



Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería en Medioambiente
Ingeniería Ambiental

**Evaluación de la toxicidad de paracetamol e ibuprofeno sobre la
macrófita *Lemna minuta*: bases para la propuesta de un criterio
ambiental en cuerpos de agua superficiales**

TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL

AUTOR: Franco Igor Salgado Gutiérrez

PROFESOR GUÍA: Dr. Hernán Gaete Olivares

VALPARAÍSO, 2019

Resumen

Los contaminantes emergentes corresponden, entre otros, a artículos de aseo personal, pesticidas y fármacos. Estos agentes químicos se encuentran presentes en los cuerpos de agua superficiales, pero no están regulados, debido a que su presencia se da en bajas concentraciones. Sin embargo, son candidatos próximos a la regulación ya que al no tener claro sus posibles efectos en los cuerpos de agua superficiales representan un factor de riesgo medio ambiental.

El objetivo de este trabajo fue determinar la toxicidad del paracetamol y el ibuprofeno de manera individual y en mezclas binarias, además de determinar el tipo de interacción entre estos dos fármacos por medio de los métodos concentración adición y proporción sinergia. Y finalmente, se propuso un criterio de calidad ambiental para estos compuestos presentes en cuerpos de aguas superficiales.

Para esto se realizó una evaluación de la fitotoxicidad por medio de bioensayos con la macrófita *Lemna minuta*, donde se evaluó como respuesta la inhibición del crecimiento expresado por el número y área de frondas en función del incremento de las concentraciones de los fármacos.

Los valores obtenidos de Cl_{50} de cada fármaco de manera individual fueron de 90,5 y 76,5 mg/L para el caso del paracetamol, y 8 y 5,9 mg/L para el ibuprofeno en relación con el número de frondas y área foliar respectivamente, determinando que el ibuprofeno es más tóxico que el paracetamol y que el área foliar es una respuesta más sensible que el número de frondas. Las mezclas binarias mostraron una interacción de tipo sinérgica, las que resultaron ser más tóxicas que el paracetamol de forma individual, indicando que la proporción sinérgica estaba ligada a este fármaco y que el aporte antagónico estaba ligado al ibuprofeno.

Se determinó el criterio de calidad ambiental para paracetamol e ibuprofeno en cuerpos de agua superficiales de 1000 y 100 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, el cual se basó en el 10% del LOEC de cada producto farmacéutico para aplicar un factor de incertidumbre y evitar un potencial daño hacia los productores primarios. Al comparar estos valores con las concentraciones evidenciadas en la literatura se puede decir que no existe riesgo ambiental asociado al paracetamol y al ibuprofeno en cuerpos de agua superficiales.

Índice

Índice de contenido	iii, iv
Índice de tablas	v
Índice de figuras	v, vi

Índice de contenido

1. Introducción	1
1.1. Problemas de los contaminantes emergentes	1
1.1.1 Efectos graves	1
1.2. PPCP como contaminantes	2
1.3. Fármacos como contaminantes emergentes	3
1.3.1 Paracetamol	5
1.3.2 Ibuprofeno	6
1.4. Tipos de interacciones químicas entre sustancias químicas	7
1.5. Modelos de interacción	8
1.5.1 Concentración Adición	8
1.5.2 Proporción Sinergia	9
1.6. Macrófitas y la contaminación acuática	9
1.6.1 Mecanismos de defensa en macrófitas	10
1.7. Evaluación de la calidad ambiental en cuerpos de agua	11
1.8. Métodos biológicos para la evaluación de la calidad de aguas	13
1.8.1 Bioensayos de toxicidad	13
2. Formulación del problema	16
3. Hipótesis	17
4. Objetivos	17
4.1. Objetivo general	17
4.2. Objetivos específicos	17
5. Materiales y métodos	18

5.1.	Metodología utilizada	18
5.2.	Condiciones de cultivo	18
5.3.	Preparación de soluciones problema.....	20
5.4.	Prueba de determinación de rangos.....	20
5.5.	Diseño experimental	21
5.5.1	Bioensayos individuales	21
5.5.2	Bioensayos de mezclas binarias	22
5.6.	Mediciones y determinaciones analíticas	23
5.6.1	Número de frondas	23
5.6.2	Área de las frondas.....	23
5.7.	Evaluación de los puntos finales	23
5.7.1	Tasa media de crecimiento específico	23
5.7.2	Porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento	24
5.8.	Análisis estadístico	24
5.9.	Propuesta de un criterio de calidad ambiental para paracetamol e ibuprofeno en cuerpos de agua superficiales.....	25
6.	Resultados	26
7.	Discusión	35
8.	Conclusiones	41
9.	Referencias	42

Índice de tablas

Tabla 1: Soluciones nutritivas para el cultivo de <i>Lemna minuta</i>	19
Tabla 2: Concentraciones [mg/L] de los fármacos utilizados en los bioensayos individuales.....	22
Tabla 3: Concentraciones [mg/L] para las mezclas binarias	22
Tabla 4: Valores de CI_{50} [mg/L] con sus intervalos de confianza al 95% para los fármacos evaluados y sus mezclas respecto al número y área de frondas.....	26
Tabla 5: Valores de CI_{50} [mg/L] estimada y experimental para CA respecto al número de frondas	32
Tabla 6: Valores de CI_{50} [mg/L] estimada y experimental para CA respecto al área de frondas.....	32
Tabla 7: Valores de CI_{50} [mg/L] para las mezclas de fármacos y los valores de PS para cada fármaco respecto al número de frondas.....	32
Tabla 8: Valores de CI_{50} [mg/L] para las mezclas de fármacos y los valores de PS para cada fármaco respecto al área de frondas.....	33

Índice de figuras

Figura 1: Estructura química del Paracetamol.....	6
Figura 2: Estructura química del Ibuprofeno	7
Figura 3: Cultivo de <i>Lemna minuta</i> en condiciones controladas.....	18
Figura 4: Colonias de <i>Lemna minuta</i> para bioensayos.	21
Figura 5: Relación entre el porcentaje de inhibición entre el número de frondas (azul), área de frondas (rojo) y las concentraciones de paracetamol (P)	27
Figura 6: Relación entre el porcentaje de inhibición entre el número de frondas (azul), área de frondas (rojo) y las concentraciones de ibuprofeno (I).....	27
Figura 7: Relación entre el porcentaje de inhibición del número de frondas (NF) frente a concentraciones de paracetamol (azul) e ibuprofeno (rojo)	28
Figura 8: Relación entre el porcentaje de inhibición del área de frondas (AF) frente a concentraciones de paracetamol (azul) e ibuprofeno (rojo).....	29
Figura 9: Comparación de las tasas de crecimiento por el número de frondas (NF) en <i>L. minuta</i> entre las concentraciones de paracetamol (P) y el control	30

Figura 10: Comparación de las tasas de crecimiento por el área de frondas (AF) en L. minuta entre las concentraciones de paracetamol (P) y el control	30
Figura 11: Comparación de las tasas de crecimiento por el número de frondas (NF) en L. minuta entre las concentraciones de ibuprofeno (I) y el control.....	31
Figura 12: Comparación de las tasas de crecimiento por el área de frondas (AF) en L. minuta entre las concentraciones de ibuprofeno (I) y el control	31
Figura 13: Relación entre el porcentaje de inhibición del número de frondas (NF) frente a concentraciones de mezclas binarias. Proporción 1:1 (rojo), 4:1 (azul) y 1:4 (verde).....	33
Figura 14: Relación entre el porcentaje de inhibición del área de frondas (AF) frente a concentraciones de mezclas binarias. Proporción 1:1 (rojo), 4:1 (azul) y 1:4 (verde).....	34

1. Introducción

Actualmente existe un alto interés por los contaminantes emergentes debido a que estos han sido detectados en diversos cuerpos de agua superficiales, aguas subterráneas e incluso en agua potable, entre los que se encuentran fármacos y productos de uso y cuidado personal, surfactantes, retardantes de fuego, aditivos industriales, esteroides y hormonas. Estos contaminantes, en la mayoría de los casos, corresponden a contaminantes no regulados debido a que se desconocen sus efectos y su presencia en el medio se da en bajas concentraciones (Becerril, 2009). Para la mayoría de estos contaminantes emergentes, la incidencia, la contribución de riesgo y los datos toxicológicos no están disponibles, por esto resulta difícil predecir qué efectos puedan tener en el medio ambiente (Grujic *et al.*, 2009).

1.1. Problemas de los contaminantes emergentes

- No se encuentran regulados en su vertido, ni se conocen las concentraciones que se podrían considerar permisibles.
- No se tiene registro de sus efectos sobre el medio ambiente o incluso sobre la salud humana.
- Su producción y consumo diario llevan a que se encuentren de forma habitual en los vertidos.
- Son difícilmente tratables por medios convencionales, superando los sistemas actualmente disponibles.

1.1.1 Efectos graves

- Carcinogénesis, debido a que muchos de los productos han demostrado intervenir en el incremento del desarrollo de diferentes tipos de cáncer.
- Toxicidad aguda y/o crónica, generando problemas neurológicos o de afección a órganos que pueden llegar a afectar a la supervivencia de ciertas especies más sensibles.
- Potencial de bioacumulación en el medio, favorecido además por una buena movilidad y una alta persistencia en el mismo.
- Disrupción endocrina, por medio de la capacidad que tienen algunos productos para interactuar con hormonas, generando diversos desequilibrios en el sistema endocrino de los seres vivos, lo que puede provocar disfunciones reproductivas, malformaciones, problemas tiroideos, entre otros.

1.2. PPCP como contaminantes

Tal vez más que con cualquier otra clase de contaminantes, la ocurrencia de los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP) en el medio ambiente posee una relación directa e inmediata entre las acciones, las actividades y los comportamientos de los ciudadanos y el medio en el que se desarrollan (Daughton, 2001). Estos productos constituyen un diverso arsenal de sustancias químicas, incluyendo medicamentos de venta libre y de prescripción para uso humano y veterinario (Wu *et al.*, 2015), los cuales pueden entrar en el ambiente por desechos humanos o animales después de la absorción incompleta y excreción del cuerpo o por las emisiones de residuos médicos, industriales, agrícolas o domésticos (Li, 2014; Michael *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2014). Estos proporcionan una potencial descarga al ambiente terminando en los cuerpos de agua superficiales debido a la eliminación incompleta por métodos convencionales de los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Ternes *et al.*, 2004).

Una característica de estos productos es que comúnmente provienen de mezclas industriales que contienen varios componentes bioactivos con diferentes estructuras químicas y formas de interacción, donde por diversas formas de degradación, como, por ejemplo, la fotodegradación o la hidrólisis, pueden dar origen a compuestos más tóxicos que los originales, produciendo dificultades para llevar a cabo evaluaciones de riesgos medioambientales (Geiger *et al.*, 2016). A pesar de que estos productos tienen una vida media relativamente corta, pueden asumir la calidad de contaminantes persistentes pues son continuamente introducidos en el ambiente por medio de efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Schnell *et al.*, 2009; Hohem *et al.*, 2011).

Algunos de los efectos de estos productos en el medio acuático son las alteraciones metabólicas, morfológicas y sexuales en las especies, inducción de resistencia a antibióticos en microorganismos patógenos e interrupción de actividades de biodegradación en plantas de tratamiento de aguas residuales (Geiger *et al.*, 2016).

En relación con el modo de acción de la mayoría de estos productos (principalmente farmacéuticos), estos son bien sabido en seres humanos y mamíferos, sin embargo, son desconocidos sobre los

organismos acuáticos. Los estudios actuales sobre los residuos de estos productos en los ecosistemas acuáticos indican que es probable un potencial riesgo en términos de toxicidad crónica (Fent *et al.*, 2006).

La toxicidad en los ecosistemas naturales no suele deberse a la exposición de una sola sustancia; sino al resultado de la exposición de una mezcla de varios agentes tóxicos, con potenciales efectos adversos en los organismos acuáticos. Sin embargo, muy pocos estudios han examinado los efectos de las mezclas, por lo que es necesario comprender el impacto y la toxicidad potencial de los contaminantes en combinación (Cleuvers, 2004; Cleuvers, 2005; Silva *et al.*, 2002).

1.3. Fármacos como contaminantes emergentes

En la actualidad, es común el conocimiento entre la comunidad científica de que los productos farmacéuticos están presentes no sólo en los efluentes del tratamiento de aguas residuales (Ferrari *et al.*, 2003; Metcalfe *et al.*, 2003) sino también en aguas superficiales (Jones *et al.*, 2002; Sanderson *et al.*, 2004; Roberts *et Thomas*, 2006), e incluso en agua potable (Benotti *et al.*, 2009; Boleda *et al.*, 2011; Bull *et al.*, 2011), en concentraciones que usualmente van desde los nanogramos por litro hasta los microgramos por litro (Pérez *et Barceló*, 2007).

En los últimos años, numerosos estudios han indicado que diversos fármacos de uso prolongado, como los antibióticos o los analgésicos, no sólo no se pueden descomponer por completo mediante el tratamiento de aguas residuales, sino que también producen cierta toxicidad biológica si entran en el medio ambiente. Otros estudios han reportado en las corrientes de aguas superficiales asiáticas concentraciones de fármacos provenientes de efluentes de instituciones médicas y de plantas de tratamiento de aguas residuales. Los contaminantes encontrados incluyeron antibióticos y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), estrógenos, antihipertensivos, hipoglucémicos y otros productos farmacéuticos comunes (Sung *et al.*, 2014).

Treinta millones de personas en todo el mundo consumen diariamente fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), por sus propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias, los que sirven para diversos tipos de tratamientos para el dolor, tanto agudo como crónico (He *et al.*, 2017). Algunos

estudios han determinado que estos fármacos son conocidos por inducir toxicidad en los organismos acuáticos (Hardman *et al.*, 2003). En un estudio realizado en Suiza se detectaron veintidós fármacos en agua potable cruda, con concentraciones de paracetamol, ciprofloxacina y sulfametoxazol igual o mayor que las concentraciones observables sin efecto, los que podrían presentar un riesgo de toxicidad (Morasch *et al.*, 2010). En otros estudios se detectaron productos farmacéuticos en aguas superficiales de Estados Unidos y Europa, originados por efluentes de aguas residuales humanas y escorrentías agrícolas (Daughton *et Ternes*, 1999).

El mecanismo de acción de los AINEs es través de la inhibición de las enzimas de la ciclooxigenasa (COX): COX-1 y COX-2, encargadas de la biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico, los que son mediadores celulares involucrados en diversos procesos homeostáticos en todo el cuerpo, y, entre otras cosas, responsables de la aparición del dolor y las inflamaciones (Parolini *et al.*, 2009; Cleuvers, 2003). Algunos xenobióticos, incluidos los AINE, pueden ser biotransformados al interactuar con un organismo no objetivo por el citocromo P450 en activos metabolitos que producen radicales de oxígeno a través del ciclo redox, induciendo un estrés oxidativo en los organismos (Parolini *et Binelli*, 2012). La importancia de los AINEs en el medio ambiente radica en sus propiedades inherentes de persistencia, naturaleza bioacumulativa, baja volatilidad y baja tendencia para la adsorción por la materia orgánica, lo que les permite permanecer en el ambiente acuático por altos períodos, favoreciendo su absorción y bioconcentración (Bendz *et al.*, 2005; Carlsson *et al.*, 2006).

Para la mayoría de los productos farmacéuticos, las concentraciones detectadas individuales de cada uno en el medio ambiente son por lo menos un orden de magnitud inferior a los niveles observados para ejercer un efecto (Geiger *et al.*, 2016; Láng *et Köhidai*, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que las mezclas de algunos fármacos exhiben toxicidades mucho más elevadas que las toxicidades previstas para las sustancias individuales (Cleuvers, 2003; Eguchi *et al.*, 2004), considerando que hay actualmente más de 4500 diferentes ingredientes activos en los productos farmacéuticos humanos (Sweetman, 2002), y que las composiciones de las mezclas varían dinámicamente, es que resulta muy complejo interpretar cualquiera de sus potenciales efectos (Brain *et al.*, 2004; Ågerstrand *et al.*, 2015).

1.3.1 Paracetamol

Un ejemplo de AINE es el paracetamol, llamado también acetaminofeno, siendo uno de los fármacos analgésicos y antipiréticos más populares y ampliamente utilizados para el tratamiento del dolor ligero o moderado. El efecto adverso más grave debido a la sobredosis crónica de paracetamol es la necrosis hepática pudiendo ser fatal. Este fármaco es también una excelente alternativa para el tratamiento de la fiebre, especialmente en el caso de la contraindicación con otros AINEs, como la aspirina, pues no posee efectos colaterales gastrointestinales, síntomas renales, ni trastornos hemorrágicos (Skoglund, 2003).

Se cree que el paracetamol aumenta el umbral del dolor inhibiendo las ciclooxigenasas en el sistema nervioso central por medio de sus efectos antipiréticos, los que bloquean el pirógeno endógeno en el centro hipotalámico encargado de regular la temperatura, de esta manera el calor es disipado por vasodilatación, lo que aumenta el flujo sanguíneo periférico y la sudoración. Sin embargo, el paracetamol no inhibe las ciclooxigenasas en los tejidos periféricos, razón por la cual carece de actividad antiinflamatoria (Graham *et al.*, 2013).

El estudio de Huber *et al.* (2009) mostró que el paracetamol en las plantas podría someterse a una vía metabólica oxidativa, similar a la descrita para los mamíferos, y con la implicación de una fase de activación, probablemente mediada por el citocromo P450 que da lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno. An *et al.* (2009) observaron la inhibición del crecimiento de las plántulas de trigo *Triticum aestivum*, acompañada de cambios en los pigmentos fotosintéticos y fracciones de proteínas solubles, así como el daño del sistema de defensa antioxidante, al igual que Kummerová *et al.* (2015) en las plantas lentejas de agua expuestas a paracetamol. En peces la exposición a este fármaco ha llevado a la muerte, daño hepático y a un desarrollo embrionario anormal (David *et al.*, 2009; Weigt *et al.*, 2010).

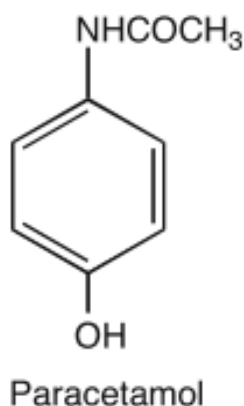


Figura 1: Estructura química del Paracetamol (Graham *et al.*, 2013).

Concentraciones reportadas de paracetamol:

- 14 - 1600 ng/L en las corrientes de China (Lin *et al.*, 2009).
- 12 - 777 ng/L en aguas superficiales (Pal *et al.*, 2010).
- 1,9 µg/L en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales en Canadá.
- 6,0 µg /L en efluentes de aguas residuales (Jones *et al.*, 2001).

1.3.2 Ibuprofeno

Otro ejemplo de AINE es el ibuprofeno, que es utilizado frecuentemente para el alivio sintomático del dolor de cabeza (cefalea), dolor dental, dolor muscular (mialgia), molestias de la menstruación (dismenorrea), síndrome febril y dolor postquirúrgico (Carabaño *et al.*, 2005). También se usa para tratar cuadros inflamatorios, como los que se presentan en artritis de tipo reumatoide y gotosa (Hardman *et al.*, 1996).

El mecanismo de acción de este fármaco es inhibir la vía de la ciclooxigenasa (COX), que es una de las tres vías principales involucradas en la biosíntesis de eicosanoides. A nivel molecular el ibuprofeno inhibe la actividad enzimática de COX a través de la competencia con su sustrato, ácido araquidónico, para los sitios catalíticos de COX (McGettigan *et al.*, 2000). Entre los efectos secundarios más importantes están los trastornos gastrointestinales y cardiovasculares (Manrique *et al.*, 2007).

Posee una movilidad relativamente alta en los ambientes acuáticos, pero una baja persistencia en el medio (Buser *et al.*, 1999). El ibuprofeno tiene el potencial de impactar negativamente el fitoplancton

en compartimentos acuáticos (Geiger *et al.*, 2016). Islas-Flores *et al.* (2017) reportaron que este fármaco afecta significativamente el crecimiento de varias especies bacterianas y fúngicas. Se reportó que la exposición a este fármaco inhibe el crecimiento del molusco *Planorbis carinatus*, reduce la capacidad reproductiva del crustáceo *Daphnia magna* y causa un comportamiento anormal en la especie *Gammarus pulex*. Por otra parte, las concentraciones de ibuprofeno en el agua de más de 100 mg/L han reportado ser fatales para los peces *Oryzias latipes* (Sanderson *et al.*, 2003; Pounds *et al.*, 2008).

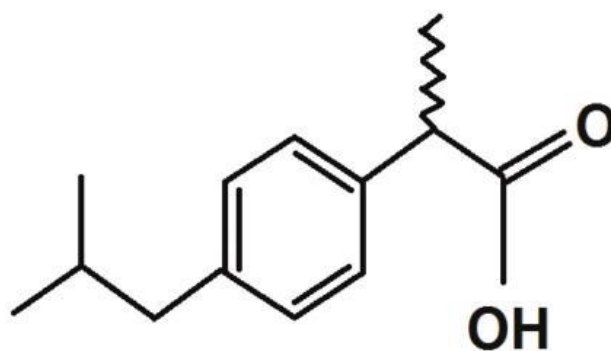


Figura 2: Estructura química del Ibuprofeno (Bushra *et al.*, 2010).

Concentraciones reportadas de ibuprofeno:

- 313 - 3777 ng/L en las corrientes taiwanesas (Lin *et al.*, 2008).
- 134 - 7100 ng/L en efluentes de plantas de tratamiento (Pal *et al.*, 2010).
- 14 - 44 ng/L en aguas superficiales (Pal *et al.*, 2010).

1.4. Tipos de interacciones químicas entre sustancias químicas

El término interacción incluye todas las formas de acción conjunta que se desvían por encima de los conceptos aditivos. Por lo tanto, el efecto combinado de dos o más sustancias puede ser mayor (sinérgico, potenciado, supra-aditivo) o menor (antagonista, inhibidor, sub-aditivo, infra-aditivo) que el previsto sobre la base de la adición de la dosis o de la respuesta combinada (Bialk-Bielińska *et al.*, 2017).

El efecto aditivo es producido cuando el efecto final de los componentes es igual a la suma de los efectos individuales que aparecen cuando se administran separadamente. Se presenta un efecto

sinérgico cuando el efecto de dos agentes combinados es mucho mayor que el efecto producido por la suma de los efectos individuales cuando se administran separadamente. El antagonismo ocurre cuando el efecto combinado de la mezcla es menor que el efecto aditivo total de los componentes individuales (ATSDR, 2004; USEPA, 2007; EFSA, 2008).

1.5. Modelos de interacción

1.5.1 Concentración Adición

Este modelo propuesto por Anderson *et Weber* (1975) asume que los efectos pueden ser estimados directamente a partir de la suma de las dosis o concentraciones de sustancias en una mezcla (Otitoloju, 2002). Esto implica que todos los compuestos contribuyen a la toxicidad total de la mezcla en proporción directa a su concentración en la mezcla y su efecto individual (Cleuvers, 2003; Kortenkamp *et al.*, 2009). Este modelo se basa en los conceptos farmacológicos del sitio de unión del ligando, la afinidad, la toxicidad individual y la ocupación del receptor, donde la ocupación del receptor es proporcional a la concentración del ligando y su afinidad por el receptor. Así, la magnitud de la respuesta biológica de la mezcla química puede ser pronosticada al sumar las dosis de los componentes (JRC, 2014).

Marcos internacionales y científicos han apoyado el uso de este método como un primer acercamiento a la evaluación del riesgo a las interacciones en mezclas binarias, independientemente del modo de acción similar o diferente de los componentes (JRC, 2015; Backhaus, 2016; Evans *et al.*, 2016), debido a que ha demostrado validez para predecir los efectos combinados de los productos químicos sobre los productores primarios acuáticos (Altenburger *et al.*, 2000; Backhaus *et al.*, 2000; Faust *et al.*, 2001).

El valor de CI_{50} estimado se obtiene sumando los valores de CI_{50} de los fármacos obtenidos experimentalmente de forma individual según su contribución en la mezcla de acuerdo con las proporciones probadas, luego el valor de CI_{50} estimado se divide por el valor CI_{50} obtenido experimentalmente de la mezcla binaria.

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

Donde:

CA = 1 indica que el efecto es aditivo

CA > 1 que hay sinergia

CA < 1 que hay antagonismo

1.5.2 Proporción Sinergia

Es importante evaluar si ambos componentes de una mezcla binaria contribuyen significativamente a la toxicidad general o si el efecto de la mezcla total está dominado por un solo componente, para esto se estima la contribución de cada sustancia activa a la toxicidad total de la mezcla mediante el método de proporción sinergia (Hewlett *et* Plackett, 1969).

La proporción de cada componente en la mezcla se calcula mediante la división del CI₅₀ de cada sustancia de manera individual por el valor de CI₅₀ obtenido experimentalmente de la mezcla evaluada.

$$PS = \frac{CI_{50} \text{ del elemento químico actuando individualmente}}{CI_{50} \text{ de la mezcla}}$$

Donde:

PS = 1 indica aditividad

PS > 1 indica sinergia

PS < 1 antagonismo

1.6. Macrófitas y la contaminación acuática

Los organismos autótrofos, como por ejemplo el fitoplancton y las macrófitas, representan una proporción significativa de la biomasa total en los ambientes acuáticos, y proporcionan una importante fuente de carbono para el ecosistema (Brain *et al.*, 2004).

Las macrófitas, como las lentejas de agua, pueden funcionar como un regulador de temperatura en los ambientes acuáticos, lo que proporciona una función vital dentro de su ecosistema ya que sirve para inhibir la formación de cianobacterias. Estas plantas se caracterizan por flotar libremente sobre la superficie del agua y se componen de estructuras similares a las hojas llamadas frondas. Prosperan en ambientes de agua dulce estancadas o de corriente lenta. Se reproducen por vía vegetativa a partir de yemas que nacen desde cavidades laterales ubicadas en la región basal de la fronda, las cuales

permanecen unidas a la fronda progenitora hasta alcanzar el tamaño suficiente, formándose así grupos clonales de la planta. Presentan un crecimiento más rápido en comparación con otras plantas fanerógamas y poseen un rol fundamental en los ecosistemas acuáticos como productoras de oxígeno, en los ciclos biogeoquímicos, en el control de la calidad del agua, en el reciclaje de nutrientes gracias a su gran capacidad de absorción, en ser un soporte físico para una variedad de organismos y en proveer de hábitats para la vida acuática, principalmente para peces (Lewis, 1995).

Una especie de macrófita que habita en Chile es la lenteja de agua *Lemna minuta* conocida también como *Lemna minuscula*. Esta especie corresponde a la más pequeña dentro del género *Lemna*, midiendo no más de 2,5 mm de largo. Esta macrófita posee una amplia distribución geográfica a lo largo del continente americano, presente en ambientes dulceacuícolas en zonas templadas, tropicales y subtropicales, confundándose fácilmente con *Lemna valdiviana* (Landolt, 1998). Esta planta es distribuida fácilmente por las aves, por lo que existe la posibilidad de su introducción ocasional en los cuerpos de agua de diferentes territorios. Estas plantas se caracterizan por permanecer en colonias de dos a cinco frondas de un solo nervio con textura de superficie translúcida uniforme presentando una forma elíptica-orbicular (Mazzeo, 1993).

Considerando las plantas acuáticas como uno de los principales productores primarios en el ecosistema acuático, la penetración de la toxicidad de los productos farmacéuticos sobre estas especies puede ser tomada como un punto importante para abordar el problema de la contaminación por ciertas sustancias químicas, ya que cualquier impacto negativo sobre estos organismos puede traer graves consecuencias, provocando una alteración en la diversidad y funcionalidad de los ecosistemas acuáticos (Xin *et al.*, 2017).

Ciertos estudios sugieren que la exposición a las concentraciones ambientalmente relevantes de los diversos fármacos como el paracetamol e ibuprofeno afecta los procesos bioquímicos de las plantas lenteja de agua, provocando la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y cambios en los sistemas antioxidantes (Kummerová *et al.*, 2015).

1.6.1 Mecanismos de defensa en macrófitas

Estas plantas acuáticas poseen diversos sistemas de defensa frente a toxinas, como por ejemplo el sistema de estrés antioxidativo donde participan antioxidantes solubles y ciertas enzimas que sirven

para reducir los efectos adversos que podrían afectar al organismo (Mizoi *et al.*, 2012; Lira-Saldivar *et al.*, 2016). El estrés oxidativo se provoca cuando la producción de especies reactivas del oxígeno excede la capacidad de las defensas antioxidantes de las células para eliminar estas especies tóxicas (Limón-Pacheco *et Gonsebatt*, 2009). Las plantas continuamente producen estas especies reactivas en diferentes organelos celulares como: mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, retículo endoplásmico y en la membrana plasmática (Karuppanapandian *et al.*, 2011).

Las consecuencias principales del estrés oxidativo son el daño a los componentes celulares y su bioacumulación, lo que lleva a la pérdida de la funcionalidad celular y la muerte eventual del organismo (Foyer *et Noctor*, 2011). Este sistema se ha reportado como un mecanismo de defensa frente a las sustancias tóxicas en organismos acuáticos expuestos a la contaminación (Alaerts *et al.*, 1996; Arora *et al.*, 2002; Barrera, 2015).

1.7. Evaluación de la calidad ambiental en cuerpos de agua

La preocupación por la contaminación acuática surge como consecuencia de los vertidos de efluentes industriales y urbanos, y contaminantes de origen agrícola que tienen como receptores los cauces naturales. Este hecho ha propiciado un auge en el desarrollo de metodologías para valorar los niveles de exposición a compuestos químicos, llegando incluso a establecerse límites permitidos de sus concentraciones tanto en agua como en sedimentos (Valenzuela, 2013).

Por otra parte, la cantidad y diversidad de sustancias que pueden llegar a los sistemas acuáticos son muy numerosas, además de la complejidad que alcanzan los medios acuáticos por su propia dinámica, por las sustancias que contienen y sus interacciones; hacen más complejas las evaluaciones del estado y calidad de los cuerpos de agua superficiales (Bro-Rasmussen *et al.*, 1994).

En Chile existen normas de emisión y de calidad presentes en el cuerpo legal, tales como:

- D.S. N°90/00. Establece Norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales.
- D.S. N°46/02. Establece Norma de emisión de residuos líquidos a aguas subterráneas.

- Norma chilena oficial 1333 modificada en 1987. Requisitos de calidad del agua para diferentes usos.
- D.S. N°143/09. Establece Normas de calidad primaria para las aguas continentales superficiales aptas para actividades de recreación con contacto directo.
- D.S. N°609/98. Establece Norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos industriales líquidos a sistemas de alcantarillado.
- D.S. N°9/15 Establece Normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales de la cuenca del río Biobío.
- D.S. N°53/13 Establece Normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales de la cuenca del río Maipo.
- D.S. N°19/13 Establece Normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales del lago Villarrica.
- D.S. N°122/09 Establece Normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas del lago Llanquihue.
- D.S. N°75/09 Establece Normas secundarias de calidad ambiental para la protección de las aguas continentales superficiales de la cuenca del río Serrano.

Todos estos instrumentos legales y normativas destinadas a la protección de los ecosistemas acuáticos consideran las concentraciones de los contaminantes de forma individual que sean ecológicamente seguras, sin considerar las interacciones que puedan presentar diversos productos químicos en mezclas complejas en los cuerpos de agua superficiales.

Este año el Centro Común de Investigación de la Comisión Europea (JRC, Joint Research Centre) ha estado trabajando con cinco consorcios de investigación para producir un documento que identifique las necesidades de investigación y políticas para hacer frente a la evaluación y gestión de los riesgos potenciales por las mezclas químicas para la salud humana y el medio ambiente. Para esto se realizó el evento "Avances en la Evaluación de Mezclas Químicas y sus Riesgos para la Salud Humana y el Medio ambiente" (Advancing the Assessment of Chemical Mixtures and their Risks for Human Health and the Environment) generado en mayo de 2018, lo que reunió a la comunidad de investigación con los servicios de la comisión y las agencias de la Unión Europea para evaluar el avance actual de la ciencia,

coordinar las estrategias de investigación con las necesidades políticas, y así priorizar la colaboración en el ámbito de la ciencia y política (JRC, 2018).

1.8. Métodos biológicos para la evaluación de la calidad de aguas

Estos métodos permiten determinar la toxicidad de agentes físicos y químicos sobre un organismo de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Sus efectos estarán condicionados por las características del efluente o toxico empleado, así como de la concentración y tiempo de exposición, teniendo como resultado en una exposición aguda la muerte del individuo y en una exposición crónica efectos subletales como, por ejemplo, alteraciones bioquímicas, cambios a nivel morfológico y fisiológico, efectos en el crecimiento, cambios en su tasa de reproducción, entre otros (Valenzuela, 2013).

1.8.1 Bioensayos de toxicidad

El bioensayo corresponde una herramienta que permite la medición experimental de cualquier perturbación de un sistema biológico causado por un agente químico o físico, y que tiene como objetivo la cuantificación de la relación concentración-efecto y/o dosis-efecto de una sustancia contaminante que provoque un efecto adverso sobre el sistema biológico determinado bajo condiciones controladas de terreno o laboratorio. Proporciona una herramienta simple, rápida, rentable, sensible y representativa de los potenciales riesgos tóxicos sobre un organismo, con una aplicación práctica que sirve para supervisar la calidad de los cuerpos de aguas superficiales. Los efectos observados en los organismos de prueba presentan valores de toxicidad que pueden ser expresados como la concentración del tóxico en el agua. Los resultados obtenidos sirven para determinar el umbral que puede soportar el sistema evaluado ante algún tipo de contaminación, los cuales servirán como guía para la toma de decisiones de las entidades reguladoras, además de informar y alertar sobre los riesgos y la degradación del medio ambiente, para de esta manera garantizar una correcta evaluación hacia la salud ambiental y humana (Valenzuela, 2013).

Dentro de la normativa chilena se han incorporado los siguientes bioensayos:

- Estimación de la toxicidad en aguas residuales de origen industrial (riles) mediante el bioensayo de inhibición en el crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis* (Nch 2313/26. Of1999).

- Determinación de la calidad del agua mediante el cálculo de la inhibición en la movilidad en el microcrustáceo de agua dulce *Daphnia magna* y *Daphnia pulex*. (Nch 2083/1999).
- Determinación de la calidad del agua mediante la inhibición de crecimiento en la microalga *Selenastrum capricornutum* (*Raphidocelis subcapitata*) (Nch 2706/2002).

Utilización de plantas acuáticas en bioensayos de toxicidad

Actualmente organismos oficiales de protección ambiental, tanto europeos como americanos, sugieren el uso de plantas vasculares acuáticas pertenecientes al género *Lemna* en la aplicación de protocolos estandarizados de ensayos para la evaluación de efectos fitotóxicos de compuestos puros y de muestras ambientales complejas, con la finalidad de proporcionar criterios representativos e integrativos de las condiciones de exposición en los medios acuáticos, además de su uso en la certificación y registro de nuevas sustancias (OECD, 2006; USEPA, 2012). Esto debido a la amplia variedad de ambientes acuáticos en el que este tipo de plantas puede desarrollarse, su fácil manejo, sus rápidas tasas de crecimiento, su alto grado de homogeneidad de tal manera que la mayoría de los clones son morfológicamente similares y su gran sensibilidad a sustancias tensoactivas y compuestos hidrofóbicos (Drost *et al.*, 2007).

Considerando que las plantas acuáticas han demostrado ser capaces de absorber y metabolizar cantidades considerables de productos farmacéuticos (Li *et al.*, 2012; Matamoros *et al.*, 2012); las pruebas de inhibición del crecimiento en las macrófitas del género *Lemna* servirían como fuente de información sobre la fitotoxicidad para otro tipo de productores primarios, siendo una de las especies más sensibles en este tipo de pruebas (Lewis, 1995; Cleuvers, 2003; Nunes *et al.*, 2014; Kummerová *et al.*, 2015).

Dentro de los fármacos más utilizados en Chile se encuentran el paracetamol y el ibuprofeno (Henríquez *et Sancha*, 2012), por lo que se presume pudiesen encontrarse presentes en los cuerpos de agua superficiales del país, lo que podría potenciar un riesgo tóxico a los productores primarios del ecosistema acuático. Se desconocen los efectos que pueda haber sobre la especie de flora acuática de agua dulce *Lemna minuta* en relación con las diferentes concentraciones de los fármacos paracetamol

e ibuprofeno de manera individual como también en mezcla. Por esto, es por lo que es necesario establecer datos toxicológicos que reflejen sus posibles riesgos sobre el medio ambiente, y así promover una correcta gestión sobre los diferentes tipos de contaminantes emergentes en función de los productores primarios de los ecosistemas acuáticos de agua dulce en el país.

Para este estudio se realizaron bioensayos de toxicidad crónica con la lenteja de agua *Lemna minuta*, con una exposición a una serie de concentraciones de los fármacos paracetamol e ibuprofeno de forma individual y en diferentes proporciones en mezclas binarias, para determinar la concentración inhibitoria del 50 % de la población (CI_{50}) y la concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC), por medio de la evaluación de los puntos finales del número y área de frondas en función de la inhibición del crecimiento en condiciones controladas de laboratorio, con el fin de determinar la toxicidad de estas sustancias químicas y sus formas de interacción en las mezclas propuestas.

2. Formulación del problema

En general la información ecotoxicológica sobre los contaminantes emergentes es escasa en nuestro país, por lo que no se puede estimar el riesgo ambiental que implican estos agentes químicos en los ecosistemas acuáticos. Dentro de los organismos que pueden ser afectados están los productores primarios los cuales son clave en las cadenas tróficas en estos ecosistemas, tomando en cuenta que cualquier efecto sobre ellos afectará los niveles tróficos superiores (Saçan *et al.*, 2006; Yamagishi *et al.*, 2017).

Los fármacos como el paracetamol y el ibuprofeno están entre los más utilizados en Chile. Los sistemas de tratamiento de aguas residuales no contemplan este tipo de compuestos químicos en su remoción, en consecuencia, son descargados a los ecosistemas acuáticos. Por lo tanto, uno de los aspectos que se deberían mejorar en el proceso de evaluación del estado y calidad de los cuerpos de agua superficiales es la necesidad de la evaluación de la toxicidad de mezclas de ingredientes farmacéuticos activos (Ågerstrand *et al.*, 2015; Backhaus, 2016; Tobillo *et al.*, 2007). Los efectos tóxicos de estos productos farmacéuticos son poco conocidos en los productores primarios como las macrófitas, las que son la base de las tramas tróficas dulceacuícolas. Esto resulta en un potencial riesgo hacia los diferentes sistemas bióticos presentes que están continuamente recibiendo cargas de estos contaminantes. Por otra parte, estos fármacos se encuentran en mezclas en el medio, por lo que podrían existir diversas interacciones entre ellos, modificando su toxicidad individual a potenciales efectos tóxicos mayores que los estimados.

De esta forma este estudio busca establecer los efectos toxicológicos de estos fármacos sobre los productores primarios en ecosistemas acuáticos de agua dulce, lo que permitirá disponer de información relevante para la determinación del riesgo ambiental que podrían presentar, además de establecer criterios de calidad ambiental base en la determinación de estándares y normas ambientales secundarias para la protección del correcto funcionamiento de los ecosistemas acuáticos.

3. Hipótesis

Las mezclas binarias de paracetamol e ibuprofeno modifican la toxicidad individual de estos compuestos sobre la especie *Lemna minuta*.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- Evaluar la toxicidad de paracetamol e ibuprofeno sobre la macrófita *Lemna minuta*, como base para la propuesta de un criterio de calidad en aguas superficiales.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar la toxicidad individual y en mezclas binarias de paracetamol e ibuprofeno sobre la macrófita *Lemna minuta*.
- Determinar el tipo de interacción entre los agentes químicos en mezclas binarias.
- Proponer un criterio de calidad ambiental para el paracetamol y el ibuprofeno en ecosistemas acuáticos de agua dulce.

5. Materiales y métodos

5.1. Metodología utilizada

Se utilizó la metodología sobre efectos ecológicos “OCSP 850.4400: Prueba de toxicidad de plantas acuáticas utilizando *Lemna spp.*” (USEPA, 2012) y “Directrices para la prueba de productos químicos, *Lemna sp.* Prueba de inhibición del crecimiento” (OECD, 2006).

5.2. Condiciones de cultivo *in vitro*

Los individuos de *Lemna minuta* se recolectaron en la Laguna Sausalito, en la ciudad de Viña del Mar, Región de Valparaíso. Las plantas en el laboratorio se mantuvieron en envases con el mismo medio de origen durante una semana para luego cambiarlas al medio de cultivo preparado en condiciones controladas de laboratorio (Fig. 3), tales como una iluminación fluorescente blanca continua para proporcionar una intensidad de luz del rango de 6500-10000 lux, una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y un pH de $7,5 \pm 0,1$ en el medio de cultivo, el cual se ajustó con soluciones de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) a concentraciones $\leq 1\text{M}$ cuando no estuvo dentro del rango establecido.



Figura 3: Cultivo de *Lemna minuta* en condiciones controladas.

El medio de cultivo corresponde a una preparación salina, el cual provee de nutrientes necesarios para el crecimiento óptimo de las colonias de *L. minuta*. El medio de cultivo se preparó a partir de cinco soluciones salinas mezcladas y diluidas en 1 L de agua destilada, proporcionando esta mezcla para la mantención de las colonias como para la exposición al tóxico (Tabla 1).

El medio nutritivo se cambió tres veces por semana para evitar efectos alelopáticos que puedan provocar la aparición de microalgas, eutrofización y/o ataque bacteriano. Los envases fueron cubiertos para reducir la pérdida de agua. Con esto se busca lograr que los individuos alcancen un crecimiento sostenido en el tiempo libre de factores estresores y contaminantes para ser utilizados en los bioensayos luego de una semana.

Tabla 1: Soluciones nutritivas para el cultivo de *Lemna minuta* según medio de Steinberg, modificado por Altenburger (ISO 20079, 2005).

Macronutrientes	mg/L
KNO ₃	350
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	295
KH ₂ PO ₄	90
K ₂ HPO ₄	12,6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100
Micronutrientes	µg/L
H ₃ BO ₃	120
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	180
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	44
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180
FeCl ₃ ·6H ₂ O	760
EDTA Disodium-dihidratado	15000

5.3. Preparación de soluciones problema

Para la preparación de las soluciones problemas se realizaron las soluciones madres de 1 L de cada fármaco con el máximo de dilución, siendo para el paracetamol de 100 mg/L y 75 mg/L para el ibuprofeno. Debido a la baja solubilidad en agua de los fármacos, estos fueron previamente disueltos en acetona para luego preparar las soluciones. El disolvente no excedió el 1,5% de la solución madre según la metodología sobre efectos ecológicos "OCSPP 850.4400: Prueba de toxicidad de plantas acuáticas utilizando *Lemna spp.*" (USEPA, 2012).

5.4. Prueba de determinación de rangos

Para establecer las concentraciones de las soluciones de prueba donde es probable que se produzcan los efectos previstos, los organismos de prueba fueron expuestos a una serie de concentraciones ampliamente espaciadas de la sustancia de ensayo (0,1; 1,0; 10 y 100 mg/L para el paracetamol y 0,1; 1,0; 10; y 75 mg/L para el ibuprofeno). Se consideró un número de tres réplicas para los controles y para las pruebas de tratamiento.

La cantidad de volumen de cada solución problema a utilizar, y así determinar la cantidad de volumen de dilución para cada prueba, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$V_i * C_i = V_f * C_f$$

Donde:

V_i = Volumen inicial de la solución problema.

C_i = Concentración inicial la solución problema.

V_f = Volumen final.

C_f = Concentración final del fármaco.

Se realizaron las diluciones nominales para cada grupo de tratamiento por medio de la dilución de las soluciones problema disolviéndolas con una fracción del medio de cultivo y agua destilada, y para los controles se utilizó agua destilada y el mismo volumen del medio de cultivo que en los tratamientos. El volumen final de preparación por cada recipiente de exposición fue de 100 mL. En cada tratamiento se

usaron cuatro plantas de tres frondas cada una (Fig. 4), posterior a un baño con agua destilada para remover impurezas. Para determinar las condiciones óptimas del crecimiento de las colonias, se seleccionaron las plantas más verdes y sanas entre siete y doce días de edad en el medio de cultivo, sin evidentes rasgos de división vegetativa para evitar una mala estimación del crecimiento, teniendo cuidado de asegurarse de que las frondas contabilizadas fueran claramente visibles. Las plantas fueron distribuidas aleatoriamente entre los recipientes de ensayo de tal manera que los resultados de la prueba no mostraran sesgos significativos de las distribuciones, de esta forma los recipientes fueron dispuestos al azar y se reposicionaron diariamente.



Figura 4: Colonias de *Lemna minuta* para bioensayos.

5.5. Diseño experimental

5.5.1 Bioensayos individuales

Estos consistieron en determinar la curva de concentración-respuesta para la inhibición del crecimiento en porcentaje, y así el valor de la concentración media de inhibición (CI_{50}) con un intervalo de confianza del 95%.

Por medio de la prueba de detección de rangos se determinó que el mayor porcentaje de inhibición se encontró en el rango de 10 - 100 mg/L para el paracetamol y de 1 - 10 mg/L para el ibuprofeno, por lo que se trabajó dentro de estos límites de concentración.

Se utilizó una serie de cinco concentraciones de prueba para cada fármaco, dispuestas en una serie geométrica con los rangos establecidos con mayor porcentaje de inhibición, para determinar las toxicidades individuales de cada fármaco (Tabla 2).

Tabla 2: Concentraciones [mg/L] de los fármacos utilizados en los bioensayos individuales.

Fármacos	Serie de Concentraciones					
Paracetamol	10	25	50	75	100	Control
Ibuprofeno	1	2,5	5	7,5	10	Control

5.5.2 Bioensayos de mezclas binarias

Para estos bioensayos se realizaron las mezclas binarias en proporciones de 4:1, 1:4 y 1:1 con relación al paracetamol con el ibuprofeno, y se utilizaron las concentraciones para cada mezcla referidas en la tabla 3.

Tabla 3: Concentraciones [mg/L] para las mezclas binarias.

Proporción Paracetamol:Ibuprofeno	Serie de Concentraciones					
4:1	1	10	25	50	75	Control
1:1	1	10	25	50	75	Control
1:4	10	14	18	22	25	Control

Se determinaron las curvas de concentración-respuesta para cada mezcla, y así el valor de la concentración media de inhibición (CI_{50}) con un intervalo de confianza del 95%.

Luego de calcular las toxicidades de las mezclas binarias se realizó la estimación de las interacciones entre sus componentes por medio del método de concentración adición (Anderson *et* Weber, 1975) y proporción sinergia (Hewlett *et* Plackett, 1969).

5.6. Mediciones y determinaciones analíticas

Durante las pruebas se realizaron registros de los cambios en el desarrollo de las plantas en cada recipiente de ensayo, respecto al tamaño, número y apariencia de las frondas, indicación de necrosis, clorosis, ruptura de colonias, pérdida de flotabilidad, longitud y apariencia de la raíz. Teniendo en cuenta también ciertas características significativas, como, por ejemplo, la presencia de material no disuelto y crecimiento de microalgas en los recipientes de prueba.

5.6.1 Número de frondas

Se contabilizó el número de frondas al inicio y al final de la exposición para luego calcular la tasa de crecimiento para cada control y concentración.

5.6.2 Área de las frondas

El área de las frondas se determinó para cada prueba y control en el comienzo y al final de la exposición con el programa "ImageJ-" por medio de las fotografías tomadas, y así estimar el aumento o disminución del área en cada planta.

5.7. Evaluación de los puntos finales

5.7.1 Tasa media de crecimiento específico

Esta variable de respuesta se calculó en base de los logaritmos de los puntos finales (número y área de la fronda) al inicio y final de la exposición, con el tiempo (expresado por día) en los controles y cada grupo de tratamiento mediante la siguiente fórmula:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

Donde:

- μ_{i-j} : Tasa media de crecimiento específico del tiempo *i* al *j*

- Ni: Variable de medida en la prueba o control en el momento i
- Nj: Variable de medida en la prueba o control en el momento j
- t: Período de tiempo de i a j
- i: Primer día del ensayo.
- j: Último día del ensayo.

5.7.2 Porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento

Se calculó el porcentaje de inhibición para cada concentración de prueba con respecto al control de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Ir\% = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} * 100$$

Donde:

- Ir%: Inhibición porcentual de la tasa media de crecimiento específico
- μC : Valor medio para μ en el control
- μT : Valor medio para μ en el grupo de tratamiento

5.8. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de regresión lineal simple para obtener una relación cuantitativa de la concentración-respuesta mediante los resultados experimentales. Los valores de Cl_{50} en cada uno de los bioensayos se calculó mediante una interpolación lineal.

Se determinaron también los intervalos de confianza para cada grupo de tratamiento respecto a la respuesta observada. Por otro lado, se determinó la correlación entre los dos puntos finales medidos en los bioensayos para establecer su grado de relevancia.

Para la estimación del LOEC se compararon los medios de tratamiento con el control, utilizando técnicas de análisis de varianza (ANOVA) provisto con el método Tukey mediante el software Minitab 18.

5.9. Propuesta de un criterio de calidad ambiental para paracetamol e ibuprofeno en cuerpos de agua superficiales

Para poder determinar un criterio de calidad para paracetamol e ibuprofeno en los cuerpos de agua superficiales se tomó como referencia la concentración más baja a la cual se encontraron diferencias significativas (LOEC) entre las tasas de crecimiento de los grupos de tratamiento con el control. Se propuso tomar como referencia el 10% de este valor, aplicando así el factor de incertidumbre correspondiente cuando se usa LOEC en vez de NOEC (concentración a la cual no se observa efecto) para crear un margen entre la concentración permitida y la concentración mínima en la cual ocurren cambios significativos en la tasa de crecimiento de los individuos, y así poder evitar las situaciones de riesgo ambiental (Bruce *et* Versteeg, 1992).

6. Resultados

En la tabla 4 se muestran los valores de Cl_{50} para los fármacos evaluados de manera individual y en mezclas binarias. Se observó que el ibuprofeno es diez veces más tóxico que el paracetamol y que la mezcla que presenta mayor toxicidad fue la que tenía mayor concentración de ibuprofeno.

Tabla 4: Valores de Cl_{50} [mg/L] con sus intervalos de confianza al 95% para los fármacos evaluados y sus mezclas respecto al número y área de frondas.

Fármacos evaluados y sus mezclas	Cl_{50} del número de frondas	Cl_{50} del área de frondas
Paracetamol (P)	90,5 (86,4-94,7)	76,5 (72,5-80,6)
Ibuprofeno (I)	8 (7,6-8,4)	5,9 (5-6,8)
1:1	34,2 (29,7-38,7)	26,7 (20,3-33,1)
1:4 (P:I)	23,2 (17,4-29)	20,3 (14,5-26,1)
4:1 (P:I)	58,9 (54,9-62,9)	55,7 (51-60,3)

El comportamiento de las colonias de *Lemna minuta* demostró una relación directa entre la inhibición del crecimiento en función con las concentraciones expuestas de los fármacos, de manera individual (Fig. 5 y 6) y en mezclas binarias (Fig. 13 y 14), de modo que al aumentar la concentración aumentaba también la inhibición del crecimiento.

Las figuras 5 y 6 muestran las regresiones entre las concentraciones de paracetamol e ibuprofeno y las variables de respuesta evaluadas, donde se observó que el área de las frondas fue la respuesta más sensible a las concentraciones de los fármacos.

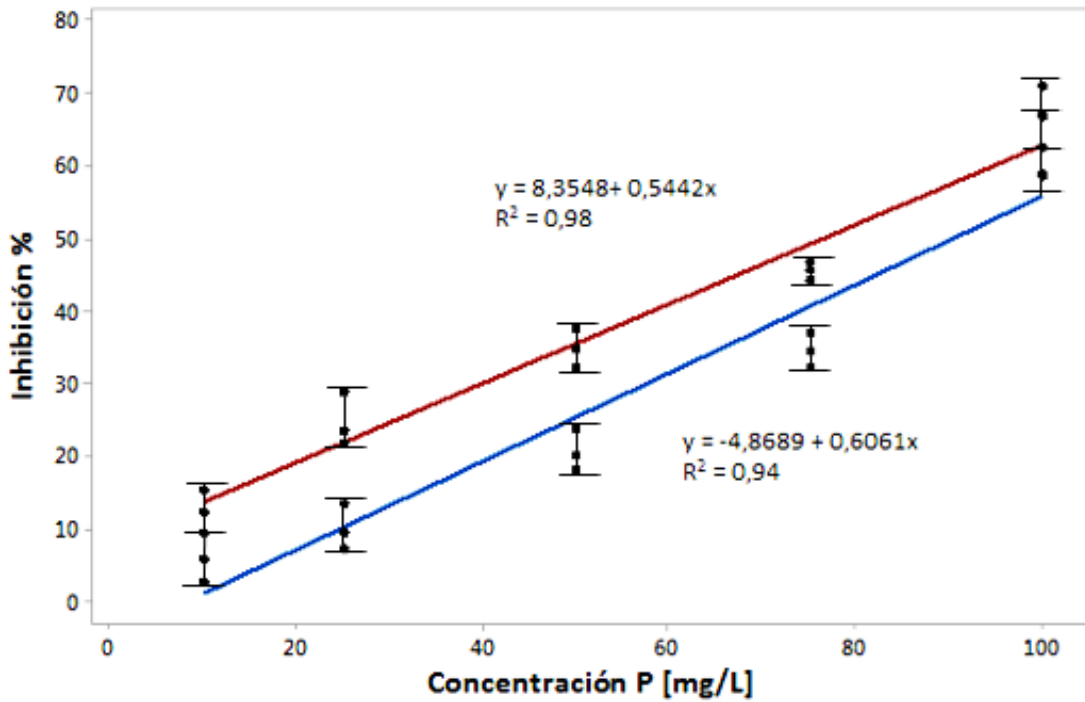


Figura 5: Relación entre el porcentaje de inhibición entre el número de frondas (azul), área de frondas (rojo) y las concentraciones de paracetamol (P). Regresión simple ($p < 0,05$).

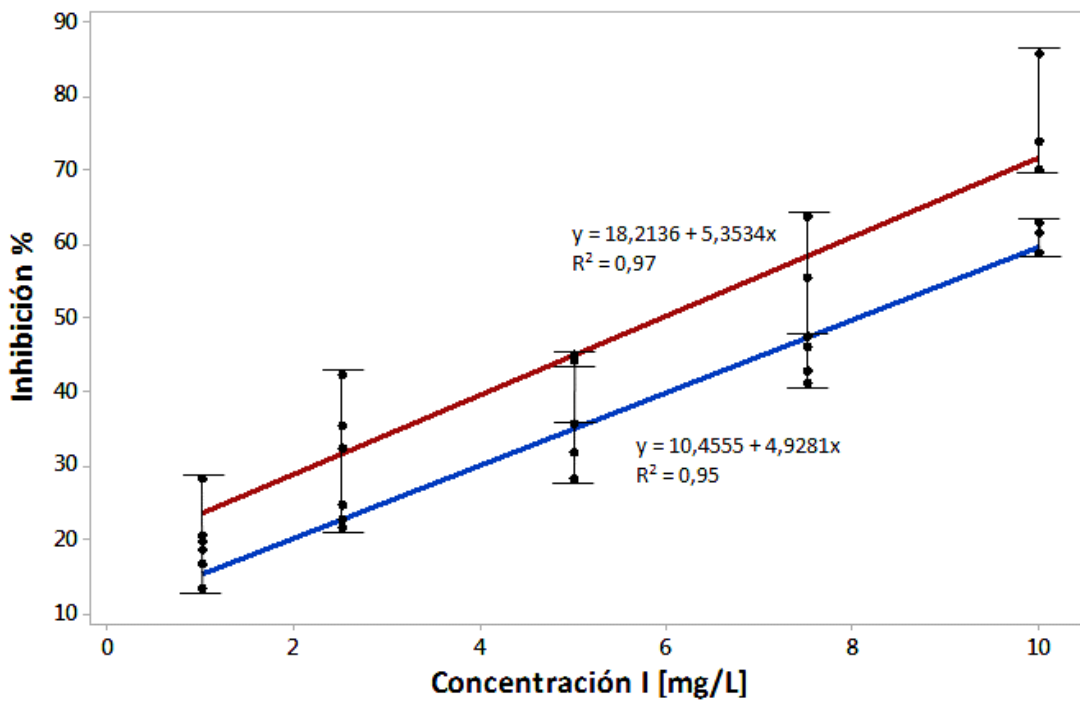


Figura 6: Relación entre el porcentaje de inhibición entre el número de frondas (azul), área de frondas (rojo) y las concentraciones de ibuprofeno (I). Regresión simple ($p < 0,05$).

En las figuras 7 y 8 se muestran las diferencias con respecto a la inhibición del crecimiento que tuvieron las colonias de *L. minuta* expuestas a los diferentes fármacos, donde en ambos casos se observó que el comportamiento frente al ibuprofeno fue altamente más tóxico que con paracetamol.

Se logró observar también que la pendiente de la recta para el caso del ibuprofeno fue mayor que la del paracetamol, indicando una mayor toxicidad.

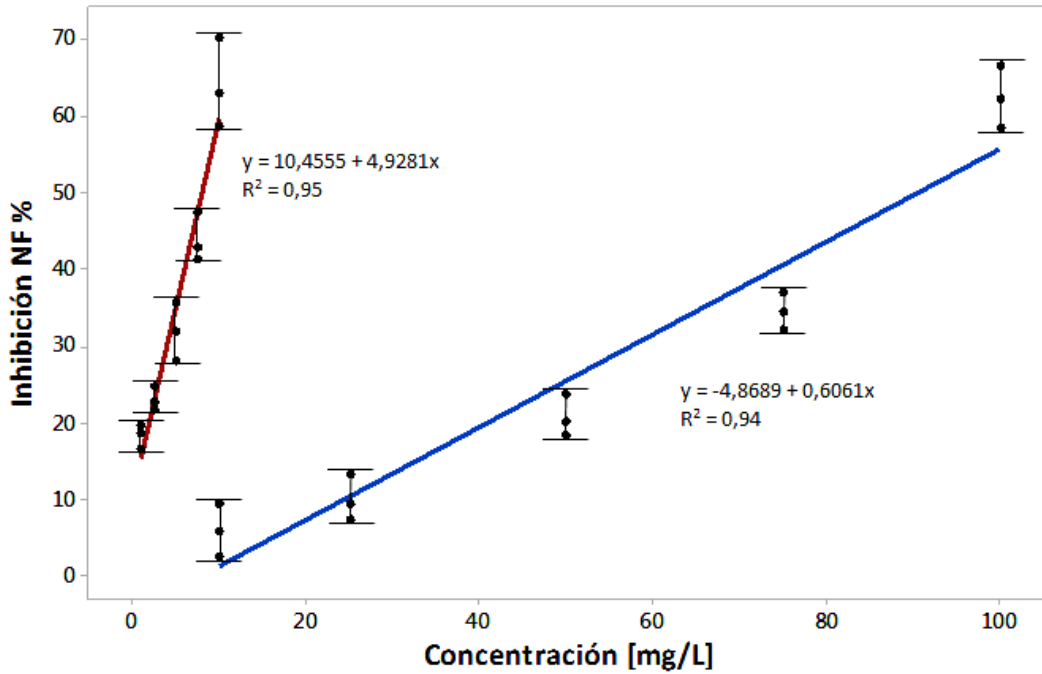


Figura 7: Relación entre el porcentaje de inhibición del número de frondas (NF) frente a concentraciones de paracetamol (azul) e ibuprofeno (rojo). Regresión simple ($p < 0,05$).

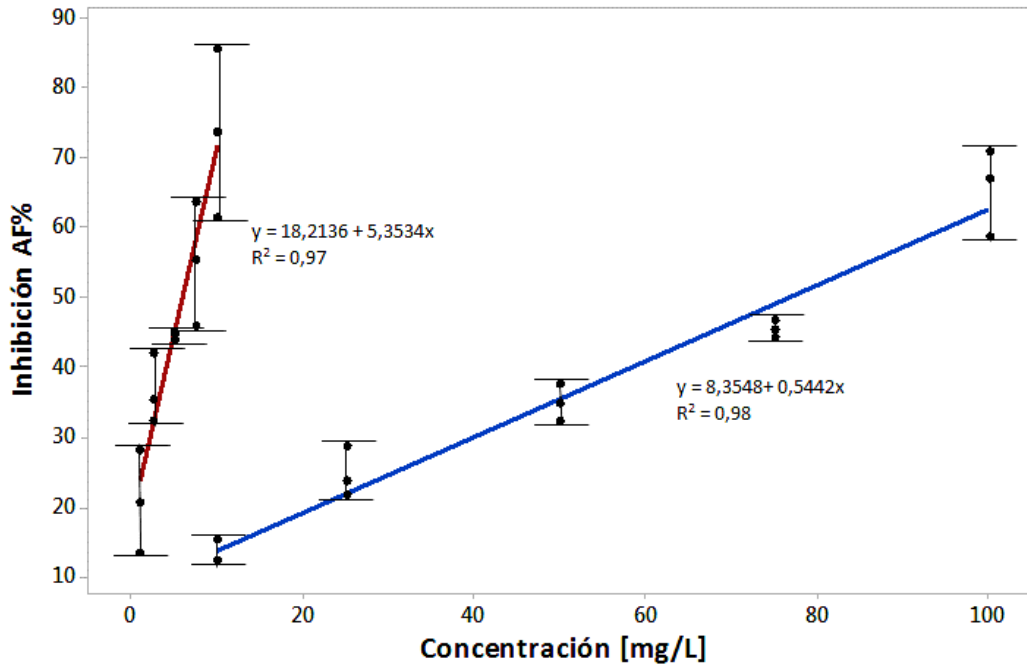


Figura 8: Relación entre el porcentaje de inhibición del área de frondas (AF) frente a concentraciones de paracetamol (azul) e ibuprofeno (rojo). Regresión simple ($p < 0,05$).

En las siguientes figuras (9, 10, 11 y 12) se muestra el efecto del aumento de las concentraciones de los fármacos sobre las tasas de crecimiento por el número y área de frondas, en relación con los grupos de tratamiento y los controles.

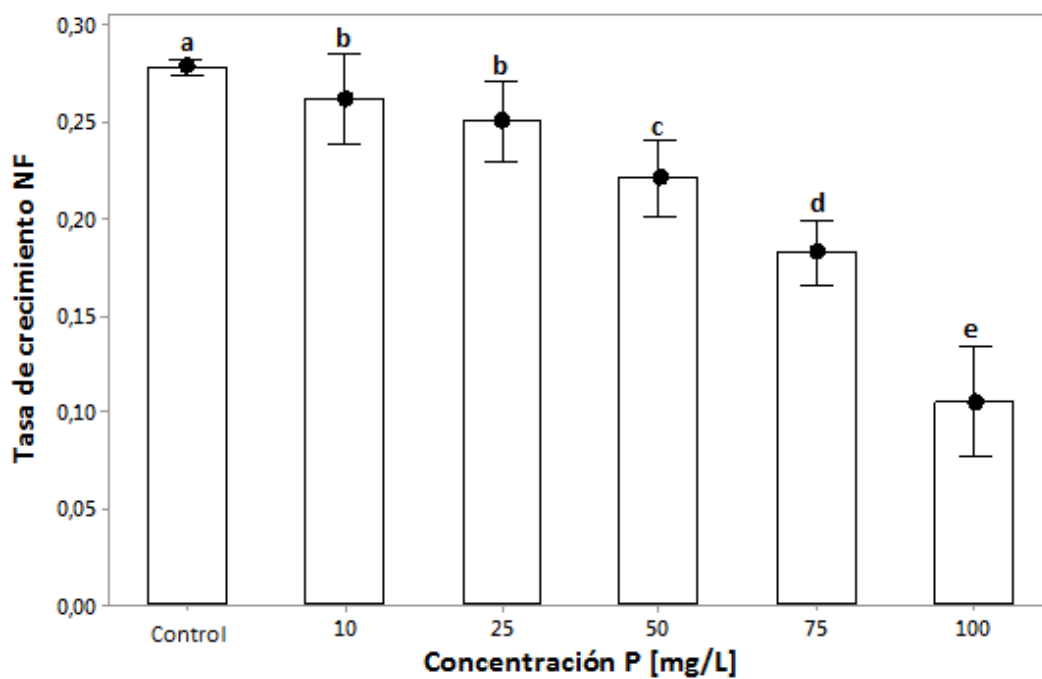


Figura 9: Comparación de las tasas de crecimiento por el número de frondas (NF) en *L. minuta* entre las concentraciones de paracetamol (P) y el control. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

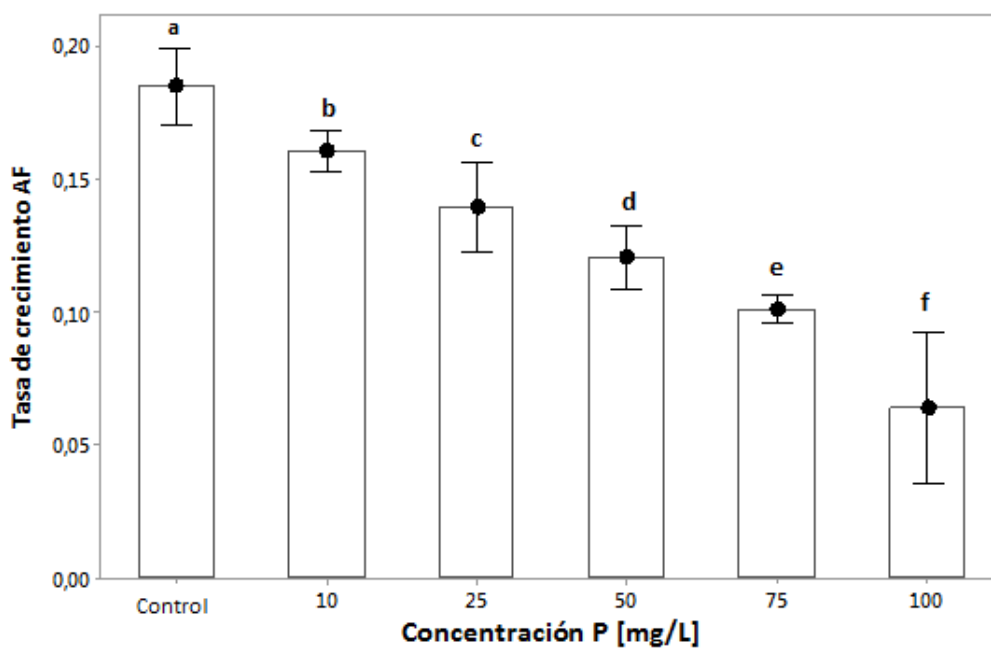


Figura 10: Comparación de las tasas de crecimiento por el área de frondas (AF) en *L. minuta* entre las concentraciones de paracetamol (P) y el control. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

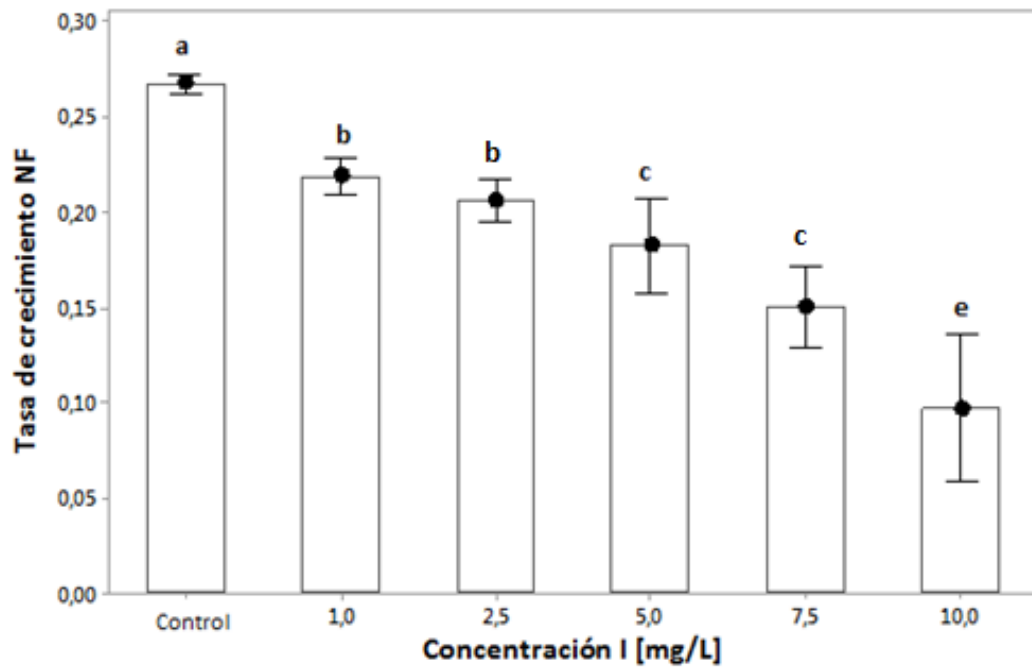


Figura 11: Comparación de las tasas de crecimiento por el número de frondas (NF) en *L. minuta* entre las concentraciones de ibuprofeno (I) y el control. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

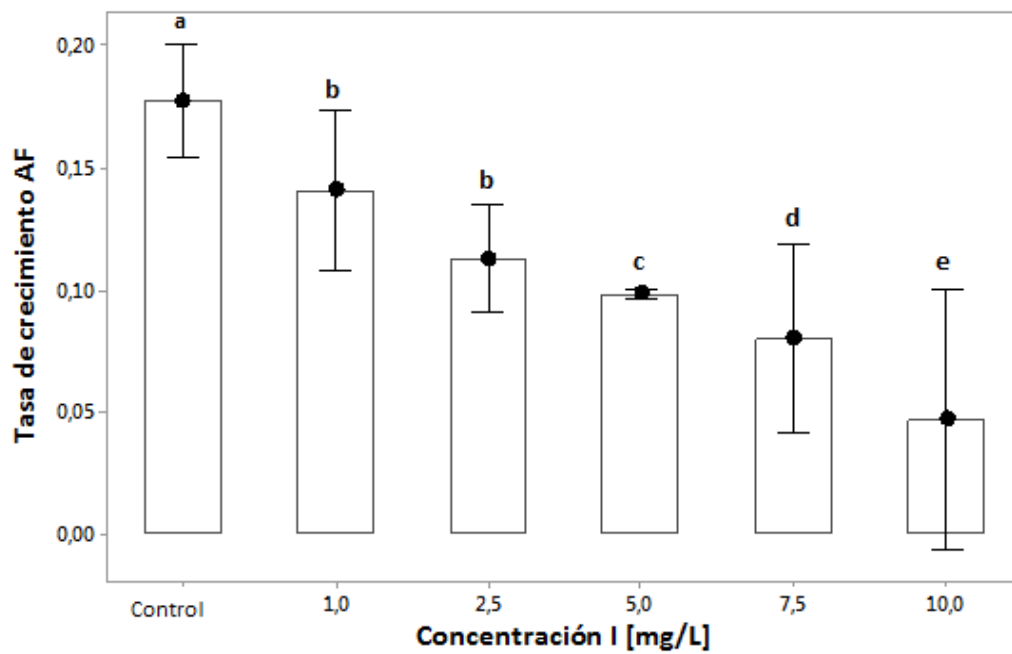


Figura 12: Comparación de las tasas de crecimiento por el área de frondas (AF) en *L. minuta* entre las concentraciones de ibuprofeno (I) y el control. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos con respecto al modelo concentración adición se muestran en las tablas 5 y 6, donde se observa que el tipo de interacción en las mezclas es sinérgico, a diferencia de la mezcla con mayor proporción de ibuprofeno (1:4), la cual se mostró con un efecto aditivo.

Tabla 5: Valores de Cl_{50} [mg/L] estimada y experimental para CA respecto al número de frondas.

Mezclas de fármacos P:I	Cl_{50} estimada	Cl_{50} experimental	CA
1:1	49,3	34,2	1,4
4:1	74	58,9	1,3
1:4	24,5	23,2	1,1

P: paracetamol, I: ibuprofeno. CA = 1 efecto aditivo, CA > 1 efecto sinérgico, CA < 1 efecto antagónico.

Tabla 6: Valores de Cl_{50} [mg/L] estimada y experimental para CA respecto al área de frondas.

Mezclas de fármacos P:I	Cl_{50} estimada	Cl_{50} experimental	CA
1:1	41,2	26,7	1,5
4:1	62,4	55,7	1,1
1:4	20,1	20,3	1

P: paracetamol, I: ibuprofeno. CA = 1 efecto aditivo, CA > 1 efecto sinérgico, CA < 1 efecto antagónico.

Con respecto al modelo de proporción sinergia los valores obtenidos están representados en las tablas 7 y 8, donde se ve que para todas las mezclas la proporción de sinergia está ligada al paracetamol y la antagónica al ibuprofeno.

Tabla 7: Valores de Cl_{50} [mg/L] para las mezclas de fármacos y los valores de PS para cada fármaco respecto al número de frondas.

Mezcla de fármacos P:I	Cl_{50}	PS1	PS2
1:1	34,2	2,6	0,2
4:1	58,9	1,5	0,1
1:4	23,2	3,9	0,3

P: paracetamol, I: ibuprofeno. PS1 para paracetamol, PS2 para ibuprofeno.

Tabla 8: Valores de CI_{50} [mg/L] para las mezclas de fármacos y los valores de PS para cada fármaco respecto al área de frondas.

Mezcla de fármacos P:I	CI_{50}	PS1	PS2
1:1	26,7	2,9	0,2
4:1	55,7	1,4	0,1
1:4	20,3	3,8	0,3

P: paracetamol, I: ibuprofeno. PS1 para paracetamol, PS2 para ibuprofeno.

En las figuras 13 y 14 se observan los comportamientos por la inhibición del crecimiento frente al aumento de las concentraciones de las mezclas binarias. Para los dos tipos de respuestas evaluados se puede ver que la mezcla con la proporción 1:4 fue la más tóxica; con una menor proporción de paracetamol y mayor de ibuprofeno.

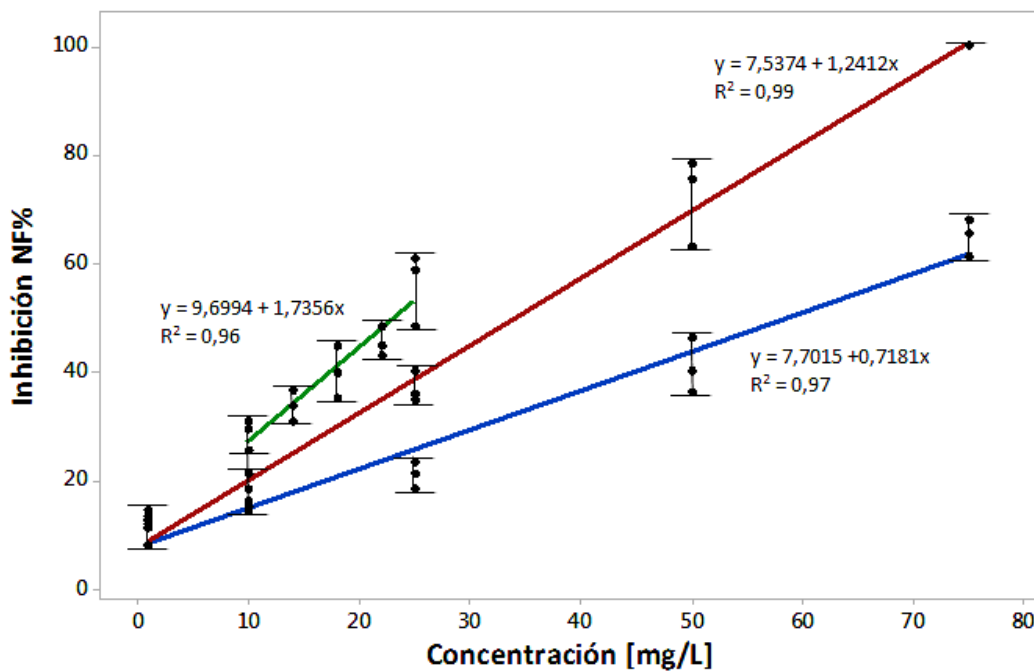


Figura 13: Relación entre el porcentaje de inhibición del número de frondas (NF) frente a concentraciones de mezclas binarias. Proporción 1:1 (rojo), 4:1 (azul) y 1:4 (verde). Regresión simple ($p < 0,05$).

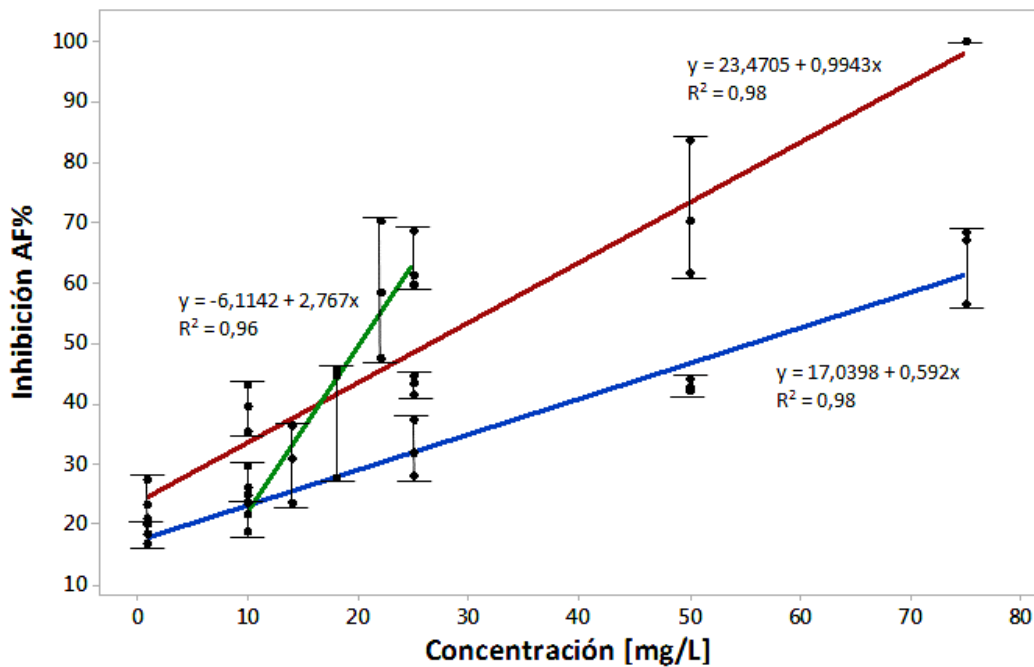


Figura 14: Relación entre el porcentaje de inhibición del área de frondas (AF) frente a concentraciones de mezclas binarias. Proporción 1:1 (rojo), 4:1 (azul) y 1:4 (verde). Regresión simple ($p < 0,05$).

La mínima concentración a la cual se observaron cambios significativos (LOEC) en las tasas de crecimiento con *L. minuta* fue de 10 mg/L para el caso del paracetamol y 1 mg/L para el ibuprofeno (Figuras 9, 10, 11 y 12). Estas concentraciones fueron determinadas mediante un análisis de ANOVA ($p < 0,05$) con el método Tukey de comparación de las medias en el software Minitab 18. De esta manera se estableció un criterio de calidad ambiental basado en estos valores, el cual consistió en sugerir la presencia del diez por ciento del LOEC, es decir 1000 y 100 $\mu\text{g/L}$ para el paracetamol y el ibuprofeno respectivamente, para de esta manera mantener un rango entre la concentración que se puede descargar a los cuerpos de agua superficiales y la concentración a la cual se inhibe una parte significativa de la tasa de crecimiento.

7. Discusión

Las toxicidades individuales encontradas en *Lemna minuta* fueron de un CI_{50} con valores de 90,5 y 76,5 mg/L para el caso del paracetamol, y 8 y 5,9 mg/L para el ibuprofeno en relación con el número de frondas y área foliar respectivamente. Lo que indica que el ibuprofeno es más tóxico que el paracetamol para la especie *Lemna minuta*. Esto también se reflejó en el valor de las pendientes de las rectas del comportamiento de los organismos frente al incremento de las concentraciones, los que fueron mayores para el caso del ibuprofeno. Esto puede deberse por las diferencias en sus composiciones, donde en el caso del paracetamol proviene del p-aminofenol y el ibuprofeno de arilpropionato. Se determinó que el área foliar resultó ser la variable respuesta más sensible, manteniendo una alta correlación con el número de frondas. Esto concuerda con Valenzuela (2013), que establece que existen parámetros más sensibles en la estimación ecotoxicológica de la contaminación con lentejas de agua que el usado regularmente como número de frondas, tales como clorofila o área foliar.

Los valores de toxicidad reportados en el presente estudio son inferiores con respecto a otra especie del mismo género, de acuerdo con Nunes *et al.* (2014), donde en un estudio sobre los efectos del paracetamol en macrófitas encontraron notorias diferencias entre dos especies del género *Lemna*. El paracetamol causó una disminución significativa del número de frondas con un CE_{50} (concentración efectiva media) de 446,6 (360,1 – 580,2) mg/L para el caso de *Lemna minor*, y para *Lemna gibba* no se reportó toxicidad en las condiciones de exposición propuestas. Estas diferencias pueden deberse a la alta variabilidad de respuestas antioxidantes en plantas acuáticas, mostrando diferencias notables entre especies aun siendo del mismo género (Regoli *et al.*, 2003; Osman *et van Noort*, 2007; Binelli *et al.*, 2009), lo que implica que existen mecanismos más preparados que otros para resistir a los diversos tipos de estresores en el ambiente.

En otro estudio con *Lemna minor*, después de diez días se observó una significativa reducción del contenido de pigmentos fotosintéticos al incrementar la concentración de paracetamol en un rango de 0,1 – 100 $\mu\text{g/L}$ (Hajkova *et Kummerová*, 2014). Las diferencias que existen entre estos datos y los resultados del presente estudio indican que variables como el tiempo de exposición y los tipos de respuestas evaluadas son determinantes para establecer la toxicidad de algún tóxico. Las diferencias en la toxicidad de los puntos finales podrían indicar qué condición o aspecto del organismo será el

primero en verse afectado o por lo menos el más sensible. Es probable que algunos tóxicos reflejen un mayor efecto en un tipo de respuesta específico en macrófitas, como, por ejemplo, que dañen los pigmentos fotosintéticos antes de que afecten el crecimiento celular, mientras que otros pueden afectar directa o indirectamente el crecimiento celular antes de los pigmentos (Cedergreen *et al.*, 2007).

Los resultados del presente estudio con respecto al ibuprofeno fueron similares a los de otras especies, Pomati *et al.* (2004) reportaron un CI_{50} de 4 mg/L en la especie *Lemna minor*, La Farré *et al.* (2001) un CE_{50} de 12 mg/L para la bacteria *Vibrio fischeri*, la cual habita en diferentes ecosistemas acuáticos, y Halling-Sørensen *et al.* (1998) un CE_{50} de 7,1 mg/L para la microalga *Skeletonema costatum*. Esto sugiere que existen diversos tipos de organismos acuáticos que son sensibles al ibuprofeno en el rango de miligramos por litro, lo que no demuestra un riesgo ambiental respecto a las concentraciones reportadas en los diferentes cuerpos de agua (Lin *et al.*, 2008).

Estudios previos realizados sobre especies de crustáceos han demostrado que la toxicidad del paracetamol fue mayor que la de ibuprofeno (Han *et al.*, 2006), mientras que en otro estudio con microalgas se determinó que el ibuprofeno fue más tóxico que el paracetamol (Moraga, 2018), como también en otros estudios con peces (Santos *et al.*, 2010). Estos resultados muestran las diferencias que existen en la sensibilidad entre las diferentes especies del ecosistema acuático, lo que indica que se requiere de una investigación adicional que revele el potencial impacto crónico de estas dos sustancias en los organismos acuáticos (Fent *et al.*, 2006; Kümmerer, 2004), considerando su bioacumulación y liberación continua al medio ambiente (Carlsson *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que además del ingrediente activo, un producto farmacéutico contiene excipientes que también deben ser evaluados (Carlsson *et al.*, 2006).

Las toxicidades observadas en este estudio para las mezclas binarias de paracetamol e ibuprofeno fueron de CI_{50} de 34,2 y 26,7 mg/L para la proporción de 1:1, 58,9 y 55,7 mg/L para la mezcla con mayor proporción de paracetamol, y 23,2 y 20,3 mg/L para la mezcla con mayor proporción de ibuprofeno, en relación con el número de frondas y área foliar respectivamente. Esto indica que la toxicidad aumenta directamente en relación con el aumento de la proporción de ibuprofeno presente en la mezcla, manteniendo una relación directa con respecto a lo evidenciado en los bioensayos individuales;

afirmando que el ibuprofeno es más tóxico que el paracetamol. También se logró evidenciar que la toxicidad de las mezclas fue mayor con relación al paracetamol de manera individual, esto dice que la toxicidad de una sola sustancia podría aumentar fuertemente en combinación con otras, y particularmente con sustancias de acción similares (Cleuvers, 2003). Bialk-Bielińska *et al.* (2017) determinaron que, aunque la concentración de cada uno de los productos químicos de forma individual en el ambiente no causaría daño, al estar presente en mezclas estos pueden causar un efecto tóxico. En un estudio se observó que una sola sustancia redujo significativamente el riesgo de la mezcla. Sin embargo, no fue suficiente para garantizar la protección contra el efecto total de la mezcla. Por ende, el porcentaje de riesgo de una sustancia química individual no debe considerarse como una medida adecuada para una evaluación, sino como una medida de la contribución del compuesto al riesgo global y a los escenarios de exposición combinada (JRC, 2015).

Según Moraga (2018) las toxicidades de las mezclas binarias entre paracetamol e ibuprofeno en la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* reportaron toxicidades de Cl_{20} de 50 mg/L en una mezcla con mayor proporción de paracetamol, 52,9 mg/L para una mezcla con iguales proporciones y 36,7 mg/L en la mezcla con una mayor proporción de ibuprofeno. Estos datos presentan similitudes en las toxicidades de las mezclas con una mayor proporción de ibuprofeno en relación con el presente estudio, correspondiendo a las mezclas con mayor toxicidad para ambos organismos de prueba. Esto puede ser por los mecanismos de defensa similares entre productores primarios de agua dulce. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las condiciones de exposición para cada organismo fueron diferentes, como los tiempos de exposición a los tóxicos.

Sung *et al.* (2014) determinaron en un estudio realizado con el crustáceo *Neocaridina denticulata* un CL_{50} (concentración letal media), para una mezcla 1:1 de paracetamol e ibuprofeno, de 6,23 mg/L, en el caso de las mezclas con mayores concentraciones de paracetamol se reportó una toxicidad mayor (4,78 mg/L) y para las mezclas con mayores concentraciones de ibuprofeno se reportó una toxicidad más baja (6,78 mg/L). Sung *et al.* (2014) determinaron que para *N. denticulata* la exposición a una mezcla que contenga una mayor concentración de paracetamol que de ibuprofeno se asocia con una mayor toxicidad. Las diferencias entre estos datos con el presente estudio se basan en diferencias interespecíficas respecto al organismo de prueba y sobre el tipo de respuesta medida, ya que Sung *et al.* (2014) no evaluaron la inhibición del crecimiento en el organismo, si no la muerte de este.

Cedergreen *et al.* (2005) han demostrado que el efecto tóxico de una mezcla puede depender de qué rasgo se mide, lo que sugiere que las evaluaciones de los riesgos tóxicos están condicionadas al tipo de respuesta evaluado. Los datos anteriores junto con los resultados del presente estudio revelan que existe una amplia gama de toxicidad de estos fármacos para diferentes tipos de organismos acuáticos. Considerando que en el ambiente los fármacos y otros productos químicos existen comúnmente como mezclas complejas más que como sustancias puras, las formas en que las interacciones entre estas sustancias afectan a los organismos son, en gran medida, desconocidas (Geiger *et al.*, 2016).

De acuerdo con el método concentración adición se determinó una interacción de tipo sinérgica para las mezclas evaluadas en el presente estudio, a excepción de la mezcla con mayor proporción de ibuprofeno en relación con el área foliar, la cual tuvo un efecto aditivo. Esto indica que una mezcla en igual proporción de paracetamol e ibuprofeno posee un efecto sinérgico, por otro lado, donde exista una mayor concentración de paracetamol el efecto se vuelve altamente más sinérgico, inversamente si existe una mayor concentración de ibuprofeno el efecto se torna hacia un sentido más antagónico.

Según el método proporción sinergia se determinó que la proporción de paracetamol en la mezcla posee un comportamiento de tipo sinérgico mientras que la proporción de ibuprofeno es de tipo antagónico. Esto posee una relación directa con el método concentración adición, ya que indica que el efecto sinérgico en las mezclas está ligado directamente al paracetamol y en relación con el ibuprofeno al de tipo antagónico.

En un estudio Cleuvers (2003) determinó que la toxicidad de la mezcla de ibuprofeno con diclofenaco en una prueba con *Daphnia magna* superó los efectos previstos por el método concentración adición, lo que resultó como un efecto sinérgico global, y en otro estudio con el pez de agua dulce *Cyprinus carpio* también se observaron efectos sinérgicos en mezclas con estos dos componentes (Islas-Flores *et al.*, 2017). Esto concuerda con los resultados del presente estudio, lo que indica que no se pueden excluir sinergias entre sustancias, independiente de un modo de acción similar o diferente, considerando que estos dos productos farmacéuticos son miembros de la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (Cleuvers, 2003).

Geiger *et al.* (2016) determinaron a partir de un estudio con la microalga *Chlorella vulgaris* que los efectos en altas concentraciones de las mezclas tóxicas con ibuprofeno fueron más altos que los efectos individuales de cada componente, causando un efecto sinérgico global, a diferencia de lo observado en bajas concentraciones, donde predominaron las interacciones de tipo antagónicas. De esta manera se establece que es importante notar que la sinergia y el antagonismo pueden variar con los diferentes niveles de concentraciones sobre el organismo, donde según Cedergreen (2014), determina que las interacciones sinérgicas entre los productos químicos ocurren a menudo en las altas concentraciones. Por lo tanto, hay que considerar que cuando se realiza una estimación de las interacciones reales llevadas a cabo en una mezcla pueden ocurrir desviaciones de las concentraciones las cuales son complejas de detectar, ocasionando posibles errores en los valores obtenidos (Bialk-Bielińska *et al.*, 2017). Pomati *et al.* (2008) establecieron que determinar un patrón común de interacción dependiente de la concentración es complejo y difícil de modelar para las mezclas con productos farmacéuticos.

Aunque el método de concentración adición ha demostrado servir con gran alcance en la predicción y la evaluación de toxicidades de las mezclas de diversos compuestos químicos, en relación con los claros casos de sinergias, estos suelen ser muy específicos para ciertas mezclas, tomando en consideración variables como tipo de compuestos, sus concentraciones y proporciones en la mezcla, organismos particulares y los puntos finales a evaluar. Por lo tanto, no pueden incorporarse en un esquema general de evaluación de riesgos, sino que deben tratarse caso por caso. De esta manera, cualquier estrategia regulatoria debiese incluir un cierto elemento de flexibilidad que permita las disposiciones adecuadas para tales casos excepcionales. Con esto surge la necesidad de definir las condiciones potenciales a interacciones sinérgicas en mezclas, y de determinar la probabilidad de que se produzcan sinergias de alto efecto (Bialk-Bielińska *et al.*, 2017).

Actualmente, existe un alto potencial para infravalorar los riesgos de la exposición combinada a mezclas químicas (JRC, 2016). Esto puede darse con factores tales como evaluaciones que no toman en cuenta la co-exposición a otros compuestos no considerados que podrían contribuir al efecto final (Dewalque *et al.*, 2014), no considerar la bioacumulación potencial en el organismo de prueba (Kortenkamp *et Faust*, 2010; Marx *et al.*, 2015) y descuidar los metabolitos de cada compuesto, los que pueden llegar a ser más tóxicos que el compuesto primario, lo que podría contribuir al riesgo general (Malaj *et al.*, 2014).

Para establecer con detalle una correcta estimación de los efectos de las mezclas es necesario evaluar para cada compuesto en particular su influencia en la mezcla, y para esto se necesitan de criterios que definan su relevancia en la toxicidad final combinada, como por ejemplo la afinidad entre las sustancias químicas presentes y la similitud en la manifestación de toxicidad de cada una (Bialk-Bielińska *et al.*, 2017).

En relación con la propuesta de un criterio de calidad para estos dos fármacos en cuerpos de agua superficiales, se sugiere 1000 y 100 $\mu\text{g/L}$ para paracetamol e ibuprofeno respectivamente. Este valor representa el diez por ciento del LOEC, es decir, la concentración más baja a la que se observó un efecto en las colonias de *Lemna minuta*. Geiger *et al.* (2016) obtuvieron un LOEC de 70 mg/L para el ibuprofeno por medio de un estudio con la microalga *Chlorella vulgaris*, valor que mantiene un rango de diferencia con el LOEC de 1 mg/L reportado en este estudio. Esto indica que la lenteja de agua es más sensible a los efectos provocados por este fármaco, como también señaló Cleuvers (2003) en su estudio sobre los efectos de un grupo de fármacos en una especie del género *Lemna*.

Comparando los valores de criterio ambiental con las concentraciones evidenciadas en algunos cuerpos de aguas superficiales, donde se detectaron concentraciones máximas de 3,77 y 1,6 $\mu\text{g/L}$ para ibuprofeno y paracetamol respectivamente (Lin *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009), y en efluentes de plantas de tratamiento 1,9 y 7,1 $\mu\text{g/L}$ de paracetamol e ibuprofeno (Pal *et al.*, 2010); estos valores son inferiores respecto a los propuestos, lo que señala un riesgo ambiental bajo. En Chile no hay datos publicados hasta la fecha.

8. Conclusiones

- Se determinó la toxicidad de los fármacos evaluados, con valores de CI_{50} de 90,5 y 76,5 mg/L para el caso del paracetamol, y 8 y 5,9 mg/L para el ibuprofeno en relación con el número de frondas y área foliar respectivamente. Siendo el ibuprofeno más tóxico que el paracetamol sobre *Lemna minuta*. Evidenciando que el área foliar es más sensible a las concentraciones de paracetamol e ibuprofeno que el número de frondas.
- Se determinó una interacción de tipo sinérgica entre estos productos farmacéuticos al estar presentes en mezclas binarias, donde las toxicidades observadas en las mezclas fueron superiores a la reportada por el paracetamol de manera individual.
- El criterio de calidad ambiental para la presencia de paracetamol e ibuprofeno en cuerpos de agua superficiales es de 1000 y 100 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, lo que implica que sobre estas concentraciones se pueden producir efectos tóxicos en productores primarios.
- El presente estudio generó datos de toxicidad mediante pruebas de inhibición del crecimiento de la macrófita de agua dulce *Lemna minuta*, los cuales servirían de base en las evaluaciones de riesgos de aguas superficiales como en normas secundarias de calidad ambiental.

9. Referencias

- Ågerstrand, M., Berg, C., Björklenius, B., Breitholtz, M., Brunström, B., Fick, J., Gunnarsson, L., Joakim Larsson, D.G., Sumpter, J.P., Tysklind, M., Rudén, C., 2015. Improving environmental risk assessment of human pharmaceuticals. *Environ. Sci. Tech.* 49, 5336-5345.
- Alaerts, G., Mahbubar, R. et Kelderman, P., 1996. Performance analysis of a fullscale duckweed-covered sewage lagoon. *Water Research*, 30(4): 843-852.
- Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2341–2347.
- An, J., Zhou, Q.X., Sun, F., Zhang, L., 2009. Ecotoxicological effects of paracetamol on seed germination and seedling development of wheat (*Triticum aestivum L.*), *J. Hazard. Mater.* 169, 751-757.
- Anderson, P.D. et Weber, L.J., 1975. The toxicity to aquatic population of mixtures containing certain heavy metals. En: *Proceeding of the International Conference on heavy Metal in the Environment*, Institute of Environmental Studies, University of Toronto. 933-953.
- Ankley, G.T., Brooks, B.W., Huggett, D.B., Sumpter, J.P., 2007. Repeating history: pharmaceuticals in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 15, 8211-8217.
- Arora, A., Sairam, R., Srivastava, G., 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82(10): 1227.
- ATSDR, 2004. *Guidance manual for the assessment of joint toxic action of chemical mixtures (final)*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Department of Health and Human Services, Atlanta.

- Backhaus, T., Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. Predictability of the toxicity of multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2348–2356.
- Backhaus, T., 2016. Environmental risk assessment of pharmaceutical mixtures: demands, gaps and possible bridges. *AAPS J.* 18, 804-813.
- Barrera Olivera, Macarena Solange. Uso de biomarcadores enzimáticos en organismo acuáticos (*Lemna valdiviana*) para evaluar la toxicidad de efluentes de pisciculturas en sistemas fluviales. Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Biología Marina y Título Profesional de Biólogo Marino. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. 2015.
- Becerril, J., 2009. Contaminantes emergentes en el agua. *Revista Digital Universitaria.* 10 de agosto 2009. V. 10 Nº. 8. 1067-6079.
- Bendz, D., Paxéus, N.A., Ginn, T.R., Loge, F.J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *J Hazard Mater.* 122:195–204.
- Benotti, M.J., Trenholm, R.A., Vanderford, B.J., Holady, J.C., Stanford, B.D., Snyder, S.A., 2009. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environ. Sci. Technol.* 43: 597–603.
- Bialk-Bielińska, A., Caban, M., Pieczyńska, A., Stepnowski, P., and Stolte, S., 2017. Mixture toxicity of six sulfonamides and their two transformation products to green algae *Scenedesmus vacuolatus* and duckweed *Lemna minor*. *Chemosphere*, 173, 542-550.
- Binelli, A., Parolini, M., Cogni, D., Pedriali, A., Provini, A., 2009. A multi-biomarker assessment of the impact of the antibacterial trimethoprim on the non-target organism *Zebra mussel*

(*Dreissena polymorpha*). Comp. Biochem. Physiol. C. 150:329–336. doi: 10.1016/j.cbpc.2009.05.011.

- Boleda, M.A., Galceran, M.A., Ventura, F., 2011. Behavior of pharmaceuticals and drugs of abuse in a drinking water treatment plant (DWTP) using combined conventional and ultrafiltration and reverse osmosis (UF/RO) treatments. Environ Pollut 159(6): 1584–1591.
- Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Hanson, M.L., Sanderson, H., Lam, M.W., Young, C., Mabury, S.A., Sibley, P.K., Solomon, K.R., 2004. Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. Aquat. Toxicol. 70, 23-40.
- Bro-Rasmussen, F., Calow, P., Canton, J.H., Chambers, P.H., Silva, A., Hoffmann, L., Jouany, J.M., Klein, W., Persoone, G., Scoullous, M., Tarazona, J.V., Vighi, M., 1994. EEC water quality objectives for chemicals dangerous to aquatic environment (list 1). Rev. Environ. Contam. Toxicol. 137, 83-110.
- Bruce R.D. et Versteeg D.J., 1992. A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485-1494.
- Bull, R.J., Crook, J., Whittaker, M., Cotruvo, J.A., 2011. Therapeutic dose as the point of departure in assessing potential health hazards from drugs in drinking water and recycled municipal wastewater. Regul Toxicol Pharmacol 60(1): 1–19.
- Buser, H.R., Poiger, T., Muller, M.D., 1999. Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. Environ. Sci. Technol. 33, 2529–2535.
- Bushra, R., et Aslam, N., 2010. Review Article An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen. 25(3), 155–162. <https://doi.org/10.5001/omj.2010.49>.

- Carabaño, A.I., Jiménez, L.I., López, C. P.M., Calvo, G.I., Pello, L.A.M., Balugo, B.P., Baro, F.M., Ruiz C. J., 2005. Eficacia de ibuprofeno y paracetamol como antitérmicos. *Anales Pediátricos*. Barcelona. 62: 117- 122.
- Carlsson, C., Johansson, A., Alvan, G., Bergman, K., Kühler T., 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total. Environ.* 364:67–87.
- Cedergreen, N. et Streibig, J.C., 2005. Can the choice of endpoint lead to contradicting results of mixture toxicity experiments? *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1676–1683.
- Cedergreen, N., Abbaspoor, M., Sørensen, H., Streibig, J.C., 2007. Is mixture toxicity measured on a biomarker indicative of what happens on a population level? A study on *Lemna minor*. *Ecotoxicol Environ Saf* 67:323–332.
- Cedergreen, N., 2014. Quantifying Synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within Environmental Toxicology. *PLoS ONE* 9(5), 96580.
- Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142, 185–194.
- Cleuvers, M., 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol Environ Safe.*; 59:309–315.
- Cleuvers, M., 2005. Initial risk assessment for three beta-blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere.* 59: 199–205.
- Daughton, C. et Ternes, T., 1999. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment. *Environ Health* 107 (suppl 6): 907-938.

- Daughton C., 2001. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Overarching Issues and Overview. ACS Symposium Series. 791, 1, 2–38.
- David, A. et Pancharatna, K., 2009. Effects of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. J. Appl. Toxicol. 29(7): 597-602.
- Dewalque, L., Charlier, C., Pirard, C., 2014. Estimated daily intake and cumulative risk assessment of phthalate diesters in a Belgian general population. Toxicology Letters, 231(2), 161–8.
- Drost, W., Matzke, M., Backhaus, T., 2007. Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. Chemosphere 67, 36–43.
- EFSA, 2008. Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). Opinion of the Scientific Panel on Plant Protection Products and their Residues to evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the identification of new approaches to assess cumulative and synergistic risks from pesticides to human health with a view to set MRLs for those pesticides in the frame of regulation (EC) 396/2005. EFSA Journal 704, 1-84.
- Eguchi, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y.S., Goto, K., Hirata, K., Miyamoto, K., Yoshimura, H., 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. Chemosphere 57, 1733-1738.
- Evans, R.M., Martin, O.V., Faust, M., Kortenkamp, A., 2016. Should the scope of human risk assessment span legislative/regulatory silos for chemicals? Sci. Total Environ. 543, 757-764.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H., 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi-components-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. Aquat. Toxicol. 56, 13–32.

- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55: 359–370.
- Foyer, C.H. et Noctor, G., 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*, 155(1): 2-18.
- Geiger, E., Hornek-Gausterer, R., Saçan, M.T., 2016. Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 129: 189-198.
- Graham, G., et Scott K., 2013. Mechanism of action of paracetamol, *American Journal of Therapeutics* · January 2005 <https://doi.org/10.1007/s10787-013-0172-x>.
- Grujic, S., Vasiljevic, T., Lausevic, M., 2009. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography – ion trap – tandem mass spectrometry *sevi c*, 1216, 4989–5000. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.059>.
- Hajkova, M. et Kummerová, M., 2014. Growth response of *Lemna minor* to paracetamol. *Mendel Net*, 457-462.
- Halling-Sørensen, B., Nors, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holtzen, H-C., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. *Chemosphere* 36:357– 93.

- Han, G.H., Hur, H.G., Kim, S.D., 2006. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: Occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 25(1): 265-271.
- Hardman, J.G., Limbird, L.E., Goodman, Gilman, A., 1996. Analgésicos-antipiréticos, antiinflamatorios y fármacos que se utilizan en el tratamiento de la gota. En: Goodman *et* Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9 edición, México, D. F.: Ed. McGraw-Hill Interamericana. 661-695.
- Hardman, J.G., Limbird, L.E., Goodman, A., 2003. *Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica*. 10th ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana.
- He, B., Wang, J., Liu, J., *et* Hu, X., 2017. Chemosphere Eco-pharmacovigilance of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Necessity and opportunities. *Chemosphere*, 181, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.084>.
- Henríquez Villa, Deyanira *et* Sancha Fernández, Ana María. Presencia de contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema. Estudio de caso: productos farmacéuticos en la cuenca del río Biobío, región del Biobío, Chile. Tesis (Magister en ciencias de la ingeniería mención recursos y medio ambiente hídrico). Universidad de Chile. 2012. 223 h.
- Hewlett, P.S. *et* Plackett, R. L., 1969. A unified theory for quantal responses to mixtures of drugs. Non-interactive action. *Biometrics*, 15: 591-610.
- Hohem, V. *et* Santos, L., 2011. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices – a review. *J. Environ. Manag.* 92, 2304–2347.
- Huber, C., Bartha, B., Harpaintner, R., Schröder, P., 2009. Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants—two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16:206–213.

- Islas-Flores, H., Gomez-Olivan, L.M., Galar-Martínez, M., Sanchez-Ocampo, E.M., SanJuanReyes, N., Ortíz-Reynoso, M., Dublan-García, O., 2017. Cyto-genotoxicity and oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to a mixture of ibuprofen and diclofenac. *Environmental Toxicology*. 1–14
- ISO. International Organization for Standardization, 2005. 20079: Water quality - Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test (ISO TC 147/SC 5).
- Jones, O.A., Voulvoulis, N., Lester, J.N., 2001. Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review. *Environ Technol*. 22: 1383–94.
- Jones, O.A., Voulvoulis, N., Lester, J.N., 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res* 36:5013–5022.
- JRC. Joint Research Centre, 2014. Assessment of Mixtures - Review of Regulatory Requirements and Guidance. JRC Science and Policy Reports. EUR 26675 EN. doi: 10.2788/138523.
- JRC. Joint Research Centre, 2015. Scientific Methodologies for the Assessment of Combined Effects of Chemicals - a Survey and Literature Review. Use of novel and alternative methods in the assessment of effects from combined exposure to multiple chemicals. Scientific and Technical Research Reports. EUR 27471 EN. doi: 10.2788/093511.
- JRC. Joint Research Centre, 2016. Review of case studies on the human and environmental risk assessment of chemical mixtures. Identification of priorities, methodologies, data gaps, future needs. Scientific and Technical Research Reports. EUR 27968 EN. doi: 10.2788/272583.
- JRC. Joint Research Centre. Chemical mixtures – EU research consortia take stock of the science-policy landscape <https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/chemical-mixtures-eu-research-science-policy>. Consulta el 10 de diciembre 2018.

- Karuppanapandian, T., Moon, J.C., Kim, C., Manoharan, K. y Kim, W., 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms". Aust. J. Crop Sci. 5:709-725.
- Kortenkamp, A., Backhaus, T., Faust, M., 2009. State of the Art on Mixture Toxicity.
- Kortenkamp, A., et Faust, M., 2010. Combined exposures to anti-androgenic chemicals: Steps towards cumulative risk assessment. International Journal of Andrology, 33(2), 463–472.
- Kümmerer, K., 2004. Pharmaceuticals in the environment, second ed. Springer, Berlin, 527 pp.
- Kummerová, M., Zezulka, S., Babula, P., Triska, J., 2015. Possible ecological risk of two pharmaceuticals diclofenac and paracetamol demonstrated on a model plant *Lemna minor*, Journal of Hazardous Materials. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.09.057>.
- La Farré, M., Ferrer, I., Ginebreda, A., Figueras, M., Olivella, L., Tirapu, L., 2001. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. J. Chromatogr. A. 938:187– 97.
- Láng, J. et Köhidai, L., 2012. Effects of the aquatic contaminant human pharmaceuticals and their mixtures on the proliferation and migratory responses of the bioindicator freshwater ciliate *Tetrahymena*. Chemosphere 89 (5), 592–601.
- Landolt, E., 1998 Lemnaceae. In Kubitzki, K. Flowering plants. Monocotyledons: *Alismataceae* and *Commelinanae* (except *Gramineae*). Springer. Berlin, Heidelberg.
- Lewis, M.A., 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. Environ. Pollut.
- Li, W.C., 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. Environ Pollut 187:193–201.

- Limón-Pacheco, J. *et* Gonsebatt, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1): 137-147.
- Lin, A.Y-C., Yu, T-H., Lin, C-F., 2008. Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere* 74(1): 131-141.
- Lin, A.Y-C., Yu, T-H., Lateef, S.K., 2009. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. *Journal of Hazardous Materials* 167(1–3): 1163-1169.
- Lira-Saldivar, R., Méndez-Argüello, B., Vera-Reyes, I., 2016. Producción de especies reactivas de oxígeno en plantas elicidadas con nanopartículas. Departamento Plásticos en la Agricultura. Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), México.
- Malaj, E., von der Ohe, P. C., Grote, M., Kühne, R., Mondy, C. P., Usseglio-Polatera, P., Schäfer, R. B., 2014. Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(26), 9549–54. <http://doi.org/10.1073/pnas.1321082111>.
- Manrique, J., *et* Martínez, F., 2007. Solubility of Ibuprofen in Some Ethanol + Water Cosolvent Mixtures at Several Temperatures, 26(3), 344–354.
- Marx, C., Mühlbauer, V., Krebs, P., *et* Kuehn, V., 2015. Environmental risk assessment of antibiotics including synergistic and antagonistic combination effects. *Science of the Total Environment*, 524-525, 269–279.
- Mazzeo, N., 1993. Revisión de la familia *Lemnaceae* en Chile. *Gayana Bot.* 50 (1): 29-40. Instituto Central de Biología, Universidad de Concepción. Concepción. Chile.

- Metcalfe, C.D., Miao, X-S., Koenig, B.G., Struger, J. 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ Toxicol Chem* 22:2881–2889.
- McGettigan, P. et Henry, D., 2000. Current problems with non-specific COX inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 6, 1693–1724.
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C.S., Manaia, C.M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res* 47:957–995.
- Moraga Riveros, Vicente. Evaluación de la toxicidad de paracetamol e ibuprofeno sobre la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*: bases para la propuesta de un criterio ambiental en cuerpos de agua superficiales. Trabajo de titulación para optar al título de ingeniero ambiental. Valparaíso, Chile. Universidad de Valparaíso. 2018.
- Morasch, B., Bonvin, F., Reiser, H., Grandjean, D., De Alencastro, L.F., Perazzolo, C., Chevre, N., Kohn, T., 2010. Occurrence and fate of micropollutants in the Vidy Bay of Lake Geneva, Switzerland. Part II: micropollutant removal between wastewater and raw drinking water. *Environ Toxicol Chem* 29: 1658–1668.
- Nunes, B., Pinto, G., Martins, L., Gonçalves, F., Antunes, S.C., 2014. Biochemical and standard toxic effects of acetaminophen on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 10815–10822.
- OECD. Organization of economic cooperation and development. Guideline for testing of chemicals. *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. Paris 221. 2006.
- Osman, A.M. et van Noort, P.C.M., 2007. Comparison of key enzymes in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, the earthworm *Allolobophora chlorotica* and *Chironomus riparius* larvae. *Ecotoxicol Environ Saf* 67:2 12–217. doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.05.003.

- Otitolaju, A. A., 2002. Evaluation of the joint action toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove periwinkle *Tympanotonus fuscatus* var *radula* (L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 53: 404-415.
- Pal, A., Gin, K.Y-H., Lin, A.Y-C., Reinhard, M., 2010. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci. Total. Environ.* 408(24): 6062-6069.
- Parolini, M. et Binelli, A., 2012. Sub-lethal effects induced by a mixture of three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology.* 21:379–92.
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Riva, C., Provini, A., 2009. An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicol Vitro.* 23: 935–942.
- Pérez, S., Barceló, D., 2007. Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. *TrAC. Trends. Anal. Chem.* 26(6): 494–514.
- Pomati, F., Netting, A.G., Calamari, D., Neilan, B.A., 2004. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis sp.* and *Lemna minor*. *Aquat. Toxicol.* 67, 387–396.
- Pomati, F., Orlandi, C., Clerici, M., Luciani, F., Zuccato, E., 2008. Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. *Toxicol. Sci.* 102, 129–137.
- Pounds, N., Maclean, S., Webley, M., Pascoe, D., Hutchinson, T., 2008. Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (*Gastropoda: Planorbidae*). *Ecotoxicol Environ Saf* 70(1): 47-52.

- Regoli, F., Winston, G.W., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., 2003. Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*. Environ. Toxicol. Chem. 22: 2120–2129. doi: 10.1897/02-378.
- Roberts, P. et Thomas, K., 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. Sci. Total. Environ. 356:143–153.
- Saçan, M.T. et Balcioglu, I.A., 2006. A case study on algal response to raw and treated effluents from an aluminium plating plant and a pharmaceutical plant. Eco-toxicol. Environ.Saf. 64: 234–243.
- Sanderson, H., Johnson, D.J., Wilson, C.J., Brain, R.A., Solomon, K.R., 2003. Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. Toxicol Lett 144(3): 383-395.
- Sanderson, H., Johnson, D.J., Reitsma, T., Brain, R.A., Wilson, C.J., Solomon, K.R., 2004. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. Regul Toxicol Pharmacol 39: 158–183.
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. Journal of Hazardous Materials 175(1–3): 45-95.
- Schnell, S., Bols, N.C., Barata, C., Porte, C., 2009. Single and combined toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on the rainbow trout liver cell line RTL-W1. Aquat Toxicol 93: 244–252.
- Sharma, V.K., Anquandah, G.A.K., Nesnas, N., 2009. Kinetics of the oxidation of endocrine disruptor nonylphenol by ferrate (VI). Environ Chem Lett 7:115–119.

- Silva, E., Rajapakse, N., Kortenkamp, A., 2002. Something from “nothing” – eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1751–1756.
- Skoglund, L. A., 2003. Naproxen 500 mg bid versus Acetaminophen 1000 mg qid: Effect on Swelling and, 849–858. <https://doi.org/10.1177/0091270003255361>.
- Sung, H.-H., Chiu, Y.W., Wang, S.-Y., Chen, C.-M., Huang, D.-J., 2014. Acute toxicity of mixture of acetaminophen and ibuprofen to Green Neon Shrimp, *Neocaridina denticulate*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.04.014>.
- Sweetman, S.C., 2002. *Martindale: The complete drug reference 30*, Third ed. Pharmaceutical Press, London, UK.
- Taylor, D., Senac, T., 2014. Human pharmaceutical products in the environment—the “problem” in perspective. *Chemosphere* 115:95–99.
- Ternes, T.A., Joss, A., Siegrist, H., 2004. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 393–399.
- USEPA, 2007. Concepts, methods and data sources for cumulative health risk assessment of multiple chemicals, exposures and effects, a resource document. EPA/600/R-06/013F.
- USEPA, 2012. *Ecological Effects Test Guidelines. OCSPP 850.4400: Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp. Fourth Edition.* 712-C-008.
- Valenzuela Pérez, José Tomás. Calibración y estimación de la sensibilidad toxicológica de *Lemna valdiviana Phil* (Araceae) en la realización de bioensayos de toxicidad crónica mediante dicromato de potasio y sulfato de cobre como tóxicos de referencia. Tesis presentada como

requisito para optar al título de Biólogo Marino. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. 2013.

- Weigt, S., Huebler, N., Braunbeck, T., von Landenberg, F., Broschard, T.H., 2010. Zebrafish teratogenicity test with metabolic activation (mDarT): Effects of phase I activation of acetaminophen on zebrafish *Danio rerio* embryos. *Toxicology* 275(1–3): 36-49.
- Wu, X., Dodgen, L., Conkle, J., Gan, J., 2015. Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: a review. *Science of the Total Environment*. 536, 655–666.
- Xin, X., Huan, G., Liu, X., An, C., Yao, Y., Weger, H., Zhang, P., Chen, X., 2017. Molecular toxicity of triclosan and carbamazepine to green algae *Chlorococcum sp.*: A single cell view using synchrotron-based Fourier transform infrared spectromicroscopy. *Environmental Pollution* 226, 12-20.
- Yamagishi, T., Horie, Y., Tatarazako, N., 2017. Chemosphere Synergism between macrolide antibiotics and the azole fungicide ketoconazole in growth inhibition testing of the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere*, 174, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.071>.