentó en términos de confirmación de identidad, selectividad, linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), veracidad, precisión y exactitud, de acuerdo con los requisitos de Eurachem (180,181), la Directiva 96/23 / EC (182) y los Métodos Oficiales de Análisis de AOAC (183), aplicado en muestras de tejido muscular de peces. Los parámetros de confirmación de identidad y selectividad son equivalentes para este análisis, detallados en el Capítulo 1.

## **5.1. Materiales y métodos**

### **5.1.1. Reactivos, solventes y materiales**

Los estándares de ibuprofeno y diclofenaco fueron de USP (Rockville, Estados Unidos). Los estándares marcados isotópicamente Ibuprofeno  $^{13}C_6$  y Diclofenaco- $d_4$  fueron de Toronto Research Chemicals (Ontario, Canadá) (Tabla 4-1).

El acetonitrilo de grado LC-MS, el metanol de grado LC-MS y el ácido clorhídrico al 37% fueron de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania), el ácido acético glacial LC-MS de PanReac AppliChem (Castellar del Vallés, Barcelona). Se produjo agua tipo I (resistividad de 18.2  $M\Omega$  cm) utilizando un sistema UV Simplicity (Millipore, Francia). Nitrógeno 99.999% de Linde (Bogotá, Colombia).

Las soluciones estándar (a una concentración de 1000 mg/L) y los estándares marcados isotópicamente se prepararon en metanol LC-MS (MeOH) (Tabla 4-2). Todas las soluciones se almacenaron a  $-20$  °C, con un tiempo de caducidad de tres meses. La mezcla de soluciones de trabajo estándar que contenía todos los PPCPs se preparó en MeOH LC-MS. Se preparó una mezcla con los patrones marcados isotópicamente para usarse en la calibración de estándar interno.

Para la homogenización del músculo se utilizó un procesador industrial Hobart Combi Cutter CC34 (Offenburg, Alemania), seguido de un Ultra Turrax T25 (IKA, Alemania) para reducir el tamaño de la partícula. Para la extracción de los PPCPs en el músculo, se utilizó QuEChERS Original de Agilent (Santa Clara, Estados Unidos) y centrifuga 0320R (Boeco, Alemania).

### **5.1.2. Extracción por QUEChERS**

Para las extracciones se utilizó músculo de peces (*P. magdaleniatum*) que cumplieran con la talla mínima de captura ( $n=6$ ). Las muestras de tejido muscular

se homogenizaron con un procesador industrial Hobart Combi Cutter CC34 (Offenburg, Germany) e inmediatamente se congelaron ( $<-20^{\circ}\text{C}$ ) hasta su análisis. Para su análisis las muestras se descongelaron y se pesaron 5.0 g del pescado homogenizado en un tubo Falcon® de 50mL, seguido de 5 mL de agua acidificada ( $\text{pH}=2.0$  HCl). Para que la mezcla fuera homogénea se utilizó el Ultra Turrax T25 (IKA, Staufen, Alemania) en el nivel máximo de potencia. Luego de la homogenización se agregaron 10mL de acetonitrilo y un sobre de Original QuEChERS. Las muestras se agitaron enérgicamente por 1 minuto y posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos, las muestras se congelaron durante una hora y luego se tomaron 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se mezclaron en un vial con 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ : MeOH (90:10 v/v) para su posterior análisis por UHPLC-QqQ-MS / MS.

El tejido muscular de los peces puede variar en las cantidades de lípidos, y en este tipo de extracción las altas concentraciones de lípidos ( $> 20\%$ ) puede interferir en las recuperaciones de AINEs ya que son compuestos lipofílicos (145,201,202). Para evitar esta interferencia se congelaron los extractos durante 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ , manipulándolos rápidamente para evitar que los lípidos se disuelvan (145).

## **5.2. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando Statgraphics Centurion XVII. El criterio de significancia se estableció con un  $p < 0.05$ , para la evaluación de la normalidad de las variables continuas se realizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La independencia de residuales por Durbin-Watson y la homocedasticidad de residuales de acuerdo a Breusch-Pagan. Las medias homogéneas se realizaron con la prueba de t-Student, la varianza homogénea mediante F-Snedecor y la inexistencia de valores atípicos por Grubbs.

## **5.3. Aplicación del método analítico**

Debido a que la metodología analítica para la cuantificación instrumental fue detallada en el capítulo anterior, este capítulo se centrará en los parámetros específicos para el tejido muscular, basado en la extracción de PPCPs por la metodología de QuEChERS y los requisitos de la Eurachem (180,181), la Directiva 96/23 / CE (182) y los Métodos Oficiales de Análisis de AOAC (183). Los parámetros considerados en este capítulo fueron: linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), veracidad, precisión y exactitud.

### **5.3.1. Linealidad**

La linealidad se evaluó en el rango de 20 a 400 ng/g (20, 40, 80, 160, 240, 320 y 400 ng/g), realizándose en muestras de matriz blanco enriquecidas. Las calibraciones se

hicieron por triplicado mediante estándar externo y comprobación por estándar interno.

La linealidad de la curva se evaluó con las mismas reglas de aceptación del capítulo anterior:

- $(R^2) > 0.995$  coeficiente de determinación.
- Shapiro-Wilk test:  $p_{calculada} > 0.05$ , normalidad de residuales.
- Durbin-Watson:  $DW > 1.5$  y  $p_{calculada} > 0.05$ , independencia de residuales.
- Breusch-Pagan test:  $p_{calculada} > 0.05$ , homocedasticidad de residuales.

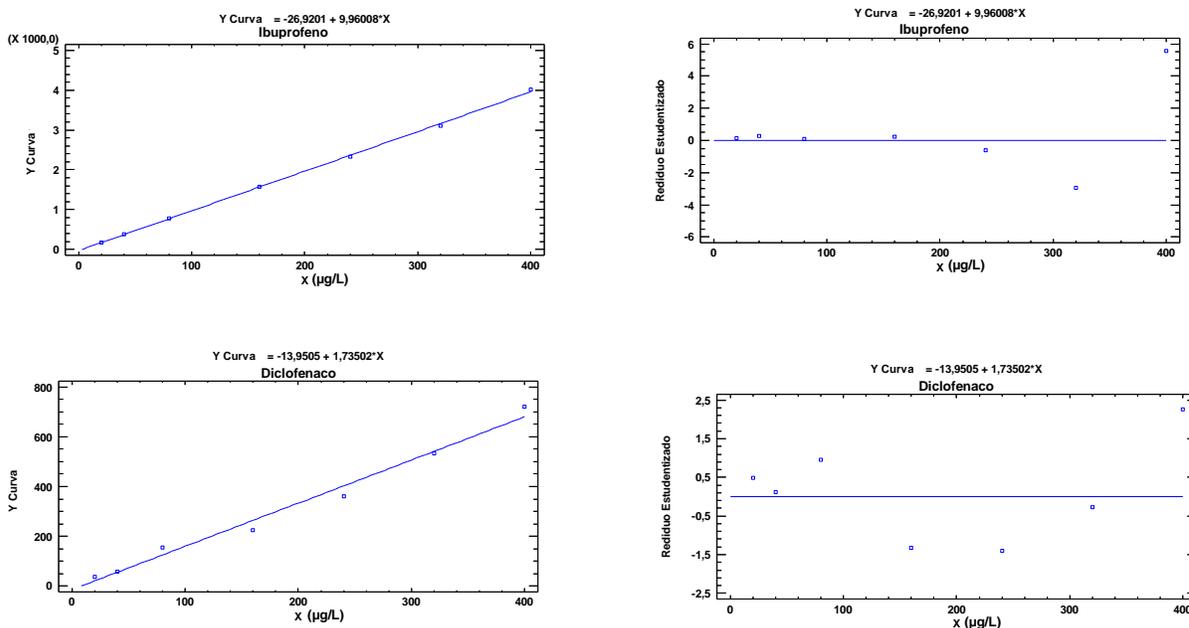
En la tabla 5-1 se muestran los resultados de cada uno de los criterios de aceptación, con relación al coeficiente de determinación ( $R^2$ ). El modelo ajustado explica para cada PPCP, entre 99.94 y 99.82% de variabilidad en Y. Los coeficientes de correlación (R) de los PPCPs fueron iguales a 0.99, lo que indica una correlación positiva.

De acuerdo al estadístico Durbin-Watson para determinar la independencia de los residuales, no hubo autocorrelación residual ( $p > 0.05$ ). los residuos presentan una distribución normal (Shapiro-Wilk,  $p > 0.05$ ), así como homocedasticidad (Breusch- $p > 0.05$ ), indicando que las variaciones de los residuales eran constantes en las concentraciones para cada PPCP.

**Tabla 5-1.** Resultados de linealidad estadística para analitos.

PPCP	Coeficiente de correlación ( $R^2$ )	Test		
		Shapiro-Wilk (p-valor)	Durbin-Watson (p-valor)	Breusch-Pagan (p-valor)
Ibuprofeno	0.999	0.519	0.596	0.399
Diclofenaco	0.998	0.509	0.408	0.367

La regresión lineal de las curvas de calibración para cada PPCP y el gráfico de los residuos se muestran en la Figura 5-1.



**Figura 5-1.** Curva de calibración promedio y gráfico residual para el análisis de ibuprofeno y diclofenaco.

### 5.3.2. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

El LOD es la concentración más baja de analito que se detectó con una forma aceptable del pico, cumpliendo con los iones de cuantificación y confirmación con una relación  $S/N > 3$ . Por su parte, e LOQ es la concentración más baja que cumple los criterios LOD pero con una relación  $S/N > 10$  (68,142,177). Estas variables calcularon utilizando diez muestras diferentes del blanco en matriz y diez muestras de un blanco enriquecido con el nivel bajo de cada PPCP (Tabla 5-2).

**Tabla 5-2.** Límites de detección y cuantificación.

Limites (ng/g)	Ibuprofeno	Diclofenaco
LOD	5.420	5.856
LOQ	16.261	17.569

### 5.3.3. Veracidad

La presencia de interferencias en las muestras de tejido muscular se evaluó a través de muestras enriquecidas a dos niveles de concentración (30 y 70% del último punto de la curva de calibración): 120 ng/g y 280 ng/g. Se realizaron las pruebas de T-Student y F-Snedecor para comparar la homogeneidad media y la variación de la

solución del patrón con respecto a la muestra enriquecida en cada PPCP. Para la identificación de los valores atípicos en las muestras fortificadas, se realizó la prueba de Grubbs y Dixon.

Para estas pruebas, los siguientes criterios de aceptación fueron tomados en cuenta:

- t-Student:  $p_{\text{calculada}} > 0.05$ , medias homogéneas.
- F-Snedecor:  $p_{\text{calculada}} > 0.05$ , varianza homogénea.
- Grubbs:  $p_{\text{calculada}} > 0.05$ , inexistencia de valor atípico.

En la tabla 5-3 se muestran los resultados de las pruebas estadísticas para cada PPCP. Los resultados muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos de las muestras enriquecidas al 30% y 70%, indicando que no hay efecto de matriz de las muestras de tejido muscular de pescado.

**Tabla 5-3.** Resultados del efecto de matriz para los PPCPs.

PPCP	Test		
	t-Student (p-valor)	F-Snedecor (p-valor)	Grubbs (p-valor)
Ibuprofeno	0.240	0.386	1.0
Diclofenaco	0.606	0.490	1.0

#### 5.3.4. Precisión y exactitud

La exactitud se midió de acuerdo al sesgo y la recuperación, y la precisión se determinó como la precisión intermedia en términos de repetibilidad (% RSD). Para esto se realizaron pruebas independientes con el mismo método, equipo y operador en análisis intra e inter-día, con músculo de peces (n=6) enriquecido con ibuprofeno y diclofenaco a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto): 20, 160 y 400 ng/g en 3 días diferentes (p=3).

La determinación de la desviación estándar relativa de reproducibilidad prevista (PRSD<sub>R</sub>) se calculó para cada nivel de concentración utilizando la fórmula de Horwitz y las ecuaciones 5 y 6 del capítulo 1.

De acuerdo al Apéndice F de AOAC (183) se tomaron los siguientes criterios de aceptación:

- Recuperación entre 62-114%.
- Porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD) < 20%.
- HorRat<sub>r</sub> < 1.3

La Tabla 5-4 muestra que los valores para el sesgo estuvieron entre -18.23 y 7.76 % y las recuperaciones fueron >81%, cumpliendo los criterios de aceptación. El RSD<sub>r</sub>

de la precisión intermedia fue <19% y los valores correspondientes al HorRat<sub>r</sub> fueron menores al 1.3, lo que indica que el método tiene valores de repetibilidad y reproducibilidad aceptables.

**Tabla 5-4.** Resultados de veracidad y precisión para cada PPCP en cada nivel de concentración.

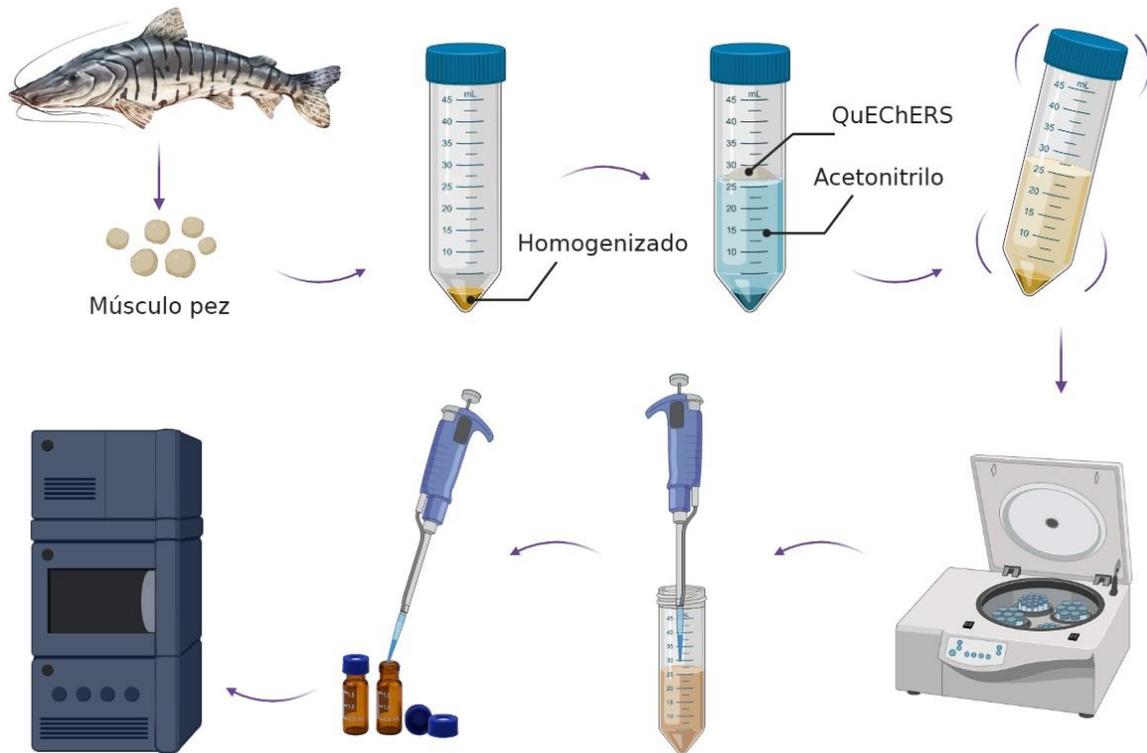
Parámetro	Ibuprofeno			Diclofenaco		
	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto
Veracidad (n=30)						
Sesgo (%)	-18.046	7.760	-14.766	-13.497	-15.457	-18.227
Recuperación (%)	81.954	107.760	85.234	86.503	84.543	81.073
Precisión (n=30, p=3)						
RSD <sub>r</sub> (%)	16.213	5.407	7.265	17.441	11.208	19.085
PRSD <sub>R</sub>	28.568	20.224	18.227	28.568	20.224	18.227
HorRat <sub>r</sub>	0.6	0.3	0.4	0.6	0.6	1.0

## 5.4. Conclusión

Se desarrolló un método sencillo y rápido para la extracción de ibuprofeno y diclofenaco, evitando los métodos tradicionales con alto consumo de solventes y generalmente extensos. Esto permitió el análisis en matrices con contenido de lípidos como el tejido muscular de pez, con la técnica de congelación para la “eliminación” de lípidos. El método de extracción por QuEChERS permitió que el procesamiento fuera más rápido y el análisis por UHPLC-QqQ-MS/MS que se obtuvieran resultados exactos, precisos y confiables. Se utilizaron los requisitos de Eurachem [63,64], la Directiva 96/23 / EC [65] y los Métodos Oficiales de Análisis de AOAC [66], teniendo en cuenta los parámetros de confirmación de identidad, selectividad, linealidad, límite de detección y cuantificación, efecto matriz, precisión y exactitud en muestras de músculo de pez enriquecidas en matriz.

El método analítico desarrollado cumplió con todos los criterios de aceptación de los sistemas de referencia de validación. El método fue aplicado con éxito en la cuantificación de muestras de Bagre rayado *P. magdaleniatum* (Capítulo 3).

# Resumen gráfico



## **6. Capítulo 3. Estado actual de contaminación por ibuprofeno y diclofenaco en *Pseudoplatystoma magdaleniatum* proveniente de los ríos Cauca y Magdalena, determinado en tres períodos climáticos.**

El río Magdalena ha sido el eje de desarrollo del país, siendo entrada al centro de Colombia desde el Mar Caribe. A nivel económico, es la cuenca más importante del país, debido a que sustenta aproximadamente el 80% de la población (18), 70% de la energía hidráulica, 95% de la termoelectricidad, 70% de la producción agrícola, incluyendo 90% del café, y 50% de la pesca de agua dulce (20). La cuenca del río Magdalena cuenta con un área de 199294 km<sup>2</sup>, lo que representa entre el 17-24% del territorio colombiano y donde vive aproximadamente la mitad de la población del país (19,20). Su cuenca es drenada por el propio Magdalena y los ríos Cauca, Sogamoso y San Jorge (18). El río Cauca es el principal afluente del Magdalena con un área de 74165 km<sup>2</sup> equivalentes al 7% del territorio (19).

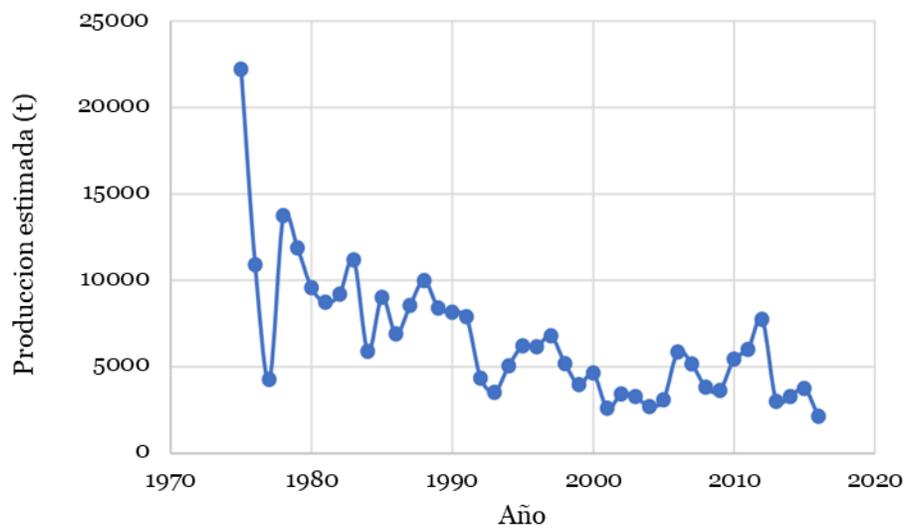
Colombia es el país más húmedo de Suramérica, con un promedio anual de lluvias de 3000 mm, lo que significa que apenas el 12% del país es tierra cultivable (18). Las abundantes lluvias no siempre significan que sean buenas para los peces, ya que hay lixiviación de los suelos, que produce escasez de minerales, lo que significa ríos con baja productividad pesquera (18). Sin embargo, la cuenca del Magdalena al tener menores precipitaciones(18), después del litoral Pacífico es la segunda pesquería más productivas (203).

Tanto el Magdalena como su principal afluente, el río Cauca, tienen su origen en el Macizo Colombiano, sin embargo, como sus valles están separados por la Cordillera Central, generando dos sistemas aluviales: Valles del Alto Magdalena y Cauca (18). El valle alto es relativamente seco con precipitaciones promedio anuales de 1500 mm, y régimen de lluvias bimodal, con dos picos, uno en mayo-junio y otro mayor en octubre (18). La cuenca presenta un ciclo hidrológico con cuatro periodos,

determinados de acuerdo a los movimientos de peces migratorios: subienda (diciembre a marzo), bajanza (abril a junio), mitaca (julio a agosto) y bajanza de mitaca (septiembre a noviembre), los cuales varían anualmente y determinan las dinámicas biológicas y pesqueras de la cuenca (22).

En el desarrollo a través del tiempo de las pesquerías de la cuenca del Magdalena, ha sido notoria la reducción acelerada en las capturas y la inclusión progresiva de especies de menor calidad no capturadas previamente (18). El potencial pesquero estimado para los 1970s en la cuenca fue de 80.000 - 120.000 toneladas/año y en los últimos 35 años la producción ha disminuido hasta un 85% con sobrexplotación de las principales especies y con el 75% de las especies de interés pesquero con algún grado de amenaza, de acuerdo al libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia (22).

La estimación de la producción del Bagre rayado *P. magdaleniatum* (117), representa el 16% de la producción total histórica, siendo los años 1975-1979 y 1983 los de mayor producción, alrededor de las 10000 toneladas. Por otra parte, para los años 1977, 1991-1993, 1999, 2000-2005, 2008, 2009 y 2013- 2016, no superaron las 5000 toneladas (19) (Figura 6-1).



**Figura 6-1.** Figura tomada y modificada de (19).

En los últimos 40 años se ha detectado una disminución del 80% en el número de individuos del Bagre rayado *P. magdaleniatum* en la cuenca de los ríos Magdalena y Cauca, Colombia (204–206). Esta disminución amenaza la economía de las comunidades en donde el Bagre habita, ya que es su principal fuente de trabajo, ingreso y alimentación (207). El *P. magdaleniatum* (Siluriformes, Pimelodidae) es endémico y la especie de mayor importancia comercial en la pesquería colombiana, sin embargo, se encuentra dentro de las especies críticas de extinción (22).

Entre los contaminantes que ingresan a los ríos, se encuentran los PPCPs, los cuales generalmente son altamente apolares e hidrofóbicos, lo que indica que se distribuyen a través de transporte lipídico y se dispersan por de la cadena alimentaria (201,202). La Unión Europea (EU) (173,174) y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) (208) han establecido listas de contaminantes prioritarios presentes en las aguas residuales y la escorrentía de aguas pluviales, que pueden ser una amenaza para los cuerpos de agua receptores, incluidas las aguas superficiales, los organismos que viven en ellas y la salud pública. Las propiedades fisicoquímicas de muchos PPCPs no permiten su eliminación con facilidad mediante procesos convencionales de tratamiento del agua (10,34). Además, no todos los PPCPs son persistentes, pero su uso continuo y liberación constante los convierte en pseudo-persistentes (10,34). Por lo tanto los productos farmacéuticos que se degraden se podrían comportar como persistentes por su liberación constante al medio ambiente (10,34).

Por otra parte, no existe una certeza sobre las afectaciones que estos productos pueden causar una vez se encuentran en el ambiente acuático, debido a que fueron diseñados específicamente para maximizar su actividad biológica en dosis bajas, y generar cambios en algunos mecanismos metabólicos, enzimáticos o de señalización celular (34). Una de las principales preocupaciones de la presencia de algunos PPCPs en las aguas es la capacidad de interferir en el sistema endocrino, alterándola homeostasis y produciendo efectos no deseados en los seres vivos. La biota acuática está expuesta involuntariamente a los productos farmacéuticos en su ambiente natural, aumentando los posibles riesgos ecotoxicológicos que estos puedan tener (34). Diferentes investigaciones han demostrado que el uso regular de algunos PPCPs puede alterar algunas el sistema endocrino, denominados como DEs, sin embargo, la evaluación del riesgo se hace difícil por la variabilidad de las concentraciones en el agua, además los efectos producidos a concentraciones subletales aun requieren más estudios (10).

Medicamentos como ibuprofeno y diclofenaco, tienen una alta disponibilidad en los cuerpos de agua, detectados con facilidad en ríos, arroyos (49,64) y en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (65). Países como Reino Unido, han detectado ibuprofeno en ríos (1.681-33.764  $\mu\text{g/L}$ ) (71), en afluentes ( $<0.984$ -6.328  $\mu\text{g/L}$ ) y efluentes ( $<0.065$ - 0,491  $\mu\text{g/L}$ ) de plantas de tratamiento de aguas residuales (209).

Estos productos farmacéuticos están diseñados para ser biológicamente activos, afectando directamente los ecosistemas acuáticos (66,67) y, en algunos casos, causando efectos farmacodinámicos similares en peces (210), en los que puede modificar las reacciones celulares en el hígado, riñón y branquias(63,68), así como disrupción del sistema endocrino por la alteración de la actividad de la aromatasa

influyendo posteriormente en el equilibrio de hormonas sexuales, así como efectos citológicos e histológicos y cambios de expresión génica en peces (69).

Específicamente, el ibuprofeno a concentraciones de 1.39 µg/L, 3.0 µg/L y 4.17 µg/L, produce en *Cyprinus carpio* trastornos del desarrollo embrionario y efectos teratogénicos, así como retraso en la eclosión y desarrollo, hipopigmentación, edema pericárdico, deformación de la yema (211). En bagre sapo (*Rhamdia quelen*) a concentraciones de 10 µg/L, en riñón posterior, aumenta la actividad de la glutatión-S-transferasa, glutatión peroxidasa, y a exposiciones de 0.1 y 1.0 µg/L disminuye el recuento de glóbulos blancos; lo que indica que el ibuprofeno causa nefrotoxicidad y un efecto inmunosupresor (132). Por otro lado, exposiciones de diclofenaco entre 1 - 500 µg/L durante 28 días en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), mostraron degeneración de gotitas hialinas de células epiteliales tubulares en el riñón y aparición de nefritis intersticial; en las branquias, necrosis de las células del pilar, que producen daño a la pared capilar dentro de las laminillas secundarias (74). En diclofenaco se han observado efectos tanto en el riñón como en las branquias incluso en concentraciones de 5 µg/L, así como acumulación en órganos como riñón, branquias y tejido muscular (74). Otro estudio en *Argyrosomus regius* con exposición a este mismo fármaco a 0.3 y 15 µg/L durante 30 días, afectó el metabolismo de los peces al aumentar el consumo de energía celular en el músculo y en consecuencia, redujo el potencial energético neto de los peces (212).

Colombia tiene incipientes procesos de monitoreo de residuos farmacéuticos tanto en ríos como en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, lo cual conlleva a un desconocimiento en el destino, transporte y niveles de toxicidad de estos productos tanto en el recurso hídrico como en los peces (105,134,157,158,164,213,214). Gran parte de las aguas residuales de Colombia no se tratan antes de su vertido o su disposición es incompleta en plantas de tratamiento de aguas residuales (67,157), lo cual puede generar alteraciones en diferentes ecosistemas y problemáticas sanitarias (64,67,68). Actualmente, no se han encontrado determinaciones de medicamentos en la cuenca del río Magdalena, ya que los estudios se han centrado en la determinación de metales pesados (26,215,216) y agroquímicos (18). Se han realizado algunas investigaciones sobre el contenido algunos PPCPs en las aguas de las principales ciudades de Colombia, encontrando que el aporte más significativo de los PPCPs proviene de AINEs, anticonvulsivos y antibióticos (43,73,135,217–219).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo fue la determinación del estado actual de la contaminación del ibuprofeno y diclofenaco en los principales ríos de Colombia y en Bagre rayado *P. magdaleniatum*, en diferentes períodos climáticos (lluvia, transición, seca), para así determinar si hay presencia y ésta es una de las posibles causas de la disminución del bagre rayado del Magdalena.

## 6.1. Materiales y métodos

La cuantificación de estos medicamentos se llevó a cabo en diez sitios a lo largo de los ríos Cauca y Magdalena, siguiendo la metodología EPA 1694 modificada (177) para las muestras de agua, y utilizando QuEChERS para la extracción en tejido muscular de Bagre. La cuantificación de ambas matrices se realizó con un UHPLC-QqQ-MS / MS.

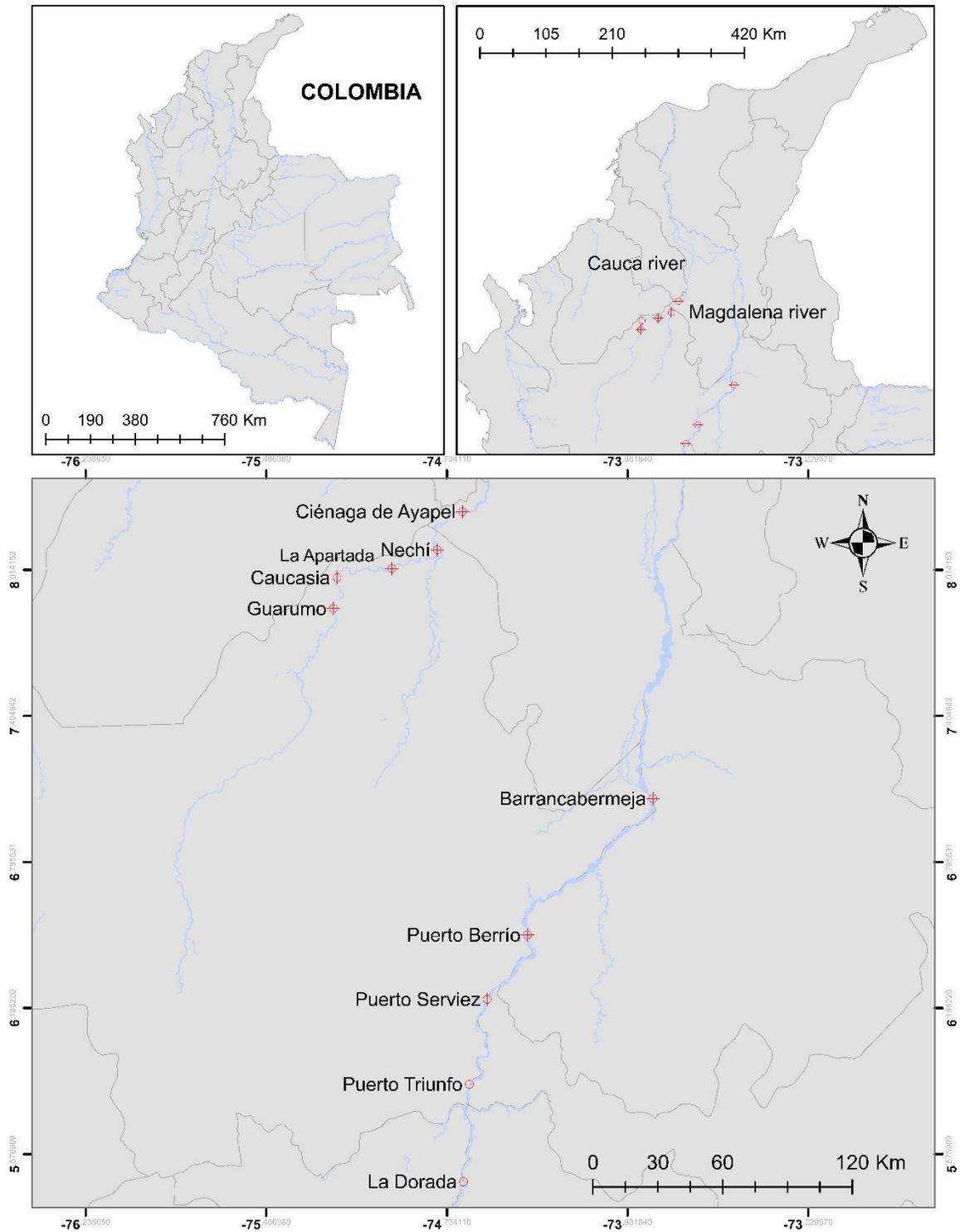
### 6.1.1. Reactivos, solventes y materiales

Los reactivos, solventes y materiales para la extracción ibuprofeno y diclofenaco en muestras de agua fue descrita en la sección 5.1.1, y para las muestras de Bagre *P. magdaleniatum* en la sección 6.1.1 de este manuscrito.

### 6.1.2. Recolección de muestras

Se realizó una recolección por duplicado de las muestras de agua, y las muestras de peces (*P. magdaleniatum*) fueron compradas en las plazas de mercado de cada uno de los cinco sitios de muestreo en el río Cauca: Ciénaga de Ayapel, Nechí, La Apartada, Cauca y Guarumo, y en los cinco sitios del río Magdalena: Barrancabermeja, Puerto Berrio, Puerto Serviez, Puerto Triunfo y La Dorada (Figura 6-2.), teniendo como criterio para su compra la talla mínima de captura (118). Los monitoreos de agua y peces se realizaron durante dos años y en tres períodos climáticos diferentes, lluvia, transición y seca. En Colombia los períodos climáticos están determinadas por la precipitación causada por el movimiento anual de la zona de convergencia intertropical (ZCIT), que presenta un periodo lluvioso en marzo – mayo y septiembre – noviembre y un periodo seco, en junio – agosto y diciembre– febrero (220).

En cada sitio de muestreo se tomaron medidas *in situ*, temperatura del agua, pH, oxígeno disuelto, saturación de oxígeno y conductividad, utilizando un equipo multiparamétrico HACH HQ40d (Loveland, Colorado, United States) previamente calibrado en el laboratorio. Las muestras de agua se recogieron en botellas de vidrio ámbar de 500 mL previamente mufladas. Las muestras de tejido muscular de los peces y las de agua, se transportaron en una nevera con hielo al Laboratorio del Grupo Diagnóstico y Control de la Contaminación (GDCON), ubicado en la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia, Colombia.



**Figura 6-2** Mapa de los puntos de recolección de muestras en los ríos Cauca y Magdalena. Fuente Ilustración propia, creada con ArcGIS.

### 6.1.3. Preparación de muestras de agua y músculo

La preparación de las muestras de agua fue descrita en la sección 5.1.2, y para las muestras de Bagre *P. magdaleniatum* en la sección 6.1.2 de este manuscrito.

## 6.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando Statgraphics Centurion XVII. La evaluación de la normalidad de las variables continuas se realizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los sitios de muestreo, las temporadas climáticas y las variables fisicoquímicas, posteriormente se realizó la prueba honestly significant difference (Tukey's HSD). Para todos los análisis estadísticos, el criterio de significancia se estableció en  $p < 0.05$ .

## 6.3. Resultados

Los resultados de las variables fisicoquímicas tomadas *in situ* se presentan en la Figura 6-3. Para todos los parámetros medidos en campo no hubo diferencias estadísticamente significativas por temporada, sin embargo, se presentaron diferencias en algunos de los sitios de muestreo, Tabla 6-1. Las temperaturas más altas se registraron en la Ciénaga Ayapel ( $31.02 \pm 1.33$  °C), Barrancabermeja ( $28.76 \pm 0.35$  °C) y Nechí ( $28.51 \pm 0.66$  °C). El pH tuvo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con un rango entre 6.91-7.69. El oxígeno disuelto presentó diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) en los sitios Barrancabermeja ( $5.42 \pm 0.34$  mg/L), La Dorada ( $5.52 \pm 0.29$  mg/L), Caucasia ( $6.56 \pm 0.49$  mg/L), Nechí ( $6.92 \pm 0.21$  mg/L) y Guarumo ( $7.13 \pm 0.03$  mg/L). Por último, no hubo diferencias estadísticamente significativas para la conductividad que se mantuvo en un rango de 68.9 – 239.1  $\mu\text{S/cm}$ .

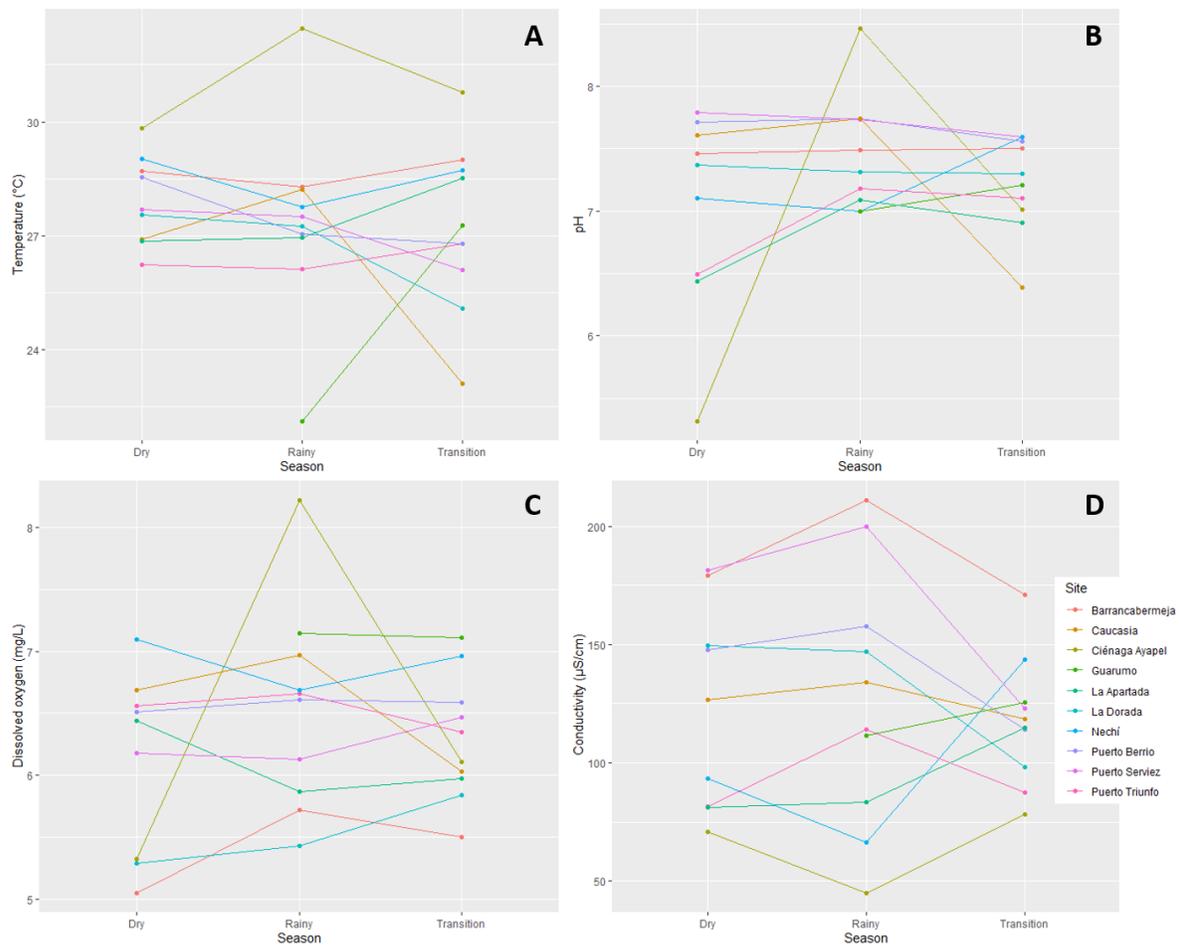
**Tabla 6-1.** Variables fisicoquímicas medidas *in situ* por sitio de muestreo tomadas en los ríos Cauca y Magdalena (Media $\pm$ SD).

Río	Sitio de muestreo	Oxígeno disuelto (mg/L)	Temperatura (°C)	pH	Saturación de oxígeno (%)	Conductividad ( $\mu\text{S/cm}$ )
Magdalena	Barrancabermeja	$5.46 \pm 0.45^a$	$28.61 \pm 0.96^{ab}$	$7.48 \pm 0.16^a$	$73.11 \pm 6.31^{ab}$	$185.13 \pm 25.36^a$
	La Dorada	$5.52 \pm 0.88^{ab}$	$26.63 \pm 1.51^a$	$7.32 \pm 0.09^a$	$71.70 \pm 10.95^a$	$136.15 \pm 30.03^a$
	Puerto Berrio	$6.57 \pm 0.18^{abc}$	$27.40 \pm 1.00^a$	$7.68 \pm 0.24^a$	$85.06 \pm 3.83^{abcd}$	$141.88 \pm 30.72^a$
	Puerto Serviez	$6.24 \pm 0.390^{abc}$	$27.16 \pm 1.17^a$	$7.71 \pm 0.21^a$	$80.85 \pm 5.60^{abc}$	$171.40 \pm 36.54^a$
	Puerto Triunfo	$6.54 \pm 0.58^{abc}$	$26.36 \pm 1.89^a$	$6.69 \pm 0.46^a$	$84.37 \pm 6.77^{abcd}$	$91.05 \pm 25.86^a$
Cauca	Caucasia	$6.88 \pm 0.67^c$	$27.61 \pm 1.07^a$	$7.58 \pm 0.55^a$	$93.06 \pm 7.54^{cd}$	$129.47 \pm 24.17^a$
	Ciénaga Ayapel	$6.28 \pm 1.61^{abc}$	$31.04 \pm 2.32^b$	$7.15 \pm 0.77^a$	$95.49 \pm 27.97^d$	$66.68 \pm 39.95^a$

Río	Sitio de muestreo	Oxígeno disuelto (mg/L)	Temperatura (°C)	pH	Saturación de oxígeno (%)	Conductividad (μS/cm)
	Guarumo	7.12±0.58 <sup>bc</sup>	26.24±2.33 <sup>a</sup>	7.21±0.48 <sup>a</sup>	91.43±9.10 <sup>abcd</sup>	122.67±35.06 <sup>a</sup>
	La Apartada	5.98±0.80 <sup>abc</sup>	28.18±1.15 <sup>a</sup>	6.87±0.24 <sup>a</sup>	75.46±9.86 <sup>ab</sup>	106.64±23.30 <sup>a</sup>
	Nechí	6.94±0.32 <sup>bc</sup>	28.62±1.22 <sup>ab</sup>	7.55±0.68 <sup>a</sup>	90.83±4.92 <sup>bcd</sup>	125.66±36.78 <sup>a</sup>

Diferentes letras minúsculas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Generalmente, los niveles apropiados para la cría de Bagre rayado están en el rango de pH entre 6.5 y 8.5 (21,221), una temperatura mínima de 23°C (21), y rango óptimo entre 26 a 28 °C (221), además de un OD a partir de 3 mg/L y como máximo 12 mg/L (21,222).



**Figura 6-3.** Parámetros fisicoquímicos medidos *in situ* por temporada climática y sitio de muestreo. Temperatura (A), pH (B), Oxígeno disuelto (C) y Conductividad (D).

Los niveles de concentración de ibuprofeno y diclofenaco en las aguas de los ríos Cauca y Magdalena de cada temporada climática se presentan en la Tabla 6-2. En general, para todos los sitios de muestreo y todas las temporadas climáticas el ibuprofeno siempre estuvo por debajo del límite de cuantificación (0.50 µg/L). El diclofenaco en la temporada seca, en tres sitios del río Cauca se presentaron niveles desde 12.20 µg/L hasta 75.04 µg/L. Por otra parte, en el río Magdalena en el período de transición hubo tres sitios de muestreo que tenían concentraciones de diclofenaco en un rango de 0.68-7.35 µg/L. Después de realizar una ANOVA por sitio de muestreo, la mayor concentración de diclofenaco promedio se encontró en Nechí.

**Tabla 6-2.** Concentraciones de ibuprofeno y diclofenaco, en agua en las temporadas climáticas y sitios de muestreo de los ríos Cauca y Magdalena (Media±SD).

Río	Sitio de muestreo	Temporada climática					
		Seca		Transición		Lluvia	
		Ibuprofeno (µg/L)	Diclofenaco (µg/L)	Ibuprofeno (µg/L)	Diclofenaco (µg/L)	Ibuprofeno (µg/L)	Diclofenaco (µg/L)
Magdalena	Barrancabermeja	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.68±0.23	<LOQ	<LOQ
	La Dorada	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Puerto Berrio	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Puerto Serviez	<LOQ	<LOQ	<LOQ	7.29±0.07	<LOQ	<LOQ
	Puerto Triunfo	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.94±0.52	<LOQ	<LOQ
Cauca	Caucasia	<LOQ	17.81±0.17	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Ciénaga Ayapel	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Guarumo	*	*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	La Apartada	<LOQ	12.20±16.55	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Nechí	<LOQ	67.54±10.61	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

LOQ= límite de cuantificación (0.500 µg/L).

\* No fue posible tomar la muestra.

En la Tabla 6-3 se presentan los resultados de concentración de ibuprofeno y diclofenaco analizado en Bagre *P. magdaleniatum* en los diferentes sitios de muestreo y por temporada climática. Para todos los sitios de muestreo, en todas las temporadas climáticas las concentraciones de ibuprofeno en Bagre estuvieron por debajo del límite de detección (5.0 µg/kg), y para el diclofenaco estuvieron por debajo de los límites de cuantificación (20.0 µg/kg). Algunas muestras estuvieron por encima del límite de detección, pero no se cuantificaron, ya que no eran precisas ni exactas.

**Tabla 6-3.** Concentraciones de ibuprofeno y diclofenaco, en Bagre *P. magdaleniatum* en las temporadas climáticas y sitios de muestreo tomadas en los ríos Cauca y Magdalena (Media±SD).

Río	Sitio de muestreo	Temporada climática					
		Seca		Transición		Lluvia	
		Ibuprofeno (µg/kg)	Diclofenaco (µg/kg)	Ibuprofeno (µg/kg)	Diclofenaco (µg/kg)	Ibuprofeno (µg/kg)	Diclofenaco (µg/kg)
Magdalena	Barrancabermeja	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	7.80±1.41 (n=6,<LOQ)
	La Dorada	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5.00±1.98 (n=4,<LOQ)
	Puerto Berrio	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	8.80±5.09 (n=6,<LOQ)
	Puerto Serviez	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6.20±0.85 (n=6,<LOQ)
	Puerto Triunfo	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6.00±2.43 (n=6,<LOQ)
Cauca	Caucasia	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
	Ciénaga Ayapel	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
	Guarumo	*	*	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
	La Apartada	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
	Nechí	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD

LOD = límite de detección (5.00 µg/kg).

LOQ= límite de cuantificación (20.00 µg/kg).

\* No fue posible tomar la muestra.

## 6.4. Discusión

Uno de los parámetros fisicoquímicos importantes de calidad del agua es el oxígeno disuelto (OD), el cual está relacionado con la fotosíntesis, la respiración y descomposición de materia orgánica (223). Este parámetro es importante en el funcionamiento del ecosistema acuático, ya que niveles bajos afecta la vida de muchas especies acuáticas, siendo los peces uno de los grupos de vertebrados más sensibles. Valores de OD en el rango de 0-5 mg/L puede producir hipoxia, a partir de 5-8 mg/L se considera aceptable, y entre 8-12 mg/L es el más adecuado para la mayoría de especies de peces (224). Es importante resaltar que a menor temperatura mayor solubilidad del oxígeno, y los sólidos disueltos presentes en las aguas disminuyen la cantidad de oxígeno en el agua (21). Por lo tanto, en aguas por encima de 25°C y muchos sólidos disueltos, empieza a ser crítico el oxígeno disuelto. Para este estudio las concentraciones de oxígeno disuelto se mantuvieron siempre en los rangos adecuados (4.14-8.82 mg/L), para el bagre rayado *P. magdaleniatum* es un

rango aceptable, ya que este requiere mínimo 3 mg/L de oxígeno disuelto para sobrevivir y crecer (21).

Aunque está bien documentada la presencia y distribución de la mayoría de los productos farmacéuticos en el mundo, aún falta información sobre la presencia de productos farmacéuticos como diclofenaco e ibuprofeno en América latina. Esta información es importante ya que la mayoría de estos países realizan descargas directas a ríos, lagos y embalses, además estas aguas no solo están en contacto con la biota acuática sino que son utilizadas para consumo humano (37). Es el caso de Colombia, la cual no cuenta con suficientes plantas de tratamiento de agua residual y la mayoría de estas plantas no tienen procesos avanzados para la eliminación de ciertos tipos de compuestos (37,225), entre ellos los PPCPs específicamente los AINEs.

En este estudio se pudo comprobar que no hay presencia de ibuprofeno ni diclofenaco en ninguna de las muestras de tejido muscular de Bagre rayado *P. magdaleniatum*. Es posible que no se evidencien estas concentraciones debido a que la vida media biológica en sangre tanto del diclofenaco (2 h (226)) como el ibuprofeno (1.8 a 2 h (227)) es corta, y por la naturaleza de estos medicamentos se encuentren acumulados en órganos que contengan un alto contenido graso y que sean detoxificadores como el hígado, ya que ambos tienen carácter lipofílico.

Se encontraron concentraciones para diclofenaco en agua, tanto de los ríos Cauca y Magdalena (0.68-75.04 µg/L), con las mayores concentraciones de este medicamento en la temporada seca, donde posiblemente haya una menor dilución y mayor concentración del diclofenaco debido a la disminución de la columna de agua en los ríos (28,38,228), estos mismos patrones se presentaron en el período seco, los cuales ya han sido reportados en aguas superficiales en Estados Unidos y Corea del sur (28). La mayor concentración del diclofenaco en comparación con la del ibuprofeno puede ser explicada desde las constante de la ley de Henry (229), para el diclofenaco la constante es de  $4.73 \times 10^{-12}$  atm-cu m/mol a 25 °C (230) y para el ibuprofeno  $1.5 \times 10^{-7}$  atm-cu m/mol a 25 °C (231), indicando la liberación en forma de vapor de 100000 veces menos del diclofenaco en comparación con el ibuprofeno.

Estudios recientes realizados en Colombia en aguas residuales urbanas de los ríos Bogotá y Medellín, presentaron niveles para diclofenaco de 0.40 y 0.24 µg/L, respetivamente (37), evidenciando concentraciones más bajas en comparación a las del presente estudio (232,233). Como se muestra en la Tabla 6-4, países como México, Sudáfrica y Nigeria presentan concentraciones de diclofenaco en el mismo orden de concentración a las del presente estudio entre 1.4 µg/L y 8.17 µg/L y 57.16 µg/L (38), sin embargo, las concentraciones de este estudio son las más altas reportadas hasta el momento. Es posible que las mayores concentraciones de

diclofenaco observadas en ambos ríos se deban a las áreas altamente urbanizadas, o a áreas rurales relacionadas con actividades agrícolas intensas (38).

Debido a la variación en parámetros como la hidrología, turbiedad, régimen hidráulico y la estructura de las comunidades microbianas (234–236), los cuales influyen en los mecanismos y velocidad de degradación de este tipo de compuestos, no es posible comparar las concentraciones de estos en el mundo, sin embargo, en la Tabla 6-4, se muestran a modo informativo las concentraciones en los diferentes cuerpos de agua. El ibuprofeno está presente en las aguas de diferentes lugares del mundo, donde se destacan los estudios en China, España, Sudáfrica, Rumania y Reino Unido, con concentraciones que oscilan entre 2.4 ng/L (29) hasta 33764 ng/L (71). Sin embargo, no es posible expresar si estos valores son altos o bajos debido a que hasta el momento no se han definido niveles máximos de este tipo de compuestos en las aguas, ya que aún no han sido incluidos en la lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión Europea en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/EC (237), ni en la Lista de contaminantes prioritarios de la EPA (208). Hasta el momento no se conocen con claridad las afecciones que estos medicamentos pueden tener en las aguas de consumo humano, así como las interacciones con el ecosistema acuático (37).

**Tabla 6-4.** Concentración de ibuprofeno y diclofenaco en aguas superficiales y peces en diferentes regiones del mundo.

Medicamento	Matriz	Sitio	Concentración	Referencia
Ibuprofeno	Agua	Río de las Perlas, China	78 ng/L (mediana)	(28)
		Río Amarillo, China	2.4-416 ng/L	(29)
		Río Hai, China	ND-127 ng/L	(29)
		Río Liao, China	ND-246 ng/L	(29)
		Río Segre, España	193 ng/L (max. conc.)	(30)
		Blue Lagoon Beach, Sudáfrica	0.17 µg/L	(31)
		Río Umgeni, Sudáfrica	0.28 µg/L	(31)
		Río Han, Corea del Sur	100 ng/L (promedio)	(32)
		Río Begej, Rumania	<LOQ–346 ng/L	(33)
		Río Lee, Reino Unido	3086 ng/L	(34)
		Río Thames, Reino Unido	0.03-0.45 µg/L	(35)
		Río Magdalena y Cauca, Colombia	<LOQ	(36)
	Pez	Laguna de Al-Arbaeen, Arabia Saudita	<i>Gerres oyena</i> <LOQ–66.4 ng/g <i>Chanos chanos</i> <LOQ–93.5 ng/g	(40)

Medicamento	Matriz	Sitio	Concentración	Referencia
Diclofenaco	Agua	Lago Haapajärvi, Finlandia	<i>Abramis brama</i> nd-34 ng/mL (bilis)	(67)
		Río Magdalena y Cauca, Colombia	<i>Rutilus rutilus</i> nd-26 ng/mL (bilis)	(36)
		Río Bogotá, Colombia	<LOD	(37)
		Río Medellín, Colombia	<i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i>	(37)
		Río Jundiaí, Brasil	0.40 µg/L (promedio)	(38)
		Cuenca en el Sub-Saharan, Camerún	0.236 µg/L (promedio)	(38)
		Río de las Perlas, China	364 ng/L	(38)
		Río Amarillo, China	419 ng/L	(28)
		Río Hai, China	119 ng/L (mediana)	(29)
		Río Liao, China	ND-136 ng/L	(29)
		Costa Rica	ND-46.5 ng/L	(29)
		Río Doubs, Francia	ND-717 ng/L	(38)
		Lago Tegel y río Havel, Alemania	266 ng/L	(38)
		Cuenca del río Apatlaco, México	300 ng/L	(38)
		Canal de riego, Nigeria	435 ng/L	(38)
		Río Begej, Rumania	1.4 µg/L	(38)
		Río Sava, Eslovenia y Croacia	57.16 µg/L	(33)
		Río Msunduzi, Sudáfrica	<LOQ-324	(38)
		Río Han, Corea del Sur	4.62 ng/L	(38)
		Río Ebro, España	8.17 µg/L	(32)
		Río Høje, Suecia	67 ng/L (promedio)	(38)
		Río Llobregat, España	>100 ng/L	(38)
		Cuenca del río Turia, España	120 ng/L	(38)
		Río Lee, Reino Unido	445.2 ng/L	(38)
		Río Thames, Reino Unido	3.5 µg/L	(34)
		Río Magdalena, Colombia	424 ng/L	(35)
		Río Cuaca, Colombia	0.0059-0.38 µg/L	(36)
		0.500-7.345 µg/L	(36)	
		0.500-75.042 µg/L	(36)	
		<i>Pterogymnus lanarius</i> 551.8±1.3ng/g (músculo)		
		<i>Pachymetopon blochii</i> 920.5±3.3 ng/g (músculo)	(78)	
		716.2±7.0 ng/g (intestino)		
		826.2±2.9 ng/g (agallas)		
		906.1±2.8 ng/g (hígado)		

Medicamento	Matriz	Sitio	Concentración	Referencia
			<i>Thyrsites atun</i> 1812±0.2 ng/g (músculo) 1125±0.3 ng/g (intestino) 1089±11 ng/g (agallas) 1125±0.3 ng/g (hígado)	
		Laguna del Mar Menor, España	<i>Liza aurata</i> 0.5±0.9 ng/g (hígado) 0.6±1.3 ng/g (hígado)	(238)
		Nanjing, China	<i>Hemiculter leucisculus</i> 1.2 ng/g (músculo) 3.6 ng/g (cerebro) 1.5 ng/g (agallas) 8.6 ng/g (hígado)	(75)
		Guadalquivir, España	<i>Carassius auratus</i> 0.2 ng/g (músculo) 1.6 ng/g (cerebro) 0.1 ng/g (agallas) 4.6 ng/g (hígado)	
		Júcar, España	ND-4.08 ng/g (músculo)	
		Ebro, España	ND-11.76 ng/g (músculo)	(72)
		Llobregat, España	ND-5.72 ng/g (músculo)	
		Laguna de Al-Arbaeen, Arabia Saudita	ND-15.35 ng/g (músculo)	
		Diferentes ríos, Estados Unidos	<i>Gerres oyena</i> 25.1 ng/g (músculo)	(40)
		Delaware, Estados Unidos	<i>Catostomus commersonii</i> 0.7 ng/g (músculo)	(239)
		Lago Haapajärvi, Finlandia	11930 µg/L (plasma) 4.7 ng/kg	(240)
		Río Magdalena, Colombia	<i>Abramis brama</i> nd-95 ng/mL (bilis) <i>Rutilus Citostomas</i> nd-148 ng/mL (bilis)	(67)
			<i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i> 16.723 µg/kg (<LOQ)	(36)

Medicamento	Matriz	Sitio	Concentración	Referencia
		Río Cauca, Colombia	<LOQ	(36)

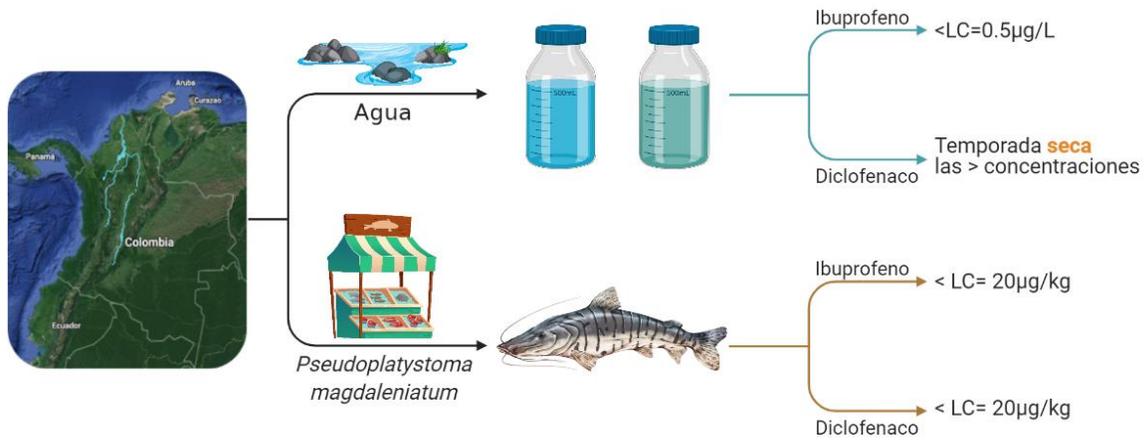
---

ND: no detectado

## 6.5. Conclusión

En este estudio se recolectaron muestras de agua y músculo de Bagre rayado *P. magdaleniatum*, en tres períodos climáticos y en diez sitios de los ríos Cauca y Magdalena, Colombia. Los resultados mostraron que no hay concentraciones de ninguno de los dos productos farmacéuticos en tejido muscular de *P. magdaleniatum*. Por otra parte, en el agua de los diferentes sitios de muestreo de agua no se encontraron niveles de ibuprofeno, posiblemente por la degradación fotoquímica directa en los ríos analizados; sin embargo, se detectaron concentraciones de diclofenaco hasta de 75 µg/L, las mayores reportadas hasta el momento, correspondientes principalmente a la temporada seca. Aunque en la actualidad no hay normatividad sobre los niveles máximos de estos medicamentos en las aguas y peces, es necesario realizar estudios de monitoreo ambiental, ya que la presencia de medicamentos como ibuprofeno y diclofenaco puede alterar los ecosistemas acuáticos y las cadenas alimenticias de los cuales dependen muchas especies, entre ellas los humanos.

# Resumen gráfico



## 7. Fase experimental

Para el desarrollo de los objetivos *in vivo* e *in vitro* se realizaron ensayos controlados durante cuatro meses continuos, con tres experimentos independientes. Todos los peces (n=18, por experimento) fueron capturados en el río Cauca. Se utilizaron Bagres rayados sexualmente maduros, *P. magdaleniatum*, Tabla 7-1.

**Tabla 7-1.** Biometría *P. magdaleniatum*. Los valores se expresan como Media±SD.

Parámetro	Tiempo cero		Cuatro meses	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Peso (kg)	2.63 ± 0.85	1.93 ± 0.25	2.73 ± 0.83	1.93 ± 0.27
Longitud (cm)	68.00 ± 7.00	61.00 ± 6.08	70.23 ± 8.02	63.50 ± 2.18

Los especímenes fueron capturados con las autorizaciones requeridas por la normativa vigente, Permiso Marco expedido por la Autoridad Colombiana de Licencias Ambientales (ANLA) en la Resolución 1461 del 3 de diciembre de 2014. El número de muestras se determinó con base en las consideraciones del Comité de Ética para la Experimentación con Animales, con el acta 89 de 29 de mayo de 2014, según la cual la cantidad de peces utilizados en el experimento debe ser la mínima, para disminuir el impacto en la captura de estos peces, los cuales han sido devastados en las últimas décadas. Todos los experimentos con animales se realizaron bajo la Directiva 2010/63 / UE del Parlamento Europeo (241).

Toda la experimentación se llevó a cabo en el Centro de Investigación Piscícola de la Universidad de Córdoba (CINPIC) ubicado en Montería, en el departamento de Córdoba. Los peces se aclimataron durante dos meses en tanques de 3.250 m<sup>3</sup>, con un fotoperiodo natural de 12/12 durante todo el año. Semanalmente se midieron los parámetros: temperatura del agua, oxígeno disuelto, porcentaje de saturación de oxígeno y pH, utilizando un multiparámetro portátil (HACH, Sension + MM15, EE. UU.), nitrógeno amoniacal y amoniaco utilizando un kit para agua dulce (API, EE. UU.), alcalinidad total con el método estándar 2320 B (242), dureza total con el método estándar 2340 C (243) y sólidos volátiles y sólidos fijos con el método estándar 2540 E (244), Tabla 7-2. Estos parámetros fueron monitoreados diariamente durante los cuatro meses de cada experimento.

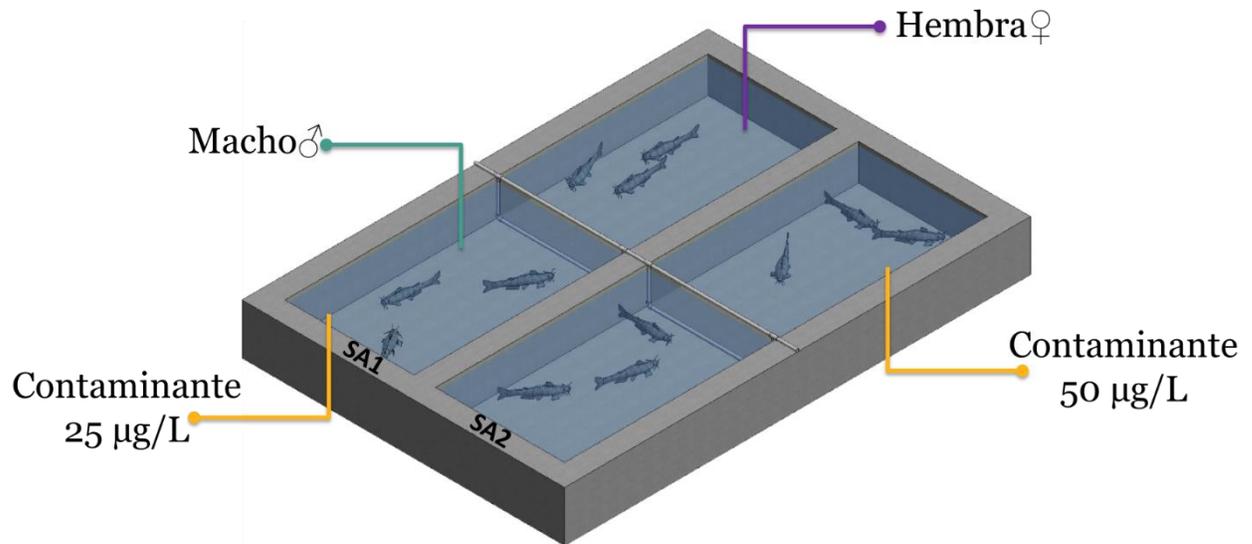
**Tabla 7-2.** Parámetros fisicoquímicos de calidad del agua de las unidades experimentales. Los valores se expresan como Media±SD.

Mes	Temperatura (°C)	Saturación oxígeno (%)	pH	Amonio (NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Alcalinidad total (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Dureza total (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Sólidos fijos (mg/L)
1	29.31±0.89	86.36±3.89	7.60±0.00	0.35±0.14	64.95±4.88	67.57±3.21	208.5±2.12
2	28.54±0.38	91.85±4.25	7.83±0.20	0.42±0.30	68.30±3.68	72.78±6.16	213±9.90
3	28.55±0.36	89.31±5.89	7.93±0.21	0.46±0.29	69.95±5.59	77.26±1.48	214±1.41
4	28.98±0.43	91.06±2.33	7.80±0.00	0.42±0.13	67.55±5.30	75.60±6.14	212±5.66

Para evitar interacciones entre los compuestos y poder identificar cuál de los dos medicamentos tenía efectos sobre los peces analizados, la experimentación se realizó por separado, los peces utilizados para la experimentación de ibuprofeno fueron diferentes de los utilizados para diclofenaco, en el caso de los controles los peces se mantuvieron para ambos experimentos.

La experimentación comenzó con ibuprofeno y seguido por diclofenaco, en cada experimento se dispusieron seis individuos por unidad experimental, separados a su vez en machos y hembras, Las unidades experimentales estaban divididas en 3 grupos: control 0 µg/L, 25 µg/L y 50 µg/L de ibuprofeno o diclofenaco, en la unidad SA1 se encontraban los peces a una concentración de 25 µg/L y en SA2 a 50 µg/L (Figura 7-1).

Debido a la degradación fotoquímica y la absorción por parte de los peces del ibuprofeno y diclofenaco, se reemplazó semanalmente el 50% del agua de los tanques y se reajustaron las concentraciones los contaminantes en cada unidad experimental. Las concentraciones oscilaron entre 22-28 µg/L (25 µg/L) y 47-53 µg/L (50 µg/L), y el grupo de control siempre se mantuvo por debajo del límite de detección. Los peces fueron alimentados con alimento vivo *Astyanax sp* (cultivados en la estación piscícola), su alimentación fue a libre demanda, lo que indica que siempre había alimento vivo disponible para su alimentación.



**Figura 7-1.** Distribución de los peces en las unidades experimentales.  
Fuente Ilustración propia, creada con SolidWorks.

## 7.1. Determinación de las concentraciones de experimentación

Las concentraciones de ibuprofeno y diclofenaco se determinaron teniendo en cuenta algunas concentraciones ambientales presentes en los afluentes (ibuprofeno 0.984-6.328 µg/L; diclofenaco 0.057-1.161 µg/L) y efluentes (ibuprofeno 0.065-0.491 µg/L; diclofenaco 0.006-0.496 µg/L) de plantas de tratamiento de agua residual (209) y en agua superficial del Reino Unido (ibuprofeno 1.681-33.764 µg/L (71)) y Nigeria (diclofenaco 57.16 µg/L (38)).

El LC50 se refiere a la exposición del contaminante por un período de 96 horas, en condiciones estáticas, semiestáticas o de flujo continuo. Después de este tiempo se registran las muertes y anomalías visibles relacionadas con la apariencia y el comportamiento. Se determinan las concentraciones necesarias para causar la muerte del 50% de los peces (70). Para este estudio además de las concentraciones ambientales presentes, se tuvo en cuenta el LC50 subletal (1/10 de LC 50) de algunas especies similares, con concentraciones para ibuprofeno de 34.35 mg/L (*Menidia beryllina*) (245), 14.2 mg/L (*Cirrhinus mrigala*) (58), 0.038 mg/L (*Clarias gariepinus*) (246) y para diclofenaco de 5-60 mg/L (*Danio rerio*) (247), 3.14 mg/L (*Clarias gariepinus*) (248), 1.0 mg/L (*Oryzias latipes*) (249). Teniendo en cuenta los niveles de estos contaminantes en el agua y una estimación de la dosis subletal, se determinó una concentración de 25 µg/L y 50 µg/L para evaluar los posibles efectos.

## **8. Capítulo 4. Efecto *in vivo* e *in vitro* sobre la calidad espermática del Bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum* sometido a diferentes concentraciones de ibuprofeno.**

El Bagre rayado presenta dos migraciones al año, la primera alimenticia, en época de verano (subienda) hacia las cabeceras del río, y la segunda migración corresponde a la reproductiva, al inicio de las lluvias (bajanza) surgiendo de las cabeceras del río (250). Esta especie tiene dimorfismo sexual, donde las hembras tienen mayor longitud estándar que los machos (251). Su estrategia de reproducción es r-estacional (muchos huevos pequeños, puesta prolongada y pelágica, alta fecundidad y mortalidad larvaria elevada) (251,252).

Para que la reproducción en esta especie sea efectiva es necesario un semen de buena calidad; esta calidad se define como la capacidad de fertilizar un óvulo y así permitir el desarrollo de un embrión normal. El análisis de semen, específicamente en peces, incluye diversos métodos como mediciones de parámetros de motilidad de los espermatozoides, concentración y viabilidad de los espermatozoides, el potencial mitocondrial y la integridad de la estructura de la cromatina (55,253).

Los espermatozoides de estos peces se almacenan en el fluido plasmático seminal en el tracto genital y su fertilización se realiza externamente (149). Los espermatozoides son inmóviles en la eyaculación y solo se vuelven móviles y metabólicamente activos después de su liberación al agua, además estos espermatozoides no tienen acrosoma. En las especies de agua dulce como el *P. magdaleniatum*, los espermatozoides se mueven durante menos de 2 minutos y, en muchos casos, solo son altamente activos durante menos de 30 s (55,149), siempre y cuando la osmolaridad y concentración iónica sean las correctas (149).

Casi cualquier parámetro físico cuantificable que se correlacione directamente con la capacidad de fertilización de los espermatozoides, podría utilizarse potencialmente como una medida de la calidad del esperma. Lo que se busca son

varios parámetros diferentes a la capacidad de fertilización, que además se puede aplicar sin la necesidad de óvulos, para así poder analizar espermatozoides antes de la fertilización y evitar las dificultades que conlleva el uso de óvulos en las pruebas de fertilización. Por esto, es importante probar otros parámetros de calidad espermática que se relacionen directamente con la capacidad de fertilización (55).

La medición de la concentración de esperma proporciona una estimación del número de espermatozoides en las muestras de semen. Se basa en el recuento de células bajo un microscopio utilizando diferentes cámaras de recuento. El porcentaje de espermatozoides móviles es el parámetro más útil para la evaluación de la calidad espermática en peces, ya que a través de este se puede predecir el éxito de la fertilización (253). Valores altos en parámetros de motilidad tienen una correlación alta con la capacidad de fertilización (253). La técnica que se utiliza para estas determinaciones es por un sistema de análisis de esperma asistido por computadora (CASA), el cual se ha desarrollado para disminuir el tiempo dedicado a la observación de los espermatozoides y así reducir las diferencias intraobservador y mejorar la precisión de los resultados finales (149). Este sistema permite una medición rápida, objetiva y precisa de la motilidad de los espermatozoides, además de determinar la velocidad de los espermatozoides y los parámetros de trayectoria: velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), velocidad de trayectoria media (VAP), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), linealidad de la motilidad de los espermatozoides ( $LIN = 100 \times VSL / VCL$ ), facilitando la documentación y recopilación de los resultados (149,253).

Hasta la fecha, hay poca investigación sobre los efectos de los medicamentos en la calidad espermática, especialmente en especies de peces tropicales (254). La calidad espermática es una medida de la capacidad de los espermatozoides para fertilizar con éxito un ovocito (55). Esta calidad es muy variable y puede depender de factores externos como la dieta, la calidad de los alimentos y la temperatura del agua (255). Cualquier parámetro que pueda cuantificarse y que tenga una correlación directa con la capacidad del esperma para fertilizar puede usarse como una medida de la calidad espermática (55), incluida la motilidad total, la progresividad total y la velocidad espermática (254,256); este análisis proporciona una evaluación cuantitativa rápida y sencilla de la motilidad del esperma de los peces y puede predecir su capacidad para fertilizar los ovocitos (256).

La reproducción de los peces, incluida la calidad de los gametos puede verse afectada por la contaminación del medio acuático debido a la actividad antropogénica (253). Varios contaminantes, como el ibuprofeno, son capaces de interferir con la vía de la ciclooxigenasa al disminuir la catálisis de la biosíntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (52,61,257,258), inhibiendo irreversiblemente la síntesis de prostanoides, y bloqueando la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, debido a la inhibición no selectiva de la ciclooxigenasa 1 y 2 (259,260). Este medicamento ha

sido detectado en ríos y arroyos (2.4 ng/L (29)) - 3086 ng/L (34)), demostrando ser capaz de causar alteraciones en la reproducción y desarrollo (60).

Gran parte de las aguas residuales de Colombia no se tratan antes de su descarga o su disposición es incompleta en plantas de tratamiento de aguas residuales (67,157), convirtiéndolas en compuestos ubicuos en aguas superficiales, aguas residuales, aguas subterráneas, suelo e incluso agua potable (64,67,68). Los principales ríos de Colombia, Cauca y Magdalena reciben la mayor parte de las aguas contaminadas del país, derivadas de la extracción de oro, refinación de petróleo, escorrentía agrícola, industrias manufactureras, curtiembres, vertidos domésticos e industriales (18,26,215,216). A pesar del alto consumo de estos medicamentos de venta libre, los estudios de estos ríos se han centrado principalmente en la determinación de metales pesados (26,215,216) y agroquímicos (18).

Debido a que el ibuprofeno es un medicamento de consumo común, se vende sin receta en Colombia y se encuentra en el grupo de medicamentos más comúnmente encontrado en los principales ríos de Colombia. Este estudio tuvo como objetivo analizar la calidad espermática tanto en condiciones de laboratorio (*in vitro*) como en peces que se mantuvieron durante cuatro meses a dos concentraciones diferentes de ibuprofeno (*in vivo*), y así determinar si esta es una posible causa de pérdida de calidad espermática en el Bagre y consecuentemente está relacionado con el declive de la especie.

## **8.1. Materiales y métodos**

### **8.1.1. Peces**

Para este estudio, se eligió un total de nueve peces machos sexualmente maduros (1945±308 g) y se dividieron en tres para cada uno de los tratamientos. En la sección 7, se describe en detalle todo lo referente a las adquisición, condiciones y adecuación de los peces para los experimentos.

### **8.1.2. Extracción de la muestra**

El semen se obtuvo en el período reproductivo de la especie (febrero y junio) (252). Los machos en la fase de espermiación, fueron estimulados para la liberación de semen por medio de una ligera presión abdominal y posteriormente inyectados con una mezcla de 10 µg/kg de peso corporal de hormona análoga del salmón (sGnRH) y 10 mg/kg de domperidona (Syndel, Canadá) para aumentar el volumen seminal. Doce horas después de la inyección, el semen se recogió mediante masaje ventral en tubos Eppendorf de 1.5 mL, desechándose el semen contaminado con heces u orina (261,262).

### **8.1.3. Motilidad total, tipos de motilidad, progresividad total y velocidad de los espermatozoides *in vivo* e *in vitro***

En una cámara Makler (Sefi Medical Instruments, Israel), se colocó una alícuota de 0.25 µL de cada muestra de semen del Bagre rayado de los diferentes tratamientos (0, 25 y 50 µg/L) y se activó con 75 µL de agua destilada (Dilución 1:300) (prueba *in vivo*). Se utilizó un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, E50i, Japón) y el sistema CASA Sperm Class Analyzer (Microptic, SCA VET 01, Ver 4.0, España) (262,263) para evaluar la motilidad total y el tipo de motilidad (rápida, media, lenta y estacionaria) entre 10 y 20 segundos después de la activación. Los espermatozoides con velocidades superiores a 100 µm/s se consideraron rápidos, entre 45 y 100 µm/s medios y entre 10 y 45 µm/s lentos, mientras que aquellos sin movimiento se consideraron inmóviles (262,264). Se estimaron las velocidades curvilíneas (VCL), lineal (VSL) y angular (VAP) y con estas velocidades se estimaron la linealidad ( $LIN=(VSL/VCL) *100$ ), rectitud ( $STR=(VSL/VAP) *100$ ) y oscilación espermática ( $WOB=(VAP/VCL) *100$ ). También se determinó la amplitud media de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la frecuencia de batimento (BCF) (265).

### **8.1.4. Duración de la motilidad**

La duración de la motilidad se estimó con un aumento de 100x y con el sistema CASA Sperm Class Analyzer (Microptic, SCA VET 01, Ver 4.0, España). El tiempo de activación se midió desde el momento en que se añadió el agua a la muestra de semen hasta que aproximadamente el 90% de los espermatozoides dejó de moverse (266).

### **8.1.5. Concentración espermática**

Para estimar la concentración espermática, 1 µL de semen se diluyó en 699 µL de glucosa al 6% (dilución 1: 700), se homogeneizó durante cinco segundos a 1200 rpm (Velp Scientifica, Zxclasic, China). Posteriormente, 10 µL de la dilución se colocaron en una cámara Makler (Sefi Medical Instruments, Israel). La concentración fue estimada con el sistema CASA Sperm Class Analyzer (Microptic, SCA VET 01, Ver 4.0, España) (266).

## **8.2. Análisis estadístico**

Se utilizó un diseño completamente al azar y las variables estudiadas se sometieron a pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk). Aquellas variables que no presentaron distribución normal después de la transformación de datos se sometieron a un análisis de varianza no paramétrico, y los tratamientos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Para determinar las diferencias se utilizó un ANOVA unidireccional seguido de una prueba de comparación múltiple post hoc de Tukey-HSD. Todos los datos se expresaron como media±desviación estándar (SD) y las

diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Statgraphics Centurion XVII (StatPoint Inc., EE. UU).

### 8.3. Resultados

La Tabla 8-1 muestra la concentración de espermatozoides y el tiempo de activación del Bagre rayado sometido a diferentes concentraciones de ibuprofeno durante cuatro meses. Estos parámetros no mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 8-1.** Concentración y duración de la motilidad de los espermatozoides de *P. magdaleniatum* sometidos a diferentes dosis de ibuprofeno (Media $\pm$ SD).

<b>Ibuprofeno (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Concentración (millones/mL)</b>	<b>Duración motilidad (s)</b>
0	18660.2 $\pm$ 4120.6 <sup>a</sup>	47.7 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>
25	19470.4 $\pm$ 6569.8 <sup>a</sup>	48.6 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>
50	23540.3 $\pm$ 10006.3 <sup>a</sup>	50.3 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>

Diferentes letras minúsculas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

La Tabla 8-2 muestra los resultados del semen *in vivo* para la motilidad total, la progresividad, la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), la frecuencia de batimento y los índices de esperma. Las motilidades más altas se registraron en el semen de los peces del grupo control y los sometidos a 25  $\mu\text{g/L}$  de ibuprofeno. No se observó diferencia significativa entre estos tratamientos ( $p > 0.05$ ), pero fueron estadísticamente superiores a los valores obtenidos en los peces sometidos a 50  $\mu\text{g/L}$  de ibuprofeno ( $p < 0.05$ ). La menor progresividad total se registró en el semen de Bagres tratados con 50  $\mu\text{g/L}$  de ibuprofeno (0.4 $\pm$ 0.4%), que fue estadísticamente diferente de los otros tratamientos ( $p < 0.05$ ). El porcentaje de espermatozoides inmóviles fue mayor en el tratamiento con 50  $\mu\text{g/L}$  de ibuprofeno, estadísticamente diferente de los otros tratamientos ( $p < 0.05$ ). Los valores más bajos de VSL, VCL y los índices STR, WOB, ALH y BFC, se obtuvieron con la mayor exposición a ibuprofeno (50  $\mu\text{g/L}$ ).

**Tabla 8-2.** Análisis *in vivo* de la motilidad total, la progresividad y las velocidades de los espermatozoides de *P. magdaleniatum* tratados con diferentes dosis de ibuprofeno. VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad lineal; VAP, velocidad angular; LIN, linealidad; STR, rectitud; WOB, oscilación; ALH, desplazamiento lateral de cabeza; BFC, frecuencia de batimiento.

Parámetros	Ibuprofeno (µg/L)		
	o (Control)	25	50
Motilidad total (%)	95.5±3.9 <sup>b</sup>	98.6±1.2 <sup>b</sup>	64.7±5.6 <sup>a</sup>
Rápidos (%)	9.7±6.3 <sup>b</sup>	42.4±11.2 <sup>c</sup>	0.4±0.4 <sup>a</sup>
Medios (%)	55.4±7.0 <sup>c</sup>	41.0±13.9 <sup>b</sup>	9.4±4.1 <sup>a</sup>
Lentos (%)	30.5±6.8 <sup>b</sup>	15.1±6.3 <sup>a</sup>	54.8±5.7 <sup>c</sup>
Inmóviles (%)	4.5± 3.9 <sup>a</sup>	1.4±1.2 <sup>a</sup>	35.3±5.6 <sup>b</sup>
Progresividad total (%)	46.8±7.8 <sup>b</sup>	63.3±10.0 <sup>c</sup>	6.2±5.6 <sup>a</sup>
VCL (µm/s)	60.9±9.0 <sup>b</sup>	84.0±12.3 <sup>c</sup>	27.4±1.5 <sup>a</sup>
VSL (µm/s)	37.9±9.6 <sup>b</sup>	59.0±12.0 <sup>c</sup>	10.8±2.5 <sup>a</sup>
VAP (µm/s)	50.2±9.2 <sup>b</sup>	70.7±10.2 <sup>c</sup>	18.1±2.3 <sup>a</sup>
LIN (%)	57.8±6.6 <sup>b</sup>	62.6±10.9 <sup>b</sup>	33.8±4.3 <sup>a</sup>
STR (%)	66.9±7.9 <sup>b</sup>	72.8±7.8 <sup>b</sup>	52.8±2.4 <sup>a</sup>
WOB (%)	78.3±5.6 <sup>b</sup>	82.0±5.5 <sup>b</sup>	60.2±5.6 <sup>a</sup>
ALH (µm)	1.4±0.2 <sup>b</sup>	1.5±0.4 <sup>b</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>
BFC (Hz)	9.2±1.7 <sup>b</sup>	11.5±0.8 <sup>c</sup>	3.1±0.8 <sup>a</sup>

Diferentes letras minúsculas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas (p <0.05).

En la Tabla 8-3 se muestran los resultados del análisis de semen en condiciones de laboratorio (*in vitro*), donde se extrajo semen de peces control y se activó con una solución de ibuprofeno de 25 y 50 µg/L en agua tipo I. Se evaluaron los parámetros de motilidad, progresividad, desplazamiento lateral de cabeza (ALH), frecuencia de batimiento e índices espermáticos. En los análisis *in vitro*, la menor motilidad se registró nuevamente en el semen activado con 50 µg/L de ibuprofeno, con diferencia significativa con el semen activado con 25 µg/L y con el control (p <0,05), siendo los resultados mucho menores incluso que los de las pruebas *in vivo*. Así mismo, la progresividad total fue menor en el semen de Bagre sometido a 50 µg/L de ibuprofeno (1.8±1.4%), siendo estadísticamente diferente de los otros dos tratamientos (p <0.05). El porcentaje de espermatozoides inmóviles fue mayor para la concentración de ibuprofeno de 50 µg/L, duplicándose en comparación con los ensayos *in vivo*, y fue estadísticamente diferente de los otros tratamientos (p <0.05).

Los valores de velocidad más bajos (VSL, VCL) se obtuvieron con la exposición más alta a ibuprofeno, al igual que los índices STR y WOB, y los valores de ALH y BFC ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 8-3.** Análisis *in vitro* de la motilidad total, la progresividad y las velocidades de los espermatozoides de *P. magdaleniatum* tratados con diferentes dosis de ibuprofeno. VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad lineal; VAP, velocidad angular; LIN, linealidad; STR, rectitud; WOB, oscilación; ALH, desplazamiento lateral de cabeza; BFC, frecuencia de batimento.

Parámetros	Ibuprofeno ( $\mu\text{g/L}$ )		
	0 (Control)	25	50
Motilidad total (%)	95.5 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup>	98.5 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	30.1 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>
Rápidos (%)	9.7 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>	54.7 $\pm$ 17.5 <sup>b</sup>	0.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
Medios (%)	55.4 $\pm$ 7.0 <sup>c</sup>	25.4 $\pm$ 7.7 <sup>b</sup>	2.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
Lentos (%)	30.5 $\pm$ 6.8 <sup>b</sup>	18.4 $\pm$ 11.3 <sup>a</sup>	27.4 $\pm$ 3.8 <sup>ab</sup>
Inmóviles (%)	4.5 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	1.5 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	68.9 $\pm$ 3.7 <sup>b</sup>
Progresividad total (%)	46.8 $\pm$ 7.8 <sup>b</sup>	68.5 $\pm$ 12.6 <sup>c</sup>	1.8 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	60.9 $\pm$ 9.0 <sup>b</sup>	92.7 $\pm$ 16.1 <sup>c</sup>	22.3 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	37.9 $\pm$ 9.6 <sup>b</sup>	62.8 $\pm$ 9.0 <sup>c</sup>	7.2 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	50.2 $\pm$ 9.2 <sup>b</sup>	79.4 $\pm$ 12.9 <sup>c</sup>	12.1 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>
LIN (%)	57.8 $\pm$ 6.6 <sup>b</sup>	63.0 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>	22.4 $\pm$ 5.7 <sup>a</sup>
STR (%)	66.9 $\pm$ 7.9 <sup>b</sup>	73.0 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>	48.2 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>
WOB (%)	78.3 $\pm$ 5.6 <sup>b</sup>	82.5 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>	46.1 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>
ALH ( $\mu\text{m}$ )	1.4 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
BFC (Hz)	9.2 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	11.6 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>	2.0 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>

Diferentes letras minúsculas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## 8.4. Discusión

Los resultados de este estudio muestran que el ibuprofeno a dosis elevadas puede afectar la calidad del espermatozoides del Bagre rayado (*P. magdaleniatum*), afectando consecuentemente su capacidad fertilizante y la reproducción y viabilidad de su descendencia, como se ha demostrado en varios estudios en los que se capturan peces de las aguas residuales, teniendo menor movilidad y capacidad de fertilización que los peces que se encuentran en aguas no contaminadas (147). Otros estudios, como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada con genisteína mostró una disminución de la motilidad y concentración de los espermatozoides (55). La exposición a algunos contaminantes emergentes puede resultar en una disminución

evidente en la calidad del esperma, afectando la reproducción general de las especies acuáticas (55).

La concentración espermática, la tasa de motilidad total y la progresividad de los peces en el grupo de control (0 µg/L de ibuprofeno) estuvieron dentro del rango para esta especie (262). Cuando se realizó el análisis *in vivo* sometiendo a los peces a una concentración de ibuprofeno de 25 µg/L durante cuatro meses, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la motilidad en comparación con los datos de los controles. Sin embargo, los peces sometidos a una concentración de 50 µg/L de ibuprofeno mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en la motilidad, la progresividad y la cinética de los espermatozoides, parámetros relacionados con el éxito reproductivo en los peces (267). Esto es consistente con otros estudios *in vivo* en diferentes especies de peces, como el estudio sobre el Bagre africano *Clarias gariepinus* que determinó una relación directa entre VCL, VSL y VAP con la tasa de eclosión (56).

Además de la capacidad de fertilización, la motilidad de los espermatozoides es un parámetro de calidad que combina la calidad de diferentes compartimentos celulares, responsables de la activación de la motilidad y el mantenimiento progresivo del movimiento (267). El ibuprofeno inhibe la ciclooxigenasa, provocando una disminución en la síntesis de prostaglandinas (258), esta disminución reduce la función de los espermatozoides, particularmente la motilidad y, por lo tanto, su capacidad para lograr la fertilización (258).

La evaluación de la linealidad (LIN), rectitud (STR) y oscilación (WOB), es útil ya que son indicadores de la curvatura de la trayectoria. Durante la exposición a este medicamento, la trayectoria puede volverse cada vez más curva y, finalmente, la progresividad se ve afectada (55). Para este estudio, se observó que los índices (LIN, STR y WOB) a la concentración más alta (50 µg/L) mostraron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en comparación con los otros tratamientos, lo que podría sugerir daño a las estructuras celulares (262).

Al comparar los resultados de los análisis *in vivo* con los resultados *in vitro*, los valores son similares en la concentración de 25 µg/L. En comparación, los análisis realizados con la concentración de 50 µg/L muestran una disminución más significativa de las variables en las pruebas *in vitro*. La motilidad total *in vitro* se redujo en 53.5%, la progresividad total en 71.1% y las velocidades entre 18.6% (VCL) y 33% (VSL y VAP), mientras que el porcentaje de inmóviles en las pruebas *in vitro* aumentó en 48.7%. Los resultados de este estudio sugieren que, si el Bagre permanece y se reproduce en aguas contaminadas, el daño a la calidad del esperma sería aún mayor, como lo demuestran los resultados de las pruebas *in vitro* e *in vivo*.

La evaluación de la calidad espermática tiene un papel importante en los resultados reproductivos y no como el simple vehículo para la entrega de ADN masculino al ovocito. Lo que indica que muestras con baja calidad espermática que lograron fertilizar, tienen consecuencias graves en las tasas de fertilización y pueden dejar una marca molecular permanente en la descendencia, entre ellas malformaciones embrionarias de aquellos que sobreviven (89). La influencia del ibuprofeno sobre la lesión oxidativa se ha encontrado en diferentes especies: en *Daphnia magna* expuesta a ibuprofeno a 2.9 mg/L durante 12 horas, hubo un aumento significativo de la peroxidación lipídica y las actividades de las enzimas antioxidantes (catalasa y superóxido dismutasa) (258). Otro estudio con la carpa *Cyprinus carpio* con exposiciones de ibuprofeno a 17.6 mg/L durante 12 a 96 horas, mostró un aumento significativo en la peroxidación de lípidos, así como aumentos en la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) en sangre, hígado y branquias, para compensar el daño oxidativo inducido (95).

Las especies de peces migratorios como el Bagre rayado requieren hábitats en las partes media y baja de la cuenca para su reproducción y el mantenimiento de procesos críticos en su ciclo de vida (22). Se considera que la cuenca del río Magdalena-Cauca tiene un alto grado de alteración en las partes alta, media y baja, ya que estas cuencas cubren el 24% de la superficie del país, abarcando 19 departamentos, y habitada por 32.5 millones de personas, equivalente al 80% de la población total de Colombia (20). Los resultados del presente estudio sugieren que la presencia de Bagre rayado en ambientes contaminados por períodos prolongados afecta la calidad de su espermatozoides, incluso si estos peces migran a áreas de desove posiblemente no contaminadas, como lo demuestran los resultados de este estudio.

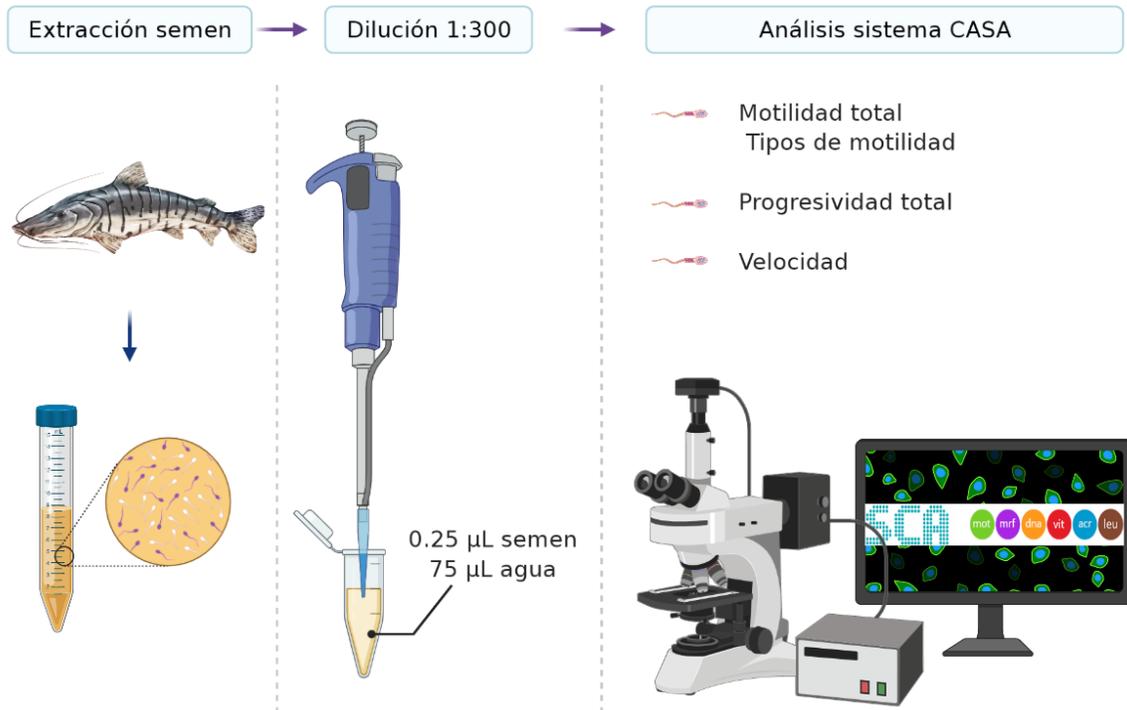
Teniendo en cuenta los resultados anteriores, los peces expuestos a concentraciones de 25 µg/L mostraron mejores resultados en los parámetros de rápido, inmóvil, progresividad total, VCL, VSL y VAP. Esto es posible porque este tipo de contaminante en el agua no tiene una respuesta lineal entre dosis y efecto. Esto significa que puede tener efectos a dosis bajas y no producir efectos a dosis más altas o viceversa, diferenciándose del principio en toxicología de que cuanto mayor es el nivel de exposición, mayor es el efecto sobre el organismo (128). Otros estudios confirman las relaciones dosis-respuesta para sustancias como el ibuprofeno pueden ser no monotónicas y los efectos generalmente están por debajo del nivel más bajo observado de efectos adversos (127,131).

## **8.5. Conclusión**

Con este estudio se realizó por primera vez un análisis del daño causado por la exposición a diferentes concentraciones de ibuprofeno, expresado en alteraciones en la calidad espermática, en pruebas realizadas tanto *in vivo* como *in vitro* en Bagre

rayado, *P. magdaleniatum*. Para este estudio, los análisis tanto *in vivo* como *in vitro* mostraron que el ibuprofeno a concentraciones de 50 µg/L en agua disminuye los parámetros cinemáticos en los espermatozoides, provocando graves daños a la reproducción y cría de esta especie en las cuencas de los principales ríos de Colombia. Teniendo en cuenta los resultados *in vitro*, se puede inferir que las alteraciones en la calidad espermática no ocurren solo con exposiciones continuas de peces al ibuprofeno, sino también cuando se libera semen en las áreas de apareamiento y desove expuestas a concentraciones de este medicamento.

# Resumen gráfico



## **9. Capítulo 5. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial y la integridad del ADN en *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, cuando se expone durante períodos prolongados a diferentes concentraciones de ibuprofeno.**

La función de los productos farmacéuticos es como medicamentos o para mejorar la calidad de la vida diaria (6,268). Sin embargo, su presencia en ambientes acuáticos y sus posibles efectos nocivos sobre los organismos acuáticos han causado preocupación en los últimos años (46). Las principales vías de entrada de los productos farmacéuticos a los ambientes acuáticos son las plantas de tratamiento de aguas residuales debido a su disposición incompleta (2,6,7,13,268) y a los vertimientos de aguas residuales sin tratar. La mayoría de estos compuestos y sus metabolitos son biológicamente activos (38) y pueden causar alteraciones en organismos acuáticos expuestos por períodos prolongados, provocando alteraciones endocrinas, genotoxicidad, carcinogenicidad y malformaciones fetales, entre otras (45,46).

Se han detectado concentraciones de ibuprofeno en todo tipo de aguas, por lo que podría estar presente en la cuenca del río Magdalena, provocando alteraciones en los Bagres que habitan estas zonas y siendo una de las posibles causas de su disminución en la cuenca. La determinación de las posibles alteraciones genotóxicas, como el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_M$ ) y la integridad del ADN se pueden determinar a través de las células sanguíneas, las cuales están constantemente expuestas a especies reactivas de oxígeno y proporcionan una fuente relativamente no invasiva para el biomonitoreo (269). Además la toma de muestra se realiza de forma relativamente fácil y los peces se utilizan como bioindicadores ya que pueden reflejar las concentraciones que están presentes en las aguas y se pueden devolver al

agua después de la recolección sin necesidad de sacrificarlos para realizar el estudio (269).

Los análisis para determinar la integridad del ADN se pueden realizar mediante citometría de flujo, ya que es una técnica rápida y confiable para cuantificar y caracterizar algunas poblaciones celulares, permitiendo la evaluación de procesos inmunopatológicos en peces (270). El citómetro de flujo mide el tamaño y la granularidad de la célula, así como la fluorescencia relativa de la misma (150). Para determinar estas características se usa un sistema óptico, acoplado a un procedimiento electrónico que registra el modo en que la célula, dispersa el haz de luz y emite fluorescencia (150). Aunque la citometría de flujo hace medidas en una sola célula puede procesar miles de ellas en unos pocos segundos distinguiendo diferentes tipos mediante la cuantificación de rasgos como la complejidad y el tamaño, así como características que puedan rastrearse mediante fluorescencia (271). Mediante la citometría de flujo es posible determinar el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ M), el cual regula la síntesis de adenosina-trifosfato (ATP), la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), el secuestro de calcio en las mitocondrias, la importación de proteínas mitocondriales y la dinámica de las mitocondrias (272–274).  $\Delta\Psi$ M es importante para muchos procesos mitocondriales y está relacionado con la salud celular y mitocondrial (271).

Otro parámetro que se puede medir por citometría de flujo es la integridad del ADN. La determinación de ambos parámetros es posible por el uso de diferentes tinciones, una de las más importantes, el DiOC<sub>6</sub> (3,3'-dihexiloxacarbocianina yoduro), es un colorante fluorescente que tiñe el retículo endoplásmico, membranas de vesículas y mitocondrias de las células, mediante la unión a través de los grupos hidrofílicos del colorante (275). Por otra parte, el yoduro de propidio (PI) es utilizado para determinar si las células son viables y sufrieron apoptosis o necrosis, a través de diferencias en la integridad de la membrana de plasma y permeabilidad (275). Este colorante es uno de los más utilizados ya que es económico, estable y es un buen indicador, ya que es capaz de excluir las células vivas (275,276). El PI se une al ADN de doble cadena mediante la intercalación entre pares de bases (275). La capacidad del PI para entrar a una célula depende de la permeabilidad de la membrana, en células apoptóticas tardías y necróticas, la integridad plasmática y nuclear disminuye, permitiendo que el PI pase, intercalándose en los ácidos nucleicos (275,276).

Debido a que el ibuprofeno es uno de los medicamentos más consumidos en el mundo (277), es posible que sea una de las causas de la disminución del Bagre rayado *P. magdaleniatum* en los últimos años. Para comprobarlo, se realizó un estudio experimental controlado durante cuatro meses con diferentes dosis (0, 25, 50 µg/L) de ibuprofeno en machos y hembras de *P. magdaleniatum*, determinando las

alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial y la integridad del ADN, por citometría de flujo.

## **9.1. Materiales y métodos**

### **9.1.1. Peces**

Para este estudio, se eligió un total de 12 peces machos y hembras sexualmente maduros y se dividieron en tres experimentos independientes, los peces se dividieron en tres grupos según su exposición: 0 control, 25 y 50  $\mu\text{g/L}$ , el grupo control (0  $\mu\text{g/L}$ ) permaneció siempre por debajo del límite de detección. En la sección 7, se describe en detalle todo lo referente a las adquisición, condiciones y adecuación de los peces para los experimentos.

### **9.1.2. Extracción de la muestra**

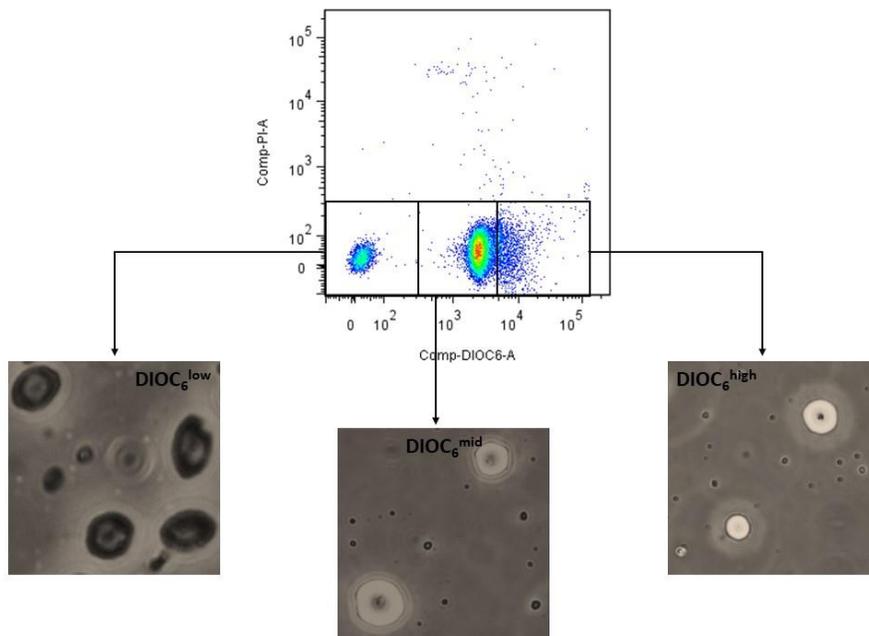
Se tomaron muestras de sangre 14 días antes de la adición de ibuprofeno y cuatro meses después. Los peces se sedaron en agua con hielo, luego las muestras de sangre se recolectaron mediante una punción directa en la vena caudal con la ayuda de un vacutainer. Los tubos en los que se recogieron las muestras contenían anticoagulantes EDTA K2. Se tomaron muestras de sangre para cada tratamiento y todas las muestras se procesaron por separado. Se extrajo 4mL de sangre de cada pez y se mantuvo durante 1 hora a 4-6 °C y en ausencia de luz ultravioleta hasta llegar al laboratorio para su análisis.

### **9.1.3. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{M}$ )**

Para la determinación de  $\Delta\Psi\text{M}$  en las muestras de sangre, se utilizó yoduro 3,3'-dihexiloxacarbocianina ( $\text{DiOC}_6$ , Molecular Probes by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Este tinte fluorescente se utiliza para la tinción mitocondrial bajo la influencia de la transición de permeabilidad (275,278). Para el análisis, se usó un tubo de poliestireno para depositar el  $\text{DiOC}_6$ , un tampón fosfato (PBS) a una concentración final de 800 nM y 10  $\mu\text{L}$  de sangre. Posteriormente, para teñir las células y evaluar simultáneamente su viabilidad, se añadió una concentración final de 1 mg/mL de yoduro de propidio (PI, Thermo Fisher Scientific).

Las muestras se incubaron durante 30 minutos y se midió el  $\Delta\Psi\text{M}$  mediante citometría de flujo (LSRFortessa, BD Biosciences). Posteriormente se separó de tres formas según la intensidad del  $\text{DiOC}_6$  en el Moflo XDP utilizando una boquilla de 70  $\mu\text{m}$ , a una frecuencia de 100 mil Hz, con una eficiencia mínima de 98 para cada una de las tres formas de separación. Los análisis de temporalidad se realizaron en las células de captación alta y captación intermedia de  $\text{DiOC}_6$  (Figura 9-1). Los datos

de citometría de flujo se analizaron utilizando el software FlowJo versión 10.6.2 (Tree Star Inc., Ashland, Oregon, Estados Unidos).



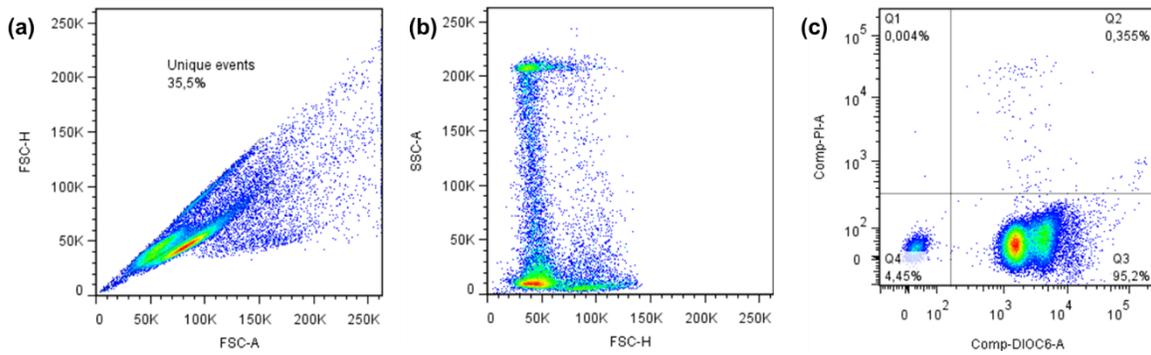
**Figura 9-1.** Gráfico de puntos de tinción con DIOC<sub>6</sub> y PI, captación de DIOC<sub>6</sub> bajo, medio y alto.

#### 9.1.4. Determinación de la integridad del ADN

La integridad del ADN se evaluó mediante tinción con PI. Las células se fijaron con 300  $\mu$ L de etanol al 70% (Merck, Alemania) preparado en PBS (pH 7.4) durante 12 horas a 4 °C. Las muestras se centrifugaron (500 g, 5 minutos, 4 °C) y los gránulos resultantes se lavaron dos veces más con 3.0 mL de PBS. Las células se tiñeron con PI 1  $\mu$ g/mL en PBS con EDTA al 0.37% p/v, Triton X-100 al 0.01% v / v y 200 U/mL de RNasa A (Sigma-Aldrich). Las muestras se incubaron durante 30 minutos y la integridad del ADN se midió mediante citometría de flujo (LSRFortessa, BD Biosciences) (273).

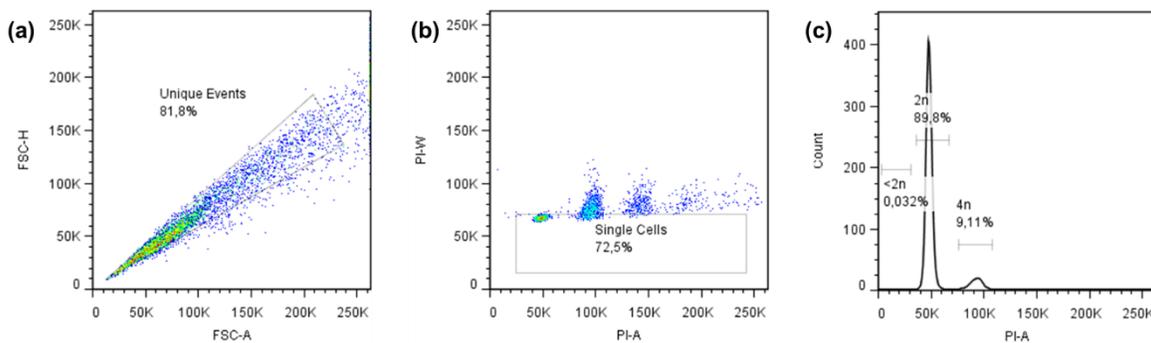
#### 9.1.5. Análisis de citometría de flujo

La determinación del daño de la membrana mitocondrial se realizó mediante la exclusión de agregados mediante la selección de la población celular de interés después de contrastar el tamaño (FSC) y la granularidad (SSC) para seleccionar eventos únicos. Después de realizar esta exclusión, las células positivas para DiOC<sub>6</sub> se compararon con las células negativas para PI, diferenciando entre las poblaciones de eritrocitos y leucocitos (Figura 9-2).



**Figura 9-2.** (a): Exclusión de agregados, selección de eventos únicos. (b): Selección de la población celular por contraste en tamaño y granularidad. (c): Contraste entre células positivas para DiOC<sub>6</sub> y PI, Q1: Células con daño en la membrana celular, positivas para PI; Q2: Células con daño en la membrana celular; Q3: Células viables con diferentes cantidades de captación de DiOC<sub>6</sub>; Q4: Células negativas para PI y DiOC<sub>6</sub>.

Para la determinación de la integridad del ADN, también se realizó una exclusión de agregados seleccionando la población celular de interés después de contrastar el tamaño (FSC) y la granularidad (SSC), para seleccionar los eventos únicos. Una vez que se seleccionaron los eventos únicos, empleando PI-A (Area) y PI-W (Width), se seleccionaron las células individuales para determinar la integridad del ADN empleando el histograma, Figura 9-3.



**Figura 9-3.** (a): Exclusión de agregados, selección de eventos únicos. (b): Selección de celdas individuales por contraste de PI-A vs PI-W. (c): Histograma para la determinación de daños en el ADN, <2n: daño en el ADN, fragmentado. 2n: ADN no fragmentado. 4n: Células somáticas.

## 9.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando Statgraphics Centurion XVII (StatPoint Inc., EE. UU.). La evaluación de la normalidad de las variables continuas se realizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se aplicaron estadísticas no paramétricas a aquellas variables que no tenían una distribución normal. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la existencia de diferencias significativas entre  $\Delta\Psi\text{M}$  y la integridad del ADN. Cuando hubo diferencia estadísticamente significativa, se utilizó un post-ANOVA por la prueba de la diferencia menos significativa (LSD-Fisher). Las diferencias estadísticas para PI+ y  $\Delta\Psi\text{M}$  se analizaron mediante análisis de varianza bidireccional (ANOVA) con el tiempo de exposición, la concentración y la interacción "tiempo x concentración" como variables. Para todos los análisis estadísticos, el criterio de significancia se estableció en  $p < 0.05$ .

## 9.3. Resultados y discusión

Se han realizado diversos estudios en peces sobre las alteraciones que puede ocasionar el ibuprofeno presente en las aguas, encontrándose un aumento de la actividad de la glutatión-S-transferasa en el riñón, reducción de la actividad de la glutatión peroxidasa, disminución del recuento de glóbulos blancos, causando nefrotoxicidad y efecto inmunosupresor (132), aumento del gasto cardíaco en embriones, disminución de la densidad celular (279) y una reducción significativa en la tasa de eclosión (99). Hasta el momento no se han encontrado publicaciones sobre las posibles alteraciones en la integridad del ADN en *P. magdaleniatum* provocadas por la presencia de ibuprofeno en las aguas.

Para este estudio, se analizaron muestras de sangre de Bagre rayado, se utilizaron concentraciones ambientales, como en algunos de los estudios mencionados anteriormente. Se realizó un análisis de  $\Delta\Psi\text{M}$ , como indicador de la viabilidad celular, este análisis podría reflejar el bombeo de hidrógeno a través de la membrana interna en los procesos de transporte de electrones y fosforilación oxidativa, procesos necesarios para la producción de ATP, lo que significa que una disfunción mitocondrial está estrechamente relacionada con una alteración en el potencial de membrana que provocaría una disminución en la producción de ATP (280).

Analizamos las variaciones entre el  $\Delta\Psi\text{M}$  y las células con daño a la membrana celular, positivas para PI. En la Tabla 9-1 se muestran los resultados de un análisis de varianza bidireccional (ANOVA), donde se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa en las muestras de PI+ entre los diferentes tratamientos, ni en las comparaciones relativas a los cuatro meses de exposición.

Al comparar el  $\Delta\Psi\text{M}$  entre los tratamientos y después de la exposición, el  $\Delta\Psi\text{M}$  Medio presenta diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con un

aumento en el porcentaje a los cuatro meses de tratamiento, así como una disminución en los porcentajes de Bajo  $\Delta\Psi M$  después de cuatro meses de exposición al ibuprofeno (Figura 9-4). A pesar de esta diferencia entre  $\Delta\Psi M$  Media y Baja, no hubo disminución de  $\Delta\Psi M$  luego de cuatro meses de tratamiento con ibuprofeno. Por lo tanto, la exposición a este medicamento a concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{g/L}$  durante cuatro meses, no produce pérdida de función mitocondrial (281).

**Tabla 9-1.** Variaciones en el  $\Delta\Psi M$  y PI+, con respecto al tiempo de exposición y las concentraciones de ibuprofeno a las que estuvo expuesta *P. magdaleniatum*.

Parámetro	Fuente de variación		
	Tiempo p-valor	Concentración p-valor	Interacción p-valor
PI+	0.96	0.32	0.79
Alto $\Delta\Psi M$	0.93	0.83	0.23
Medio $\Delta\Psi M$	0.001*	0.43	0.36
Bajo $\Delta\Psi M$	0.01*	0.54	0.43

p < 0.05, ANOVA para tiempo de exposición y concentración.

\*Factor significativo.

En la Tabla 9-2 se muestra el análisis de  $\Delta\Psi M$ , la mediana de la intensidad de fluorescencia, determinada por sexo y concentración de ibuprofeno en los diferentes tiempos de análisis. Para las hembras expuestas a 25  $\mu\text{g/L}$  de ibuprofeno y que presentan ratios de 0.75 y 0.76 ( $\Delta\Psi M$  alta y  $\Delta\Psi M$  media, respectivamente), se indica que al momento del ensayo sus leucocitos tenían una función mitocondrial menor en el momento cero. Sin embargo, las hembras expuestas a 50  $\mu\text{g/L}$  y que presentaban proporciones de 1.63 tenían hiperactividad mitocondrial en el tiempo cero. Ambos eventos se deben a un tipo de estrés que se puede interpretar respectivamente como despolarización e hiperpolarización (282,283). Mientras tanto, los análisis realizados luego de cuatro meses de exposición a este ibuprofeno muestran, para los machos expuestos a una concentración de 50  $\mu\text{g/L}$  proporciones de 0.68 y 0.70 (Alto  $\Delta\Psi M$  y Medio  $\Delta\Psi M$ , respectivamente), y 32% y 30% de sus leucocitos presentan una menor absorción de DIOC<sub>6</sub> que el control en el momento de la prueba. Para los que tienen una proporción superior a 1 ( $\Delta\Psi M$  alto), hay un 12, 28 y 34% de leucocitos con alguna hiperpolarización y, como estos no superan el 1.5, esto puede atribuirse a las fluctuaciones de la prueba.

**Tabla 9-2.** Porcentaje de  $\Delta\Psi$ M, mediana intensidad de fluorescencia y ratio, relacionados por sexo y concentración de ibuprofeno en los diferentes tiempos de análisis aplicados a *P. magdaleniatum* (Media  $\pm$  SD).

Sexo	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Tiempo cero								
		Alto $\Delta\Psi$ M (%)	MFI Alto	Ratio	Medio $\Delta\Psi$ M (%)	MFI Medio	Ratio	Bajo $\Delta\Psi$ M (%)	MFI Bajo	Ratio
Hembra	0 control	14.6 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	3413	1.00	23.5 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	2119	1.00	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>	401	1.00
Macho		10.7 $\pm$ 5.7 <sup>ab</sup>	3582.5	1.00	33.3 $\pm$ 3.7 <sup>ab</sup>	1818	1.00	4.1 $\pm$ 4.2 <sup>ab</sup>	1125	1.00
Hembra	25	9.1 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	3352	0.76	22.6 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>	2210	0.75	1.1 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	568	0.36
Macho		10.9 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>	3547	0.91	32.9 $\pm$ 7.3 <sup>ab</sup>	1957	1.10	1.2 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	1154	0.42
Hembra	50	19.6 $\pm$ 12.4 <sup>b</sup>	3613	1.63	17.8 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	2250.5	0.59	0.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	525.5	0.00
Macho		13.1 $\pm$ 6.0 <sup>ab</sup>	3497	1.09	37.2 $\pm$ 7.1 <sup>abc</sup>	1777	1.24	4.4 $\pm$ 3.6 <sup>ab</sup>	1181	1.51

Sexo	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Cuatro meses								
		Alto $\Delta\Psi$ M (%)	MFI Alto	Ratio	Medio $\Delta\Psi$ M (%)	MFI Medio	Ratio	Bajo $\Delta\Psi$ M (%)	MFI Bajo	Ratio
Hembra	0 control	12.0 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>	4200	1.00	73.4 $\pm$ 1.1 <sup>d</sup>	2332	1.00	0.1 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	472	1.00
Macho		11.7 $\pm$ 2.3 <sup>ab</sup>	4474	1.00	76.9 $\pm$ 3.3 <sup>d</sup>	1716	1.00	0.4 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	696.5	1.00
Hembra	25	13.2 $\pm$ 4.5 <sup>ab</sup>	3670	1.12	74.7 $\pm$ 3.6 <sup>d</sup>	1995	0.99	0.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	710	1.52
Macho		15.1 $\pm$ 6.0 <sup>ab</sup>	4242	1.28	73.6 $\pm$ 2.9 <sup>d</sup>	2340	0.97	0.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	523	0.26
Hembra	50	15.9 $\pm$ 11.3 <sup>ab</sup>	3941	1.34	69.1 $\pm$ 11.4 <sup>cd</sup>	2418.5	0.91	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	396	0.13
Macho		8.0 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	4425	0.68	53.1 $\pm$ 37.8 <sup>bcd</sup>	2322	0.70	0.1 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	499	0.16

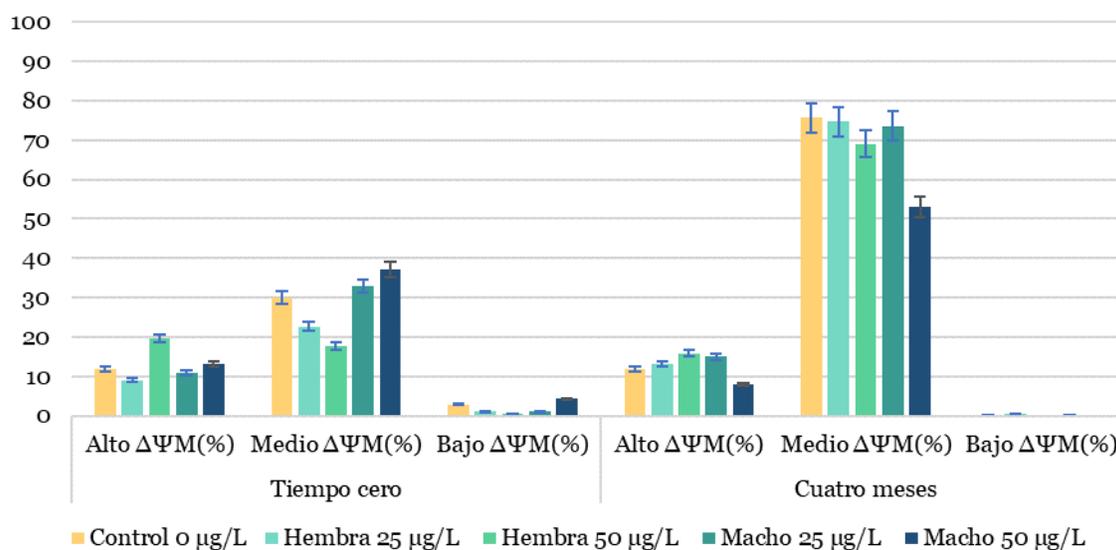
Alto  $\Delta\Psi$ M: muestras con alto potencial de membrana mitocondrial.

Medio  $\Delta\Psi$ M: muestras con potencial de membrana mitocondrial medio.

Bajo  $\Delta\Psi$ M: muestras con bajo potencial de membrana mitocondrial.

MFI: mediana de la intensidad de fluorescencia.

Diferentes letras minúsculas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 9-4.** Porcentaje de  $\Delta\Psi$ M, discriminada por sexo y tiempo de exposición a las dos concentraciones de ibuprofeno, en *P. magdaleniatum*.

Hasta ahora, no se han encontrado resultados comparables, en los que el análisis de  $\Delta\Psi M$  en muestras de sangre se realiza mediante citometría de flujo. Sin embargo, la determinación de  $\Delta\Psi M$  mediante citometría de flujo se sugiere como biomarcador confiable debido a su mayor especificidad y rápida evaluación cuantitativa del posible riesgo de exposición a este tipo de fármacos (280).

En la Tabla 9-3 se muestra la integridad del ADN, los resultados para el tiempo cero y luego de cuatro meses de exposición a ibuprofeno, no presenta diferencia estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos, y no se evidencia efecto sobre el ADN (Figura 9-5), ya que, luego de cuatro meses de exposición a ibuprofeno, el promedio para macho y hembras es de 92.30% para 2n, lo que indica que la gran mayoría no presenta fragmentación en ADN y solo 0.32% tiene algún tipo de daño en el ADN.

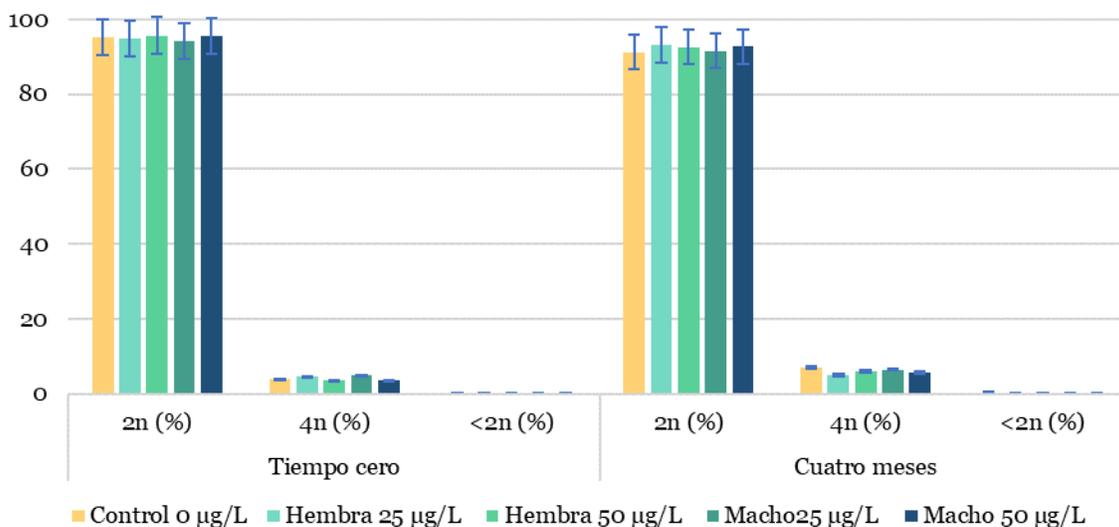
**Tabla 9-3.** Integridad del ADN, relacionado por sexo y concentración de ibuprofeno en diferentes momentos de experimentación en *P. magdaleniatum*.

Sexo	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Tiempo cero			Linealidad
		2n (%)	4n (%)	<2n (%)	
Hembra	0 control	97.100 $\pm$ 0.500	5.490 $\pm$ 0.072	0.420 $\pm$ 0.034	1.970 $\pm$ 0.016
Macho		96.300 $\pm$ 1.313	3.075 $\pm$ 1.110	0.255 $\pm$ 0.064	1.973 $\pm$ 0.019
Hembra	25	94.800 $\pm$ 0.700	4.527 $\pm$ 0.583	0.087 $\pm$ 0.064	1.994 $\pm$ 0.004
Macho		94.333 $\pm$ 1.950	4.860 $\pm$ 1.669	0.240 $\pm$ 0.225	1.962 $\pm$ 0.019
Hembra	50	95.750 $\pm$ 0.212	3.560 $\pm$ 0.113	0.360 $\pm$ 0.014	1.985 $\pm$ 0.007
Macho		95.600 $\pm$ 1.058	3.590 $\pm$ 0.670	0.321 $\pm$ 0.279	1.970 $\pm$ 0.022

Sexo	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Cuatro meses			Linealidad
		2n (%)	4n (%)	<2n (%)	
Hembra	0 control	91.200 $\pm$ 0.089	6.670 $\pm$ 0.008	0.388 $\pm$ 0.140	1.921 $\pm$ 0.008
Macho		91.350 $\pm$ 0.071	7.090 $\pm$ 0.141	0.399 $\pm$ 0.161	1.932 $\pm$ 0.007
Hembra	25	93.233 $\pm$ 2.139	5.093 $\pm$ 2.169	0.301 $\pm$ 0.033	1.927 $\pm$ 0.020
Macho		91.567 $\pm$ 1.210	6.540 $\pm$ 0.920	0.317 $\pm$ 0.035	1.930 $\pm$ 0.010
Hembra	50	92.650 $\pm$ 0.778	6.135 $\pm$ 0.573	0.245 $\pm$ 0.078	1.928 $\pm$ 0.008
Macho		92.767 $\pm$ 2.250	5.647 $\pm$ 2.358	0.301 $\pm$ 0.092	1.940 $\pm$ 0.022

Media  $\pm$  SD.

<2n: daño del ADN, fragmentado. 2n: ADN no fragmentado. 4n: Células somáticas.



**Figura 9-5.** Integridad del ADN, discriminada por sexo y tiempo de exposición a las dos concentraciones de ibuprofeno, en *P. magdaleniatum*.

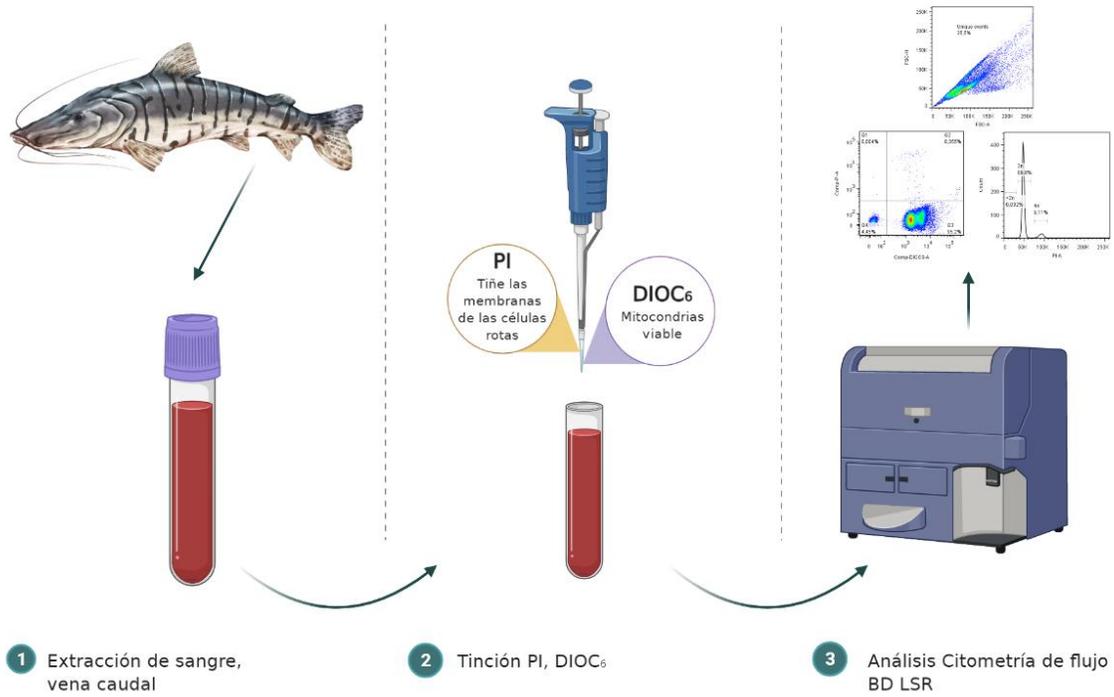
Al comparar estos resultados con otros estudios en los que la integridad del ADN se determina mediante el ensayo cometa, las alteraciones del ibuprofeno fueron evidentes en células monocíticas de moncholo (*Hoplais malabaricus*) (284). En *Rhamdia quelen* con exposición a ibuprofeno de 66.40 ng/L, se evidenció la pérdida de ADN estadísticamente significativo después de los 5 y 28 días de exposición, en un 22.74-34.32% (125). En otro estudio con *Oreochromis niloticus*, con exposición a 300 ng/L de este medicamento, se evidenciaron efectos genotóxicos tanto en la exposición aguda (48 h) como en la subcrónica (10 días) (285). Para el presente estudio, no se observaron células hipodiploides ni hubo pérdida de linealidad que pudiera interpretarse como proveniente del ADN. Es probable que, a las concentraciones y tiempo de exposición a las que se realizó el análisis, el ibuprofeno no cause alteraciones al ADN.

## 9.4. Conclusión

Este estudio es uno de los primeros en analizar alteraciones en el potencial de la membrana mitocondrial y la integridad del ADN por citometría de flujo en peces neotropicales. Los resultados para el  $\Delta\Psi_M$  mostraron una diferencia estadísticamente significativa para el  $\Delta\Psi_M$  medio y el  $\Delta\Psi_M$  bajo, pero sin diferencias entre el  $\Delta\Psi_M$  después de cuatro meses de exposición, lo que indica que a estas concentraciones y tiempos de exposición no hay pérdida de función mitocondrial, causada por el ibuprofeno. Por otro lado, no hubo alteraciones en la integridad del ADN y los porcentajes de ADN sin fragmentación fueron superiores al

90% en todos los sexos, niveles y tiempos de exposición. Se concluye que el Bagre *P. magdaleniatum* expuesto a ibuprofeno en concentraciones de 25, 50 µg/L durante cuatro meses, no produce alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial ni en la integridad del ADN. Sin embargo, se necesita más investigación a diferentes niveles de concentración de ibuprofeno y mayores tiempos de exposición, ya que, en las condiciones de este estudio, no fue posible demostrar que los efectos provocados por el ibuprofeno fueran una de las causas del declive de esta especie en el Cauca y Cuenca del río Magdalena de Colombia.

# Resumen gráfico



## **10. Capítulo 6. Determinación de vitelogenina en machos y hembras de *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, expuestos a diferentes concentraciones de ibuprofeno.**

Como se ha mencionado en capítulos anteriores el ibuprofeno interfiere con la vía de la ciclooxigenasa, inhibiendo la actividad de las enzimas presentes en la síntesis de prostaglandinas (51,52,61,257,258); Las prostaglandinas y su ácido araquidónico están involucrados en diversos procesos relacionados con la reproducción como la maduración de los ovocitos y la regulación de la esteroidogénesis gonadal, influyendo directamente en los procesos reproductivos (51).

Un biomarcador utilizado en peces para determinar los trastornos reproductivos es la vitelogenina (VTG). La VTG, es el precursor de las proteínas de la yema en todos los organismos ovíparos, incluido los peces, es considerada como la reserva de nutrientes esenciales de la yema para el crecimiento y el desarrollo, mediante la división en las proteínas de la yema en fosvitina y lipovitelina, almacenadas en los huevos (286). Esta glicolipofosfoproteína se produce en el hígado en respuesta al estrógeno endógeno circulante (287). Los estrógenos endógenos, como E2, regulan la expresión de genes que controlan la síntesis de proteínas, secretándose en el torrente sanguíneo (287) hasta el ovario, donde se absorbe y modifica para desarrollar la yema de huevo (288). La VTG también es una proteína de unión a metales, y transporta varios iones como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (288). Además de la ovogénesis, la yema participa en la embriogénesis proporcionando nutrientes esenciales al embrión (289–291).

Naturalmente, los niveles de VTG en sangre en las hembras aumentan durante la vitelogénesis, los cuales se correlacionan con el crecimiento de ovocitos en el ovario y, por lo tanto, pueden usarse como indicadores para evaluar el estado reproductivo y la madurez de las poblaciones de peces (288). En condiciones normales, los niveles de estrógeno en peces macho son insuficientes para iniciar la producción de VTG, sin embargo, la producción de la proteína puede ser inducida por la exposición a compuestos estrogénicos ambientales (287), por esto, la presencia de altos niveles

de VTG en peces machos se considera una alteración endocrina por exposición a agonistas del receptor de estrógenos (120,288,289,291). Teniendo en cuenta lo anterior, la VTG se ha considerado una proteína exclusivamente femenina; sin embargo, se han detectado niveles plasmáticos bajos en machos e incluso peces sexualmente inmaduros, lo que puede indicar que la VTG desempeña un papel independiente del género (120,131,288,289,291).

En los últimos años se ha verificado que la VTG participa en la defensa inmune de los peces (292). Oponiéndose a la creencia tradicional de que la VTG y sus proteínas de la yema derivadas eran únicamente una fuente de nutrientes para los embriones en desarrollo (292). Se ha demostrado que es una molécula de reconocimiento de patrones multivalente, capaz de identificar componentes no propios, incluidos lipopolisacáridos, peptidoglicano, ácido lipoteicoico y glucano, actuando como una opsonina que puede mejorar la fagocitosis de macrófagos (286). En Barbo Rosado (*Puntius conchoni*) y *Cyprinus carpio* se observó que esta proteína poseía una actividad antimicrobiana; en *Salmo salar* L la VTG sérica pudo neutralizar la infectividad del virus de la necrosis pancreática infecciosa (292).

Esto indica que la VTG no es exclusiva de las hembras, sino que es una molécula inmunocompetente importante en la defensa de los peces contra los microbios, bacterias y virus, al funcionar como un receptor de reconocimiento de patrones (292). Es posible que esta proteína sea un factor antiinflamatorio similar a otras proteínas plasmáticas (292).

La cuantificación de vitelogenina en plasma/suero de peces, se ha realizado por diferentes ensayos inmunológicos como inmunodifusión radial simple (SRID), radioinmunoensayo (RIA) y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (288). Entre estos ensayos, el ELISA es el preferido ya que es sensible y no requiere el uso de agentes radioisotópicos (288). Recientemente se han desarrollado diferentes Kit ELISA comerciales específicos para la detección y cuantificación de VTG en diferentes especies de peces (*Cyprinus Carpio*, *Pimephales Promelas*, *Gadus morhua*, *Oryzias latipes*, *Oncorhynchus mykiss*, *Danio rerio*, entre otros).

En este estudio se expuso machos y hembras de Bagre rayado *P. magdaleniatum*, durante cuatro meses con concentraciones ambientales de ibuprofeno (25 y 50 µg/L), con el objetivo de determinar posibles alteraciones en los niveles de vitelogenina de ambos sexos y establecer si el ibuprofeno en estas condiciones causa alteración endocrina en el *P. magdaleniatum*, afectando la reproducción en los peces.

## **10.1. Materiales y métodos**

### **10.1.1. Peces**

Para los experimentos se utilizó el Bagre rayado *P. magdaleniatum* sexualmente maduro. En cada tanque experimental, se dividieron en machos y hembras con pesos y longitudes promedio de  $1.86 \pm 0.49$  kg y  $61.14 \pm 4.76$  cm para los machos y  $2.07 \pm 0.64$  kg y  $63.86 \pm 6.01$  cm para hembras. Además de la separación por sexo, los peces se dividieron en tres grupos según su exposición: 0 control, 25 y 50  $\mu\text{g/L}$ . El grupo control (0  $\mu\text{g/L}$ ) permaneció siempre por debajo del límite de detección. En la sección 7 Fase experimental, se describe en detalle todo lo referente a las adquisición, condiciones y adecuación de los peces para los experimentos.

### **10.1.2. Extracción de la muestra**

Se tomaron muestras de sangre 14 días antes de la adición de ibuprofeno y cuatro meses después. Los peces se sedaron en agua con hielo, luego las muestras de sangre se recolectaron mediante una punción directa en la vena caudal con la ayuda de un vacutainer. Los tubos en los que se recogieron las muestras contenían anticoagulantes EDTA K2. Se tomaron muestras de sangre para cada tratamiento y todas las muestras se procesaron por separado. Se extrajo 4mL de sangre de cada pez y se mantuvo durante 1 hora a  $4-6$  °C y en ausencia de luz ultravioleta hasta llegar al laboratorio para su análisis.

Para el análisis las muestras de sangre completa se centrifugaron (5000 g durante 15 min) y se separó el plasma sanguíneo en tubos Eppendorf. Las muestras de plasma se congelaron hasta su análisis a  $\leq -80$  °C.

### **10.1.3. Preparación y análisis de muestras de vitelogenina mediante Kit ELISA**

Se utilizó el kit Fish Vitellogenin (VTG) ELISA Cat No:MBS779081 (MyBiosource, EE. UU.), basado en el principio del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con tecnología sándwich de doble anticuerpo de biotina. Como se indica en las instrucciones del kit, las muestras y el estándar se agregaron a los pocillos, que previamente habían sido recubiertos con el anticuerpo objetivo. Luego se añadió estreptavidina HRP, para formar un inmunocomplejo, se realizó la incubación y el lavado, se eliminó la enzima no unida y se añadieron los sustratos A y B. La solución se torna azul y finalmente cambió a amarillo debido al efecto del ácido. La profundidad de color o luz se correlacionó positivamente con la concentración de vitelogenina (293), utilizando un fotómetro de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific, EE. UU.) a una longitud de onda de 450 nm.

De acuerdo con las concentraciones de los estándares y los valores de densidad óptica (OD) correspondientes, se calculó la ecuación de regresión lineal de la curva estándar. Luego, de acuerdo con los valores de OD de las muestras, se calculó concentración correspondiente de cada muestra.

## **10.2. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando Statgraphics Centurion XVII (StatPoint Inc., EE. UU.). La evaluación de la normalidad de las variables continuas se realizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se aplicaron estadísticas no paramétricas a aquellas variables que no tenían una distribución normal. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la existencia de diferencias significativas entre las variables. Todos los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar, para todos los análisis estadísticos el criterio de significancia se estableció en  $p < 0.05$ .

## **10.3. Resultados y discusión**

Las muestras de vitelogenina plasmática para *P. magdaleniatum* estuvieron en el rango entre 94.7 – 222.8 ng/mL para ambos sexos, dentro del rango de cuantificación del kit ELISA (10 - 480 ng/mL). En ambos tratamientos con exposición, incluso en los controles (sin exposición a ibuprofeno), se encontraron concentraciones de vitelogenina en machos.

Los niveles presentes de vitelogenina en machos pueden deberse a dos motivos: los peces capturados para el estudio ya tenían algún grado de alteración causada en el medio natural. No es posible determinar si los niveles son altos, ya que no se tienen estudios previos sobre los niveles “normales” de vitelogenina en machos ni hembras de la especie en estudio, lo que hace difícil hacer una afirmación sobre si hay un grado de alteración endocrina. El segundo se relaciona con estudios donde esta glicoproteína está relacionada directamente con la defensa inmunológica, independiente del sexo en los peces (291).

Específicamente, la vitelogenina puede actuar como una molécula inmunocompetente importante en la defensa de los peces contra los microbios, sirviendo como receptor de reconocimiento de patrones con múltiples especificidades, capaz de identificar bacterias Gram negativas y positivas; actuando como una molécula efectora capaz de matar o neutralizar bacterias/virus, y como una opsonina capaz de potenciar la fagocitosis (286,291,292,294). Además, esta proteína en las hembras, podrían servir como una alternativa en la inmunidad embrionaria por sus propiedades antibacterianas y antivirales (291).

Como se muestra en la Tabla 10-1, tanto machos como hembras tuvieron niveles de vitelogenina similares antes y después de la exposición durante los cuatro meses de a las diferentes concentraciones de ibuprofeno, incluso sin cambios en la

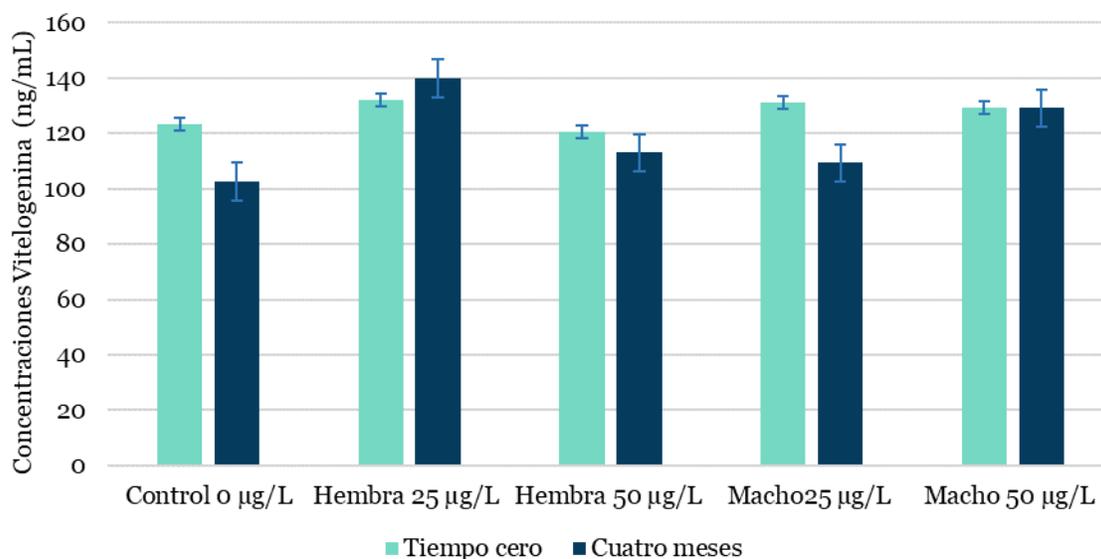
concentración más alta, y sin diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en ninguna de las diferentes exposiciones de concentración.

**Tabla 10-1.** Concentración de vitelogenina en plasma de *P. magdaleniatum*, en el tiempo cero y después de la exposición a ibuprofeno durante cuatro meses a dos concentraciones.

Concentración de exposición ( $\mu\text{g/L}$ )	Tiempo cero		Cuatro meses	
	Hembra (ng/mL)	Macho (ng/mL)	Hembra (ng/mL)	Macho (ng/mL)
0 (Control)	$132.087 \pm 0.69^a$	$123.26 \pm 11.55^a$	$104.058 \pm 0.14^a$	$102.62 \pm 0.27^a$
25	$132.21 \pm 19.69^a$	$131.31 \pm 12.89^a$	$139.92 \pm 23.05^a$	$109.35 \pm 6.77^a$
50	$120.58 \pm 5.71^a$	$129.56 \pm 12.05^a$	$113.05 \pm 4.01^a$	$129.19 \pm 4.84^a$

Diferentes letras minúsculas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Como se observa en la Figura 10-1, la exposición a ibuprofeno durante cuatro meses no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre los niveles de vitelogenina en machos o hembras. Es posible que el tiempo de exposición o las concentraciones de este fármaco no fueron suficientes para causar alteraciones significativas en los niveles de vitelogenina.



**Figura 10-1.** Vitelogenina (ng/mL) en machos y hembras de *P. magdaleniatum*, en el tiempo cero y después de cuatro meses de exposición a ibuprofeno.

Esto es consistente con estudios realizados en pez cebra (*Danio rerio*) con siete días de exposición a concentraciones entre 20 - 500  $\mu\text{g/L}$ , donde el ibuprofeno no influyó

en los niveles de vitelogenina en ninguno de los sexos (51). Por otra parte, un estudio realizado en Medaka (*Oryzias latipes*) expuestos a diferentes concentraciones de ibuprofeno (0.01 - 1000 µg/L), evidenció la relación entre tiempo de exposición y los efectos en machos adultos, la vitelogenina en el plasma sanguíneo fue mayor cuando se expuso a 1000 µg/L con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.1$ ) respecto a las demás concentraciones y el control (52). Otro estudio realizado en la misma especie, *Oryzias latipes*, los peces fueron expuestos a diferentes concentraciones entre 1 y 100 µg/L de ibuprofeno durante seis semanas, donde hubo un aumento en la producción de vitelogenina relacionado con el aumento en el peso relativo del hígado de las hembras expuestas, afectando significativamente el número de huevos por evento reproductivo y disminuyendo el número de eventos de desove por semana (53).

De acuerdo con lo anterior, aún no está claro si el ibuprofeno provoca alteraciones en los niveles de vitelogenina en los peces estudiados. Esto puede deberse a que este tipo de contaminante en el agua no tiene una respuesta lineal entre dosis y efecto, lo que significa que puede tener efectos a dosis bajas y no tener efecto a dosis más altas, o viceversa, lo que dificulta predecir los efectos observados en dosis altas (128). Esto difiere del principio de toxicología de que cuanto mayor es el nivel de exposición, mayor es el efecto en el cuerpo. Sin embargo, otros estudios han indicado que sustancias como el ibuprofeno, las cuales interfieren con hormonas, no cumplen con este principio. Las relaciones dosis-respuesta pueden no ser monotónicas y los efectos generalmente ocurren por debajo del nivel más bajo de efectos adversos observados (LOAEL) (127,131).

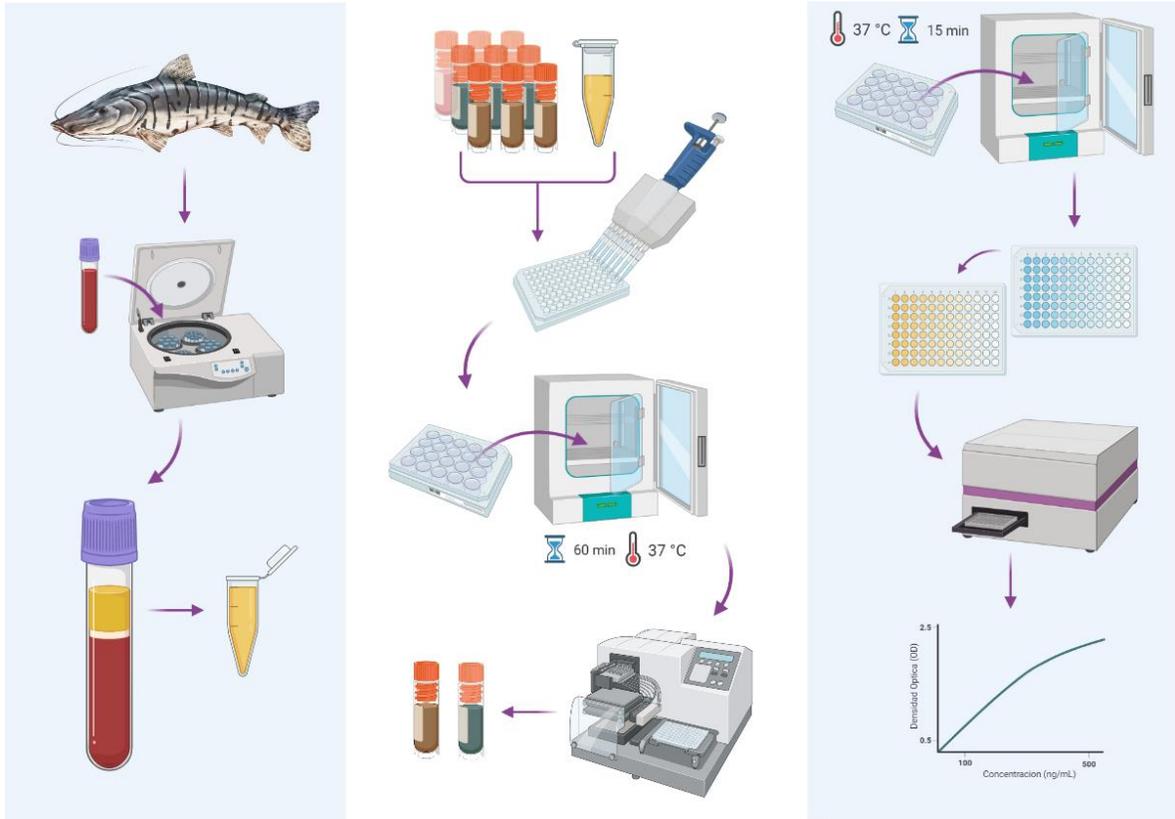
Cabe señalar también que el ibuprofeno tiene un pKa de 5.3 (227), lo que indica que en las condiciones en las que se realizó este estudio se encuentra en su forma iónica pH (7.80 ± 0.12). Se han estudiado los efectos de las variaciones en el pH de ácidos débiles como el ibuprofeno sobre la absorción y por tanto la toxicidad, encontrando que la toxicidad era 5-30 veces mayor a pH 6.0 que a pH 9.0, y 2-10 veces mayor a pH 7.5 que a pH 9, (295). Esto puede indicar que, a un pH más bajo, el ibuprofeno tiene una mayor influencia en los niveles de vitelogenina.

#### **10.4. Conclusión**

Los niveles de vitelogenina fueron similares en machos y hembras después de los cuatro meses de exposición, sin mostrar ningún cambio en las diferentes concentraciones de exposición. Debido a que este medicamento puede presentar un comportamiento no monotónico y sus efectos podrían ocurrir a concentraciones más bajas o altas, los tiempos y concentraciones de exposición de ibuprofeno para este estudio no mostraron ningún efecto.

De acuerdo con otros estudios realizados con este medicamento, los niveles de vitelogenina presentes en machos responden a procesos relacionados con la defensa inmunológica en peces y no solo a alteraciones endocrinas. Por lo tanto, en este estudio no fue posible identificar alteraciones producidas por el ibuprofeno en los tiempos y concentraciones a los cuales fueron sometidos ya que los niveles de vitelogenina fueron muy similares después de los cuatro meses de exposición.

# Resumen gráfico



## 11. Hepatotoxicidad en peces causada por diclofenaco

El diclofenaco es un AINE utilizado para tratar dolor e inflamación tanto en humanos como animales, al inhibir las vías de las isoenzimas de prostaglandina-ciclooxigenasa (COX) (226). La ciclooxigenasa 1 (COX-1) es la forma esencial de la COX que se encuentra en varios órganos y células endoteliales vasculares, y participa en la producción de prostaglandinas encargadas de proteger la pared del estómago (prostaglandina E<sub>2</sub>), agregación plaquetaria (tromboxano A<sub>2</sub>) y función renal (prostaglandina I<sub>2</sub>) (226). Por otra parte, la ciclooxigenasa 2 (COX-2) es inducida principalmente por inflamación; la acumulación de COX-2 en algunas áreas del sistema nervioso central produce prostaglandinas, que están involucradas en los procesos de dolor, fiebre e inflamación. Los peces, aves y mamíferos tienen genes codificadores de COX (226).

En 1996, Stumpf et al. fueron los primeros en informar sobre la presencia de diclofenaco en aguas residuales y ríos de Alemania (104). Este medicamento se ha encontrado en todos los compartimentos ambientales, varios estudios han reportado remociones de diclofenaco en PTAR de 0%, mientras que otros alcanzan tasas de remoción parcial entre 20 y 75% (83,296). Casi el 75% del diclofenaco usado ingresa al agua y al suelo, siendo más persistente en las aguas debido a su hidrofilia y estabilidad (38); por su Log K<sub>oc</sub> de 2.39 el diclofenaco se adsorbe en los sólidos en suspensión y sedimentos, y por su pK<sub>a</sub> de 4.15 se encuentra en forma de anión a pH de 5 a 9, por tanto este medicamento cuando está presente en el agua no se volatiliza (230).

Una vez el diclofenaco se libera al medio ambiente, su principal vía de degradación en las aguas es la fotodegradación, con una vida media entre 1 a 3 horas generalmente, o hasta por 8 días; por lo cual se detectan sus productos de degradación en el agua fácilmente (83,104,226,230). El diclofenaco y sus fotoproductos pueden absorberse en sedimento y/o ser metabolizado por las plantas, invertebrados y peces (104).

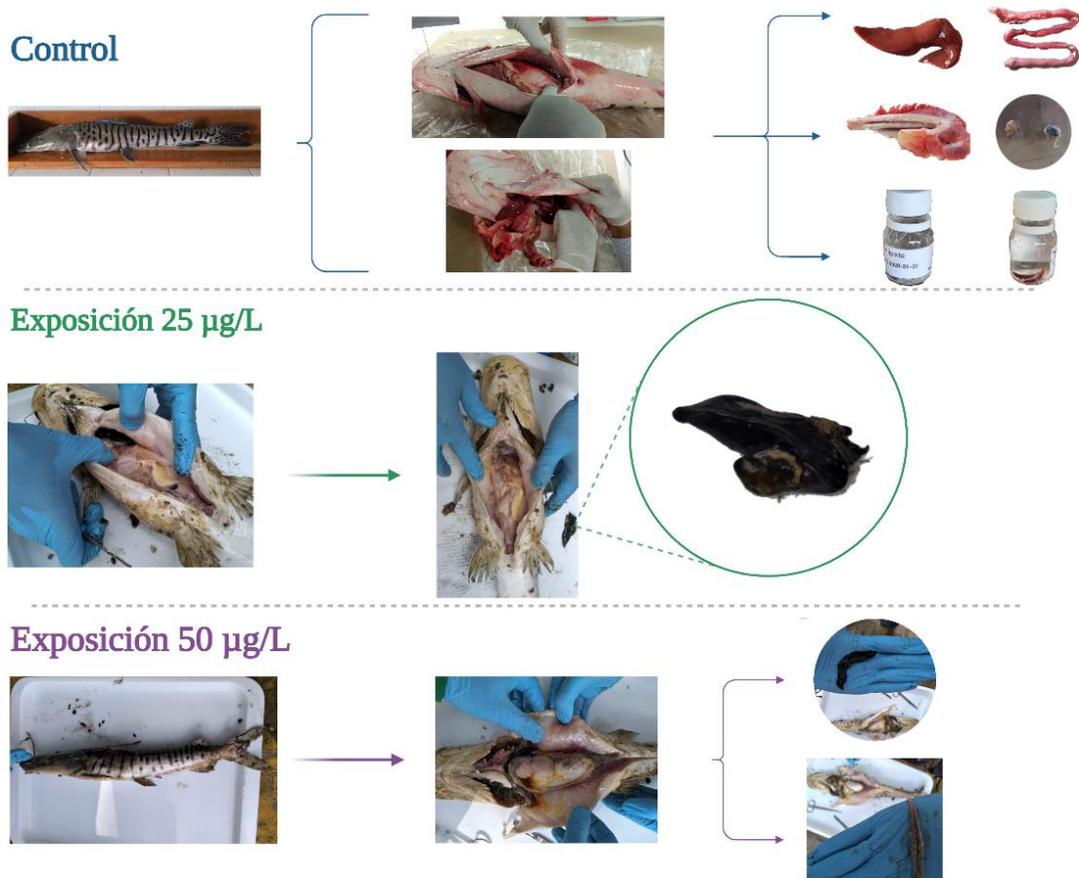
Este medicamento ha recibido mucha atención entre los animales por el hecho de ser causante de la casi extinción de varias especies de buitres en Pakistán, India,

Nepal y recientemente en Egipto (104,297). También ha sido caso de estudio los efectos de este medicamento en una gran variedad de organismos acuáticos (297). Se ha encontrado en peces que con exposiciones a corto plazo (24 a 96 h) y a largo plazo (28 a 30 días) a concentraciones bajas (0.5 µg/L), puede afectar procesos bioquímicos y/o funciones fisiológicas como estrés oxidativo, proteínas de biotransformación, metabolización y parámetros inmunes [276].

### **11.1. Caso de estudio**

Para esta investigación y como se mencionó en la sección 7, los peces fueron sometidos a diferentes concentraciones de diclofenaco, sin embargo, alrededor de los días 54-60 de exposición a este medicamento, los peces comenzaron a tener comportamientos extraños como natación hacia un lado del cuerpo y flotación, y finalmente murieron.

Los primeros peces en los que se identificó la muerte estaban sometidos a 50 µg/L. Cuando se realizaron las necropsias (Figura 11-1), se evidenció que tenían el hígado completamente necrosado, estómago con ligera capa de grasa e intestino con coloración oscura. Inmediatamente se procedió a revisar los peces que se encontraban en concentraciones de 25 µg/L, sin embargo, los peces ya habían fallecido hace mucho tiempo ya se encontraron los huesos en el fondo del estanque. Es importante aclarar que a los peces se le realizaba un seguimiento constante de los parámetros de calidad del agua, sin embargo, por ser una especie que necesita aguas turbias para su desarrollo y bienestar no era posible identificar o visualizar las especies diariamente, para evitar el estrés y que este pudiera afectar algunos de los parámetros analizados.



**Figura 11-1.** Necropsia *P. magdaleniatum* tras exposición a diclofenaco a 25 y 50 µg/L y en condiciones control.

Las especies a las cuales se les pudo realizar la necropsia se enviaron para el análisis histopatológico de tejidos, junto con un pez control para realizar la comparación. Se realizó el análisis en diferentes tejidos como hígado, bazo, páncreas, intestino, ojo, branquias y gónadas de los peces afectados, así como del control. Los tejidos fueron fijados en formol para su análisis.

Los resultados de los análisis histológicos de los peces que estuvieron expuestos a las diferentes concentraciones de diclofenaco, se presentan en la Figura 11-2, en general los peces presentaron en hígado severos cambios autolíticos, así como abundante y múltiples colonias de bacterias saprófitas, todo debido a que los peces ya estaban en proceso de descomposición.

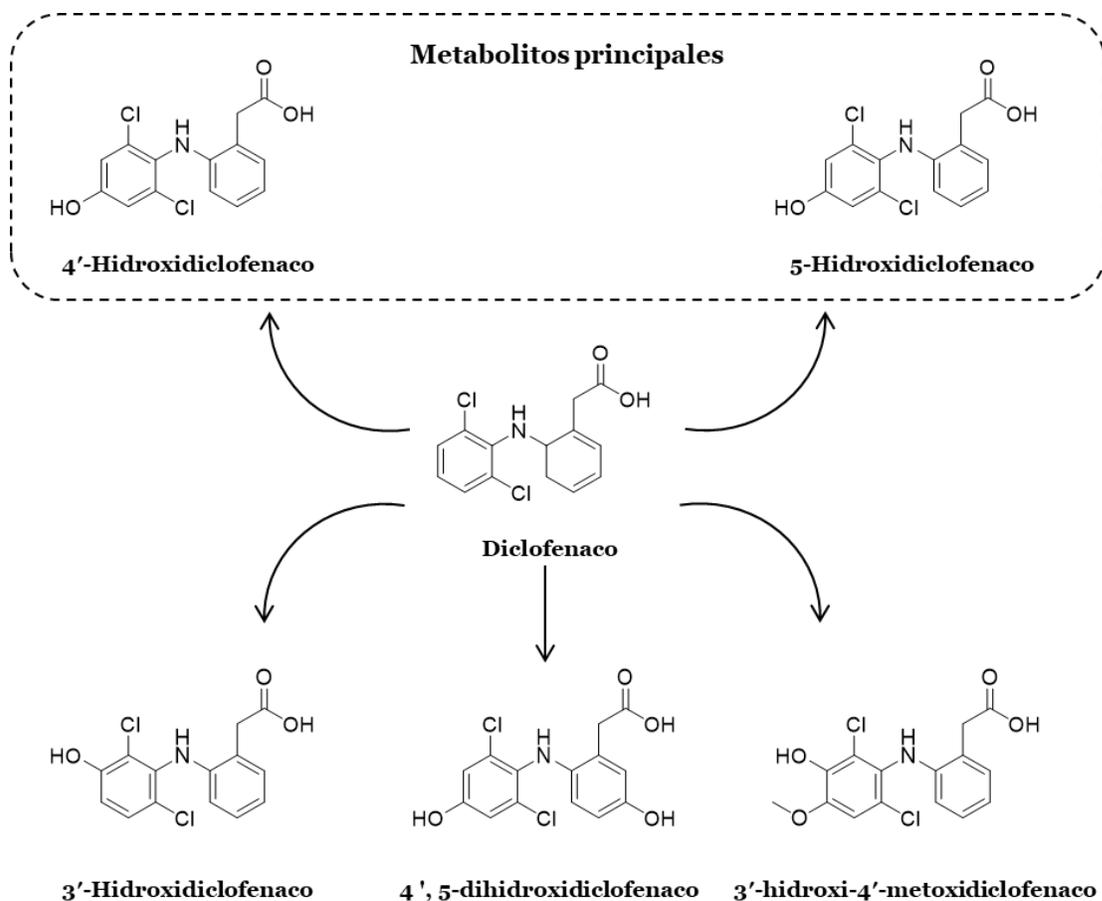
# Análisis histopatológico

	Control	25 µg/L	50 µg/L
<b>Hígado</b>	Vacuolización antómica moderada generalizada y leve activación de centros melanomacrófagos.	Completamente negro. Se observan abundante y múltiples colonias de bacterias saprófitas.	Completamente negro. Quistes de larvas de digenios/nemátodos y abundante presencia de bacterias saprófitas.
<b>Estomago</b>		Con ligera capa de grasa.	Aparentemente normal.
<b>Intestino</b>		Ligeramente oscuro.	Aparentemente normal.
<b>Tejidos</b>		Severos cambios autolíticos que impiden la evaluación de los tejidos.	Avanzados cambios autolíticos en todos los cortes.
<b>Bazo</b>	Depleción linfóide leve generalizada con activación leve de centros melanomacrófago.		
<b>Branquias</b>	Branquitis linfocítica con hiperplasia interlamelar moderada multifocal. Moderada y multifocal presencia de detritos celulares, bacilos.		
<b>Gónadas</b>	Indiferenciada: En desarrollo, sin cambios relevantes.		

**Figura 11-2.** Resumen análisis histopatológico de tejidos provenientes de necropsia de peces *P.magdaleniatum*.

El diclofenaco ha sido clasificado como uno de los compuestos más tóxicos para los organismos acuáticos, actuando en todos los niveles tróficos (296). Provoca cambios citotóxicos en *Oncorhynchus mykiss* (5 - 500 µg/L), efectos citológicos en riñones y otros órganos en salmónidos (1 µg/L) (297), estrés oxidativo en *Cyprinus carpio* (7.098 mg/L) y *Hoplias malabaricus* (suministrado por los alimentos 0.2, 2 y 20 µg/kg ), cambios en el desarrollo embrionario en *Danio rerio* (1.5 – 23.7 mg/L), alteración endocrina en *Astyanax altiparanae* (4.4 mg/L) (296), cambios celulares en hígado, riñones y branquias, así como alteraciones histológicas, necrosis y estrés oxidativo *Danio rerio* (226,298)

En humanos este medicamento se metaboliza en el hígado, produciendo una variedad de metabolitos detectables que son principalmente conjugados hidroxilados, metoxilados y acil glucurónido en orina y/o plasma (38,226). El 4'-hidroxidiclofenaco y el 5-hidroxidiclofenaco se han identificado como metabolitos principales (38,226), y se han encontrado otros metabolitos como el 3'-hidroxidiclofenaco, 4',5-dihidroxidiclofenaco y 3'-hidroxi-4'-metoxidlofenaco (Figura 11-3). La gran mayoría de estos metabolitos se conjugan con ácido glucurónico, glucurónido, taurina y sulfato en el hígado (38). Otras investigaciones realizadas en *Gasterosteus aculeatus* con concentraciones de hasta 4.10 µg/L durante seis meses, lograron detectar 4'-hidroxidiclofenaco como metabolito principal (38). Similarmente en *Oncorhynchus mykiss*, se identificaron metabolitos de diclofenaco hidroxilado y sus conjugados glucurónidos y sulfatos (38).



**Figura 11-3.** Metabolitos de degradación de diclofenaco. Realizada con ChemDraw.

El hígado es el órgano donde se observan mayores efectos por diclofenaco, ya que este es donde se generan los radicales libres a mayor tasa, por ser el sitio primario de reacciones oxidativas (296). Este medicamento produce bioacumulación principalmente en hígado, seguido por riñones, músculo y branquias en *O. mykiss* (1 y 5  $\mu\text{g/L}$  durante 28 días) y *Galaxias maculatus* (0.17-763  $\mu\text{g/L}$ ) (74). Otros estudios encontraron bioacumulaciones similares, principalmente en el hígado, las branquias y el músculo en *Carassius carassius* (2  $\mu\text{g/L}$  durante 7 días), concordando con otro estudio en *O. mykiss* (1-500  $\mu\text{g/L}$ ) con el mismo patrón de acumulación (298).

En estudios recientes en peces expuestos a este medicamento, la concentración de efecto observado (LOEC) para lesiones de hígado, riñón y branquias es de 1  $\mu\text{g/L}$  y valores de CE50 sobre supervivencia y/o crecimiento y/o reproducción en estudios de laboratorio crónicos oscilan entre 5-70  $\text{mg/L}$ . Las concentraciones medias letales (CL 50) para larvas y adultos de diferentes especies de peces como *Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oryzias latipes*, *Danio rerio* fueron > 1  $\text{mg/L}$  con

exposiciones entre 96 h y 3 meses, sin embargo, la mortalidad directa puede ocurrir en concentraciones más bajas de 100 µg/L para las truchas juveniles y 80 µg/L para los *Gasterosteus aculeatus* (104).

Algunos estudios realizados sobre los efectos citológicos e histológicos revelan efectos desde 0.5 µg/L de diclofenaco en agua. Se encontró colapso de la arquitectura celular, agotamiento de glucógeno de los hepatocitos en el hígado, degeneración de las gotitas hialinas en los riñones, necrosis de las células pilares en las branquias, hiperplasia hematopoyética renal (104,299). Otro estudio con exposiciones a 1 µg/L de diclofenaco mostraron un metabolismo hepático activado en hígado de trucha (74). En peces expuestos a concentraciones  $\geq 4.6$  µg/L de diclofenaco, se encontraron grandes lisosomas secundarios densos en electrones, principalmente cerca de los canalículos biliares y en algunos casos se evidenció cariólisis y mitocondrias muy dilatadas (299), así como hiperplasia hematopoyética renal en *Gasterosteus aculeatus* (297). En *O. mykiss* expuestas a concentraciones de 20 µg/L se encontraron mayores cantidades de desechos celulares y lisosomas secundarios, lo cual indica una citopatología grave en peces expuestos a estas concentraciones de diclofenaco (299). A concentraciones de 271 µg/L en *Gasterosteus aculeatus* se presenta mortalidad significativa ( $\geq 25$  %) (297).

Diferentes estudios han determinado los efectos de los diversos contaminantes emergentes sobre los organismos acuáticos expuestos, sin embargo, no es posible generalizarlos ya que no todas las especies presentan las mismas respuestas a la exposición de ciertos compuestos farmacéuticos; estas pueden estar dadas, por la concentración, el tejido analizado, el tiempo de exposición y las tolerancias entre especies (296).

Teniendo en cuenta el potencial del diclofenaco para causar alteraciones tanto en humanos como animales, este medicamento en 2015 se incluyó en la primera lista de vigilancia de sustancias prioritarias dentro de la Directiva Marco Europea del Agua (2008/105 / EC), en la que se propuso un Environmental Quality Standards (EQS) de 0.05 µg/L para organismos de agua dulce (104), concentración máxima de 100 ng/L en agua dulce (296). Sin embargo, para el 2018 la Comisión Europea concluyó que el diclofenaco debía eliminarse de la lista de vigilancia ya que habían "suficientes datos de seguimiento de alta calidad"; hasta el momento no hay información oficial sobre la inclusión o no en la lista de sustancias prioritarias de la Directiva Marco del Agua. Si el diclofenaco se llega a incluir y se establece un estándar de calidad ambiental, se requerirán grandes inversiones para reducir las emisiones de las PTAR [277].

Teniendo en cuenta lo anterior y para realizar los análisis en la Pasantía de Investigación Internacional, se hizo necesario tomar muestras de sangre de peces que estaban sometidos a las mismas condiciones de este estudio, pero con el

contaminante emergente triclosán. Los resultados de estos análisis se desarrollan en el siguiente capítulo.

## **12. Capítulo 8. Cambios en la actividad enzimática del Bagre *Pseudoplatystoma magdaleniatum* inducidos por la exposición a diferentes concentraciones de ibuprofeno y triclosán**

La mayoría de PPCPs y sus metabolitos son biológicamente activos y pueden causar alteraciones en los organismos acuáticos expuestos durante largos períodos, provocando alteraciones endocrinas, genotoxicidad, carcinogenicidad y malformaciones fetales, entre otras (45,46). Los PPCPs incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos como el ibuprofeno, así como agentes antimicrobianos como el triclosán, que se detectan con frecuencia en la superficie y el agua potable (268).

Como se ha mencionado en capítulos anteriores el ibuprofeno es AINE que inhibe de forma reversible la síntesis de prostanoides (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos), al inhibir no selectivamente las enzimas ciclooxigenasa 1 y 2 y bloquear la síntesis de prostaglandinas tromboxanos (259,260). Este medicamento puede provocar alteraciones en la reproducción y el desarrollo (60), estrés oxidativo, cambios hematológicos (0.1, 1.0 y 10 µg/L) (132), y daño al ADN en peces (66.4 ng/L) (125).

Los agentes antimicrobianos como el triclosán se utilizan ampliamente en todo el mundo. Actualmente está regulado por la Unión Europea por la Directiva 98/8/EC (300,301). El triclosán forma parte de muchos productos de cuidado personal como jabones líquidos, desodorantes, pasta de dientes, así como en la impregnación textil para reducir el crecimiento microbiano (302,303). El triclosán es altamente tóxico para las bacterias y el fitoplancton, además es tóxico para algunos organismos acuáticos, ya que es lipofílico tiende a acumularse en los organismos(302). Esta

sustancia interfiere con la absorción de yoduro y el eje hipotalámico-pituitario-tiroideo debido a su estructura similar con las hormonas tiroideas (304).

Además, este compuesto aumenta el estrés oxidativo debido al aumento en la producción de especies reactivas al oxígeno y la alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes (304). Este es uno de los diez contaminantes orgánicos que se encuentran comúnmente en el agua, detectado principalmente en aguas superficiales, así como en sedimentos de ríos (5160 ng/L) (304), algas filamentosas (50-400 ng/g) (305), delfines mulares (0.12-0.27 ng/g) (306) y tejidos de peces (0.73-50 ng/g (307), 26 ng/g (42)).

Teniendo en cuenta que los PPCPs llegan a los ríos de Colombia con gran facilidad, inicialmente se determinaron las concentraciones de ibuprofeno y triclosán presentes en los peces (*P. magdaleniatum*) que habitan los ríos Magdalena y Cauca. Debido a los diferentes modos de acción de los PPCPs, fue necesario determinar un gran conjunto de respuestas bioquímicas, capaces de reflejar cambios sutiles pero evidentes (45). Para ello, se analizaron diferentes biomarcadores bioquímicos para comprender mejor el modo de acción a diferentes concentraciones de ibuprofeno y triclosán en el Bagre rayado.

## **12.1. Materiales y métodos**

Las concentraciones de ibuprofeno y triclosán se determinaron teniendo en cuenta algunas concentraciones ambientales presentes en los afluentes (triclosán <33-463 µg/L; ibuprofeno <0.984-6.328 µg/L) y efluentes (triclosán <13-82 µg/L; ibuprofeno < 0.065-0.491 µg/L) de plantas de tratamiento de aguas residuales (209) y algunos ríos del Reino Unido (triclosán <5-24 µg/L (209); ibuprofeno 1.681-33.764 µg/L (71)). Además, se tuvo en cuenta la CL<sub>50</sub> subletal (1/10 de CL<sub>50</sub>) de algunas especies similares, para ibuprofeno: 14.2 mg/L (58), y para triclosán: 14.7 µg/L (168), 34 µg/L (308) y 42 µg/L (309). Teniendo en cuenta los niveles de estos contaminantes en el agua y una estimación de la dosis subletal, se determinó una concentración de 25 µg/L y 50 µg/L para evaluar los posibles efectos.

Todos los análisis se llevaron a cabo en la Universidad de Murcia, España en el Grupo de Toxicología y Evaluación de Riesgos, con la tutoría de la Doctora Emma Martínez López.

### **12.1.1. Peces**

Para los experimentos se utilizó el Bagre rayado *P. magdaleniatum* sexualmente maduro. En cada tanque experimental, se dividieron en machos y hembras y a su vez se dividieron en tres grupos según su exposición a ibuprofeno y triclosán: 0 control, 25 y 50 µg/L; permaneciendo el grupo control (0 µg/L) siempre por debajo del límite de detección. En la sección 7, se describe en detalle todo lo referente a las

adquisición, condiciones y adecuación de los peces para los experimentos. Las adiciones de cada contaminante se realizaron en estanques diferentes, no se realizaron mezclas de contaminantes.

### **12.1.2. Extracción de la muestra**

Se tomaron muestras de sangre 14 días antes de la adición de ibuprofeno y triclosán, y cuatro meses después. Los peces se sedaron en agua con hielo, luego las muestras de sangre se recolectaron mediante una punción directa en la vena caudal con la ayuda de un vacutainer. Los tubos en los que se recogieron las muestras contenían anticoagulantes heparina de sodio. Se tomaron muestras de sangre para cada tratamiento y todas las muestras se procesaron por separado. Se extrajo 4mL de sangre de cada pez y se mantuvo durante 1 hora a 4-6 °C y en ausencia de luz ultravioleta hasta llegar al laboratorio para su análisis.

### **12.1.3. Análisis bioquímico**

Las muestras de sangre se centrifugaron (5000 g durante 15 min) y se separó el plasma sanguíneo en tubos Eppendorf. Las muestras de plasma se congelaron hasta su análisis a  $\leq -80$  °C. Todos los biomarcadores se midieron en plasma. Las muestras de sangre para los análisis fueron tomadas en Colombia y se transportaron vía aérea con cadena de frío hasta la Universidad de Murcia, España.

### **12.1.4. Análisis de proteína, creatinina, úrea, albúmina, globulinas, creatina quinasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamino transferasa, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa y lactato deshidrogenasa**

Se determinaron proteínas, creatinina, úrea, albúminas, globulinas, creatina quinasa (CK), fosfatasa alcalina (ALP), gamma-glutamino transferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH) en el plasma de peces utilizando kits disponibles comercialmente (Olympus Systems Reagents; Olympus Life and Material Science Europe GmbH, Hamburgo, Alemania) siguiendo las indicaciones de los fabricantes. El Coeficiente de Variación (CV) intra e inter estuvieron por debajo del 10% en todos los casos. Todos los parámetros se realizaron con un analizador automático (Olympus Diagnostica, GmbH, Friburgo, Alemania).

### **12.1.5. Acetilcolinesterasa**

La actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) se realizó según el protocolo descrito por Ellman et al (310), utilizando acetiltiocolina como sustrato, y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm. Cuando la AChE hidroliza el sustrato,

la acetiltiocolina forma tiocolina, que a su vez reacciona con 5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato (DTNB) para formar un complejo que absorbe la radiación en la longitud de onda de 412 nm (311).

### **12.1.6. Peroxidación lipídica**

El grado de peroxidación lipídica (LPO) se midió cuantificando TBARS, según Buege y Aust (312). Esta metodología se basa en la reacción del malondialdehído (MDA) formado por la degradación de los productos iniciales de las membranas lipídicas por el ataque de radicales libres con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (311,313). Las lecturas de absorbancia de cada muestra se realizaron por triplicado, a 535 nm.

## **12.2. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando Statgraphics Centurion XVII (StatPoint Inc., EE. UU.). Los datos se presentan como medias con desviación estándar (SD). La evaluación de la normalidad de las variables continuas se realizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y la homocedasticidad se evaluó mediante la prueba de Levene; para algunos parámetros bioquímicos, fue necesario realizar una transformación de potencia. Se utilizó ANOVA unidireccional para determinar las diferencias estadísticas en las respuestas de los biomarcadores, con respecto a la concentración, el sexo o el tiempo de exposición. Si dio una diferencia estadísticamente significativa, se utilizó un post-ANOVA por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD-Fisher). A los datos que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. Para todos los análisis estadísticos, el criterio de significancia se estableció en  $p < 0.05$ .

## **12.3. Resultados y discusión**

### **12.3.1. Estado actual de la contaminación por ibuprofeno y triclosán en *Pseudoplatystoma magdaleniatum* de los ríos Magdalena y Cauca.**

Los resultados indican que no hubo niveles detectables (LOD = 5.00 µg/kg) de ibuprofeno en el músculo de los peces analizados. Por otro lado, se registraron concentraciones de triclosán en el período seco, correspondientes a los peces capturados en la Ciénaga de Ayapel ( $70.360 \pm 30.360$  µg/kg) y Nechí ( $46.106 \pm 12.821$  µg/kg); en la temporada de transición, en los peces de La Dorada ( $43.110 \pm 32.682$  µg/kg). Se debe tener en cuenta que la determinación en el músculo de este tipo de compuesto no es la más indicada, si los análisis se hubieran realizado en el hígado, posiblemente las concentraciones fueran mayores (49,314,315). La medición en el hígado no fue posible, porque el pescado se compraba en las plazas de mercado y por regulación se vende sin vísceras.

La medición de la lipofiliidad es un factor para predecir el potencial de bioacumulación. Es más probable que el triclosán se encuentre en el músculo de los peces analizados que el ibuprofeno, ya que el triclosán se ioniza a un pH superior a 7.9 (316), además tiene un  $\log K_{ow} = 4.76$ , lo que permite una mayor bioacumulación en los organismos acuáticos (317). Por otro lado, el ibuprofeno es un compuesto con una lipofiliidad media con un rango de  $\log K_{ow} = 2.48 - 3.5$  (231,318), así como un coeficiente de adsorción más bajo ( $K_d = 1.52$  L/kg) en comparación con el triclosán ( $K_d = 116.86$  L/kg) (319), por lo que posiblemente no esté tan disponible en el medio acuático, ni se acumule tan fácilmente como el triclosán.

Teniendo en cuenta las concentraciones obtenidas en el músculo, es posible relacionarlas con alteraciones bioquímicas medidas en plasma. Según García (2012), en individuos de *Pimephales promelas* expuestos durante 28 días a concentraciones de 250  $\mu\text{g/L}$  de ibuprofeno, se encontraron factores de bioconcentración (BCF) para músculo e hígado de 0.7, en ambos casos, y un factor cinético de bioconcentración ( $\text{BCF}_k$ ) de 0.6, y 1.0, respectivamente. En *Ictalurus punctatus* con exposición durante 7 días, presentaron  $\text{BCF}_k$  para músculo, hígado y plasma de 0.2, 0.5 y 1.4 respectivamente (320). Otro estudio en *Ictalurus punctatus* con exposición a carbamazepina determinó un BCF experimental en plasma de 1.4, además los datos sugieren que las concentraciones tisulares en *Pimephales sp*, *I. punctatus* y *O. niloticus* son similares o ligeramente superiores a las concentraciones observadas en plasma de peces (321). Por otro lado, los coeficientes de partición sangre:hígado y sangre:músculo en *Ictalurus punctatus* fueron 2.2 y 3.5, respectivamente. De acuerdo con lo anterior, es posible afirmar que las concentraciones de los contaminantes analizados encontradas en el músculo corresponden generalmente a una exposición crónica del contaminante. Por otra parte, si están presentes en el plasma sugiere exposiciones recientes; en ambos casos generando afecciones a nivel bioquímico en especies acuáticas expuestas (320,321)

La desintoxicación de los PPCPs en organismos implica la interacción de enzimas, pero cuando existe algún tipo de estrés puede haber inducción o inhibición de las enzimas que participan en los procesos. Es por eso que los cambios en las actividades enzimáticas se consideran una advertencia temprana de los efectos adversos del estrés, antes de un posible daño grave a los organismos expuestos (317). De acuerdo a los diferentes daños que estos contaminantes pueden ocasionar en los peces estudiados, se realizó un análisis discriminado por tipo de alteración.

### **12.3.2. Membrana mitocondrial**

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) actúa sobre la vía glucolítica, responsable de la conversión de piruvato en lactato por la vía de producción de energía anaeróbica (317,322,323), vital para la fisiología muscular en condiciones de estrés químico cuando se requiere un alto nivel de energía por períodos cortos (45). En el

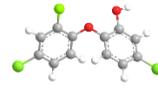
presente estudio, la actividad de LDH para peces en las condiciones del experimento de triclosán fue de  $769.0 \pm 252.7$  U/L. Después de la exposición al contaminante, no hay diferencia significativa en cuanto a los tiempos de exposición (Tabla 12-1). Sin embargo, existe una diferencia estadísticamente significativa ( $F = 13.65$ ,  $p = 0.0038$ ) con respecto a la concentración (Figura 12-1).

**Tabla 12-1.** Variaciones de los parámetros de análisis en cuanto a concentración de ibuprofeno, sexo y tiempo de exposición.

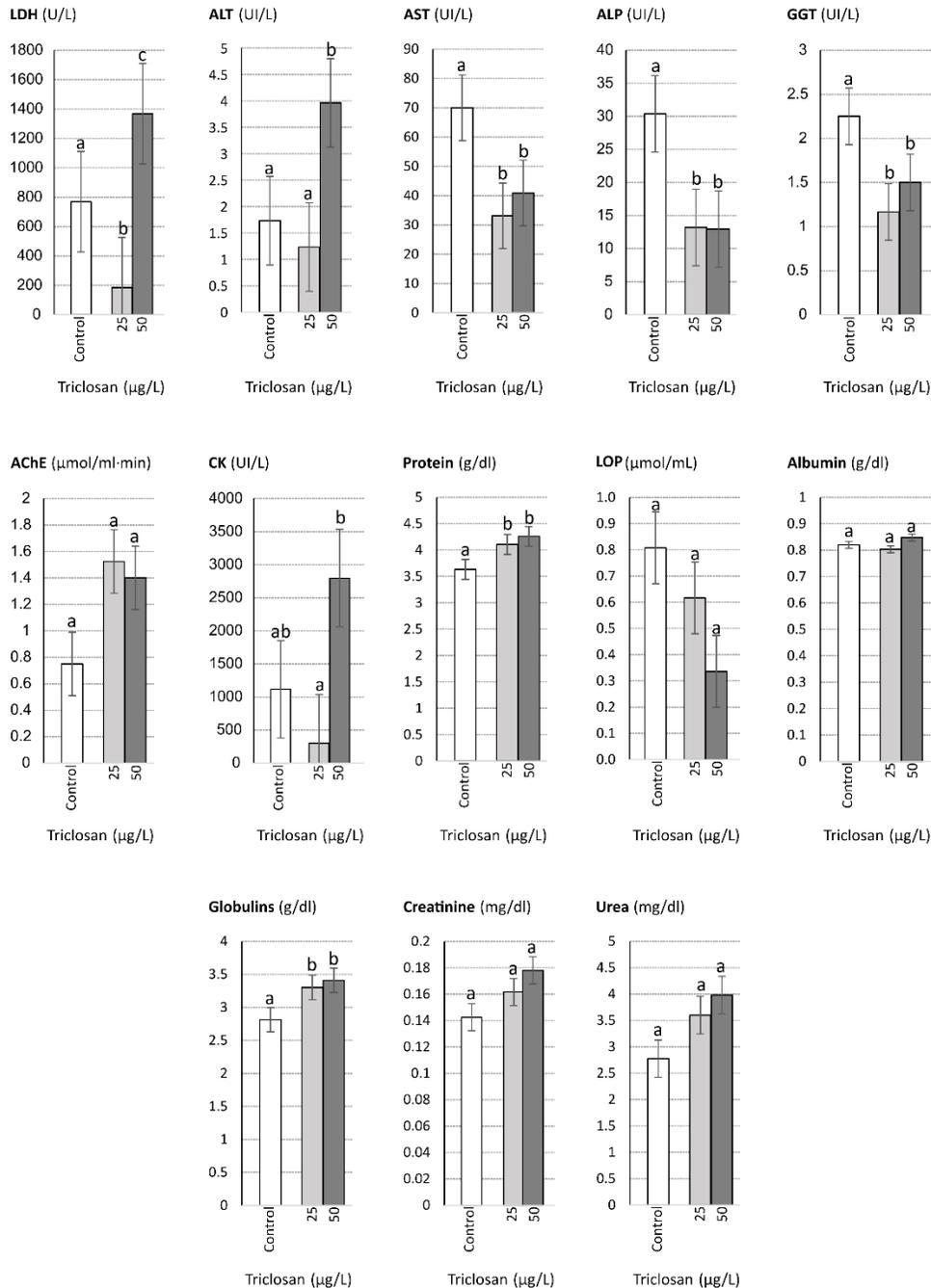
Parámetros	p-valor					
	Concentración		Sexo		Tiempo de exposición	
	Ibuprofeno	Triclosán	Ibuprofeno	Triclosán	Ibuprofeno	Triclosán
LDH (U/L)	0.0190*	0.0038*	0.0234*	0.8601	0.4423	0.0611
ALT (IU/L)	0.6210	0.0006*	0.8721	0.9706	0.0791	0.2305
AST (IU /L)	0.4823	0.0015*	0.6845	0.4000	0.6886	0.2241
ALP (IU/L)	0.4192	0.0332*	0.3790	0.8100	0.3469	0.5137
GGT (IU/L)	0.3182	0.0082*	0.3181	0.6076	0.2042	0.3445
AChE ( $\mu\text{mol/ml}$ min)	0.7093	0.6389	0.1215	0.3828	0.4599	0.7771
CK (IU/L)	0.0079*	0.0442*	0.3027	0.5958	0.6964	0.1157
Proteína (g/dL)	0.7153	0.0382*	0.6341	0.1274	0.0180*	0.5099
Albumina (g/dL)	0.7488	0.8395	0.4488	0.9598	0.2000	0.1512
Globulina (g/dL)	0.5575	0.0136*	0.5616	0.3523	0.0995	0.2174
Creatinina (mg/dL)	0.7811	0.7039	0.7213	0.5852	0.0148*	0.1035
Úrea (mg/dL)	0.0029*	0.5449	0.6415	0.2923	0.4823	0.7673

$p < 0.05$ , ANOVA para concentración, sexo y tiempo de exposición.

\*Factor significativo.



# Triclosan



**Figura 12-1.** Parámetros bioquímicos en plasma de *P. magdaleniatum* después de exposición a triclosán. Los valores representan la media  $\pm$  SD. Diferentes letras minúsculas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

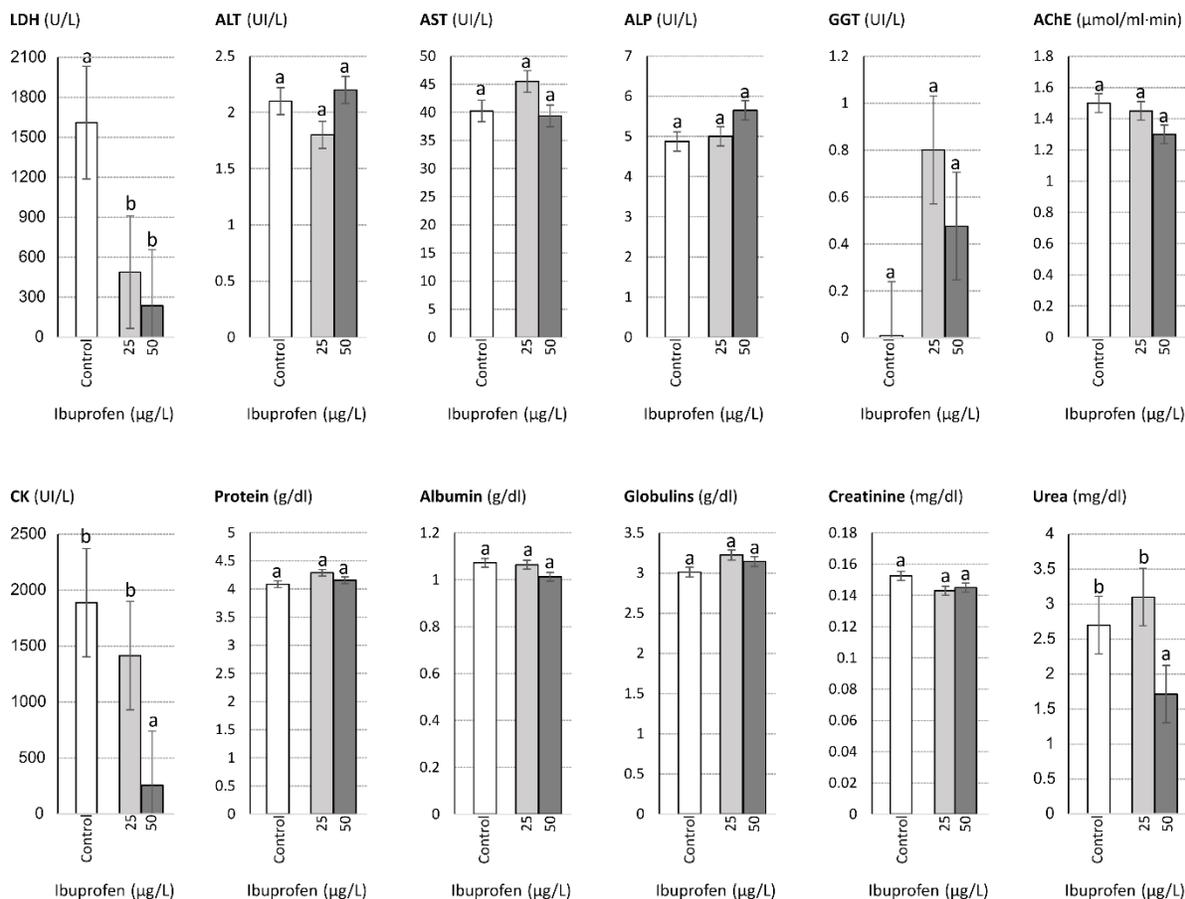
A una concentración de 25 µg/L de triclosán, hay una disminución significativa en la actividad de LDH, y a una concentración de 50 µg/L, hay un aumento en la actividad de LDH (Tabla 12-2). Por otro lado, los niveles en los peces expuestos a ibuprofeno en condiciones de control fueron  $1327.4 \pm 262.1$  U/L. Como se observa en la Figura 12-2, luego de la exposición al fármaco hubo una disminución significativa ( $F = 4.92$ ,  $p = 0.0190$ ) en la actividad de esta enzima, en las dos concentraciones de exposición,  $488.4 \pm 277.4$  U/L con 25 µg/L y  $235.0 \pm 72.7$  U/L para 50 µg/L.

**Tabla 12-2.** Parámetros bioquímicos en plasma de *P. magdaleniatum*, en condiciones de control y expuestos a diferentes concentraciones de ibuprofeno y triclosán.

Parámetros	Ibuprofeno	Triclosán	Ibuprofeno	Triclosán	Ibuprofeno	Triclosán
	0 µg/L (Control)		25 µg/L		50 µg/L	
LDH (U/L)	$1327.4 \pm 262.1^a$	$769.0 \pm 252.7^a$	$488.4 \pm 277.4^b$	$184.5 \pm 43.5^b$	$235.0 \pm 72.7^b$	$1368.4 \pm 492.9^c$
ALT (IU/L)	$2.7 \pm 0.7$	$1.7 \pm 0.3^a$	$1.8 \pm 0.8$	$1.2 \pm 0.4^a$	$2.2 \pm 0.7$	$4.0 \pm 1.7^b$
AST (IU/L)	$40.3 \pm 5.6$	$70.0 \pm 17.9^a$	$45.5 \pm 14.8$	$33.1 \pm 5.7^b$	$39.4 \pm 6.5$	$40.9 \pm 12.4^b$
ALP (IU/L)	$4.9 \pm 1.9$	$30.4 \pm 6.2^a$	$5.0 \pm 0.9$	$13.2 \pm 2.5^b$	$5.7 \pm 1.1$	$13.0 \pm 3.6^b$
GGT (IU/L)	$0.01 \pm 0.00$	$2.25 \pm 0.07^a$	$0.91 \pm 0.54$	$1.17 \pm 0.18^b$	$0.48 \pm 0.22$	$1.50 \pm 0.48^b$
AChE (µmol/ml min)	$1.5 \pm 0.7$	$0.8 \pm 0.2$	$1.5 \pm 1.0$	$1.5 \pm 0.6$	$1.3 \pm 0.5$	$1.4 \pm 0.7$
CK (IU/L)	$1888.4 \pm 396.1^a$	$1115.7 \pm 689.4^{ab}$	$1414.4 \pm 888.1^a$	$300.9 \pm 62.9^a$	$256.3 \pm 146.2^b$	$2797.1 \pm 1845.5^b$
Proteína (g/dL)	$4.09 \pm 0.77$	$3.63 \pm 0.37^a$	$4.29 \pm 0.29$	$4.11 \pm 0.30^b$	$4.16 \pm 0.48$	$4.26 \pm 0.33^b$
Albumina (g/dL)	$1.07 \pm 0.23$	$0.82 \pm 0.11$	$1.06 \pm 0.14$	$0.80 \pm 0.14$	$1.01 \pm 0.15$	$0.85 \pm 0.12$
Globulina (g/dL)	$3.01 \pm 0.54$	$2.81 \pm 0.26^a$	$3.23 \pm 0.20$	$3.30 \pm 0.27^b$	$3.14 \pm 0.35$	$3.41 \pm 0.26^b$
Creatinina (mg/dL)	$0.15 \pm 0.03$	$0.14 \pm 0.08$	$0.14 \pm 0.02$	$0.16 \pm 0.03$	$0.15 \pm 0.02$	$0.18 \pm 0.03$
Úrea (mg/dL)	$2.7 \pm 0.6^a$	$2.8 \pm 0.3$	$3.1 \pm 0.8^a$	$3.0 \pm 1.6$	$1.7 \pm 0.6$	$4.0 \pm 1.5^b$

Los datos se presentan como media  $\pm$  SD; diferentes letras minúsculas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

# Ibuprofen



**Figura 12-2.** Parámetros bioquímicos en plasma de *P. magdaleniatum* tras exposición a ibuprofeno. Los valores representan la media  $\pm$  SD. Diferentes letras minúsculas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

La LDH puede activarse en organismos en condiciones de estrés, como niveles bajos de oxígeno o la presencia de contaminantes tóxicos (322). Un aumento de la actividad de esta enzima provocada por contaminantes, es reconocida como un marcador potencial para la evaluación de una sustancia química (324), especialmente en organismos acuáticos. Cualquier variación en el metabolismo de proteínas y carbohidratos en condiciones de estrés puede provocar cambios en la actividad de LDH (323). Esta enzima se utiliza como indicador del deterioro tisular por estrés, provocado por alteraciones en las vías de producción de energía celular y daño celular (317,324). La disminución puede ser el resultado del cambio en la función de la membrana mitocondrial o de un deterioro del metabolismo de los

carbohidratos por la exposición continua de los peces a estos contaminantes, como se describe en el estudio *L. rohita*, con exposiciones continuas de oxitetraciclina (323). Resultados contrarios se muestran en un estudio realizado en *C. carpio* con exposición a una mezcla de PPCPs, reveló un aumento de la actividad de LDH en comparación con el control, lo que indica un posible daño tisular, condiciones hipóxicas y un cambio en el metabolismo anaeróbico (45). Otro estudio con *O. mykiss* expuestos a concentraciones de carbamazepina también mostró un aumento de la enzima en relación con el control, como posible resultado de la liberación de isoenzimas de los tejidos destruidos (324).

Además, en este estudio se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $F = 4.65$ ,  $p = 0.0433$ ) en cuanto al sexo. Las concentraciones más altas de LDH fueron en machos con una media de  $825.8 \pm 560.9$  U/L; en las hembras, la actividad enzimática fue alrededor de la mitad, con un promedio de  $441.7 \pm 179.5$  U/L. Estos resultados fueron similares a los resultados para LDH encontrados en *Coelorrinchus mediterraneus*, potencialmente expuestos a químicos antropogénicos, con una diferencia estadísticamente significativa ( $t = 2.980$ ;  $p = 0.004$ ) para el sexo, las mayores actividades de LDH se encontraron en machos (325).

### **12.3.3. Daño hepático**

La alanina aminotransferasa (ALT), la aspartato aminotransferasa (AST) y la fosfatasa alcalina (ALP) son indicadores relevantes del estrés hepático (324,326). ALT y AST están involucrados en la generación de glucosa para la producción de energía bajo estrés, movilizándolo L-aminoácidos para la gluconeogénesis (317), y también se utilizan como indicadores de daño hepático por contaminantes (45,327).

Para este estudio, la actividad media de ALT en condiciones de control para el ibuprofeno fue de  $2.7 \pm 0,7$  UI/L, sin diferencias significativas para ningún parámetro (concentración, sexo y tiempo de exposición) (Figura 12-2). La concentración de ALT en los peces de control para el triclosán fue de  $1.7 \pm 0.3$  UI/L; Como se ve en la Figura 12-1, hay un aumento estadísticamente significativo ( $F = 15.91$ ,  $p = 0.0006$ ) en la concentración de  $50 \mu\text{g/L}$  (Tabla 12-2). Los tiempos de exposición no presentan diferencias estadísticamente significativas. El aumento de la actividad de la ALT puede estar relacionado con daño tisular, principalmente daño hepático, relacionado con problemas en el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos en el hígado, o que el cuerpo está tratando de mitigar el estrés causado por el triclosán aumentando la tasa de metabolismo(323,327). De acuerdo con otros estudios en crías de peces (*Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella*, *Labeo rohita* y *Cirrhinus mrigala*) expuestos al triclosán, se ha relacionado el aumento significativo en la actividad de ALT con un mayor gasto de energía en comparación a peces sin exposición al contaminante (317).

La actividad media de AST en condiciones de control para el tratamiento con ibuprofeno fue de  $40.3 \pm 5.6$  UI/L, sin diferencias estadísticamente significativas en cuanto a concentraciones, tiempos de exposición o sexo (Figura 12-2). Por otro lado, la concentración media de AST en condiciones de control de peces con triclosán fue de  $70.0 \pm 17.9$  UI/L, en la que hubo una disminución significativa ( $F = 11.79$ ,  $p = 0.0015$ ) en los niveles de AST para las concentraciones de  $25 \mu\text{g/L}$  y  $50 \mu\text{g/L}$  (Tabla 12-2). Estos resultados concuerdan con el estudio realizado en *O. niloticus* con exposición a diferentes metales, donde se observó una disminución en la actividad de AST provocada por altas acumulaciones de metales en los tejidos (328). La disminución y por tanto la inhibición de las actividades de la AST puede estar provocada por la pérdida de esta enzima en las regiones solubles de los hepatocitos y por tanto los mecanismos de desintoxicación no son lo suficientemente eficaces para prevenir las alteraciones provocadas por el triclosán o las células dañadas son incapaces de sintetizar AST (323).

ALP es una enzima ubicua unida a la membrana plasmática, responsable de la eliminación de grupos fosfato de diferentes tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y otros compuestos fosforilados (329,330). Esta enzima es producida por células que recubren los conductos biliares del hígado (45), por lo que es un indicador de trastornos hepáticos y evaluación de la integridad de la membrana plasmática (329,331). En este estudio, la actividad ALP para la experimentación con ibuprofeno no mostró diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros (Figura 12-2). Para los peces expuestos a triclosán, la concentración promedio de ALP bajo condiciones de control fue de  $30.4 \pm 6.2$  UI/L; como se presenta en la Figura 12-1, hay una disminución estadísticamente significativa ( $F = 4.88$ ,  $p = 0.0332$ ) la concentración de  $25 \mu\text{g/L}$  y  $50 \mu\text{g/L}$  (Tabla 12-2).

Las alteraciones en la actividad de la ALP se pueden determinar no solo por el aumento sino por la disminución de la actividad de ATP en comparación con el control. Algunos autores han podido determinar que el aumento de la actividad de esta enzima puede estar relacionado con el daño de las vías biliares, y su disminución puede ser un índice de necrosis hepática (330). En un estudio realizado con *C. carpio* utilizando diferentes PPCPs de una planta de tratamiento, se observó una disminución de ALP como consecuencia de la disminución de la función de ALP en el hígado (45). En otro estudio con *C. auratus gibelio var*, hubo un aumento en las dosis bajas de cobre ( $0.1$ ,  $0.2$ ,  $0.5 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{L}$ ), por lo que se atribuyó al aumento de la actividad funcional de los órganos analizados (329).

Por el contrario, hubo una disminución de ALP a exposiciones más altas ( $1.0$  y  $2.0 \text{ mg Cu}^{2+}/\text{L}$ ), posiblemente debido a la pérdida de ALP en la membrana plasmática en el líquido extracelular, inactivación de la molécula enzimática in situ o inhibición de la actividad enzimática a nivel celular o molecular. También puede ser el resultado

de la reducción en la concentración de fosfolípidos específicos requeridos por esta enzima de membrana para expresar su actividad (329,332).

La gamma-glutamyltransferasa (GGT), también conocida como transglutaminasa, es una enzima multifuncional que requiere de calcio como cofactor para catalizar la formación de un enlace isopéptido covalente entre las  $\gamma$ -carboxamidas de los residuos de glutamina y el grupo de residuos de lisina, lo que produce cisteína para preservar la homeostasis intracelular del estrés oxidativo (333–335). Esta enzima participa en funciones biológicas críticas como la formación de epidermis de la piel y la regulación de la apoptosis (333–335). La GGT se concentra en el hígado, pero su expresión es detectable en el epitelio biliar, ocasionalmente en los hepatocitos periportales, la vesícula biliar, el bazo, el páncreas y los riñones (335). Además de la ALT, AST, ALP y GGT, esta es considerada una enzima hepática, relacionada con una mayor carga de estrés oxidativo (336), que se ha utilizado como biomarcador de alteraciones en el hígado de organismos acuáticos.

En este estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de GGT para peces expuestos a ibuprofeno (Figura 12-2). En cambio, los peces expuestos al triclosán mostraron una disminución significativa ( $F = 8.07$ ,  $p = 0.0082$ ) en la actividad de GGT, tanto en la concentración de 25  $\mu\text{g/L}$  como en la de 50  $\mu\text{g/L}$ , en relación con los peces control ( $2.3 \pm 0.1$  UI/L) (Figura 12-1). Nuestros resultados concuerdan con los encontrados por la exposición a ibuprofeno y carbamazepina en *Solea senegalensis*, donde no hubo diferencias en las respuestas de la actividad plasmática de GGT (259). Otro estudio realizado en *Clarias gariepinus* con exposiciones subletales a cromo, mostró una diferencia insignificante ( $p < 0.05$ ) en plasma, hígado y riñón (337).

#### **12.3.4. Neurotoxicidad**

La acetilcolinesterasa (AChE) es la enzima que hidroliza el neurotransmisor acetilcolina, volviendo a su estado de reposo cuando se activa (322). Esta enzima actúa en las sinapsis colinérgicas del sistema nervioso central y periférico, lo que la convierte en un biomarcador rápido y sensible de exposición a muchos contaminantes ambientales como los PPCP (322). Con las concentraciones en las que se realizó este estudio, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la actividad de AChE (Figuras 12-1 y 12-2). En el presente estudio no fue posible identificar ningún tipo de efecto neurotóxico causado por concentraciones de exposición de ibuprofeno o triclosán en peces. Aunque la medición de la actividad de la AChE plasmática no es la única que indica un efecto neurotóxico, se relaciona con la alteración de la vía de síntesis enzimática, provocando disfunción en los canales iónicos de las neuronas, pérdida de neuronas colinérgicas y modificación postranscripcional o postraducciona l de esta enzima en peces (317).

### **12.3.5. Daño muscular**

La creatina quinasa (CK) es una familia de proteínas, cuya función es transportar fosfato en células con altas tasas metabólicas, además del transporte de energía intracelular; participan en la transformación de ATP en células que tienen tasas de renovación de energía altas y variables (338). Las CK catalizan la conversión de creatina y consumen ATP para crear fosfocreatina y ADP (324,339). En el presente estudio, peces tratados con ibuprofeno en condiciones de control, tuvieron un promedio de  $1888.4 \pm 396.1$  UI/L. Cuando fueron expuestos a las diferentes concentraciones de este fármaco, hubo una disminución estadísticamente significativa ( $F = 7.45$ ,  $p = 0.0079$ ) en la actividad de CK para la concentración de 50  $\mu\text{g/L}$ , con respecto al control (Tabla 12-2). Los peces del tratamiento con triclosán en condiciones de control tuvieron un promedio de  $1115.7 \pm 689.4$  UI/L. A diferencia del ibuprofeno, hubo un aumento estadísticamente significativo ( $F = 5.03$ ,  $p = 0.0442$ ) en la actividad de CK para la concentración de 50  $\mu\text{g/L}$ , referente al control (Tabla 12-2).

Al comparar nuestros resultados de triclosán con otros estudios con diferentes contaminantes, presentan comportamientos similares: en ensayos con exposición aguda a carbamazepina en *O. mykiss*, hubo un aumento significativo en la actividad de CK en comparación con el grupo de control (324), así como otro estudio en la misma especie pero con exposición aguda a deltametrina (340). En *D. rerio*, con respuesta dependiente de la concentración de antibióticos  $\beta$ -dicetona (339). La disminución de CK con ibuprofeno como contaminante en nuestro estudio puede ser el resultado de la acumulación del fármaco debido a la exposición continua durante el tratamiento experimental, provocando la inhibición de las actividades de la CK.

### **12.3.6. Estrés oxidativo**

Las proteínas plasmáticas están compuestas por albúminas, globulinas y otros componentes del sistema inmunológico como fibrinógeno, proteínas reguladoras, factores de coagulación y proteínas de transporte (341). Las proteínas son indispensables en la arquitectura y fisiología de la célula (317), por lo tanto, las alteraciones en la actividad de las proteínas totales son un marcador de estrés oxidativo. Un aumento significativo de la peroxidación lipídica produce la liberación de radicales libres que reaccionan con proteínas (342). En los procesos de lipoperoxidación, los radicales libres pueden causar daño a las proteínas de membrana, las cuales inactivan receptores o enzimas unidas a membranas. El aumento del daño proteico está relacionado con deficiencias en la eliminación de proteínas o con una mayor tasa de oxidación de proteínas debido al envejecimiento (343,344).

En el presente estudio, la actividad proteica de los peces del experimento en condiciones de control con ibuprofeno fue de  $4.09 \pm 0.77$  g/dL. Después de la

exposición al medicamento hubo diferencia estadísticamente significativa ( $F = 6.64$ ,  $p = 0.0180$ ) en cuanto a los tiempos de exposición, sin embargo, no presentó diferencias en cuanto a concentración de exposición o sexo.

La actividad proteica en condiciones control de los peces del experimento con triclosán fue de  $3.63 \pm 0.37$  g/dL, después de la exposición durante cuatro meses presentaron a una disminución en la actividad proteica ( $4.04 \pm 0.39$  g/dL) respecto al tiempo cero ( $4.49 \pm 0.41$  g/dL). Como se ve en la Figura 12-1, la exposición de los peces con triclosán generó un aumento significativo en la proteína total ( $F = 4.34$ ,  $p = 0.0382$ ), en las dos concentraciones de exposición (Tabla 12-2). Debido a que se encontró una alteración, la cual podría interpretarse como estrés oxidativo causado por el triclosán, se realizó un análisis de LPO, sin embargo, en este análisis no se evidenció daño por estrés oxidativo (Figura 12-1).

Resultados similares se presentan en el estudio realizado en *Salmo trutta* Linnaeus con exposición continua a metales y plaguicidas organofosforados, en el que hubo un aumento significativo en los niveles de glutatión y proteínas totales, pero sin daño por estrés oxidativo por producción de MDA (345). Es importante resaltar que una causa del aumento de proteína puede estar relacionada con los hábitos de alimentación. Estos peces presentaron niveles más altos de proteína total en la temporada de primavera, sugiriendo que en este momento había más fuente de alimento disponible y un aumento en este parámetro (345). Otro ejemplo de este tipo de alteración son los resultados en diferentes especies, *C. carpio*, *C. idella*, *L. rohita* y *C. mrigala* con triclosán, que presentaron diferencias estadísticamente significativas con una disminución de la actividad proteica respecto al control (317). Los autores indica un aumento en el catabolismo de proteínas con el fin de apoyar la demanda de energía para los procesos metabólicos o los procesos necesarios para la síntesis de proteínas se debilitaron o dañaron en los peces por el estrés del triclosán (317).

Entre las proteínas plasmáticas, la albúmina es la más dominante en el pescado, relacionada con sustancias lipofílicas, provocando que xenobióticos como el ibuprofeno y el triclosán se asocien a esta o proteínas similares, por sus características hidrófobas (341). Esta proteína tiene funciones de almacenamiento y transporte (343,346). Aumentos en la actividad de la albúmina pueden producirse en las primeras etapas del daño hepático (336). La actividad de la albúmina del presente estudio tanto para ibuprofeno como para triclosán no mostró una diferencia estadísticamente significativa con una media de  $1.05 \pm 0.15$  g/dL para ibuprofeno y  $0.82 \pm 0.12$  g/dL para triclosán, en consonancia con los resultados del estudio realizado en *C. carpio* con exposición continua a diferentes PPCPs de un efluente de planta de tratamiento de aguas residuales (45).

Además de la albúmina, las globulinas también son un grupo heterogéneo de proteínas séricas (347), que contienen factores de coagulación, proteínas de transporte, mediadores de inflamación e inmunoglobulinas (348). La mayoría de las globulinas son sintetizadas por los hepatocitos, excepto las inmunoglobulinas (348). La concentración de globulina se calcula restando la proteína total y la albúmina (347) y las proporciones albúmina globulina (A/G) reflejan cambios en los dos tipos principales de proteínas (348). Para este estudio, los peces expuestos a ibuprofeno en condiciones de control tuvieron una media en las globulinas de  $3.01 \pm 0.54$  g/dL, sin una diferencia estadísticamente significativa para ningún parámetro (Figura 12-2). Por el contrario, los peces expuestos a triclosán presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $F = 6.28$ ,  $p = 0.0136$ ) (Figura 12-1); en condiciones de control, el promedio fue de  $2.81 \pm 0.26$  g/dL. Con la exposición al triclosán, hubo un aumento de globulinas en ambas concentraciones, comparado con el control (Tabla 12-2).

La creatinina es un compuesto generado a partir de la degradación de la creatina, se puede considerar como un producto de desecho metabólico generado por la actividad muscular (259). La creatinina es filtrada por los riñones y eliminada por la orina (259). Por esta razón, los niveles altos de creatinina plasmática son indicativos de mal funcionamiento renal, baja tasa de filtración glomerular, distrofia muscular y esfuerzo físico del cuerpo (259,327). Es importante señalar que la determinación de la enfermedad renal a partir de las concentraciones plasmáticas de nitrógeno y creatinina no es útil, ya que los riñones de los peces contribuyen poco a la excreción de desechos nitrogenados (349). Los peces de la experimentación con triclosán en condiciones de control tuvieron un promedio de  $0.14 \pm 0.08$  mg/dL. Después de la exposición al contaminante, no hubo una diferencia significativa con respecto a la concentración, los tiempos de exposición o el sexo. Por otro lado, la actividad de creatinina de los peces del experimento con ibuprofeno en condiciones de control fue de  $0.15 \pm 0.03$  mg/dL, sin diferencia estadísticamente significativa para concentraciones o sexo, sin embargo, existe una diferencia estadísticamente significativa ( $F = 7.11$ ,  $p = 0.0148$ ) respecto al tiempo de exposición. Después de cuatro meses de exposición hubo una disminución ( $0.14 \pm 0.02$  mg/dL) en la actividad de creatinina con respecto al tiempo de exposición cero ( $0.16 \pm 0.02$  mg/dL).

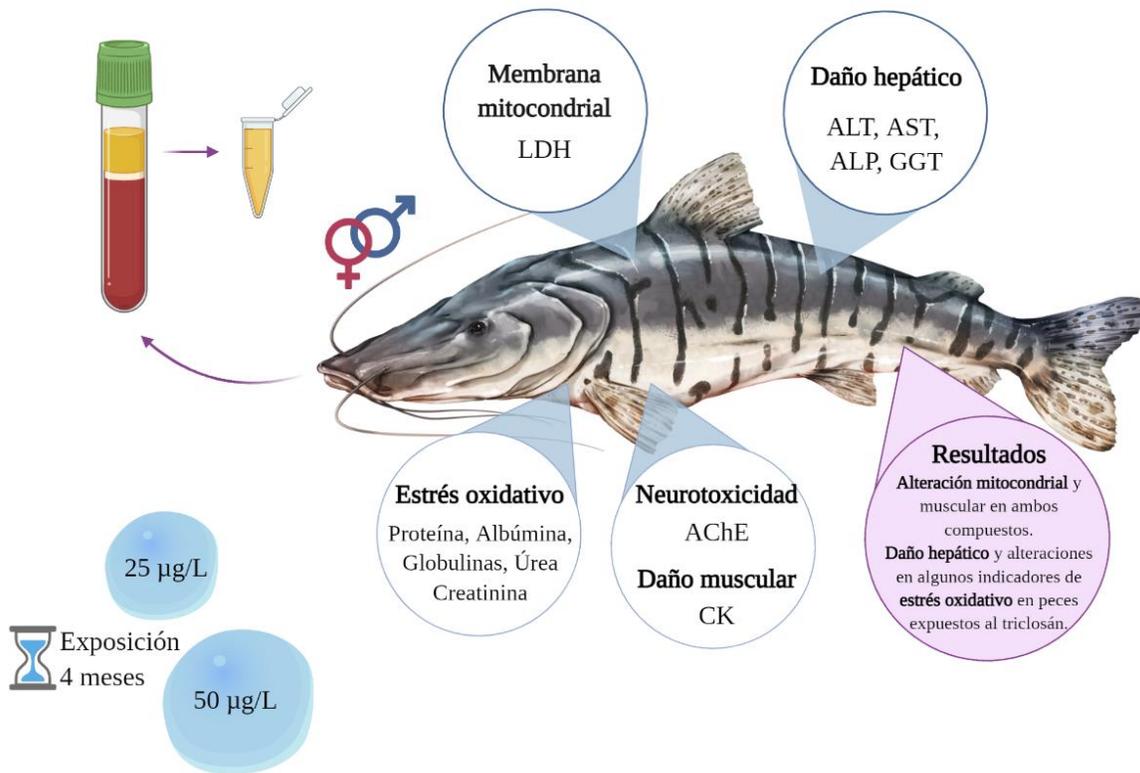
Entre los compuestos nitrogenados no proteicos del pescado se encuentra la creatinina y la úrea (350). La úrea en los peces proviene de la degradación de las purinas por el ácido úrico, sin embargo, la mayoría de los peces generan cantidades bajas de úrea (349). Aunque los factores que regulan el metabolismo de la úrea no están claros, las branquias parecen ser el principal órgano de excreción en la mayoría de los peces, seguidas de los riñones. Por lo tanto, el aumento de la actividad de la

úrea plasmática puede ser indicativo de una alteración del epitelio branquial en lugar de una enfermedad renal en los teleósteos (349). En este estudio, los peces del tratamiento con triclosán en condiciones de control tuvieron un promedio de  $2.8 \pm 0.3$  mg/dL de úrea, sin diferencias significativas para ningún parámetro. Por el contrario, como se observa en la Figura 12-2, los peces con tratamiento con ibuprofeno, en condiciones de control, presentaron un promedio de  $2.7 \pm 0.6$  mg/dL. Después de la exposición al ibuprofeno, hubo una disminución estadísticamente significativa ( $F = 8.25$ ,  $p = 0.0029$ ) en la concentración de  $50 \mu\text{g/L}$  (Tabla 12-2).

## **12.4. Conclusión**

Tras la exposición de *P. magdaleniatum* a dos concentraciones diferentes ( $25$  y  $50 \mu\text{g/L}$ ) de ibuprofeno y triclosán durante cuatro meses, se evidenció alteración a nivel mitocondrial provocada por ambos compuestos. Los peces expuestos a triclosán sufrieron alteraciones relacionadas con daño hepático (ALT, AST, ALP y GGT) con diferencia entre las concentraciones de exposición, pero sin diferencias entre sexo y tiempo de exposición. A nivel muscular, hubo alteraciones determinadas por el biomarcador CK, con diferencias a diferentes concentraciones de ibuprofeno y triclosán. El triclosán presentó diferencias en la actividad proteica, en términos de concentración y tiempo de exposición, así como para las globulinas a concentraciones de exposición. Por otro lado, los peces expuestos al ibuprofeno mostraron una diferencia en la actividad de la úrea. Los presentes resultados sugieren que tanto el ibuprofeno como el triclosán pueden representar un peligro para este pez, ya que varias enzimas asociadas afectan la función correcta de la producción de energía, la respuesta inmune, la arquitectura y la fisiología celular a las concentraciones probadas. Teniendo en cuenta los niveles de triclosán encontrados en el músculo *P. magdaleniatum* en algunos sitios de muestreo de los mercados y el BCF, es posible afirmar que este contaminante ya puede estar provocando algún tipo de alteración bioquímica en este pez a niveles ambientales de los ríos Magdalena y Cauca.

## Resumen gráfico



## 13. Conclusiones

Por medio de esta investigación se determinaron las concentraciones de los productos farmacéuticos ibuprofeno y diclofenaco en muestras de agua de los principales ríos de Colombia, Magdalena y Cauca, y en tejido muscular de Bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum* en tres épocas climáticas diferentes, además se emplearon diferentes técnicas para determinar si estos medicamentos eran posibles disruptores endocrinos y como podían afectar la reproducción del Bagre rayado del Magdalena.

La información en los cuerpos de agua y los peces sobre la determinación de estos compuestos en el país es limitada, ya que la mayoría de las investigaciones se han centrado en la determinación de metales pesados y plaguicidas, por otra parte, esta es una de las primeras investigaciones sobre análisis de disrupción endocrina en *P. magdaleniatum*, lo cual ha generado diferentes retos en la mayoría de los aspectos de la investigación.

Los análisis de músculo de bagre rayado tanto para ibuprofeno como diclofenaco estuvieron por debajo de los límites de cuantificación del método, así como las concentraciones de ibuprofeno en todos los sitios de muestreo. Sin embargo, teniendo en cuenta que en este trabajo se encontraron las mayores concentraciones de diclofenaco en agua, las mayores a nivel mundial, es necesario promover y continuar con este tipo de investigaciones donde se realice un monitoreo ambiental, en las que se generen datos históricos sobre el grado de contaminación y los sitios de vertimiento de estos contaminantes, para poder diseñar regulaciones que permitan establecer límites seguros en lo que estos medicamentos pueden estar en las aguas, tanto para consumo humano como para los organismos que habitan vienen en ellas.

A través los biomarcadores analizados se pretendía obtener resultados para entender cuál es el riesgo potencial de la exposición de ibuprofeno y diclofenaco en concentraciones ambientales y así poder determinar cuál es el riesgo potencial del Bagre *P. magdaleniatum* al estar expuesto constantemente a estos contaminantes. Algunos de los biomarcadores utilizados demostraron que el ibuprofeno puede causar disrupción endocrina cuando el *P. magdaleniatum* está expuesto a concentraciones de 25 y 50 µg/L. Para los análisis de calidad espermática, tanto las pruebas *in vivo* como las *in vitro* demostraron claramente la disminución los

parámetros cinemáticos en los espermatozoides con exposiciones de 50 µg/L de ibuprofeno en agua, provocando graves daños a la reproducción y cría de esta especie en las cuencas de los principales ríos de Colombia. Además, los resultados *in vitro* muestran que las alteraciones en la calidad espermática no solo pueden suceder con exposiciones continuas del ibuprofeno, sino también cuando se libera semen en las áreas de apareamiento y desove si el medicamento está presente estas concentraciones. Así mismo los análisis realizados con biomarcadores enzimáticos demostraron alteraciones para ibuprofeno en las diferentes concentraciones de exposición (25 y 50 µg/L) a nivel mitocondrial; con exposiciones de 25 µg/L hubo alteraciones a nivel muscular y de estrés oxidativo determinadas por los biomarcadores creatina quinasa (CK) y úrea, lo que posiblemente general un riesgo para la especie, ya que la alteración de estas enzimas afectan la función correcta de la producción de energía, la respuesta inmune, la arquitectura y la fisiología celular.

Por otra parte, los biomarcadores analizados sobre potencial de la membrana mitocondrial, integridad del ADN por citometría de flujo y vitelogenina en muestras de sangre, no fueron concluyentes en esta investigación, dado que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de exposición, los tiempos, los sexos que demostrara una alteración. Para la determinación de las alteraciones de disrupción endocrina en *P. magdaleniatum* expuestos a concentraciones independientes de ibuprofeno y diclofenaco a 25 y 50 µg/L durante cuatro meses no se recomiendan los biomarcadores de potencial de membrana mitocondrial, integridad del ADN y vitelogenina; estos biomarcadores no fueron útiles posiblemente por las concentraciones y tiempos de exposición escogidas, ya que este medicamento puede presentar un comportamiento no monotónico y sus efectos podrían ocurrir a concentraciones más bajas o más altas, o con otros tiempos de exposición. Además, el *P. magdaleniatum* tiene un ciclo de vida mayor (60 años) a los peces modelo, lo cual hace que los parámetros físicos y/o químicos respondan diferente como lo harían peces con un ciclo de vida más corto. Con lo cual no indica que, utilizando otra especie con un ciclo de vida más corto, concentraciones de exposición y tiempos diferentes, el potencial de membrana mitocondrial, integridad del ADN y vitelogenina pueden ser aptos y dar resultados concluyentes, como se han demostrado otros estudios.

## 14. Productos asociados

### 14.1. Publicaciones científicas

Gallego-Ríos SE, Peñuela GA. Evaluation of ibuprofen and diclofenac in the main rivers of Colombia and striped catfish *Pseudoplatystoma magdaleniatum*. *Environ Monit Assess* 2021;193:1–17. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08922-5>

Gallego-Ríos SE, Atencio-García VJ, Peñuela GA. Effect of ibuprofen in vivo and in vitro on the sperm quality of the striped catfish *Pseudoplatystoma magdaleniatum*. *Environ Sci Pollut Res* 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13245-6>

Gallego R SE, Peñuela GA, Martínez-López E. Enzymatic activity changes in striped cat fish *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, induced by exposure to different concentrations of ibuprofen and triclosan. *Chemosphere* 2021;271:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129399>

Gallego-Ríos SE, Peñuela GA, Martínez-López E (2021) Updating the use of biochemical biomarkers in fish for the evaluation of alterations produced by pharmaceutical products. *Environ Toxicol Pharmacol* 88:103756. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103756>

### 14.2. Sometidos

Sara E. Gallego-Ríos, Gustavo A. Peñuela. Evaluation of mitochondrial membrane potential and DNA integrity in Catfish *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, when exposed for prolonged times to different concentrations of ibuprofen (*Fish Physiology and Biochemistry*)

Sara E. Gallego-Ríos, Gustavo A. Peñuela. Vitellogenin determination in male and female striped catfish, *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, exposed to different concentrations of ibuprofen (*Journal of Experimental Zoology*)

### 14.3. Participación en congresos / foros

Evento: ISEAC 40 International Conference on Environmental & Food Monitoring, 2018. Santiago de Compostela-España.

Título del trabajo: Monitoring of Certain Emerging Contaminants in the Striped Catfish, a Native Fish to Colombia.

Modalidad: Presentación oral.

Participación: Autor principal.

Evento: Foro sobre la apropiación social de Tecnologías para la gestión sostenible del Agua, 2020. México (virtual).

Título del trabajo: Evaluación de ibuprofeno y diclofenaco en los principales ríos de Colombia.

Modalidad: Presentación oral.

Participación: Autor principal.

Evento: 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020, XVIII Congreso Latinoamericano de Cromatografía – COLACRO, X Congreso Colombiano de Cromatografía – COCOCRO y IV Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular - C2B2.

Título del trabajo: Desarrollo, validación y aplicación de un método analítico para la cuantificación de contaminantes emergentes en Bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, por QuEChERS UHPLC – MS / MS.

Modalidad: Presentación oral.

Participación: Autor principal.

Evento: XIII Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos - CIBIA.

Título del trabajo: Estado actual de contaminación de algunos productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) en Bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum* proveniente de los ríos Cauca y Magdalena.

Modalidad: Presentación oral.

Participación: Autor principal.

# Bibliografía

1. Recabarren-Villalón T, Ronda AC, Arias AH. Uso de biomarcadores en la evaluación ambiental de ecosistemas marinos en América. *JAINA Costas y Mares ante el Cambio Climático*. 2019;1(2):1–18.
2. Meijide FJ, Da Cuña RH, Prieto JP, Dorelle LS, Babay PA, Lo Nostro FL. Effects of waterborne exposure to the antidepressant fluoxetine on swimming, shoaling and anxiety behaviours of the mosquitofish *Gambusia holbrooki*. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2018;163(July):646–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.085>
3. Salgado LD, Marques AEML, Kramer RD, Oliveira FG de, Moretto SL, Lima BA de, et al. Integrated assessment of sediment contaminant levels and biological responses in sentinel fish species *Atherinella brasiliensis* from a sub-tropical estuary in south Atlantic. *Chemosphere* [Internet]. 2019;219:15–27. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.204>
4. Maulvault AL, Camacho C, Barbosa V, Alves R, Anacleto P, Pousão-Ferreira P, et al. Living in a multi-stressors environment: An integrated biomarker approach to assess the ecotoxicological response of meagre (*Argyrosomus regius*) to venlafaxine, warming and acidification. *Environ Res* [Internet]. 2019;169(October 2018):7–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.10.021>
5. Sakalli S, Giang PT, Burkina V, Zamaratskaia G, Rasmussen MK, Bakal T, et al. The effects of sewage treatment plant effluents on hepatic and intestinal biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio*). *Sci Total Environ* [Internet]. 2018;635:1160–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.188>
6. Giang PT, Sakalli S, Fedorova G, Tilami SK, Bakal T, Najmanova L, et al. Biomarker response, health indicators, and intestinal microbiome composition in wild brown trout (*Salmo trutta m. fario* L.) exposed to a sewage treatment plant effluent-dominated stream. *Sci Total Environ* [Internet]. 2018;625:1494–509. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.020>
7. García-Camero JP, Beltrán FJ, Encinas A, Rivas FJ, Oropesa AL. The added value of a zebrafish embryo-larval model in the assessment of wastewater tertiary treatments. *Environ Sci Water Res Technol*. 2019;5(12):2269–79.
8. Oost D, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in

- environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2003;13(2):57–149.
9. Pedrazzani R, Bertanza G, Brnardić I, Cetecioglu Z, Dries J, Dvarionienė J, et al. Opinion paper about organic trace pollutants in wastewater: Toxicity assessment in a European perspective. *Sci Total Environ*. 2019;651:3202–21.
  10. Archer E, Petrie B, Kasprzyk-Hordern B, Wolfaardt GM. The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), endocrine disrupting contaminants (EDCs), metabolites and illicit drugs in a WWTW and environmental waters. *Chemosphere* [Internet]. 2017;174:437–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.101>
  11. Oropesa A, Moreno J, Gómez L. Lesiones histopatológicas en peces originadas por la exposición a contaminantes emergentes: recopilando y analizando datos. *Rev Toxicol*. 2017;34:99–108.
  12. Schröder P, Helmreich B, Škrbić B, Carballa M, Papa M, Pastore C, et al. Status of hormones and painkillers in wastewater effluents across several European states—considerations for the EU watch list concerning estradiols and diclofenac. *Environ Sci Pollut Res*. 2016;23(13):12835–66.
  13. Montagner CC, Jardim WF. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, Sao Paulo State (Brazil). *J Braz Chem Soc*. 2011;22(8):1452–62.
  14. Burger J. Bioindicators: Types, Development, and Use in Ecological Assessment and Research. *Environ Bioindic*. 2006;1(1):22–39.
  15. McCarty LS, Power M, Munkittrick KR. Bioindicators versus biomarkers in ecological risk assessment. *Hum Ecol Risk Assess*. 2002;8(1):159–64.
  16. Gallego R SE, Peñuela GA, Martínez-López E. Enzymatic activity changes in striped cat fish *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, induced by exposure to different concentrations of ibuprofen and triclosan. *Chemosphere*. 2021;271:1–13.
  17. Martínez-Morcillo S, Rodríguez-Gil JL, Fernández-Rubio J, Rodríguez-Mozaz S, Míguez-Santiyán MP, Valdes ME, et al. Presence of pharmaceutical compounds, levels of biochemical biomarkers in seafood tissues and risk assessment for human health: Results from a case study in North-Western Spain. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. 2020;223(1):10–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.10.011>
  18. Galvis G, Mojica JI. The Magdalena River fresh water fishes and fisheries. *Aquat Ecosyst Heal Manag*. 2007;10(2):127–39.
  19. Barreto-Reyes C, The Nature Conservancy Colombia, MacArthur Foundation, AUNAP. Producción pesquera en la Cuenca del Río Magdalena: desembarcos y estimación ecosistémica [Internet]. Bogotá (Colombia); 2017. 38 p. Available from: [http://sepec.aunap.gov.co/Archivos/AUNAP/Produccion\\_pesquera-cuenca\\_del\\_rio\\_Magdalena.pdf](http://sepec.aunap.gov.co/Archivos/AUNAP/Produccion_pesquera-cuenca_del_rio_Magdalena.pdf)

20. Friedrich-Ebert-Stiftung, Foro Nacional Ambiental. ¿Para dónde va el río Magdalena? Riesgos sociales, ambientales y económicos del proyecto de navegabilidad [Internet]. First. Valderrama JA, editor. Bogotá (Colombia); 2015. 291–311 p. Available from: <https://www.foronacionalambiental.org.co/publicaciones/detalle/para-donde-va-el-rio-magdalena-riesgos-sociales-ambientales-y-economicos-del-proyecto-de-navegabilidad/>
21. Augusto G, Millán C. Guía para el manejo, cría y conservación del bagre rayado: *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linneo) [Internet]. Convenio Andrés Bello, editor. Bogotá; 2003. 56 p. Available from: [https://www.academia.edu/17458383/Guia\\_Cultivo\\_bagre\\_rayado?auto=download](https://www.academia.edu/17458383/Guia_Cultivo_bagre_rayado?auto=download)
22. Mojica J, Usma J, Álvarez R, Lasso CA. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia 2012. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia WWF Colombia Universidad de Manizales. Bogotá (Colombia); 2012. 319 p.
23. WWF. Informe 2016 - Riesgo y resiliencia en una nueva era [Internet]. 2016. Available from: [awsassets.panda.org/downloads/informe\\_planeta\\_vivo\\_2016.pdf](https://awsassets.panda.org/downloads/informe_planeta_vivo_2016.pdf)
24. AUNAP. Seis razones para cumplir la veda del bagre rayado del Magdalena que inicia el 1º de mayo [Internet]. Bogotá (Colombia); 2021 p. Abril 30 de 2021. Available from: <https://www.aunap.gov.co/index.php/sala-de-prensa/boletines/327-seis-razones-para-cumplir-la-veda-del-bagre-rayado-del-magdalena-que-inicia-el-1-de-mayo>
25. Tognelli MF, Lasso CA, Bota-Sierra CA, Jiménez-Segura LF, Cox NA. Estado de conservación y distribución de la biodiversidad de agua dulce en los Andes tropicales. Tognelli MF, Lasso CA, Bota-Sierra CA, Jiménez-Segura LF, Cox NA, editors. Estado de conservación y distribución de la biodiversidad de agua dulce en los Andes tropicales. Gland, Suiza, Cambridge, UK y Arlington, USA: UICN, Gland, Suiza, Cambridge, UK y Arlington, USA; 2021. 199 p.
26. Tejada-Benitez L, Flegel R, Odigie K, Olivero-Verbel J. Pollution by metals and toxicity assessment using *Caenorhabditis elegans* in sediments from the Magdalena River, Colombia. *Environ Pollut* [Internet]. 2016;212:238–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.057>
27. Ortegon Torres L, Ordoñez Osorio K, Henao Murillo B, Duque J, Pelaez Jaramillo C. Efectos genotóxicos de los contaminantes ambientales, en peces de importancia comercial del río Magdalena, en el departamento del Tolima. *Tumbaga*. 2014;1(9):21–53.
28. Huang Q, Yu Y, Tang C, Zhang K, Cui J, Peng X. Occurrence and behavior of non-steroidal anti-inflammatory drugs and lipid regulators in wastewater and urban river water of the Pearl River Delta, South China. *J Environ Monit*. 2011;13(4):855–63.

29. Wang L, Ying GG, Zhao JL, Yang XB, Chen F, Tao R, et al. Occurrence and risk assessment of acidic pharmaceuticals in the Yellow River, Hai River and Liao River of north China. *Sci Total Environ* [Internet]. 2010;408(16):3139–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.047>
30. Huerta B, Rodriguez-Mozaz S, Nannou C, Nakis L, Ruhí A, Acuña V, et al. Determination of a broad spectrum of pharmaceuticals and endocrine disruptors in biofilm from a waste water treatment plant-impacted river. *Sci Total Environ*. 2015;540:241–9.
31. Ngubane NP, Naicker D, Ncube S, Chimuka L, Madikizela LM. Determination of naproxen, diclofenac and ibuprofen in Umgeni estuary and seawater: A case of northern Durban in KwaZulu–Natal Province of South Africa. *Reg Stud Mar Sci* [Internet]. 2019;29:100675. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100675>
32. Yoon Y, Ryu J, Oh J, Choi BG, Snyder SA. Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). *Sci Total Environ* [Internet]. 2010;408(3):636–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.049>
33. Petrović M, Škrbić B, Živančev J, Ferrando-Climent L, Barcelo D. Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole-linear ion trap in different types of water in Serbia. *Sci Total Environ*. 2014;468–469:415–28.
34. Ebele AJ, Abou-Elwafa Abdallah M, Harrad S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg Contam* [Internet]. 2017;(2016). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405665016300488>
35. White D, Lapworth DJ, Civil W, Williams P. Tracking changes in the occurrence and source of pharmaceuticals within the River Thames, UK; from source to sea. *Environ Pollut* [Internet]. 2019;249:257–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.015>
36. Gallego-Ríos SE, Peñuela GA. Evaluation of ibuprofen and diclofenac in the main rivers of Colombia and striped catfish *Pseudoplatystoma magdaleniatum*. *Environ Monit Assess*. 2021;193(4):1–17.
37. Botero-Coy AM, Martínez-Pachón D, Boix C, Rincón RJ, Castillo N, Arias-Marín LP, et al. An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater. *Sci Total Environ* [Internet]. 2018;642:842–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.088>
38. Sathishkumar P, Meena RAA, Palanisami T, Ashokkumar V, Palvannan T, Gu FL. Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota - a review. *Sci Total Environ* [Internet]. 2020;698:134057. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134057>

39. EPA. Contaminants of Emerging Concern including Pharmaceuticals and Personal Care Products [Internet]. Water Quality Criteria Washington, D.C; 2008. Available from: <https://www.epa.gov/wqc/contaminants-emerging-concern-including-pharmaceuticals-and-personal-care-products>
40. Ali AM, Rønning HT, Sydnes LK, Alarif WM, Kallenborn R, Al-Lihaibi SS. Detection of PPCPs in marine organisms from contaminated coastal waters of the Saudi Red Sea. *Sci Total Environ* [Internet]. 2018;621:654–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.298>
41. Ebele AJ, Abou-Elwafa Abdallah M, Harrad S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg Contam* [Internet]. 2017;3(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>
42. Meador JP, Yeh A, Young G, Gallagher EP. Contaminants of emerging concern in a large temperate estuary. *Environ Pollut* [Internet]. 2016;213:254–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.088>
43. Arias J. Pharmaceutical and Personal Hygiene Products (PPcPs): A Threat Little Studied in Colombian Waters. *Agric Res Technol* [Internet]. 2019;22(3):1–8. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/975b/b7c1bfb0f472cd6bcoae424be33dd12071df.pdf>
44. Yin L, Wang B, Yuan H, Deng S, Huang J, Wang Y, et al. Pay special attention to the transformation products of PPCPs in environment. *Emerg Contam* [Internet]. 2017;3(2):69–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2017.04.001>
45. Giang PT, Burkina V, Sakalli S, Schmidt-Posthaus H, Rasmussen MK, Randak T, et al. Effects of Multi-Component Mixtures from Sewage Treatment Plant Effluent on Common Carp (*Cyprinus carpio*) under Fully Realistic Condition. *Environ Manage* [Internet]. 2019;63(4):466–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00267-017-0964-7>
46. Liu N, Jin X, Feng C, Wang Z, Wu F, Johnson AC, et al. Ecological risk assessment of fifty pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Chinese surface waters: A proposed multiple-level system. *Environ Int* [Internet]. 2020;136(8):105454. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105454>
47. Bizarro C, Ros O, Vallejo A, Prieto A, Etxebarria N, Cajaraville MP, et al. Intersex condition and molecular markers of endocrine disruption in relation with burdens of emerging pollutants in thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*) from Basque estuaries (South-East Bay of Biscay). *Mar Environ Res* [Internet]. 2014;96:19–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.10.009>

48. Chen TH, Chou SM, Tang CH, Chen CY, Meng PJ, Ko FC, et al. Endocrine disrupting effects of domestic wastewater on reproduction, Sexual behavior, And gene expression in the brackish medaka *Oryzias melastigma*. *Chemosphere* [Internet]. 2016;150:566–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.057>
49. Nallani GC, Paulos PM, Constantine LA, Venables BJ, Huggett DB. Bioconcentration of ibuprofen in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere*. 2011;84(10):1371–7.
50. Jobling S, Tyler CR. Endocrine disruption in wild freshwater fish. *Pure Appl Chem*. 2003;75(11–12):2219–34.
51. Morthorst JE, Lister A, Bjerregaard P, Der Kraak G Van. Ibuprofen reduces zebrafish PGE2 levels but steroid hormone levels and reproductive parameters are not affected. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2013;157(2):251–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.12.001>
52. Han S, Choi K, Kim J, Ji K, Kim S, Ahn B, et al. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat Toxicol*. 2010;98(3):256–64.
53. Flippin JL, Huggett D, Foran CM. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat Toxicol*. 2007;81(1):73–8.
54. Jenkins JA, Rosen MR, Draugelis-Dale RO, Echols KR, Torres L, Wieser CM, et al. Sperm quality biomarkers complement reproductive and endocrine parameters in investigating environmental contaminants in common carp (*Cyprinus carpio*) from the Lake Mead National Recreation Area. *Environ Res* [Internet]. 2018;163(February):149–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.041>
55. Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. 2004;234(1–4):1–28.
56. Rurangwa F, Volckaert F, Huyskens G, Kime D, Ollevier F. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*. 2001;55(01):751–69.
57. Song Y, Chai T, Yin Z, Zhang X, Zhang W, Qian Y, et al. Stereoselective effects of ibuprofen in adult zebrafish (*Danio rerio*) using UPLC-TOF/MS-based metabolomics. *Environ Pollut* [Internet]. 2018;241:730–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.009>
58. Saravanan M, Devi KU, Malarvizhi A, Ramesh M. Effects of Ibuprofen on hematological, biochemical and enzymological parameters of blood in an

- Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2012;34(1):14–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2012.02.005>
59. Zhang K, Yuan G, Werdich AA, Zhao Y. Ibuprofen and diclofenac impair the cardiovascular development of zebrafish (*Danio rerio*) at low concentrations. *Environ Pollut* [Internet]. 2020;258:113613. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113613>
  60. Vianneth M, Roa S. Condición de venta de analgésicos antiinflamatorios no esteroides , legalmente autorizados para su comercialización en Colombia . Estrategias de uso racional Resumen Condition of sale of non-steroidal anti-inflammatory drugs Introducción. *Rev Colomb Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 2013;42(2):145–68.
  61. Gonzalez-Rey M, Bebianno MJ. Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012;33(2):361–71.
  62. Chen J-B, Gao H-W, Zhang Y-L, Zhang Y, Zhou X-F, Li C-Q, et al. Developmental Toxicity of Diclofenac and Elucidation of Gene Regulation in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci Rep*. 2014;4:4841.
  63. Schmidt W, O'Rourke K, Hernan R, Quinn B. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus* spp.) and their comparison with standardized toxicity tests. *Mar Pollut Bull*. 2011;62(7):1389–95.
  64. Wabaidur SM, AlOthman ZA, Siddiqui MR, Mohsin K, Bousiakou LG, Karikas GA. UPLC–MS method for the simultaneous determination of naproxen, fluvastatin and ibuprofen in waste water samples. *J Ind Eng Chem*. 2015;24:302–7.
  65. Memmert U, Peither A, Burri R, Weber K, Schmidt T, Sumpter JP, et al. Diclofenac: New data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. *Environ Toxicol Chem*. 2013;32(2):442–52.
  66. Stancova V, Plhalova L, Blahova J, Zivna D, Bartoskova M, Siroka Z, et al. Effects of the pharmaceutical contaminants ibuprofen, diclofenac, and carbamazepine alone, and in combination, on oxidative stress parameters in early life stages of tench (*Tinca tinca*). *Orig Pap Vet Med*. 2017;62(02):90–7.
  67. Brozinski JM, Lahti M, Meierjohann A, Oikari A, Kronberg L. The anti-inflammatory drugs diclofenac, naproxen and ibuprofen are found in the bile of wild fish caught downstream of a wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol*. 2013;47(1):342–8.
  68. Paíga P, Lolic A, Hellebuyck F, Santos LHMLM, Correia M, Delerue-Matos C. Development of a SPE-UHPLC-MS/MS methodology for the determination of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawater. *J*

- Pharm Biomed Anal. 2015;106:61–70.
69. Guiloski IC, Ribas JLC, Pereira L da S, Neves APP, Silva de Assis HC. Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;114:204–11.
  70. OECD. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Guidel Test Chem [Internet]. 2019;(203). Available from: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069961-en.pdf?expires=1565351121&id=id&accname=guest&checksum=0AF5EB9897DE5E64BC932F08F6474BE9>
  71. Petrie B, Barden R, Kasprzyk H, Hordern B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 2014;72:3–27.
  72. Pico Y, Belenguer V, Corcellas C, Diaz-Cruz MS, Eljarrat E, Farré M, et al. Contaminants of emerging concern in freshwater fish from four Spanish Rivers. *Sci Total Environ.* 2019;659:1186–98.
  73. Aristizabal-Ciro C, Botero-Coy AM, López FJ, Peñuela GA. Monitoring pharmaceuticals and personal care products in reservoir water used for drinking water supply. *Environ Sci Pollut Res.* 2017;24(8):7335–47.
  74. Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele RD. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat Toxicol.* 2004;68(2):141–50.
  75. Liu J, Lu G, Xie Z, Zhang Z, Li S, Yan Z. Occurrence, bioaccumulation and risk assessment of lipophilic pharmaceutically active compounds in the downstream rivers of sewage treatment plants. *Sci Total Environ* [Internet]. 2015;511:54–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.033>
  76. American Resource Water Association. Contaminants of Emerging Concern. *Water Resour Impact.* 2007;9(3):5–8.
  77. Puckowski A, Mioduszewska K, Lukaszewicz P, Borecka M, Caban M, Maszkowska J, et al. Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2016;127:232–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.049>
  78. Ojemaye CY, Petrik L. Occurrences, levels and risk assessment studies of emerging pollutants (pharmaceuticals, perfluoroalkyl and endocrine disrupting compounds) in fish samples from Kalk Bay harbour, South Africa. *Environ Pollut* [Internet]. 2019;252:562–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.091>
  79. Coll C, Bier R, Li Z, Langenheder S, Gorokhova E, Sobek A. Association

- between Aquatic Micropollutant Dissipation and River Sediment Bacterial Communities. *Environ Sci Technol*. 2020;54(22):14380–92.
80. Karlsson S, Meili M, Bergström U. Bioaccumulation factors in A critical review [Internet]. 2002 p. R-02-36 Bioaccumulation. Available from: <http://skb.se/upload/publications/pdf/R-02-36.pdf>[https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/33/055/33055640.pdf](https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/33/055/33055640.pdf)
  81. López-Serna R, Petrović M, Barceló D. Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). *Sci Total Environ*. 2012;440:280–9.
  82. Osorio V, Marcé R, Pérez S, Ginebreda A, Cortina JL, Barceló D. Occurrence and modeling of pharmaceuticals on a sewage-impacted Mediterranean river and their dynamics under different hydrological conditions. *Sci Total Environ*. 2012;440:3–13.
  83. Nunes B, Daniel D, Canelas GG, Barros J, Correia AT. Toxic effects of environmentally realistic concentrations of diclofenac in organisms from two distinct trophic levels, *Hediste diversicolor* and *Solea senegalensis*. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2020;231(February):108722. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108722>
  84. World Health Organization (WHO). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. 2002;180.
  85. World Health Organization. Antibiotic Resistance: Multi-Country Public Awareness Survey. *World Health Organ* [Internet]. 2015;1–51. Available from: [www.who.int](http://www.who.int)
  86. Novo A, André S, Viana P, Nunes OC, Manaia CM. Antibiotic resistance, Antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Res*. 2013;47(5):1875–87.
  87. Halling-Sorensen B, Holten Lutzhoft HC, Andersen HR, Ingerslev F. Environmental risk assessment of antibiotics: Comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46(SUPPL. 1):53–8.
  88. Tetreault GR, Bennett CJ, Shires K, Knight B, Servos MR, McMaster ME. Intersex and reproductive impairment of wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges. *Aquat Toxicol*. 2011;104:278–90.
  89. Riesco MF, Valcarce DG, Martínez-Vázquez JM, Robles V. Effect of low sperm quality on progeny: a study on zebrafish as model species. *Sci Rep*. 2019;9(1):11192.
  90. Praskova E, Voslarova E, Siroka Z, Plhalova L, Macova S, Marsalek P, et al. Assessment of diclofenac LC50 reference values in juvenile and embryonic

- stages of the zebrafish (*Danio rerio*). *Pol J Vet Sci.* 2011;14(4):545–9.
91. Panprommin D, Poompuang S, Srisapoom P. Molecular characterization and seasonal expression of the vitellogenin gene from Günther's walking catfish *Clarias macrocephalus*. *Aquaculture.* 2008;276(1–4):60–8.
  92. Banda JA, Gefell D, An V, Bellamy A, Biesinger Z, Boase J, et al. Characterization of pharmaceuticals, personal care products, and polybrominated diphenyl ethers in lake sturgeon serum and gametes. *Environ Pollut* [Internet]. 2020;266:115051. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115051>
  93. Dey S, Bano F, Malik A. Pharmaceuticals and personal care product (PPCP) contamination-a global discharge inventory [Internet]. *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology Emerging Contaminants and Micro Pollutants.* Elsevier Inc.; 2019. 1–26 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816189-0.00001-9>
  94. Kim JW, Ishibashi H, Yamauchi R, Ichikawa N, Takao Y, Hirano M, et al. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *J Toxicol Sci.* 2009;34(2):227–32.
  95. Islas-Flores H, Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, García-Medina S, Neri-Cruz N, Dublán-García O. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environ Sci Pollut Res.* 2014;21(7):5157–66.
  96. Mehinto AC. Impacts of the human pharmaceutical diclofenac in the aquatic environment. 2013;53(9):1689–99.
  97. Wang S, Oakes KD, Bragg LM, Pawliszyn J, Dixon G, Servos MR. Validation and use of in vivo solid phase micro-extraction (SPME) for the detection of emerging contaminants in fish. *Chemosphere* [Internet]. 2011;85(9):1472–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.035>
  98. Montes-Grajales D, Fennix-Agudelo M, Miranda-Castro W. Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review. *Sci Total Environ* [Internet]. 2017;595:601–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.286>
  99. Xia L, Zheng L, Zhou JL. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* [Internet]. 2017;182:416–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.054>
  100. Tiedeken EJ, Tahar A, McHugh B, Rowan NJ. Monitoring, sources, receptors, and control measures for three European Union watch list substances of emerging concern in receiving waters – A 20 year systematic review. *Sci Total Environ.* 2017;574:1140–63.
  101. Ferrando-Climent L, Collado N, Buttiglieri G, Gros M, Rodriguez-Roda I,

- Rodriguez-Mozaz S, et al. Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Sci Total Environ* [Internet]. 2012;438:404–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.073>
102. Guzik U, Wojcieszńska D. Biodegradation of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and Their Influence on Soil Microorganisms. In: Kumar A, Sharma S, editors. *Microbes and Enzymes in Soil Health and Bioremediation* [Internet]. Springer; 2019. p. 22. Available from: <http://www.springer.com/series/14379>
  103. Poirier-Larabie S, Segura PA, Gagnon C. Degradation of the pharmaceuticals diclofenac and sulfamethoxazole and their transformation products under controlled environmental conditions. *Sci Total Environ* [Internet]. 2016;557–558:257–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.057>
  104. Joachim S, Beaudouin R, Daniele G, Geffard A, Bado-Nilles A, Tebby C, et al. Effects of diclofenac on sentinel species and aquatic communities in semi-natural conditions. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021;211.
  105. García Gómez C, Gortáres Moroyoqui P, Drogui P. Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción. *Rev Química Viva*. 2011;(2):96–105.
  106. Romano Mozo D. Disruptores endocrinos Nuevas respuestas para nuevos retos [Internet]. Instituto Sindical de Trabajo Ambiente y Salud (ISTAS), editor. Madrid, Spain; 2012. 60 p. Available from: <https://noharm-uscanada.org/documentos/americalatina/disruptores-endocrinos-nuevas-respuestas-para-nuevos-retos>
  107. Buser HR, Poiger T, Muller MD. Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environ Sci Technol*. 1999;33(15):2529–35.
  108. Bernal Duffo E. El Río Magdalena: Escenario primordial de la patria. *Banrepcultural* [Internet]. 20013 Jun;1. Available from: <https://www.banrepcultural.org/biblioteca-virtual/credencial-historia/numero-282/el-rio-magdalena-escenario-primordial-de-la-patria>
  109. IDEAM- CORMAGDALENA. Estudio ambiental de la Cuenca Magdalena – Cauca y elementos para su ordenamiento territorial. *Estud Actual diagnóstico Territ para Modif al plan Regul*. 2001;1–72.
  110. Ordóñez JI. Río Magdalena, patrimonio de la humanidad. *Periódico UNAL* [Internet]. 2020 Oct 20;1. Available from: <https://unperiodico.unal.edu.co/pages/detail/rio-magdalena-patrimonio-de-la-humanidad/>
  111. Valderrama M. La Pesca En La Cuenca Magdalena-Cauca: Análisis Integral De Su Estado Y Su Problemática, Y Discusión De La Estrategia De Manejo. *foros*

Reg "¿Para dónde va el río Magdalena? Riesgos Soc ambien- tales y económicos del Proy Naveg. 2015;13.

112. Zuluaga Rodríguez J, Ramírez Botero CM, Gallego Ríos SE, Peñuela GA, Macías SM, López Marín BE, et al. Iron, Copper, and Zinc in Some Fish Species of the Atrato River Delta, Colombian Caribbean. *J Aquat Food Prod Technol* [Internet]. 2017;26(7):856–70. Available from: <https://doi.org/10.1080/10498850.2017.1346741>
113. Guzmán D, Ruíz JF, Cadena M. Regionalización de Colombia según la estacionalidad de la precipitación media mensual, a través análisis de componentes principales (ACP). Grupo de Modelamiento de Tiempo Clima y Escenarios de Cambio Climático, Subdirección de Meteorología – IDEAM, editors. Vol. 85. 2014. 2071–2079 p.
114. Cormagdalena. *Altas Cuenca del río grande de la Magdalena*. 1st ed. Barrancabermeja, Colombia: Corporación Autónoma Regional del Río Grande de la Magdalena; 2007. 278 p.
115. Instituto de Investigación de los Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. II. Pesquerías continentales de Colombia: cuencas del Magdalena-Cauca, Sinú, Canalete, Atrato, Orinoco, Amazonas y vertiente del Pacífico. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia [Internet]. Lasso CA, Gutiérrez F de P, Morales-Betancourt MA, Córdoba EA, Ramírez-Gil H, Ajiaco-Martínez RE, editors. *Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia*. Colombia; 2011. 304 p. Available from: [http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/9332#.XuxT\\_j1Vo\\_k.mendeley%0Ahttp://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/9332](http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/9332#.XuxT_j1Vo_k.mendeley%0Ahttp://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/9332)
116. Fernandez B. Diagnóstico de la industria del cemento en Colombia y evaluación de alternativas tecnológicas para el cumplimiento de la norma de emisión de fuentes fijas. *Cienc Unisalle* [Internet]. 2008;155. Available from: [https://ciencia.lasalle.edu.co/ing\\_ambiental\\_sanitaria/589/](https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/589/)
117. Buitrago-Suárez UA, Burr BM. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*. 2007;38(1512):1–38.
118. SEPEC, AUNAP, Universidad del Magdalena, MinAgricultura. *Tallas mínimas de captura y recomendaciones técnicas para el aprovechamiento sostenible de los recursos pesqueros de Colombia*. Bogota; 2013.
119. Hutchinson TH, Pickford DB. Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment. *Toxicology*. 2002;181–182:383–7.
120. Matozzo V, Gagné F, Marin MG, Ricciardi F, Blaise C. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environ Int*. 2008;34(4):531–45.

121. Niemuth NJ, Klaper RD. Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere*. 2015;135:38–45.
122. Bahamonde PA, Munkittrick KR, Martyniuk CJ. Intersex in teleost fish: Are we distinguishing endocrine disruption from natural phenomena? *Gen Comp Endocrinol*. 2013;192:25–35.
123. Bahamonde PA, Tetreault GR, McMaster ME, Servos MR, Martyniuk CJ, Munkittrick KR. Molecular signatures in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) inhabiting an urbanized river reach receiving wastewater effluents. *Aquat Toxicol*. 2014;148:211–20.
124. Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ Sci Technol*. 1998;32(17):2498–506.
125. Rocco L, Frenzilli G, Fusco D, Peluso C, Stingo V. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2010;73(7):1530–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.032>
126. Monneret C. What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus - Biol* [Internet]. 2017;340(9–10):403–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.004>
127. Zoeller RT, Vandenberg LN. Assessing dose-response relationships for endocrine disrupting chemicals (EDCs): a focus on non-monotonicity. *Environ Health*. 2015;14:42.
128. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee DH, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*. 2012;33(3):378–455.
129. Kraak G Van Der, Hewitt M, Lister A, McMaster ME, Munkittrick KR. Endocrine Toxicants and Reproductive Success in Fish. *Hum Ecol Risk Assess An Int J*. 2001;7(5):1017–25.
130. WHO Technical Report Series. The selection and use of essential medicines: report of the WHO Expert Committee on Selection and Use of Essential Medicines, 2019 (including the 21st WHO Model List of Essential Medicines and the 7th WHO Model List of Essential Medicines for Children). Geneva: World Health Organization. WHO Press; 2019. 681 p.
131. Genovese G, Ragueira M, Da Cuña RH, Ferreira MF, Varela ML, Lo Nostro FL. Nonmonotonic response of vitellogenin and estrogen receptor  $\alpha$  gene expression after octylphenol exposure of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Aquat Toxicol*. 2014;156:30–40.
132. Mathias FT, Fockink DH, Disner GR, Prodócimo V, Ribas JLC, Ramos LP, et al. Effects of low concentrations of ibuprofen on freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018;59(March):105–13.
133. Sauvé S, Desrosiers M. A review of what is an emerging contaminant. *Chem*

Cent J. 2014;8(15):2–7.

134. Meador JP, Yeh A, Young G, Gallagher EP. Contaminants of emerging concern in a large temperate estuary. *Environ Pollut.* 2016;213:254–67.
135. Bedoya-Ríos DF, Lara-Borrero JA, Duque-Pardo V, Madera-Parra CA, Jimenez EM, Toro AF. Study of the occurrence and ecosystem danger of selected endocrine disruptors in the urban water cycle of the city of Bogotá, Colombia. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng* [Internet]. 2018;53(4):317–25. Available from: <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1401372>
136. Rathod RH, Chaudhari SR, Patil AS, Shirkhedkar AA. Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. *Futur J Pharm Sci.* 2019;5(1).
137. Gumustas M, Kurbanoglu S, Uslu B, Ozkan SA. UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters. Vol. 76, *Chromatographia.* 2013. 1365–1427 p.
138. Fern C, Vela-amieva M, Ibarra-gonz I. Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta pediátrica México.* 2009;30(5):258–63.
139. Walkner C, Gratzner R, Meisel T, Bokhari SNH. Multi-element analysis of crude oils using ICP-QQQ-MS. *Org Geochem.* 2017;103:22–30.
140. Humbert L. Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications. *Ann Toxicol Anal.* 2010;22(2):61–8.
141. Elsevier. Solid-Phase Extraction. Redding Mors, editor. Amsterdam, Netherlands: Colin F. Poole; 2020. 720 p.
142. Chevolleau S, Bouvillea A, Debrauwer L. Development and validation of a modified QuEChERS protocol coupled to UHPLC-APCI-MS/MS for the simple and rapid quantification of 16 heterocyclic aromatic amines in cooked beef. *Food Chem* [Internet]. 2020;316(September 2019):126327. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126327>
143. Duedahl-Olesen L, Iversen NM, Kelmo C, Jensen LK. Validation of QuEChERS for screening of 4 marker polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and malt. *Food Control* [Internet]. 2020;108(December 2018):106434. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.010>
144. Peña-Herrera JM, Montemurro N, Barceló D, Pérez S. Development and validation of an analytical method for determination of pharmaceuticals in fish muscle based on QuEChERS extraction and SWATH acquisition using LC-QTOF-MS/MS system. *Talanta* [Internet]. 2019;199(November 2018):370–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.119>
145. Norli HR, Christiansen A, Deribe E. Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis

- by gas chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr A* [Internet]. 2011;1218(41):7234–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.050>
146. Boe-Hansen GB, Satake N. An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. *Theriogenology* [Internet]. 2019;137:93–103. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.043>
  147. Kime DE, Van Look KJW, McAllister BG, Huyskens G, Rurangwa E, Ollevier F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol*. 2001;130(4):425–33.
  148. Wilson-Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*. 2007;67(3):661–72.
  149. Liu QH, Li J, Xiao ZZ, Ding FH, Yu D De, Xu XZ. Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*). *Aquaculture*. 2007;263(1–4):20–5.
  150. Pérez Lara JC, Cruz Wendolaine S, Romero Ramírez H, Rodríguez Alba JC. Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. 2018;18(2):41–52. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2018/muv182d.pdf>
  151. Blair TA, Frelinger AL, Michelson AD. *Flow cytometry* [Internet]. 4th ed. Platelets. Elsevier Inc.; 2019. 627–651 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00035-7>
  152. Bajgelman MC. Principles and applications of flow cytometry [Internet]. *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*. Elsevier Inc.; 2019. 119–124 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816548-5.00008-3>
  153. Fazio F, Saoca C, Costa G, Zumbo A, Piccione G. Flow cytometry and automatic blood cell analysis in striped bass *Morone saxatilis* (Walbaum, 1792): A new hematological approach. *Aquaculture* [Internet]. 2019;513(August):734398. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734398>
  154. He J. *Practical Guide to ELISA Development* [Internet]. Fourth Ed. The Immunoassay Handbook. Elsevier Ltd; 2013. 901–911 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00071-3>
  155. Drijvers JM, Awan IM, Perugino CA, Rosenberg IM, Pillai S. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: The Application of ELISA in Clinical Research [Internet]. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier Inc.; 2017. 119–133 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00007-2>
  156. Gil MJ, Soto AM, Usma JI, Gutiérrez OD. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Prod + Limpia*. 2012;7(2):52–73.

157. Pal A, He Y, Jekel M, Reinhard M, Gin KYH. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environ Int.* 2014;71:46–62.
158. Vandermeersch G, Lourenço HM, Alvarez Muñoz D, Cunha S, Diogène J, Cano Sancho G, et al. Environmental contaminants of emerging concern in seafood - European database on contaminant levels. *Environ Res.* 2015;143:29–45.
159. Richardson SD. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal Chem.* 2007;79:4295–324.
160. Stuart M, Lapworth D, Crane E, Hart A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci Total Environ.* 2012;416:1–21.
161. Pal A, Gin KYH, Lin AYC, Reinhard M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci Total Environ.* 2010;408:6062–9.
162. Jurado A, Vázquez-Suñé E, Carrera J, López de Alda M, Pujades E, Barceló D. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Sci Total Environ.* 2012;440:82–94.
163. Sorensen JPR, Lapworth DJ, Nkhuwa DCW, Stuart ME, Gooddy DC, Bell RA, et al. Emerging contaminants in urban groundwater sources in Africa. *Water Res.* 2015;72:51–63.
164. Naidu R, Arias Espana VA, Liu Y, Jit J. Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management. *Chemosphere.* 2016;154:350–7.
165. Raghav M, Eden S, Mitchell K, Witte B. Contaminants of Emerging Concern in Water. Water Resources Research Center College of Agriculture and Life Sciences, University of Arizona. 2013;1–12.
166. Becerril Bravo JE. Contaminantes emergentes en el agua. *Rev Digit Univ.* 2009;10(8):1–7.
167. Silva DCVR, Araújo CVM, López-Doval JC, Neto MB, Silva FT, Paiva TCB, et al. Potential effects of triclosan on spatial displacement and local population decline of the fish *Poecilia reticulata* using a non-forced system. *Chemosphere.* 2017;184:329–36.
168. Liang X, Nie X, Ying G, An T, Li K. Assessment of toxic effects of triclosan on the swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) by a multi-biomarker approach. *Chemosphere* [Internet]. 2013;90(3):1281–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.087>
169. European Commission. Amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products [Internet]. Official Journal of the European Union 2014 p. L 107/5-107/9. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal->

content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0358&from=EN

170. Comunidad Andina. Resolución 2025 de 2018 [Internet]. Comunidad Andina; 2018. p. 1–2. Available from: <http://www.comunidadandina.org/Normativa.aspx>
171. Comunidad Andina. Resolución N°1953 Restricción y prohibición del uso de ingredientes utilizados en jabones cosméticos para el aseo e higiene corporal que tengan acción antibacterial o antimicrobiana [Internet]. 2017. Available from: <https://www.invima.gov.co/documents/20143/448427/Resolucion+1953+a+antibacteriales.pdf/03213afb-79ec-a027-139b-c1d206fc07de>
172. Official Journal of the European Union. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. 2013 p. L78/40.
173. Official Journal of the European Union. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. 2000.
174. Official Journal of the European Union. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy [Internet]. 2008 p. L348/84-L348/97. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0105&from=EN>
175. Salvadore E, Bronders J, Batelaan O. Hydrological modelling of urbanized catchments: A review and future directions. *J Hydrol.* 2015;529(P1):62–81.
176. Paíga P, Santos LHMLM, Delerue-Matos C. Development of a multi-residue method for the determination of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in aqueous environmental matrices by SPE-UHPLC–MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2017;135:75–86. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708516313498>
177. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Water, Office of Science and Technology, Engineering and Analysis Division. Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS [Internet]. US EPA. 2007. p. [EPA-821-R-08-002]. Available from: [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method\\_1694\\_2007.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method_1694_2007.pdf)
178. Batt AL, Furlong ET, Mash HE, Glassmeyer ST, Kolpin DW. The importance of quality control in validating concentrations of contaminants of emerging concern in source and treated drinking water samples. *Sci Total Environ* [Internet]. 2017;579:1618–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.127>
179. Elzayat EM, Ibrahim MF, Abdel-Rahman AA, Ahmed SM, Alanazi FK, Habib

- WA. A validated stability-indicating UPLC method for determination of diclofenac sodium in its pure form and matrix formulations. *Arab J Chem* [Internet]. 2017;10:S3245–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.12.022>
180. Eurachem / CITAC. Setting and Using Target Uncertainty in Chemical Measurement. First. Bettencourt da Silva R, Williams A, editors. 2015. 30 p.
  181. EURACHEM / CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Guide CG 4. Third. Ellison SLR, Williams A, editors. 2012. 141 p.
  182. Official Journal of the European Communities. Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044)(Text with EEA relevance) (2002/657/EC). 2002 p. L 221/8, L 221/36.
  183. AOAC Official Methods of Analysis. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements [Internet]. Rockville, USA; 2016. Available from: [http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf)
  184. Pascale R, Caivano M, Buchicchio A, Mancini IM, Bianco G, Caniani D. Validation of an analytical method for simultaneous high-precision measurements of greenhouse gas emissions from wastewater treatment plants using a gas chromatography-barrier discharge detector system. *J Chromatogr A* [Internet]. 2017;1480:62–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.024>
  185. Johnson AR, Vitha MF. Chromatographic selectivity triangles. *J Chromatogr A* [Internet]. 2011;1218(4):556–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.046>
  186. Etxebarria N, Zuloaga O, Olivares M, Bartolomé LJ, Navarro P. Retention-time locked methods in gas chromatography. *J Chromatogr A*. 2009;1216(10):1624–9.
  187. Budiman H, Zuas O. Trace Measurement Of CO, CH<sub>4</sub>, And CO<sub>2</sub> in High Purity Gases by GC-Fid-Methanizer: Method Validation and Uncertainty Estimation. *Sci Study Res*. 2017;18(3):259–74.
  188. Pérez Cuadrado J, Pujol Forn M. Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, editor. Barcelona, España: Monografías de AEFI; 2001. 315 p.
  189. Linsinger TPJ. Use of recovery and bias information in analytical chemistry and estimation of its uncertainty contribution. *TrAC - Trends Anal Chem* [Internet]. 2008;27(10):916–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2008.08.013>
  190. Magnusson B, Örnemark U. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd ed. 2014. 70 p.

191. Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes K, et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2015;870(1):29–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017>
192. Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes K, et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2015;870(1):8–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.016>
193. Antonio C, Orozco R, Báez R, De B. Uso de la Ecuación de Horwitz en Laboratorios de Ensayos NMX-EE-17025-IMNC-2006. *Simp Metrol* 2010. 2010;1–8.
194. Joint Committee for Guides in Metrology. Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement [Internet]. First edit. 2008. Available from: <http://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html>
195. Official Journal of the European Union. COMMISSION DIRECTIVE 2009/90/EC of 31 July 2009 laying down, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status. Brussels; 2009 p. L 201/36-L 201/38.
196. Cazenave J, Bacchetta C, Rossi A, Ale A, Campana M, Parma MJ. Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: A field caging study. *Ecol Indic.* 2014;38:104–12.
197. Tanna RN, Tetreault GR, Bennett CJ, Smith BM, Bragg LM, Oakes KD, et al. Occurrence and degree of intersex (testis-ova) in darters (*Etheostoma* spp.) across an urban gradient in the Grand River, Ontario, Canada. *Environ Toxicol Chem.* 2013;32(9):1981–91.
198. Jobling S, Coey S, Whitmore J, Kime D, Van Look K, McAllister B, et al. Wild Intersex Roach (*Rutilus rutilus*) Have Reduced Fertility. *Biol Reprod.* 2002;67(2):515–24.
199. Jasinska EJ, Goss GG, Gillis PL, Van Der Kraak GJ, Matsumoto J, de Souza Machado AA, et al. Assessment of biomarkers for contaminants of emerging concern on aquatic organisms downstream of a municipal wastewater discharge. *Sci Total Environ.* 2015;530–531:140–53.
200. Phenomenex. Una solución más sencilla de QuEChERS para análisis de multi residuos en alimentos [Internet]. 2012. Available from: [www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com)
201. Aycan İÖ, Elpek Ö, Akkaya B, Kıraç E, Tuzcu H, Kaya S, et al. Diclofenac induced gastrointestinal and renal toxicity is alleviated by thymoquinone treatment. *Food Chem Toxicol.* 2018;118(May):795–804.
202. Nunes B, Antunes SC, Gomes R, Campos JC, Braga MR, Ramos AS, et al. Acute

- Effects of Tetracycline Exposure in the Freshwater Fish *Gambusia holbrooki*: Antioxidant Effects, Neurotoxicity and Histological Alterations. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2015;68(2):371–81.
203. Duarte LO, Cuervo C, Vargas O, Gil-Manrique B, Cuello F, De León G, et al. Estadísticas de desembarco y esfuerzo de las pesquerías artesanales de Colombia 2020. Santa Marta; 2020.
  204. De La Hoz-M J, J.C. Narváez L, Manjarrés-Martínez L, Nieto A L, Rivera R, Cuello F, et al. Boletín Estadístico Enero – Junio de 2014 [Internet]. Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP), editor. Bogotá (Colombia); 2014. Available from: <http://sepec.aunap.gov.co/Home/VerPdf/18>
  205. De La Hoz-M J, J.C. Narváez L, Manjarrés-Martínez L, Nieto A L, Rivera R, Cuello F, et al. Boletín Estadístico Noviembre - Diciembre de 2014 [Internet]. Bogotá (Colombia); 2014. Available from: <http://sepec.aunap.gov.co/Home/VerPdf/19>
  206. González J, Landines MA, Borbón J, Correal ML, Sánchez C. Evaluación de algunos marcadores de exposición a contaminantes en tres especies de bagres colombianos (Pisces :Siluriformes). *Biota Colomb*. 2014;15(1):7–14.
  207. Garcia SM, Zerbi A, Aliaume C, Do Chi T, Lasserre G. The ecosystem approach to fisheries [Internet]. Vol. 443, FAO Fisheries Technical Paper. 2003. 71 p. Available from: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y4773e/y4773e00.pdf>
  208. United States Environmental Protection Agency (EPA). Toxic and Priority Pollutants Under the Clean Water Act [Internet]. EPA, United States Environmental Protection Agency. 2014. Available from: <https://www.epa.gov/eg/toxic-and-priority-pollutants-under-clean-water-act>
  209. Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res* [Internet]. 2009;43(2):363–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.047>
  210. Huggett DB, Cook JC, Ericson JF, Williams RT. A theoretical model for utilizing mammalian pharmacology and safety data to prioritize potential impacts of human pharmaceuticals to fish. *Hum Ecol Risk Assess*. 2003;9(7):1789–99.
  211. Gutiérrez-Noya VM, Gómez-Oliván LM, Ramírez-Montero M del C, Islas-Flores H, Galar-Martínez M, Dublán-García O, et al. Ibuprofen at environmentally relevant concentrations alters embryonic development, induces teratogenesis and oxidative stress in *Cyprinus carpio*. *Sci Total Environ* [Internet]. 2020;710:136327. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136327>
  212. Duarte IA, Reis-Santos P, Novais SC, Rato LD, Lemos MFL, Freitas A, et al.

- Depressed, hypertense and sore: Long-term effects of fluoxetine, propranolol and diclofenac exposure in a top predator fish. *Sci Total Environ.* 2020;712.
213. Mottaleb MA, Bellamy MK, Mottaleb MA, Islam MR. Use of LC-MS and GC-MS Methods to Measure Emerging Contaminants Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) in Fish. *J Chromatogr Sep Tech.* 2015;6(3):2–9.
  214. Peña Álvarez A, Castillo Alanís A. Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). *Tip Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas.* 2015;18(1):29–42.
  215. Noreña-Ramirez DA, Murillo-Perea E, Guio-Duque JA, Arteaga JJM-. Heavy metals (Cd, Pb and Ni) in fish species commercially important from Magdalena river, Tolima tract, Colombia. *Rev Tumbaga.* 2012;2(7):61–76.
  216. Tejeda-Benítez L, Noguera-Oviedo K, Aga DS, Olivero-Verbel J. Toxicity profile of organic extracts from Magdalena River sediments. *Environ Sci Pollut Res.* 2018;25(2):1519–32.
  217. Gracia-Lor E, Martínez M, Sancho J V, Peñuela G, Hernández F. Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2012;99:1011–23.
  218. Hernández F, Ibáñez M, Botero-Coy AM, Bade R, Bustos-López MC, Rincón J, et al. LC-QTOF MS screening of more than 1,000 licit and illicit drugs and their metabolites in wastewater and surface waters from the area of Bogotá, Colombia. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(21):6405–16.
  219. Pemberthy D, Padilla Y, Echeverri A, Peñuela GA. Monitoring pharmaceuticals and personal care products in water and fish from the Gulf of Urabá, Colombia. *Heliyon.* 2020;6(6).
  220. Vélez MI, Hooghiemstra H, Metcalfe S, Wille M, Berrío JC. Late Glacial and Holocene environmental and climatic changes from a limnological transect through Colombia, northern South America. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol.* 2006;234(1):81–96.
  221. Tucker CS. Water Quantity and Quality Requirements for Channel Catfish Hatcheries. *South Reg Aquac Cent Factsheet.* 1991;Publicatio(461):8.
  222. Imasd. Oxígeno Disuelto. Red de Monitoreo Ambiental Participativo de Sistemas Acuáticos. 2007. p. 1–3.
  223. Mavropoulou AM, Vervatis V, Sofianos S. Dissolved oxygen variability in the Mediterranean Sea. *J Mar Syst.* 2020;208(May 2019).
  224. Goyenola G. Dissolved oxygen [Internet]. RED MAPSA. 2007. p. 3. Available from: [http://imasd.fcien.edu.uy/difusion/educamb/propuestas/red/curso\\_2007/c](http://imasd.fcien.edu.uy/difusion/educamb/propuestas/red/curso_2007/c)

225. Arias ME, Brown MT. Feasibility of using constructed treatment wetlands for municipal wastewater treatment in the Bogotá Savannah, Colombia. *Ecol Eng.* 2009;35(7):1070–8.
226. Penha LC de C, Rola RC, Martinez CB dos R, Martins C de MG. Effects of anti-inflammatory diclofenac assessed by toxicity tests and biomarkers in adults and larvae of *Danio rerio*. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2021;242(December 2020):108955. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108955>
227. Bushra R, Aslam N. An overview of clinical pharmacology of ibuprofen. *Oman Med J.* 2010;25(3):155–61.
228. Andrade-Sossa C, García-Folleco M, Rodríguez-Munar CA, Duque SR, Realpe E. Effects of water level fluctuation on rotifers assemblage structure in Largo Lake (Yahuaraca system - river Amazon floodplain - Colombia). *Caldasia* [Internet]. 2011;33(2). Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/cal/article/view/36412/38106>
229. Vallero D. Air Pollutant Kinetics and Equilibrium. In: *Fundamentals of Air Pollution*. 2014. p. 437–73.
230. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 3033, Diclofenac. [Internet]. 2004 [cited 2021 Apr 4]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac>
231. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 3672, Ibuprofen [Internet]. 2021 [cited 2021 Apr 15]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ibuprofen>.
232. Suárez G CA. Colombia Andina. Editorial Norma, editor. 2002. 248 p.
233. Roldán Pérez G, Ramírez Restrepo JJ. *Fundamentos de limnología neotropical. Ilustrada*. Universidad de Antioquia, editor. Medellín; 2008. 440 p.
234. Ávila C, Nivala J, Olsson L, Kassa K, Headley T, Mueller RA, et al. Emerging organic contaminants in vertical subsurface flow constructed wetlands: Influence of media size, loading frequency and use of active aeration. *Sci Total Environ* [Internet]. 2014;494–495:211–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.128>
235. Muerdter CP, Wong CK, Lefevre GH. Emerging investigator series: The role of vegetation in bioretention for stormwater treatment in the built environment: Pollutant removal, hydrologic function, and ancillary benefits. *Environ Sci Water Res Technol.* 2018;4(5):592–612.
236. Gomes IB, Maillard JY, Simões LC, Simões M. Emerging contaminants affect the microbiome of water systems—strategies for their mitigation. *npj Clean Water* [Internet]. 2020;3(1). Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/s41545-020-00086-y>

237. European Commission. European Commission Implementation Decision 2018/840 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Im. Off J Eur Union. 2018;61(9–12):L 141/9.
238. Moreno-González R, Rodríguez-Mozaz S, Huerta B, Barceló D, León VM. Do pharmaceuticals bioaccumulate in marine molluscs and fish from a coastal lagoon? *Environ Res* [Internet]. 2016;146:282–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.001>
239. Huerta B, Rodríguez-Mozaz S, Lazorchak J, Barcelo D, Batt A, Wathen J, et al. Presence of pharmaceuticals in fish collected from urban rivers in the U.S. EPA 2008–2009 National Rivers and Streams Assessment. *Sci Total Environ* [Internet]. 2018;634:542–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.387>
240. Bean TG, Rattner BA, Lazarus RS, Day DD, Burket SR, Brooks BW, et al. Pharmaceuticals in water, fish and osprey nestlings in Delaware River and Bay. *Environ Pollut* [Internet]. 2018;232:533–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.083>
241. Official Journal of the European Union. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of The Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 2010. p. L 276/33-79 (20.10.2010).
242. Rice E, Baird R, Eaton A. 2320 Alkalinity. In: *Standard Methods for the examination of water and wastewater* [Internet]. 23rd ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 2017. Available from: <https://www.standardmethods.org/doi/abs/10.2105/SMWW.2882.023>
243. Rice E, Baird R, Eaton A. 2340 Hardness. In: *Standard Methods for the examination of water and wastewater* [Internet]. 23rd ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 2017. Available from: [standardmethods.org/doi/10.2105/SMWW.2882.025](https://www.standardmethods.org/doi/10.2105/SMWW.2882.025)
244. Rice E, Baird R, Eaton A. 2540 Solids. In: *Standard Methods for the examination of water and wastewater* [Internet]. 23rd ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 2017. Available from: [standardmethods.org/doi/10.2105/SMWW.2882.030](https://www.standardmethods.org/doi/10.2105/SMWW.2882.030)
245. Jeffries KM, Brander SM, Britton MT, Fangué NA, Connon RE. Chronic exposures to low and high concentrations of ibuprofen elicit different gene response patterns in a euryhaline fish. *Environ Sci Pollut Res*. 2015;22(22):17397–413.

246. Ogunwole GA, Saliu JK, Osuala FI, Odunjo FO. Chronic levels of ibuprofen induces haematotoxic and histopathology damage in the gills, liver, and kidney of the African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*). *Environ Sci Pollut Res*. 2021;
247. Praskova E, Plhalova L, Chromcova L, Stepanova S, Bedanova I, Blahova J, et al. Effects of subchronic exposure of diclofenac on growth, histopathological changes, and oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci World J*. 2014;2014.
248. Ajima MNO, Ogo OA, Audu BS, Ugwoegbu KC. Chronic diclofenac (DCF) exposure alters both enzymatic and haematological profile of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Drug Chem Toxicol*. 2015;38(4):383–90.
249. Nassef M, Matsumoto S, Seki M, Khalil F, Kang IJ, Shimasaki Y, et al. Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* [Internet]. 2010;80(9):1095–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.073>
250. Arce Hernández M. Evaluación del estado de poblaciones de bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum* en la cuenca media del río Magdalena durante la temporada de Subienda del 2004. *Rev la Acad Colomb Ciencias Exactas, Físicas y Nat*. 2008;32(123):257–66.
251. Palacio J. Biologic characteristics of blanquillo *Sorubim cuspicaudus* Littmann, Burr and Nass, 2000 and bagre rayado *Pseudoplatystoma magdaleniatum* Buitrago-Suárez and Burr, 2007 (Siluriformes: Pimelodidae) related to their reproduction in the middle basin of the Ma. *Actual Biológicas*. 2009;31(90):53–66.
252. Arce JW, Alonso JC, Hernández S, Valderram M. Determination of spawning characteristics and fecundity of the the Magdalena Catfish *Pseudoplatystoma magdaleniatum*. *Biota Colomb*. 2014;15(1):70–82.
253. Betsy J. Cryopreservation of Fish Gametes. Betsy J, Kumar S, editors. *Cryopreservation of Fish Gametes*. Springer; 2020. 356 p.
254. Zhang J, Ma W, Xie B, Gui JF, Mei J. Beneficial effect and potential molecular mechanism of chloroquine on sperm motility and fertilizing ability in yellow catfish. *Aquaculture* [Internet]. 2017;468:307–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.028>
255. Adewumi A, Olaleye V, Adesulu E. Egg and sperm quality of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell) broodstock fed differently heated soybean-based diets. *Res J Agric Biol Sci*. 2005;1(1):17–22.
256. Nyina-wamwiza L, Milla S, Pierrard MA, Rurangwa E, Mandiki SN, Van Look KJ, et al. Partial and total fish meal replacement by agricultural products in the diets improve sperm quality in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology* [Internet]. 2012;77(1):184–94. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.032>

257. Roodbari F, Abedi N, Talebi AR. Early and late effects of ibuprofen on mouse sperm parameters, chromatin condensation, and DNA integrity in mice. *Int J Reprod Biomed.* 2015;13(11):703–10.
258. Banihani SA. Effect of ibuprofen on semen quality. *Andrologia.* 2019;51(4):1–6.
259. González-Mira A, Varó I, Solé M, Torreblanca A. Drugs of environmental concern modify *Solea senegalensis* physiology and biochemistry in a temperature-dependent manner. *Environ Sci Pollut Res [Internet].* 2016;23(20):20937–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7293-x>
260. Motov S, Butt M, Masoudi A, Palacios W, Fassassi C, Drapkin J, et al. Comparison of Oral Ibuprofen and Acetaminophen with Either Analgesic Alone for Pediatric Emergency Department Patients with Acute Pain. *J Emerg Med [Internet].* 2020;58(5):725–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2020.02.010>
261. Adekunle A, Ogunduyile FD. Effects of Velvet Bean (*Mucuna pruriens*) on Sperm Quality of African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) Broodstock. *J Fish Aquat Sci.* 2011;6(6):655–61.
262. Herrera-Cruz E, Aristizabal-Regino J, Yepes-Blandón J, Estrada-Posada A, Espinosa-Araujo J, Atencio-Garcia V. Evaluation of three cryoprotectants to preserve striped catfish ( *Pseudoplatystoma magdaleniatum* ) semen. *Rev Colomb Biotecnol.* 2019;XXI:55–62.
263. Corso MN, Marques LS, Gracia LFG, Rodrigues RB, Barcellos LJ, Streit DP. Effects of different doses of eugenol on plasma cortisol levels and the quality of fresh and frozen-thawed sperm in South American catfish (*Rhamdia quelen*). *Theriogenology.* 2019;125:135–9.
264. Atencio V, Dorado M, Navarro E, Pérez F, Herrera B, Movilla J, et al. Evaluation of Ethylene Glycol as a Cryoprotectant in the Sperm Cryopreservation of Trans-andean Shovelnose Catfish (*Sorubim cuspicaudus*, Pimelodidae). *Acta Biológica Colomb.* 2014;19(2):271.
265. Özgür ME, Maraş Z, Erdogan S. The relationship between semen seminal plasma ions and sperm cell velocities of wild-caught longspine scraper, *Capoeta trutta*. *Arch Anim Breed.* 2019;62(2):557–64.
266. Atencio V, Dorado M, Navarro E, Pérez F, Herrera B, Movilla J, et al. Evaluation of Ethylene Glycol as a Cryoprotectant in the Sperm Cryopreservation of Trans-andean Shovelnose Catfish (*Sorubim Cuspicaudus*, Pimelodidae). *Acta Biológica Colomb [Internet].* 2014;19(2):271. Available from: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/41288>
267. Bobe J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. *Gen Comp Endocrinol*

- [Internet]. 2010;165(3):535–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>
268. Aguilar-Romero I, Romero E, Wittich RM, van Dillewijn P. Bacterial ecotoxicity and shifts in bacterial communities associated with the removal of ibuprofen, diclofenac and triclosan in biopurification systems. *Sci Total Environ* [Internet]. 2020;741:140461. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140461>
  269. Ternjej I, Mihaljević Z, Stanković I, Kerovec M, Sipos L, Želježić D, et al. Estimation of DNA integrity in blood cells of eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) inhabiting an aluminium-polluted water environment: An alkaline comet assay study. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2010;59(2):182–93.
  270. Alzamora-Gonzales L, de Amat-Herbozo C, Colona-Vallejos E, Cervantes-Aguilar E, Velarde-Álvarez RD, Aquino-Ortega R, et al. Método rápido para la cuantificación de leucocitos sanguíneos y su utilidad en la evaluación del estado de salud en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*. *Lat Am J Aquat Res*. 2015;43(5):1019–23.
  271. Allauca P, Ugarelli A, Santiani A. Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas Determination of mitochondrial membrane potential by flow cytometry during the cryopreserv. *Rev Inv Vet Perú*. 2019;30(1):288–98.
  272. Luna-Ortiz P, El-Hafidi M, Martínez-Rosas M. La función mitocondrial y la cardioprotección. *Rev Mex Anesthesiol*. 2013;36(4):294–305.
  273. Restrepo G, Varela E, Duque JE, Gómez JE, Rojas M. Freezing, Vitrification, and Freeze-Drying of Equine Spermatozoa: Impact on Mitochondrial Membrane Potential, Lipid Peroxidation, and DNA Integrity. *J Equine Vet Sci*. 2019;72:8–15.
  274. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov Y, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem* [Internet]. 2018;552:50–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5792320/pdf/nihms902260.pdf>
  275. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*. 2011;(50):3–6.
  276. Özgen Ü, Savaşan S, Buck S, Ravindranath Y. Comparison of DiOC6(3) uptake and annexin V labeling for quantification of apoptosis in leukemia cells and non-malignant T lymphocytes from children. *Commun Clin Cytom*. 2000;42(1):74–8.
  277. Ngo VTH, Bajaj T. Ibuprofen. In: ncbi, editor. *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing; 2020. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542299/>

278. Rojas M, Garcı LF, Puzo G, Olivier M. tuberculosis – Induced Macrophage Apoptosis by Altering Ca + 2 -Dependent Cell Signaling. *J Infect Dis.* 2000;182(1):240–51.
279. Zhang K, Yuan G, Werdich AA, Zhao Y. Ibuprofen and diclofenac impair the cardiovascular development of zebrafish (*Danio rerio*) at low concentrations. *Environ Pollut* [Internet]. 2020;258:113613. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113613>
280. Padmini E, Usha Rani M. Mitochondrial membrane potential is a suitable candidate for assessing pollution toxicity in fish. *Sci Total Environ* [Internet]. 2011;409(19):3687–700. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.020>
281. Blanco F, López-Armada M. Papel de la mitocondria en la artrosis. *Rev esp Reum (Ed impr).* 2005;32(1):32–6.
282. Franco R, Bortner CD, Cidlowski JA. Potential roles of electrogenic ion transport and plasma membrane depolarization in apoptosis. *J Membr Biol.* 2006;209(1):43–58.
283. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Harris A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques.* 2011;50(2):98–115.
284. Ribas JLC, da Silva CA, de Andrade L, Galvan GL, Cestari MM, Trindade ES, et al. Effects of anti-inflammatory drugs in primary kidney cell culture of a freshwater fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2014;40(1):296–303.
285. Ragugnetti M, Adams ML, Guimarães ATB, Sponchiado G, De Vasconcelos EC, De Oliveira CMR. Ibuprofen genotoxicity in aquatic environment: An experimental model using *Oreochromis niloticus*. *Water Air Soil Pollut.* 2011;218(1–4):361–4.
286. Liu M, Pan J, Ji H, Zhao B, Zhang S. Vitellogenin mediates phagocytosis through interaction with FcγR. *Mol Immunol* [Internet]. 2011;49(1–2):211–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2011.08.011>
287. Desforges JPW, Peachey BDL, Sanderson PM, White PA, Blais JM. Plasma vitellogenin in male teleost fish from 43 rivers worldwide is correlated with upstream human population size. *Environ Pollut* [Internet]. 2010;158(10):3279–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2010.07.017>
288. Garnayak SK, Mohanty J, Rao T V., Sahoo SK, Sahoo PK. Vitellogenin in Asian catfish, *Clarias batrachus*: Purification, partial characterization and quantification during the reproductive cycle by ELISA. *Aquaculture.* 2013;392–395:148–55.
289. Dang ZC. Interpretation of fish biomarker data for identification,

- classification, risk assessment and testing of endocrine disrupting chemicals. *Environ Int* [Internet]. 2016;92–93:422–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.003>
290. Canapa A, Barucca M, Gorbi S, Benedetti M, Zucchi S, Biscotti MA, et al. Vitellogenin gene expression in males of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* from Terra Nova Bay (Ross Sea): A role for environmental cadmium? *Chemosphere*. 2007;66(7):1270–7.
  291. Zhang S, Dong Y, Cui P. Vitellogenin is an immunocompetent molecule for mother and offspring in fish. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2015;46(2):710–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.08.011>
  292. Li Z, Zhang S, Zhang J, Liu M, Liu Z. Vitellogenin is acidal factor capable of killing bacteria via interaction with lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Mol Immunol*. 2009;46(16):3232–9.
  293. MyBioSource. Fish Vitellogenin (VTG) ELISA Kit [Internet]. Vol. 2. San Diego, California, United States; 2015. Available from: <https://www.mybiosource.com/fish-elisa-kits/vitellogenin-vtg/779081>
  294. Li Z, Zhang S, Liu Q. Vitellogenin functions as a multivalent pattern recognition receptor with an opsonic activity. *PLoS One*. 2008;3(4):4–10.
  295. Boström ML, Berglund O. Influence of pH-dependent aquatic toxicity of ionizable pharmaceuticals on risk assessments over environmental pH ranges. *Water Res*. 2015;72:154–61.
  296. Muñoz-Peñuela M, Lo Nostro FL, Dal’Olio Gomes A, Tolussi CE, Branco GS, Pinheiro JPS, et al. Diclofenac and caffeine inhibit hepatic antioxidant enzymes in the freshwater fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes). *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2021;240(July 2020):108910. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108910>
  297. Näslund J, Asker N, Fick J, Larsson DGJ, Norrgren L. Naproxen affects multiple organs in fish but is still an environmentally better alternative to diclofenac. *Aquat Toxicol* [Internet]. 2020;227(February):105583. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105583>
  298. Nkoom M, Lu G, Liu J, Dong H. Biological uptake, depuration and biochemical effects of diclofenac and carbamazepine in *Carassius carassius*. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2020;205(February):111106. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111106>
  299. Triebkorn R, Casper H, Heyd A, Eikemper R, Köhler HR, Schwaiger J. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*. 2004;68(2):151–66.
  300. Official Journal of the European Union. DIRECTIVE 98/8/EC OF THE

EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market. 1998 p. L 123/1-63.

301. Official Journal of the European Union. COMMISSION IMPLEMENTING DECISION (EU) 2016/110 of 27 January 2016 not approving triclosan as an existing active substance for use in biocidal products for product- type 1 [Internet]. 2016 p. L 21/86-87. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016D0110&from=EN>
302. Rüdél H, Böhmer W, Müller M, Fliedner A, Ricking M, Teubner D, et al. Retrospective study of triclosan and methyl-triclosan residues in fish and suspended particulate matter: Results from the German Environmental Specimen Bank. *Chemosphere* [Internet]. 2013;91(11):1517–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.030>
303. Pullaguri N, Nema S, Bhargava Y, Bhargava A. Triclosan alters adult zebrafish behavior and targets acetylcholinesterase activity and expression. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2020;75(November 2019):103311. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103311>
304. Chen ZF, Ying GG, Liu YS, Zhang QQ, Zhao JL, Liu SS, et al. Triclosan as a surrogate for household biocides: An investigation into biocides in aquatic environments of a highly urbanized region. *Water Res* [Internet]. 2014;58:269–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.072>
305. Coogan MA, Edziyie RE, La Point TW, Venables BJ. Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. *Chemosphere*. 2007;67(10):1911–8.
306. Fair PA, Lee HB, Adams J, Darling C, Pacepavicius G, Alae M, et al. Occurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and in their environment. *Environ Pollut* [Internet]. 2009;157(8–9):2248–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.002>
307. Shanmugam G, Ramasamy K, Selvaraj KK, Sampath S, Ramaswamy BR. Triclosan in Fresh Water Fish Gibelion Catla from the Kaveri River, India, and Its Consumption Risk Assessment. *Environ Forensics*. 2014;15(3):207–12.
308. Stenzel A, Wirt H, Patten A, Theodore B, King-Heiden T. Larval exposure to environmentally relevant concentrations of triclosan impairs metamorphosis and reproductive fitness in zebrafish. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2019;87(August 2018):79–86. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.05.055>
309. Oliveira R, Domingues I, Grisolia CK, Soares AMVM. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environ Sci Pollut Res*. 2009;16(6):679–88.

310. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7(2):88–95.
311. Rodrigues S, Antunes SC, Correia AT, Golovko O, Žlábek V, Nunes B. Assessment of toxic effects of the antibiotic erythromycin on the marine fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by a multi-biomarker approach. *Chemosphere.* 2019;216:234–47.
312. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* [Internet]. 1978;52:302–10. Available from: <http://stacks.iop.org/1742-6596/71/i=1/a=012004?key=crossref.9538450afe63dad1c84f8f585373a48b>
313. Rodrigues S, Antunes SC, Correia AT, Nunes B. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pro-oxidant and genotoxic responses following acute and chronic exposure to the antibiotic oxytetracycline. *Ecotoxicology* [Internet]. 2017;26(1):104–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-016-1746-3>
314. Abdulla Bin-Dohaish EJ. The effects of 4-nonylphenol contamination on livers of Tilapia fish (*Oreochromis spilurs*) in Jeddah. *Biol Res.* 2012;45(1):15–20.
315. Zhang Y, Geißen SU, Gal C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* [Internet]. 2008;73(8):1151–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>
316. Aldous, E., Rockett, L., Johnson I. Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances: triclosan, Water Framework Directive. *Water Framew Dir* [Internet]. 2009;52(ii):74. Available from: <https://www.wfduk.org/sites/default/files/Media/Triclosan - UKTAG.pdf>
317. Dar OI, Sharma S, Singh K, Sharma A, Bhardwaj R, Kaur A. Biochemical markers for prolongation of the acute stress of triclosan in the early life stages of four food fishes. *Chemosphere* [Internet]. 2020;247:125914. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125914>
318. Scheytt T, Mersmann P, Lindstädt R, Heberer T. 1-Octanol/water partition coefficients of 5 pharmaceuticals from human medical care: Carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, and propyphenazone. *Water Air Soil Pollut.* 2005;165(1–4):3–11.
319. Xu J, Wu L, Chang AC. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere* [Internet]. 2009;77(10):1299–305. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.063>
320. Nallani GC, Paulos PM, Constantine LA, Venables BJ, Huggett DB. Bioconcentration of ibuprofen in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere* [Internet]. 2011;84(10):1371–7. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.008>

321. Garcia SN. Field and laboratory fish tissue accumulation of the anti-convulsant drug carbamazepine. University of North Texas; 2013.
322. de Oliveira dos Santos PR, Costa MJ, Dos Santos ACA, Silva-Zacarán ECM, Nunes B. Neurotoxic and respiratory effects of human use drugs on a Neotropical fish species, *Phalloceros harpagos*. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2020;230(October 2019):108683. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108683>
323. Ambili TR, Saravanan M, Ramesh M, Abhijith DB, Poopal RK. Toxicological effects of the antibiotic oxytetracycline to an Indian Major carp *Labeo rohita*. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2013;64(3):494–503.
324. Li ZH, Zlabek V, Velisek J, Grabic R, Machova J, Kolarova J, et al. Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2011;74(3):319–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.09.008>
325. Koenig S, Solé M. Muscular cholinesterase and lactate dehydrogenase activities in deep-sea fish from the NW Mediterranean. *Mar Environ Res* [Internet]. 2014;94:16–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.11.003>
326. Ademola zaid A. Growth response, nutrient utilization, biochemical and hematological parameters of Juvenile African catfish (*clarias gariepinus*) fed diet supplemented with *gongronema latifolia* (benth) extract. *Egypt J Aquat Biol Fish*. 2018;22(2):138–42.
327. Julinta RB, Abraham TJ, Roy A, Singha J, Boda S, Patil PK. Dietary influences of oxytetracycline on the growth and serum biomarkers of *Oreochromis niloticus* (L.). *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2019;186(October):109752. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109752>
328. Öner M, Atli G, Canli M. Effects of metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures on some enzymatic and non-enzymatic indicators in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2009;82(3):317–21.
329. Jiang H, Yang H, Kong X, Wang S, Liu D, Shi S. Response of Acid and Alkaline Phosphatase Activities to Copper Exposure and Recovery in Freshwater Fish *Carassius auratus gibelio* var. *Life Sci J*. 2012;9(3):233–45.
330. Elia AC, Pacini N, Fioravanti ML, Dörr AJM, Zaccaroni A, Parmeggiani AM, et al. Assessment of detoxifying markers for florfenicol in Rainbow Trout Liver. *J Aquat Anim Health* [Internet]. 2016;28(4):258–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/08997659.2016.1206637>
331. Lovatto N de M, Goulart FR, de Freitas ST, Mombach PI, Loureiro BB, Bender ABB, et al. Nutritional evaluation of phosphorylated pumpkin seed (*Cucurbita moschata*) protein concentrate in silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy and

- Gaimard, 1824). *Fish Physiol Biochem.* 2015;41(6):1557–67.
332. Akanji MA, Nafiu MO, Yakubu MT. Enzyme activities and histopathology of selected tissues in rats treated with potassium bromate. *African J Biomed Res.* 2008;11(1):87–95.
  333. Meng Q, Watanabe Y, Suzuki R, Oguri R, Tatsukawa H, Hitomi K. Transglutaminase orthologues in medaka fish - biochemical characterization and establishment of gene-deficient mutants. *Anal Biochem* [Internet]. 2020;593(January):113610. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113610>
  334. Kikuta A, Furukawa E, Ogawa R, Suganuma N, Saitoh M, Nishimaki T, et al. Biochemical characterization of medaka (*Oryzias latipes*) transglutaminases, OLTGK1 and OLTGK2, as orthologues of human keratinocyte-type transglutaminase. *PLoS One.* 2015;10(12):1–13.
  335. Asifa K, Chitra K. Hepatic Biotransformation of Chlordecone and Induction of Hepatotoxicity in the Cichlid Fish , *Pseudotropheus maculatus* ( Bloch , 1795 ). *Int J Appl Res.* 2017;3(5):521–6.
  336. Niemelä O, Alatalo P. Biomarkers of alcohol consumption and related liver disease. *Scand J Clin Lab Invest.* 2010;70(5):305–12.
  337. Kori-Siakpere O, Adamu KM, Okobi IJ. Sublethal Effects of Chromium on Enzymatic Activities of the African Catfish: *Clarias Gariepinus* (Burchell, 1822). *Not Sci Biol.* 2012;4(1):24–30.
  338. Dickmeis T, Rastegar S, Aanstad P, Clark M, Fischer N, Plessy C, et al. Expression of brain subtype creatine kinase in the zebrafish embryo. *Mech Dev.* 2001;109(2):409–12.
  339. Ding L, Zang L, Zhang Y, Zhang Y, Wang X, Ai W, et al. Joint toxicity of fluoroquinolone and tetracycline antibiotics to zebrafish (*Danio rerio*) based on biochemical biomarkers and histopathological observation. *J Toxicol Sci.* 2017;42(3):267–80.
  340. Velíšek J, Jurčíková J, Dobšíková R, Svobodová Z, Piačková V, Máchová J, et al. Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007;23(3):297–301.
  341. Tierney KB, Kennedy CJ, Gobas F, Gledhill M, Sekela M. Organic Contaminants and Fish [Internet]. First Edit. Vol. 33, *Fish Physiology*. Elsevier Inc.; 2013. 1–52 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398254-4.00001-7>
  342. Oldewage A. Oxidative stress biomarkers in the African sharptooth catfish , *Clarias gariepinus* , associated with infections by adult digeneans and water quality. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2020;12(June):232–41.
  343. González-torres MC, Ortiz-muñiz MBR. Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica.* 2000;25(1):3–9.

344. Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J.* 2016;473(7):805–25.
345. Mijošek T, Filipović Marijić V, Dragun Z, Krasnići N, Ivanković D, Erk M. Evaluation of multi-biomarker response in fish intestine as an initial indication of anthropogenic impact in the aquatic karst environment. *Sci Total Environ.* 2019;660:1079–90.
346. Ao J, Gao L, Yuan T, Jiang G. Interaction mechanisms between organic UV filters and bovine serum albumin as determined by comprehensive spectroscopy exploration and molecular docking. *Chemosphere* [Internet]. 2015;119(800):590–600. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.019>
347. Garner BC. Globulins. *Clin Vet Advis Horse.* 2011;934–5.
348. Smith GS, Walter GL, Walker RM. Clinical Pathology in Non-Clinical Toxicology Testing [Internet]. Third Edit. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Elsevier; 2013. 565–594 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00018-2>
349. Thrall MA, Weiser G, Allison R, Campbell T. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. 2nd Editio. Wiley-Blackwell; 2012. 775 p.
350. Ariño A, Beltrán JA, Herrera A, Roncalés P. Fish and seafood: Nutritional Value. *Encycl Hum Nutr.* 2012;2–4:254–61.