

EVALUACIÓN DE COMPUESTOS DE ORIGEN FARMACÉUTICO EN LA CUENCA DEL RÍO SUQUÍA, EFECTOS TÓXICOS SOBRE LA ICTIOFAUNA

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Lic. María Eugenia Valdés



Dpto. de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Químicas
Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA).
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales-CONICET
Universidad Nacional de Córdoba

2015

Director de Tesis:

Dr. Daniel A. Wunderlin

Co-director de Tesis:

Dra. María de los Ángeles Bistoni

Comisión de Tesis:

Dra. Beatriz Toselli

Dra. Sandra E. Martín

Evaluador externo:

Dr. Andrés Venturino

A mamá, papá y mi hermano,
por ser el motor de mi fuerza...

A Nina, Pedro y Damian,
por enseñarme a creer en este camino...

AGRADECIMIENTOS

En medio del caos emocional y mental al que uno llega en este momento, estas páginas parecen un respiro y, sinceramente, las más sentidas en lo personal. Este trabajo no existiría hoy sin la ayuda y el apoyo de muchas personas que por suerte crucé en el camino, a quienes, aun sin mencionar particularmente, agradezco de corazón.

Esta Tesis no hubiera empezado sin la aceptación de mi director, Daniel (sugerido por mi “madre científica”, Nina), a trabajar en su grupo de investigación sin conocerme, ni saber quien era. Junto con el “sí” que habrá dado Mari, mi co-directora, integrándome también a su grupo, les agradezco la enorme oportunidad que me dieron de intentar aportar ese famoso “ladrillo a la pared de la Ciencia” y enseñarme como se trabaja y se logra más de lo que uno espera perseverando contra viento y marea! A los dos, gracias por dirigirme y acompañarme en estos 5 años.

A Vale, Vero, Gringa y Romi, que fueron y son para mi el pilar del grupo, les agradezco enormemente la guía que me dieron, el apoyo constante, las sugerencias y el enseñarme sin escatimar explicaciones, hasta en los momentos mas difíciles y sobre todo (y comúnmente!) urgentes, no hubiera avanzado mas del primer obstáculo si no fuera por ustedes. Las quiero y las admiro por la fuerza que le ponen todos los días y esta muy bueno contar con ustedes, de verdad, gracias.

A los becarios copadooooossss!!!! Mis amigos incondicionales en este camino y en la vida! Gracias Ro, Marilyn, Natu, Lid, Santi, Lucas y las mas recientes Chani y July, esta tesis no existiría sin el apoyo de ustedes!! Y sobre todo el aguante y compartir cotidiano que hacen que podamos seguir adelante y superar los problemas, que den ganas de ir a trabajar y compartir mates y charlas, mesada y risas, y que se aliviane tanto esfuerzo y lagrimas q me bancaron!!! De verdad, saben q los quiero mucho y les agradezco de corazón todo lo que compartimos, que le da sentido a los recuerdos que tengo desde que empecé y los conocí.

Turco, gracias por estar y ayudarme en bromato cada vez que lo necesite!

Al grupo de biología, gracias por integrarme apenas llegué y bancarme de a momentos pero no por eso menos importantes en esta tesis!!! Noe, Ange, Ale, Lauri, Andre, Pao y Mari, gracias por enseñarme el mundo de los peces, a no sentirme un bicho raro (y hacerlo mas divertido!) y por acompañarme cada vez que los necesité.

Al grupo de orgánica, gracias por recibirme como una mas!!! Lizi, Pao, Ivi, Ger, Luri, Luz y Roxi (y los que se fueron y me vieron llegar!) gracias por recibirme con tanto cariño, integrarme al Dpto. de Organica y compartir no solo el laboratorio sino lo cotidiano durante todo este tiempo! Y Cari, gracias por acompañarme al comienzo con tanto entusiasmo!!!

Naty Pigni, sos un párrafo aparte porque te pasaste desde que te conocimos!! Gracias por el aguante y la ayuda constante en esta última etapa, por hacer mas ameno este último tramo de tesis y enchufarnos de fuerza y pilas! Voy a estar para lo que necesites, asi sea acompañarte a los asados!!!

A Fredy, no hubiera podido medir nada sin tu ayuda con los estándares!! Gracias por darme una mano tan importante en este trabajo! A la Dra. Susana Ghenti (Dpto. Bioquímica Clínica) por los esteroides y como siempre gracias a Yani y Damian por darme los primeros estándares pa arrancar.

Al Dr. Barceló del Instituto Catalán de Investigaciones del Agua (ICRA), muchas gracias por recibir mi desesperada urgencia por medir los fármacos en peces con tan buena predisposición! Gracias Sara y Belinda por compartir toda su experiencia conmigo y aportar a una parte muy importante de esta tesis, y a todo el grupo por ayudarme y acompañarme en una estadía hermosa para mi.

A Nina, Pedro, Damián y Yani, gracias por seguir estando cada vez que los necesito y apoyarme a seguir en este camino, del cual fueron gran parte del motivo inicial, entusiasmo y las ganas de seguir trabajando en ambiente! Los quiero mucho!!!

A mis amigas de la vida, Car, Vir, Flor y Jose, gracias por aguantar tantas descargas y acompañarme en mi vuelta a Córdoba, por darme oxígeno de la Tesis y hacer ameno y compartido esto de hacernos adultas! Caro, gracias por estar desde cualquier lugar del mundo! y aportar tu toque artístico a esta Tesis.

Al grupo de terapia que me acompañó desde el principio! Gracias Mela, Cari y chicos!!

A mi familia grande (por parentezo y alma!), gracias por recordarme siempre las cosas importantes de la vida. A mamá, mi hermano y papá, gracias por apoyarme en cada decisión que tomo y, como dije antes, por ser el ejemplo de fuerza mas grande que conozco, sin un poquito del cual no estaría hoy aca.

INDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	v
ABSTRACT	ix
CAPITULO 1: INTRODUCCION GENERAL	1
1.1 Contaminación de agua dulce por compuestos de origen farmacéutico	3
1.2 Destino ambiental de fármacos en el ambiente	4
1.3 Efectos de fármacos sobre la biota acuática.....	6
1.4 Situación local	7
1.5 Objetivos generales y específicos	9
CAPITULO 2: OPTIMIZACION METODOLOGICA DE ANALISIS DE FARMACOS Y COMPUESTOS RELACIONADOS EN AGUA Y PECES	11
2.1 Introducción	13
2.2 Materiales y métodos	22
2.2.1 Reactivos y materiales.....	22
2.2.2 Separación y detección.....	23
2.2.3 Extracción de fármacos a partir de agua superficial del Río Suquía.....	24
2.2.4 Extracción de fármacos a partir de tejidos biológicos.....	25
2.2.4.1 Extracción de fármacos a partir de pez completo.....	26
2.2.4.2 Extracción de fármacos a partir de pez completo según Huerta <i>et al.</i> , 2013.....	27
2.2.4.3 Extracción de fármacos a partir de órganos de pez	32
2.3 Resultados y discusión	34
2.3.1 Separación y detección.....	34
2.3.2 Extracción de fármacos a partir de agua superficial del Río Suquía.....	39
2.3.3 Extracción de fármacos a partir de tejidos biológicos.....	41
2.3.3.1 Extracción de fármacos a partir de pez completo.....	41
2.3.3.2 Extracción de fármacos a partir de pez completo según Huerta <i>et al.</i> , 2013.....	44
2.3.3.3 Extracción de fármacos a partir de órganos de pez	45
2.4 Conclusiones parciales	48
CAPITULO 3: DETERMINACION DE FARMACOS Y COMPUESTOS RELACIONADOS EN AGUA Y PECES DEL RIO SUQUIA	49
3.1 Introducción	51
3.2 Materiales y métodos	56
3.2.1 Sitio de estudio	56
3.2.2 Toma de muestras.....	56
3.2.3 Análisis de fármacos en agua del Río Suquía	58
3.2.4 Análisis de fármacos en peces.....	58
3.2.5 Análisis de datos.....	58
3.3 Resultados y discusión	60
3.3.1 Análisis de fármacos en agua del Río Suquía	60
3.3.1.1 Caracterización química	60

3.3.1.2	Distribución espacial y temporal de fármacos y esteroides	61
3.3.2	Análisis de fármacos en peces	68
3.4	Conclusiones parciales.....	74
CAPITULO 4: BIOMARCADORES EN PECES EXPUESTOS A FÁRMACOS.....		75
4.1	Introducción	77
4.1.1	Biomarcadores de exposición: bioconcentración	77
4.1.2	Biomarcadores de efecto: enzimas antioxidantes, de biotransformación, colinesterasas y comportamiento	79
4.2	Materiales y métodos	87
4.2.1	Recolección de peces y aclimatación	87
4.2.2	Bioconcentración	87
4.2.2.1	Pez completo.....	87
i.	Diseño experimental	87
ii.	Extracción y medición	88
4.2.2.2	Órganos de pez.....	88
i.	Diseño experimental	88
ii.	Extracción y medición	89
4.2.3	Enzimas antioxidantes, de biotransformación y colinesterasas	89
4.2.3.1	Diseño experimental	89
4.2.3.2	Extracción enzimática y medición de actividad.....	90
4.2.4	Comportamiento natatorio	91
4.2.5	Análisis estadístico	92
4.3	Resultados y discusión.....	95
4.3.1	CARBAMAZEPINA	95
4.3.1.1	Bioconcentración	95
i.	Pez completo.....	95
ii.	Órganos de pez	96
4.3.1.2	Enzimas antioxidantes y de biotransformación	99
4.3.1.3	Enzimas colinesterasas.....	105
4.3.1.4	Comportamiento natatorio	106
4.3.1.5	Análisis discriminante.....	110
4.3.2	ATENOLOL	113
4.3.2.1	Bioconcentración	113
4.3.2.2	Enzimas antioxidantes y de biotransformación	114
4.3.2.3	Enzimas colinesterasas.....	118
4.3.2.4	Comportamiento natatorio	119
4.3.2.5	Análisis discriminante.....	123
4.4	Conclusiones parciales.....	125
CAPITULO 5: DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES		127
5.1	Discusión general.....	129
5.2	Conclusiones.....	133
BIBLIOGRAFÍA.....		135

ABREVIATURAS

AD: Análisis discriminante

AND: Androstenodiona, Androst-4-eno-3,17-diona

API: Ionización a presión atmosférica (“*atmospheric pressure ionization*”)

ASE: Extracción acelerada con solvente (“*accelerated solvent extraction*”)

ATE: Atenolol, 2-[p-4-[2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi]fenil]acetamida

Carazolol: 1-(Carbazol-4-iloxi)-3-(isopropilamino)-2-propanol

CAT: Catalasa

CBZ: Carbamazepina, 5*H*-dibenzo[*b,f*]azepina-5-carboxamida

CEC: Contaminantes emergentes (“*contaminants of emerging concern*”)

CHM: Chacra de la Merced

Ciprofloxacina: Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolina carboxílico

Citalopram: 1-[3-(Dimetilamino)propil]-1-(p-fluorofenil)-5-ftalancarbonitrilo

Claritromicina: 6-*O*-Metileritromicina

Clopidogrel: (+)-(*S*)- α -(*o*-clorofenil)-6,7-dihidrotieno[3,2-*c*]piridina-5(4*H*)-acetato de metilo

Codeína: (5 α ,6 α)-7,8-Dideshidro-4,5-epoxi-3-metoxi-17-metilmorfinan-6-ol

CR: Capilla de los remedios

DHT: Dihidrotestosterona, 17 β -Hidroxi-5 α -androstan-3-ona

Diazepam: 7-Cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-ona

Diclofenac: Ácido [*o*-(2,6-dicloroanilino)fenil] acético

10,11-EpoxiCBZ: Carbamazepina-10,11-epóxido, 1*a*,10*b*-dihidro-6*H*-dibenzo[*b,f*]oxireno[2,3-*d*]-azepina-6-carboxamida

2-HidroxiCBZ: 2-Hidroxi-5*H*-dibenzo[*b,f*]azepina-5-carboxamida

E1: Estrona, 3-hidroxi-estra-1,3,5(10)-trieno-17-ona

E2: 17 β -Estradiol, estratri-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -diol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EE2: 17 α -Etinilestradiol, 17 α -etnil-3,17 β -dihidroxi-1,3,5(10)estratrieno

Enalapril: Éster 1'-etilico de 1[N-[(*S*)-1-carboxi-3-fenilpropil]-L-alanil]-L-prolina

EROs: Especies reactivas de oxígeno

ESI: Ionización por electropulverización (“*electrospray ionization*”)

Furosemida: Ácido 4-cloro-N-(2-furilmetil)-5-sulfanoil antranílico

G. affinis: *Gambusia affinis*

GC: Cromatografía gaseosa (“*gas chromatography*”)

GPC: Cromatografía de permeación en gel (“*gel permeation chromatography*”)

GPx: Glutación peroxidasa
GR: Glutación reductasa
GSH: Glutación reducido
GSSG: Glutación oxidado
GST: Glutación *S*-transferasa
Hidroclorotiazida: 6-Cloro-3,4-dihidro-7-sulfamoilbenzo-1,2,4-tiadiazina-1,1-dióxido
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia (“*high performance liquid chromatography*”)
HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución (“*high resolution mass spectrometry*”)
J. multidentata: *Jenynsia multidentata*
LC: La Calera
Levamisol: 6-Fenil-2,3,5,6-tetrahidroimidazol[2,1-*b*]tiazol
LOD: Límite de detección de un método de análisis
LOQ: Límite de cuantificación de un método de análisis
Lorazepam: 7-Cloro-5-(*o*-cloro-fenil)-1,3-dihidro-3-hidroxi-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-ona
m/z: Cociente masa sobre carga
mDa: miliDalton
MeOH: Metanol
Metoprolol: (±)-1-(Isopropilamino)-3[*p*(2-metoxietil)fenoxi]-2-propanol
MS/MS: Espectrometría de masas en tándem
MS: Espectrometría de masas (“*mass spectrometry*”)
MT: Metiltestosterona, 17β-hidroxi-17α-metilandro-4-en-3-ona
Nadolol: 1-(*terc*-Butilamino)-3-[(5,6,7,8-tetrahidro-cis-6,7-dihidroxi-1-naftil)oxi]-2-propanol
NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
O. bonariensis: *Odontesthes bonariensis* (pejerrey)
OxCBZ: Oxcarbazepina, 10,11-dihidro-10-oxo-5*H* -dibenzo[*b,f*]azepina-5-carboxamida
PLE: Extracción líquida a presión (“*pressurized liquid extraction*”)
PPCP: Fármacos y productos de cuidado personal (“*pharmaceuticals and personal care products*”)
ppm: Partes por millón
Propranolol: 1-(Isopropilamino)-3-(1-naftaliloxi)-2-propanol
QqLiT: Analizador híbrido de triple cuadrupolo-trampa iónica lineal
QqQ: Analizador de triple cuadrupolo (“*triple quadrupole*”)
QTOF: Analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (“*quadrupole-time-of-flight*”)
RP: Río Primero

rpm: Revoluciones por minuto

RY: Río Yuspe

Salbutamol: 2-(*terc*-Butilamino)-1-(4-hidroxi-3-hidroximetil)feniletanol

Setralina: (1*S*, 4*S*)-4-(3,4-diclorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-*N*-metil-1-naftilamina

SOD: Superóxido dismutasa

Sotalol: (+)-(5)-4'-[1-Hidroxi-2-(ispropilamino)etil]metanosulfanilida

SPE: Extracción en fase sólida (“*solid phase extraction*”)

SRM: Monitoreo de reacción selectiva, ruptura ion padre-ion hijo (“*single reaction monitoring*”)

T: Testosterona, 17 β -Hidroxiandrost-4-en-3-ona

UPLC: Cromatografía líquida de ultra eficacia (“*ultra performance liquid chromatography*”)

VCM: Villa Corazón de María

Venlafaxina: (\pm)-1-[α -[(Dimetilamino)metil]-*p*-metoxibencil]ciclohexanol

RESUMEN

Los contaminantes emergentes de origen farmacéutico han sido objeto de estudio de manera creciente en las últimas dos décadas, principalmente debido a su amplia distribución en los ecosistemas acuáticos y a la capacidad de ejercer efectos en la biota e incluso en la salud humana.

En esta Tesis Doctoral se evaluó la presencia y distribución de fármacos y compuestos relacionados en agua y peces del Río Suquía (Córdoba, Argentina), junto al estudio de los efectos de dos fármacos (carbamazepina y atenolol) sobre estos peces, incluyendo biomarcadores de exposición y de efecto.

En una primera instancia, fue necesario optimizar una metodología de análisis para 15 fármacos y esteroides en muestras de agua superficial. Esta optimización se logró mediante un paso de limpieza y pre-concentración por extracción en fase sólida (SPE), seguida de separación-detección por cromatografía líquida de alta eficacia, acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HPLC-HRMS, analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo). Para el estudio en peces, fue necesario optimizar un método de extracción para carbamazepina y atenolol en pez completo. Este último método se realizó por homogeneización, extracción asistida por ultrasonido, limpieza y pre-concentración de los extractos por SPE. Un método similar de extracción fue aplicado para el análisis del contenido de ambos fármacos y sus metabolitos en distintos órganos de pez (branquias, intestino, hígado, cerebro y músculo). Finalmente, para el análisis de fármacos en peces capturados a campo (sitios contaminados), se utilizó una metodología basada en literatura (Huerta *et al.*, 2013), logrando menores límites de detección mediante la utilización de extracción líquida a presión (ASE), limpieza por cromatografía de permeación en gel (GPC), seguido de separación-detección por cromatografía líquida de ultra eficacia y espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS, analizador de triple cuadrupolo).

Para verificar la presencia de fármacos y productos relacionados en aguas superficiales de la cuenca del Río Suquía, se llevaron a cabo cuatro campañas de monitoreo. Se definieron seis sitios de muestreo: un sitio de referencia, en el Río Yuspe (cuenca alta), y cinco sitios en la cuenca media y baja del Río Suquía. Los muestreos se realizaron tanto en temporada húmeda como seca, durante el período 2011-2012, para contemplar cambios temporales y espaciales

en la cuenca. No se detectaron compuestos de origen farmacéutico en agua superficial (fase disuelta) aguas arriba de la Ciudad de Córdoba. Sin embargo, si se determinó la presencia de fármacos y esteroides aguas abajo de la Estación Depuradora de Aguas Residuales de Córdoba (EDAR)-Bajo Grande, hasta la localidad de Río Primero (70 km aguas abajo de la EDAR), tanto en temporada húmeda como seca. Se detectaron 6 fármacos (atenolol, diclofenac, carbamazepina, oxcarbazepina, ciprofloxacina, enalapril) y 2 esteroides naturales (estrón y dihidrotestosterona) disueltos en el agua. El rango de concentración encontrado varió entre 2 y 481 ng/L. Los contaminantes más frecuentemente detectados fueron atenolol (ATE), diclofenac y carbamazepina (CBZ). También se detectaron 20 fármacos de uso humano y veterinario (psiquiátricos, β -bloqueantes, analgésicos/antiinflamatorios, anticoagulante, diurético, broncodilatador y antiparasitario), en peces (*Gambusia affinis* y *Jenynsia multidentata*) recolectados aguas abajo de la EDAR. El rango de concentración hallado en estos peces varió entre 0,4 y 41 ng fármaco/g peso húmedo de pez. Los factores de bioacumulación para ATE, diclofenac y CBZ en los peces estudiados oscilaron entre 12 y 208 L/kg. La temporada seca, que presenta un menor caudal del río, fue la época que mostró mayor concentración de fármacos en el Suquia, tanto en agua como en peces.

En bioensayos de laboratorio, se evaluó la bioconcentración (biomarcador de exposición) de CBZ y ATE en peces. Los factores de bioconcentración en *G. affinis* (pez completo), fueron cercanos a 1 L/kg para CBZ, y menores a 1 L/kg para ATE, luego de 96 h de exposición. Asimismo, se evaluó la bioconcentración de CBZ y dos de sus metabolitos (carbamazepina-10, 11-epóxido y 2-hidroxicarbamazepina) en órganos de *J. multidentata*, luego de 48 h de exposición. Los factores de bioconcentración de CBZ en distintos órganos de este pez oscilaron entre 5-9 L/kg, siendo cerebro e hígado los órganos que mostraron mayor acumulación del fármaco y los metabolitos estudiados.

Como biomarcadores de efecto, frente a la exposición a CBZ y ATE, se evaluaron cambios en el sistema enzimático antioxidante (actividad de las enzimas catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa), de detoxificación (actividad de glutatión *S*-transferasa), cambios en la actividad de acetilcolinesterasa (neurotransmisión colinérgica), y en la actividad natatoria de *J. multidentata*. La exposición a CBZ indujo cambios en el sistema antioxidante y de detoxificación de este pez, principalmente en intestino, sumado a activación de acetilcolinesterasa (cerebro, músculo e hígado). Las respuestas de estos biomarcadores de efecto fueron variables según la concentración de CBZ y el tiempo de exposición. El

comportamiento natatorio, por el contrario, no mostro un patrón claro de dosis-respuesta. Por otro lado, la exposición de *J. multidentata* a ATE no produjo cambios significativos en el sistema antioxidante ni de detoxificación. Sin embargo, la exposición a ATE indujo inhibición de acetilcolinesterasa, aumento de la actividad natatoria y del comportamiento exploratorio. De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer informe de cambios en el comportamiento y en la actividad de acetilcolinesterasa en peces (*in vivo*) causados por ATE. Asimismo es el primer informe de metabolitos de CBZ en órganos de pez.

ABSTRACT

Contaminants of emerging concern, mainly of pharmaceutical origin, have been an increasingly research topic over the past two decades, because of their ubiquity in aquatic ecosystems and their potential to cause effects on biota and human health.

In this PhD thesis, the presence and distribution of pharmaceuticals and related compounds in water and fish of the Suquía River (Córdoba, Argentina) was evaluated, together with the study of carbamazepine and atenolol effects on fish, by measuring changes in biomarkers of exposure and effect.

Firstly, it was necessary to optimize the methodology of analysis of 15 pharmaceuticals and steroids in surface water samples. The optimization was accomplished by clean-up and pre-concentration using solid phase extraction (SPE), followed by separation and detection of compounds through high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS, time-of-flight analyzer). An extraction methodology was optimized to study carbamazepine and atenolol in whole fish homogenates. This was accomplished by homogenization, ultrasonication extraction, clean-up and pre-concentration of extracts by SPE. A similar extraction methodology was applied to study both pharmaceuticals and their metabolites in fish organs (gills, intestine, liver, brain and muscle). Finally, a previously described methodology was applied for the analysis of pharmaceuticals in fish from polluted sites in the river. Good limits of detection were achieved with this method, using accelerated solvent extraction (ASE), gel permeation chromatography for clean-up (GPC) followed by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS, triple quadrupole analyzer).

Four monitoring campaigns were carried out to measure pharmaceuticals and related compounds in surface waters from the Suquía River basin. Six monitoring stations were defined: a reference site, Yuspe River (in the high basin area) and five sampling stations in the middle and lower basin area. Samples were taken twice during wet and dry season (period 2011-2012), to account for temporal and spatial variations along the basin. Pharmaceutical compounds were not detected in the dissolved phase of water samples at monitoring stations upstream from Córdoba city. However, pharmaceuticals and steroids were detected downstream from the wastewater treatment plant of Córdoba (WWTP-Bajo Grande), until Rio Primero station (located 70 km downstream the WWTP), during both wet and dry seasons.

Six pharmaceuticals (atenolol, diclofenac, carbamazepine, oxcarbazepine, ciprofloxacin and enalapril) and two natural steroids (estrone and dihydrotestosterone) were detected in the dissolved phase of water samples, in the range 2-481 ng/L. The most frequently detected contaminants were atenolol (ATE), diclofenac and carbamazepine (CBZ). Twenty pharmaceuticals of human and veterinary use (psychiatric, β -blockers, analgesics/anti-inflammatories, an antiplatelet agent, a diuretic, a bronchodilator and an anthelmintic) were detected in fish (*Gambusia affinis* y *Jenynsia multidentata*) collected downstream the WWTP. Concentration of pharmaceutical in fish ranged from 0.4 to 41 ng/g wet weight. Bioaccumulation factors for ATE, diclofenac and CBZ in studied fish ranged from 12 to 208 L/kg. Dry season, with lower river flow, was the season showing the highest pharmaceuticals concentration, both in water and fish compartments. To our knowledge, this is the first report of pharmaceuticals in the Suquía basin, and the second report of such compounds in rivers from Argentina.

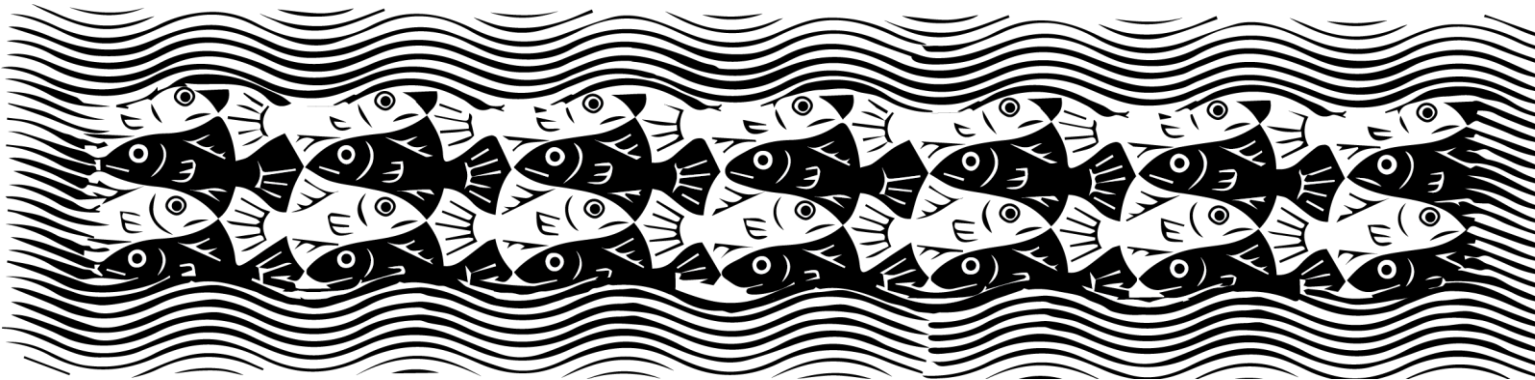
The bioconcentration of CBZ and ATE in fish was evaluated in laboratory bioassays. After 96 h exposure, bioconcentration factors in *G. affinis* (whole fish homogenates) were almost 1 L/kg for CBZ and less than 1 L/kg for ATE. In addition, bioconcentration of CBZ and two metabolites (carbamazepine-10,11-epoxide and 2-hydroxycarbamazepine) was measured in organs of *J. multidentata* after 48 h exposure. Bioconcentration factors ranged from 5 to 9 L/kg, being brain and liver the organs with the highest CBZ and metabolites accumulation.

Changes in the enzymatic antioxidant defense system (catalase, glutathione reductase and glutathione peroxidase activities), detoxification system (glutathione *S*-transferase), acetylcholinesterase activity (cholinergic neurotransmission) and swimming behavior of *J. multidentata* were measured as biomarkers of effect upon exposure to CBZ and ATE. CBZ exposure induced changes in the antioxidant defense and detoxification systems of *J. multidentata*, mostly in intestine, while acetylcholinesterase activity was significantly increased in brain, muscle and liver. The response of effect biomarkers was variable according to CBZ concentration and exposure time. Conversely, swimming behavior did not show a clear dose-response pattern. On the other hand, ATE exposure did not cause significant changes in the antioxidant defense and detoxification systems of *J. multidentata*. However, ATE exposure induced inhibition of the acetylcholinesterase activity and increased locomotion and exploratory behavior. To our knowledge, this is the first study reporting

changes in the swimming behavior and acetylcholinesterase activity in fish (*in vivo*) caused by ATE. In addition, this is the first report on CBZ metabolites in fish organs.

CAPITULO 1

INTRODUCCION GENERAL



1.1 Contaminación de agua dulce por compuestos de origen farmacéutico

Los ecosistemas de agua dulce son esenciales para el desarrollo y el bienestar humano por los servicios que estos brindan, como el aporte de agua y alimentos, la reducción de los desechos generados por el hombre y la capacidad de actuar como reguladores del clima. La sobreexplotación y contaminación de estos recursos impacta negativamente sobre su integridad y la biota que forma parte de los mismos, afectando directamente a los servicios que prestan y por lo tanto al bienestar humano. La gestión de nuestros recursos hídricos de una manera sostenible y equitativa es fundamental para el sustento de la vida, la salud y la dignidad de los pueblos, y constituye una de las bases esenciales de nuestro desarrollo social y económico (PNUMA 2007, 2012).

La contaminación de los recursos acuáticos, es una problemática de creciente importancia en las últimas décadas, debido al uso cada vez más intensivo de estos recursos por las demandas del crecimiento poblacional, el cual no se ve acompañado en igual medida de políticas sustentables para garantizar su integridad y el mantenimiento de las funciones ecosistémicas, de vital importancia para todos los organismos, incluidos los seres humanos. Las plantas de tratamiento de efluentes, diseñadas para disminuir la carga de contaminantes, no logran la remoción completa de todos compuestos que traen los efluentes, por lo cual una gran variedad de contaminantes ingresa a los ecosistemas acuáticos (Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2004).

Así, el avance de métodos analíticos sensibles, como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, ha llevado a la identificación de contaminantes orgánicos a niveles de trazas en matrices ambientales. Dentro de estos se encuentran los llamados “contaminantes de preocupación emergente” (CEC por sus siglas en inglés, “*Contaminants of Emerging Concern*”) o simplemente “contaminantes emergentes”. Los mismos han sido definidos como compuestos químicos, materiales sintéticos o naturales, que han sido recientemente descubiertos, o se sospecha que están presentes en varios compartimentos ambientales, y cuya persistencia y/o toxicidad es probable que altere significativamente el metabolismo de un ser vivo (Sauvé y Desrosiers, 2014). En general, los CECs son compuestos que poseen un riesgo para el ambiente o la salud humana y aún no se encuentran regulados. Dentro de este grupo, se encuentran los fármacos y productos de cuidado personal (PPCP: “*Pharmaceuticals and Personal Care Products*”). De acuerdo a la Farmacopea Argentina (Ministerio de Salud de la Nación, 2013), un *principio activo* o *droga farmacéutica* es toda sustancia química o mezcla

de sustancias relacionadas, de origen natural o sintético, que poseyendo un efecto farmacológico específico, se emplea en medicina humana. En el contexto ambiental, “fármaco” abarca principios activos tanto de uso humano como drogas de uso veterinario. Los productos de cuidado personal se utilizan para mejorar la calidad de vida e incluyen productos como fragancias, cosméticos, champú, tinturas de pelo, desodorantes y pasta dental. Los PPCPs son compuestos biológicamente activos, diseñados para interactuar con vías y procesos específicos en humanos y animales, por lo cual ha crecido la preocupación en cuanto a los potenciales efectos de los mismos en la salud humana y ambiental (Boxall *et al.*, 2012).

1.2 Destino ambiental de fármacos en el ambiente

Existe un consumo creciente de productos farmacéuticos a nivel mundial, principalmente derivados de la práctica terapéutica occidental (Daughton y Ruhoy, 2013). En la Unión Europea aproximadamente 3000 sustancias distintas se usan como ingredientes farmacéuticos en la medicina humana (Fent *et al.*, 2006). Entre ellos los más consumidos son analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos (ácido acetil-salicílico, paracetamol, ibuprofeno, diclofenac); antibióticos (penicilina, sulfonamidas, macrolidas); antidiabéticos (metformina); antiepilépticos (carbamazepina); β -bloqueantes (atenolol, metoprolol); anticonceptivos (etinilestradiol); reguladores de lípidos (atorvastatina, clofibrato); antidepresivos (fluoxetina, diazepam, risperidona); antihistamínicos (loratadina), entre otros (Fent *et al.*, 2006; Khetan y Collins, 2007; Martin-Diaz *et al.*, 2009).

En la Argentina, el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC) ha publicado informes de los grupos terapéuticos más vendidos por las 75 empresas que comprenden el núcleo de la Industria Farmacéutica. En el 2010, los medicamentos que representaron las mayores ventas fueron los que tratan afecciones del sistema nervioso, patologías del aparato digestivo y metabolismo y enfermedades del aparato cardiovascular (Fig. 1.1). Esta estructura de ventas se ha mantenido invariante desde 2003 (INDEC, 2010). Sin embargo, no se ha encontrado información respecto a los principios activos más consumidos en el país, y en particular en la ciudad de Córdoba (INDEC, Colegio de Farmacéuticos de Córdoba, Centro de Información de Medicamentos-Fac. de Cs. Químicas-Univ. Nacional de Córdoba).

Los compuestos parentales y/o metabolitos de fármacos de uso humano ingresan a los ecosistemas acuáticos a través de los sistemas cloacales o cámaras sépticas, luego de su consumo y excreción por orina y heces (Fig. 1.2) (Fent *et al.*, 2006). Los fármacos de uso

veterinario ingresan al ambiente acuático mayoritariamente por aplicación directa en la acuicultura y por el uso de estiércol, biosólidos (lodos de plantas de tratamiento) o excreción directa de ganado en los campos y subsecuente escorrentía (EMEA/CHMP 2006; Mompelat *et al.*, 2009; Christen *et al.*, 2010; Boxall *et al.*, 2012).

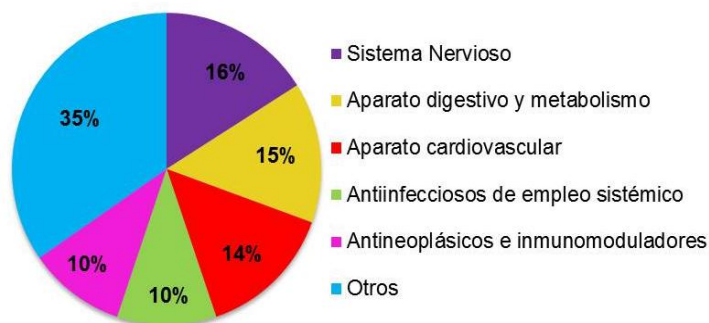


Fig. 1.1. Medicamentos de mayor facturación promedio de la Industria Farmacéutica Argentina durante el 2010, clasificados por grupo anatómico (INDEC, 2010).

Existen otras vías de exposición como emisiones de fábricas de medicamentos, disposición de medicamentos sin usar en rellenos sanitarios, riego con aguas residuales, emisiones clandestinas y disposición de animales muertos tratados con medicamentos (Boxall *et al.*, 2012). Esto conduce a la contaminación de suelos y, dependiendo de las características del mismo, los fármacos pueden ingresar al agua subterránea por percolación (Mompelat *et al.*, 2009; López-Serna *et al.*, 2013). Aunque en menor medida, también pueden encontrarse en el agua potable e incluso en cultivos agrícolas irrigados con aguas contaminadas (Mompelat *et al.*, 2009; Shenker *et al.*, 2011).

A nivel mundial, se han detectado un gran número de fármacos en efluentes y lodos de plantas de tratamiento, en el orden de $\mu\text{g/L}$ - mg/kg (Miège *et al.*, 2009; Sim *et al.*, 2010; Verlicchi *et al.*, 2012). En cursos de agua superficial, principalmente receptores de efluentes, se han detectado fármacos en el orden de ng/L - $\mu\text{g/L}$, mientras que en agua subterránea y agua potable en el orden de ng/L (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Heberer, 2002; Kolpin *et al.*, 2002; Fent *et al.*, 2006; Khetan y Collins, 2007; Mompelat *et al.*, 2009; Gros *et al.*, 2012; Li, 2014). En suelos y sedimentos los fármacos alcanzan niveles de $\mu\text{g/kg}$ (Li, 2014). También han sido detectados en la biota acuática, así como en alimentos (Huerta *et al.*, 2012; Sabourin *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Zenker *et al.*, 2014).

Los fármacos de uso humano ingresan continuamente a los sistemas acuáticos, por lo que los organismos acuáticos se encuentran expuestos a los mismos durante toda su vida. En

consecuencia los fármacos, aun ingresando en baja concentración, son considerados como “*pseudo-persistentes*”, cuando sus vidas medias son excedidas por las tasas de ingreso desde los efluentes (Ankley *et al.*, 2007).

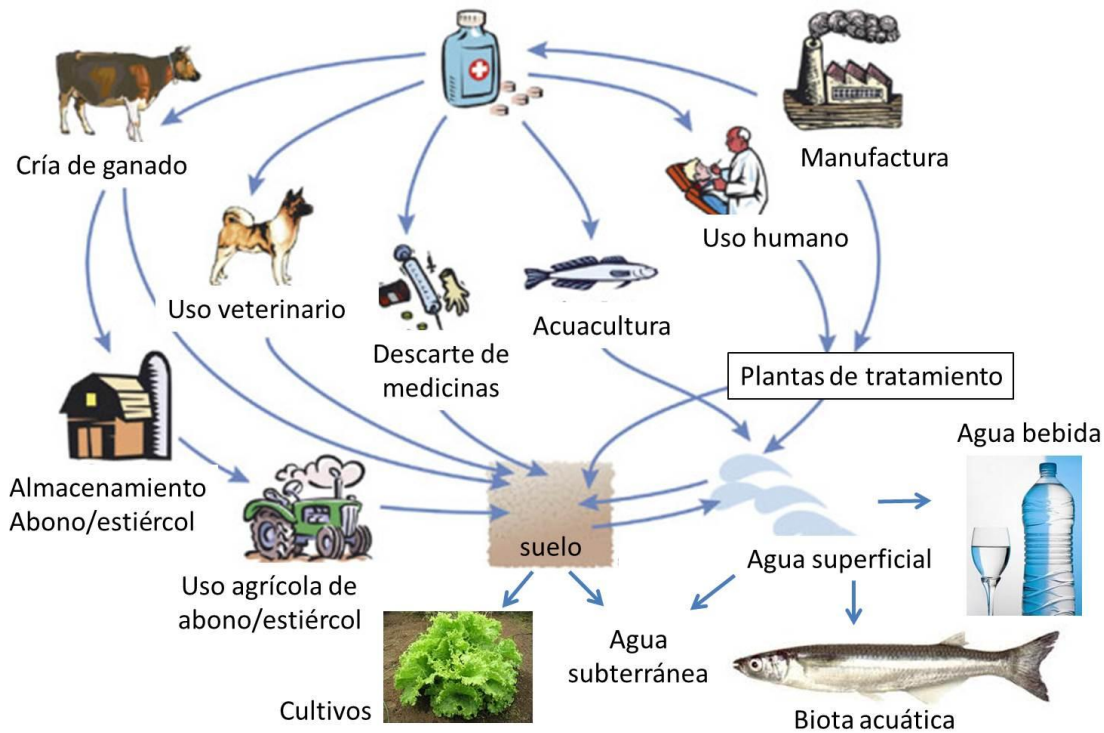


Fig. 1.2. Ingreso de fármacos al ambiente (Boxall *et al.*, 2012, con modificaciones).

1.3 Efectos de fármacos sobre la biota acuática

Los fármacos son diseñados para tener baja toxicidad aguda, pero alta potencia en bajas dosis para afectar una vía biológica específica. La gran preocupación al respecto es que algunas de estas vías están altamente conservadas a través de los distintos *phyla* (vertebrados), por lo cual los fármacos diseñados para producir un efecto en humanos o cría de ganado tienen alta probabilidad de ser biológicamente activos en la biota silvestre (Corcoran *et al.*, 2010).

En los últimos 15 años, se ha trabajado intensamente a nivel mundial para determinar la ocurrencia, destino ambiental, efectos y riesgos de los fármacos en el ambiente (Boxall *et al.*, 2012). Por ejemplo, desde 1993 en la Unión Europea los productos medicinales que salen al mercado requieren una evaluación de riesgo ambiental, la cual entró en vigencia en el 2006 (EMEA/CHMP 2006; Kuster *et al.*, 2009). En la Argentina no se han elaborado aún dichas regulaciones o normativas.

En la bibliografía se mencionan efectos de toxicidad aguda y crónica, medidos a través de ensayos ecotoxicológicos regulares en diversos organismos expuestos a concentraciones de fármacos desde ng/L a mg/L (Crane *et al.*, 2006; Fent *et al.*, 2006; Corcoran *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010). Sin embargo, respuestas como cambios histológicos, bioquímicos, efectos en el comportamiento y cambios en la regulación de genes (sobre o sub-regulación) se han observado a concentraciones menores que las anteriormente mencionadas, por lo cual se ha sugerido el uso de biomarcadores más específicos en relación al modo de acción de los fármacos (Fent *et al.*, 2006; Boxall *et al.*, 2012). Un biomarcador se define como un cambio en una respuesta biológica, a nivel molecular, celular, fisiológico y/o cambios en el comportamiento de un organismo que se puede relacionar con la exposición o efectos tóxicos de contaminantes ambientales (van der Oost *et al.*, 2003). Uno de los principales motivos del uso de biomarcadores es que proveen información en cuanto a efectos biológicos de los contaminantes sobre la biota, más que su cuantificación ambiental, así como información sobre los mecanismos de acción de los mismos. Un bioindicador es un organismo (o parte de un organismo o una comunidad de organismos) que contiene información sobre la calidad del ambiente (o parte del mismo) (Markert *et al.*, 2003a). En este sentido, los peces son organismos muy utilizados como bioindicadores ya que, debido al nicho ecológico que ocupan y a que muchos de sus procesos fisiológicos son similares a los de mamíferos, son probablemente los organismos vertebrados más afectados por fármacos en el ambiente acuático (Corcoran *et al.*, 2010).

1.4 Situación local

En la provincia de Córdoba, Argentina, la cuenca del Río Suquía cubre aproximadamente 7.700 km², de los cuales 900 km² corresponden al área de drenaje de la ciudad capital. El rápido crecimiento de la población de Córdoba (duplicada en los últimos 20 años) es un factor de presión importante, ya que, además de no contar al momento con un tratamiento eficaz de reducción de contaminantes, la estación depuradora de aguas residuales de la ciudad (EDAR-Bajo Grande) realiza descargas directas al río cuando su capacidad se ve sobrepasada, como también lo hacen clandestinamente industrias y asentamientos poblacionales de la zona (Hued y Bistoni, 2005). A través de varios estudios en la cuenca, se ha demostrado que las actividades antrópicas impactan negativamente sobre la calidad del agua y sedimentos, afectando también a la ictiofauna, lo cual es particularmente notorio en las localidades situadas aguas abajo de la descarga de la EDAR (Pesce y Wunderlin, 2000; Wunderlin *et al.*,

2001; Hued y Bistoni, 2005; Merlo *et al.*, 2011; Monferrán *et al.*, 2011; Maggioni *et al.*, 2012; Bonansea *et al.*, 2013). No existen al momento evidencias de mediciones de residuos de origen farmacéutico en la cuenca del Río Suquía ni de los potenciales efectos ecotoxicológicos sobre la biota nativa. Evaluar el ingreso y efectos de fármacos en especies ícticas locales que puedan ser utilizadas como centinela es muy importante para entender cómo pueden afectar los fármacos a las poblaciones de peces y contribuir a la preservación de nuestros ecosistemas acuáticos. Por otra parte, el efecto de un contaminante sobre la biota varía de acuerdo a la especie, el sexo, las concentraciones del tóxico, el tiempo de exposición al mismo y las características físicas y químicas del medio, lo cual podría ocasionar que las especies autóctonas respondan de modo diferente a las exóticas. *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) (Fig. 1.3) es una especie íctica autóctona utilizada como modelo de estudio, la cual se encuentra ampliamente distribuida en la región neotropical de Sudamérica, desde la provincia de Río Negro (Argentina) a la ciudad de Río de Janeiro (Brasil) (Malabarba *et al.*, 1998). Esta especie presenta la habilidad de adaptarse a una gran variedad de ambientes, incluyendo aquellos contaminados (Haro y Bistoni, 1996; Malabarba *et al.*, 1998; Hued y Bistoni 2005), y ha sido utilizada en numerosos estudios de toxicidad en laboratorio y en monitoreos a campo (Cazenave *et al.*, 2005, 2008; Pesce *et al.*, 2008; Amé *et al.*, 2009; Ballesteros *et al.*, 2007, 2009a, 2009b; Monferrán *et al.*, 2011; Guyón *et al.*, 2012; Guyón *et al.*, 2012; Hued *et al.*, 2012; Maggioni *et al.*, 2012). Asimismo se ha utilizado como bioindicador otra especie íctica del mismo orden taxonómico, *Gambusia affinis* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes) (Fig. 1.3) (Hued y Bistoni, 2005; Maggioni *et al.*, 2012; Rautenberg *et al.*, 2015). *G. affinis* es una especie introducida interesante de estudiar por su capacidad invasiva y de adaptación, lo cual le permite habitar tanto sitios no contaminados como contaminados (Hued y Bistoni, 2005; Grapputo *et al.*, 2006). Se ha usado como modelo ecotoxicológico por su facilidad de mantenimiento en condiciones de laboratorio y su amplia distribución a nivel mundial (Orlando *et al.*, 2005), incluyendo varios puntos a lo largo del Río Suquía (Hued y Bistoni, 2005, 2007), lo cual permite comparar los resultados obtenidos en esta especie con otros sitios de distintas regiones del mundo.



Fig. 1.3. Ejemplares adultos hembras de *Jenynsia multidentata* (izquierda) y *Gambusia affinis* (derecha).

En relación a la problemática de los fármacos en el ambiente, se ha resaltado la necesidad de mayor participación de la comunidad científica en el proceso regulatorio (Ankley *et al.*, 2007). Por este motivo, y considerando los antecedentes antes mencionados, se juzgó de importancia investigar la presencia de fármacos y compuestos relacionados en la cuenca del Río Suquía, sumado al estudio del efecto que los mismos producen en dos especies ícticas (*J. multidentata* y *G. affinis*) presentes en la misma.

1.5 Objetivos generales y específicos

Objetivos generales:

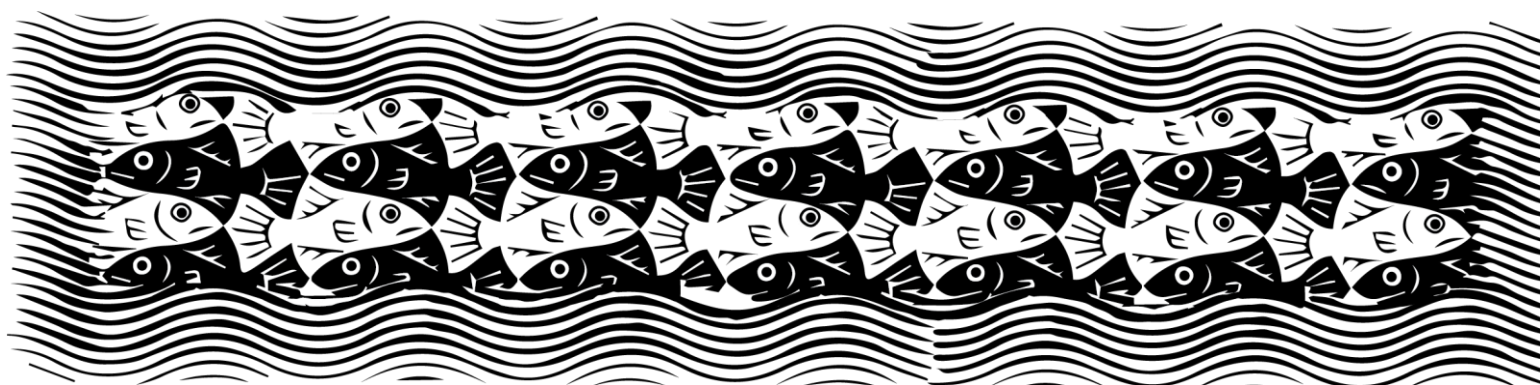
- Evaluar la presencia y distribución de fármacos y compuestos relacionados, o sus metabolitos, en agua y peces del Río Suquía (Córdoba, Argentina).
- Evaluar el efecto de estos contaminantes emergentes sobre los peces, a través del análisis de diversos biomarcadores evaluados en bioindicadores propios de la cuenca.

Para poder cumplir con estos objetivos generales, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1- Optimizar métodos para el análisis de fármacos y compuestos relacionados a nivel de traza en agua dulce natural (cuenca del Río Suquía) y en tejidos de peces que habitan la cuenca.
- 2- Estudiar la distribución espacial y temporal de fármacos y compuestos relacionados en agua y peces del Río Suquía.
- 3- Determinar la respuesta de biomarcadores de exposición (bioconcentración), de efecto fisiológico (respuesta de enzimas antioxidantes, de detoxificación y colinesterasas) y conductual (comportamiento natatorio) en peces expuestos a carbamazepina y atenolol.
- 4- Determinar cuál/es de los biomarcadores utilizados es el más apropiado para evaluar el efecto de los fármacos seleccionados sobre los peces.

CAPITULO 2

OPTIMIZACION METODOLOGICA DE ANALISIS DE FARMACOS Y COMPUESTOS RELACIONADOS EN AGUA Y PECES



2.1 Introducción

Los fármacos abarcan un grupo amplio de compuestos de diferente estructura química y propiedades físicas-químicas. En general, son compuestos de características polares/semi-polares, pero varían en sus propiedades físicas-químicas, como la solubilidad en agua, acidez e hidrofiliidad/hidrofobicidad (Tabla 2.1) (Li, 2014). Estas propiedades determinan el destino ambiental de los fármacos y en qué matriz se los encontrará en mayor proporción (por ejemplo, aquellos hidrofílicos se encontrarán mayoritariamente en agua y los hidrofóbicos adsorbidos a partículas sólidas o en la biota), lo que determinará la estrategia metodológica a seguir para el análisis de los mismos.

Tabla 2.1. Indicadores de riesgo ambiental de los grupos terapéuticos más estudiados y nivel de hidrofobicidad (Kow: coeficiente de partición octanol-agua) de fármacos (Khetan y Collins, 2007; Mompelat *et al.*, 2009).

FARMACO	INDICADOR DE RIESGO	Kow < 2,5	2,5 < Kow < 4	Kow > 4
analgésicos	Alta prescripción venta sin receta detectados en el ambiente	aspirina (ácido acetilsalicílico) paracetamol (acetaminofeno)	diclofenac ibuprofeno naproxeno	indometacina ácido tolfenámico
antibióticos	grandes volúmenes detectado en el ambiente toxicidad y resistencia bacteriana	betalactámicos (penicilinas) quinolonas sulfonamidas (sulfametoxazol)	macrolidas	fenol (triclosan)
β-bloqueantes	grandes volúmenes detectado en el ambiente	atenolol metoprolol sotalol	propranolol	
antiepilépticos	grandes volúmenes prescripción a largo plazo persistencia	carbamazepina fenobarbital		
reductores de lípidos séricos	prescripción a largo plazo comúnmente detectados		clofibrato	atorvastatina gemfibrozilo
antidepresivos	sujetos a pruebas de toxicidad	oxazepam	diazepam risperidona	fluoxetina
hormonas	tratamientos más estudiados elevada toxicidad comúnmente detectados		etinilestradiol	
antihistamínicos	de tenencia común sin prescripción		difenhidramina	loratadina

Para evaluar la presencia y distribución de los fármacos en el ambiente se necesitan métodos analíticos confiables y eficientes. Las bajas concentraciones, alta polaridad e

inestabilidad térmica de estos compuestos, sumado a la interacción con matrices ambientales complejas, hacen de su análisis, y en particular el pre-tratamiento de la muestra, un desafío. La estrategia estándar de análisis establecida hasta el momento es el pre-tratamiento de la muestra seguido de separación por cromatografía líquida o gaseosa (HPLC o GC) y detección por espectrometría de masas (MS) (Ramirez *et al.*, 2007).

La elección del grupo de fármacos a analizar se basa generalmente en consideraciones en cuanto al consumo local, la toxicidad para la flora y fauna acuática y/o humanos, y en la persistencia de los compuestos en el ambiente (Mompelat *et al.*, 2009). Siguiendo este criterio, los grupos terapéuticos más estudiados en la bibliografía incluyen las drogas antiinflamatorias no esteroideas, antibióticos, β -bloqueantes, antiepilépticos, reductores de lípidos séricos, antidepresivos, hormonas y antihistamínicos (Tabla 2.1) (Khetan y Collins, 2007).

En los últimos años ha aumentado la tendencia al análisis simultáneo de un gran número de compuestos diversos, buscando el menor esfuerzo analítico posible (Gracia-Lor *et al.*, 2011; Gros *et al.*, 2012). Los fármacos, por sus características polares, no se extraen directamente de las muestras acuosas por los procedimientos convencionales. Los métodos actuales de análisis en agua incluyen una etapa de pre-tratamiento y concentración de la muestra: filtración y ajuste de pH, dependiendo el grupo de compuestos a analizar, seguido de extracción por partición líquido-sólido (SPE, “*Solid Phase Extraction*”). La SPE cumple doble función como etapa de purificación y pre-concentración de la muestra. Se han utilizado distintas combinaciones de cartuchos de fase reversa, según el grupo de compuestos a analizar y las características de la matriz acuosa, como polímeros de características hidrofílicas-lipofílicas (por ejemplo el copolímero formado por *N*-vinilpirrolidona, hidrófilo y divinilbenceno, hidrófobo, los más comúnmente utilizados), cartuchos con fases sólidas netamente hidrofóbicas (como octadecilsilano-C18), o cartuchos con fases sólidas mixtas, modificadas para favorecer el intercambio catiónico (por ejemplo copolímero divinilbenceno-*N*-vinilpirrolidona modificado con grupos ácidos sulfónicos).

La extracción de fármacos desde tejidos biológicos es aún más compleja por la presencia de otros componentes en la matriz como lípidos, proteínas y pigmentos, que se convierten en interferentes en el análisis. La extracción asistida por ultrasonido es la técnica más comúnmente usada para la extracción de diferentes grupos de fármacos desde tejidos biológicos (Huerta *et al.*, 2012). Algunos procedimientos más avanzados están basados en

extracción líquida a presión (PLE, “*Pressurized Liquid Extraction*”), también conocida como extracción acelerada con solvente (ASE, “*Accelerated Solvent Extraction*”), la cual consiste en extracción de muestras sólidas o semi-sólidas con solvente a alta presión y temperatura, por períodos cortos (10-20 min por muestra), minimizando el uso de solvente. En la etapa de purificación se ha utilizado la extracción en fase sólida (SPE, similar a la utilizada para la extracción de fármacos a partir de aguas), cromatografía de adsorción (columnas con fase estacionaria de alúmina, sílica o florisil) y cromatografía de permeación en gel (GPC), entre otros métodos (Ternes, 2001; Fatta *et al.*, 2007; Kot-Wasik *et al.*, 2007; Richardson y Ternes, 2011).

Luego de la extracción, la muestra se somete a separación en una columna cromatográfica, utilizando la espectrometría de masas como técnica preferida para la detección y cuantificación. Si bien la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) puede seguir siendo la técnica ideal para determinados fármacos, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), acoplada a ionización a presión atmosférica-espectrometría de masas (API-MS), se ha establecido como la técnica de preferencia para el análisis simultáneo de un grupo amplio de fármacos de diferentes estructuras químicas (Buchberger, 2007). La interfaz más ampliamente usada en el análisis de fármacos es la ionización por electropulverización (ESI, “*electrospray*”). Sin embargo, una de las principales desventajas de la ESI es el efecto matriz (modificación de la señal del analito, producto del aumento o disminución de la ionización, causada por compuestos de la matriz co-eluidos con el analito) (Zhao y Metcalfe, 2008). El efecto más comúnmente informado es la supresión iónica (disminución de la señal del analito), la cual ocurre en matrices complejas cuando no se logra una adecuada limpieza (“*clean-up*”) de la muestra (Gros *et al.*, 2009). En general, la supresión iónica se produce por una interacción entre el ion procedente del analito con otros iones formados en la cámara de ESI, dando lugar a especies no-iónicas o a iones de distinta relación masa/carga (m/z). La evaluación y compensación de este efecto es un componente importante en la validación de métodos de análisis de fármacos en muestras ambientales, especialmente cuando se analizan extractos de muestras con matrices complejas (Zhao y Metcalfe, 2008).

Los espectrómetros de masas con analizador de triple cuadrupolo (QqQ) han sido ampliamente adoptados en combinación con HPLC para el análisis ambiental. Los equipos de QqQ permiten aislar el ión procedente del analito de interés en el primer cuadrupolo, la ruptura de este ión en el segundo cuadrupolo (generalmente mediado por colisión con un gas

inerte y la aplicación de un voltaje apropiado), y el análisis de los fragmentos resultantes de esta ruptura en el tercer cuadrupolo. Este proceso es una de las técnicas de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y permite disminuir hasta niveles mínimos el “ruido” que interfiere en la detección de los iones de interés. Estos equipos también evitan resultados de tipo “falso-positivos” si se utiliza el cociente de intensidad de al menos dos transiciones (rupturas) ion padre-ion hijo (SRM, “*single reaction monitoring*”). Como una alternativa a los QqQ, se han utilizado los espectrómetros de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF). Los analizadores de tiempo de vuelo permiten la medida de la masa exacta, con errores típicamente menores a 2 mDa. En combinación con un cuadrupolo, el TOF permite la adquisición de espectros de masas en modo barrido completo (“*full scan*”, en un rango de m/z determinado) de los iones “padre” con alta resolución de masas, así como también permite realizar rupturas y análisis de los fragmentos (MS/MS) en alta resolución, para minimizar el riesgo de falsos positivos (Buchberger, 2007). La diferencia entre los analizadores de triple-cuadrupolo y los equipos de alta resolución es la sensibilidad, que es mayor en los triple-cuadrupolo, por al menos uno o dos órdenes de magnitud, lo que suele ser crucial para el análisis de contaminantes ambientales a niveles de trazas.

Finalmente cabe destacar que, si bien en otros países ya se cuenta con protocolos estandarizados para el análisis de fármacos y productos de uso personal (por ejemplo el método EPA-*Environmental Protection Agency*-1694) así como para el análisis de esteroides (EPA 1698) en matrices ambientales, en la Argentina se carece de este tipo de normativas o protocolos estandarizados y validados por organismos oficiales reconocidos.

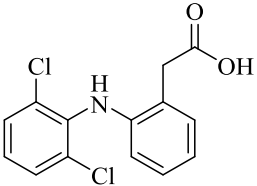
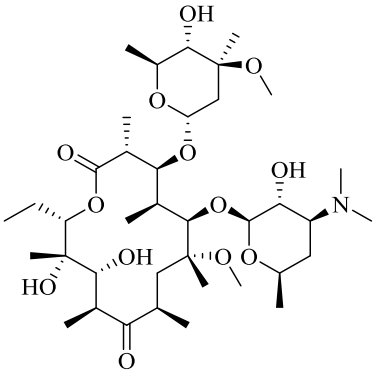
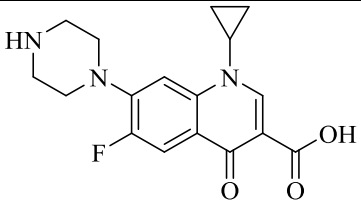
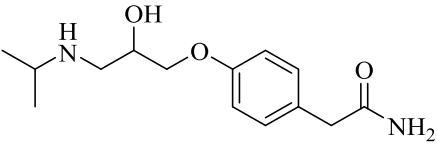
Por este motivo se consideró de importancia optimizar métodos analíticos sensibles, con el instrumental disponible en nuestro país, para el análisis de fármacos en muestras de agua y peces del Río Suquía. En primer lugar se seleccionaron 15 compuestos a analizar en base a su frecuencia de consumo local (Obra social DASPU-Dirección de Asistencia Social del Personal Universitario-), frecuencia de aparición en cuencas hídricas superficiales de otros países (Mompelat *et al.*, 2009), importancia biológica en base a efectos publicados (Santos *et al.*, 2010), disponibilidad de estándares comerciales y posibilidades de detección en los equipos utilizados. Los analitos seleccionados incluyen distintas clases terapéuticas de fármacos y hormonas esteroideas, a saber: antiinflamatorios (diclofenac), β -bloqueantes (atenolol, propranolol), antibióticos (ciprofloxacina, claritromicina), diuréticos-antihipertensivos (enalapril, furosemida), antiepilépticos (carbamazepina, oxcarbazepina),

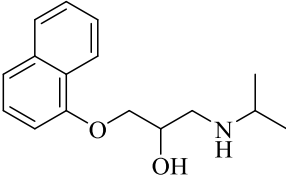
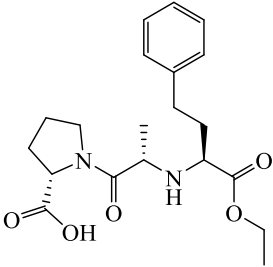
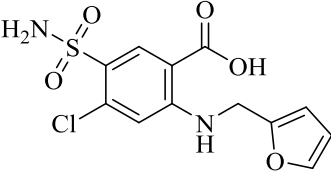
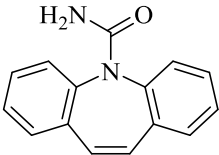
andrógenos (testosterona, androstenodiona, dihidrotestosterona y metiltestosterona) y estrógenos (17α -etinilestradiol, 17β -estradiol, estrona) (Tabla 2.2).

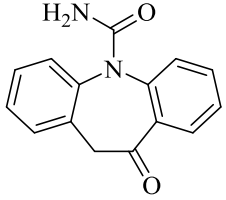
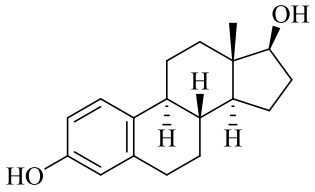
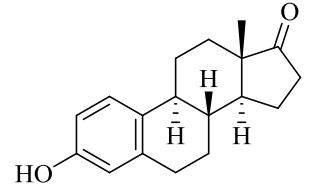
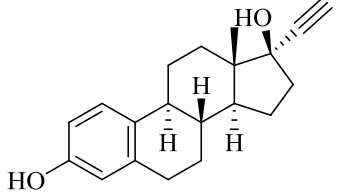
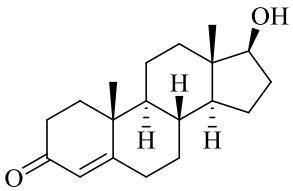
Objetivo específico:

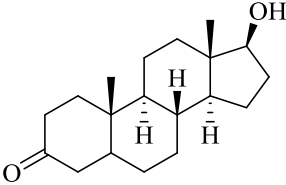
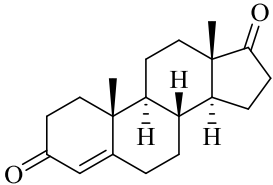
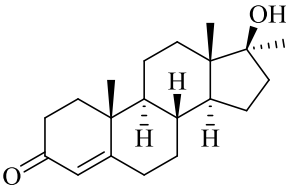
- Optimizar métodos para el análisis de fármacos y compuestos relacionados a nivel de trazas en agua dulce natural (Río Suquía) y en tejidos de peces que habitan la cuenca.

Tabla 2.2. Compuestos (fármacos y esteroides) seleccionados para el estudio en la Cuenca del Río Suquía, estructura química, peso y fórmula molecular, constante de acidez (pKa = -log Ka) y coeficiente de partición octanol-agua (log K_{ow}). Excepto indicado, los datos fueron tomados de la base de datos:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>.

Compuesto	Grupo Terapéutico	Estructura química	PM (g/mol)	Fórmula molecular	pK _a	Log K _{ow}
Diclofenac	Analgésico- antiinflamatorio		296,1486	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	4,15	4,51
Claritromicina	Antibiótico (Macrolidas)		747,9534	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	8,99	3,16
Ciprofloxacina	Antibiótico (Quinolonas)		331,3415	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	6,09	0,28
Atenolol (ATE)	β-bloqueante		266,3361	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	9,6	0,16

Propranolol	β -bloqueante		259,3434	$C_{16}H_{21}NO_2$	9,42	3,48
Enalapril	Antihipertensivo		376,4467	$C_{20}H_{28}N_2O_5$	2,97 (grupo carboxilo) 5,35 (grupo amino)	0,07
Furosemida	Diurético		330,7441	$C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$	pKa ₁ : 3,8 pKa ₂ : 7,5	2,03
Carbamazepina (CBZ)	Anticonvulsivo- antineuralgico		236,2686	$C_{15}H_{12}N_2O$	13,9	2,45

Oxcarbazepina (OxCBZ)	Anticonvulsivo- antineurálgico		252,2680	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	-0,65 (estimado)	1,5
17β-estradiol (E ₂)	Hormona (estrógeno natural)		272,3820	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	10,4 ³	4,01 3,94 ¹
Estrona (E ₁)	Hormona (estrógeno natural)		270,3661	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	10,4 ⁴	3,13 3,43 ¹ 4,1 ⁴
17α-etinilestradiol (EE ₂)	Hormona (estrógeno sintético)		296,4034	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	10,4 ²	3,67 4,15 ²
Testosterona (T)	Hormona (andrógeno natural)		288,4244	C ₁₉ H ₂₈ O ₂		3,32

Dihidrotestosterona (DHT)	Hormona (andrógeno natural)		290,4403	$C_{19}H_{30}O_2$		3,55
Androstenodiona (AND)	Hormona (andrógeno natural)		286.4085	$C_{19}H_{26}O_2$		2,75
Metiltestosterona	Hormona (andrógeno sintético)		302,451	$C_{20}H_{30}O_2$		3,36

^{1,2,3,4}: (Yin *et al.*, 2002; Beausse, 2004; Neale *et al.*, 2009; Pal *et al.*, 2010)

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Reactivos y materiales

Los estándares analíticos de fármacos utilizados fueron provistos por el Dpto. de Farmacia de la Fac. de Cs. Químicas, Univ. Nac. de Córdoba, gracias a la generosa colaboración del Dr. Alfredo Quevedo. Se utilizaron estándares analíticos (pureza $\geq 98\%$) de los siguientes proveedores: diclofenac sódico ($\text{NaC}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NO}_2$) y atenolol ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$) Parafarm (Buenos Aires, Argentina), propranolol ($\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_2$), ciprofloxacina ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3$), claritromicina ($\text{C}_{38}\text{H}_{69}\text{NO}_{13}$), enalapril ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$), furosemida ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$), carbamazepina ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$), oxcarbazepina ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$), androstenediona ($\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_2$), testosterona ($\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2$), dihidrotestosterona ($\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_2$), metiltestosterona ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$), 17α -etinilestradiol ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$), 17β -estradiol ($\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$) y estrona ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_2$) Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). Se prepararon soluciones stock individuales de 1 mg/mL, en metanol (grado HPLC) para la mayoría de los compuestos, excepto ciprofloxacina (metanol/ácido fórmico 0,1% 1:1). A partir de estas soluciones stock se prepararon curvas de calibración realizando diluciones seriadas en fase móvil (condición final optimizada: metanol/agua 15:85). Todas las soluciones stock se conservaron en viales color caramelo a -20°C hasta ser usadas; las soluciones diluidas se prepararon antes de su uso a partir de la solución stock. Se utilizó metanol grado HPLC (J.T. Baker, Estados Unidos), ácido fórmico 98–100% (Merck Química Argentina, Argentina), acetato de amonio puriss. p.a. para espectrometría de masas (Fluka, Alemania), ácido clorhídrico e hidróxido de sodio grado analítico (Anedra, Argentina) y agua ultrapura proveniente de un sistema de purificación en tándem con filtración por carbón activado, ósmosis inversa e intercambio iónico con desinfección por luz ultravioleta y filtración por membrana de $0,45\ \mu\text{m}$, de conductividad $< 0,06\ \mu\text{S}/\text{cm}$ (Arium 611 UV system, Sartorius, Alemania). Se utilizaron filtros de celulosa ($47\ \text{mm}$ diámetro, $0,45\ \mu\text{m}$ tamaño de poro, Sartorius, Alemania) y membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF $13\ \text{mm}$ diámetro, $0,22\ \mu\text{m}$ tamaño de poro, Millipore, Estados Unidos) para la filtración de muestras. Para la extracción en fase sólida se usaron cartuchos de fase reversa polimérica: polímeros de estireno divinilbenceno modificados en la superficie, StrataTM-X (500 mg/6 mL, Phenomenex, Estados Unidos) y copolímero divinilbenceno-*N*-vinilpirrolidona, Oasis[®] HLB (60 mg/3 mL, Waters, Estados Unidos) y fase reversa octadecilsilano: Li-Chrolut C-18 (200 mg/3 mL, Merck, Alemania).

2.2.2 Separación y detección

Se optimizaron las condiciones de separación y detección de los compuestos seleccionados en un cromatógrafo líquido de alta eficacia acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (HPLC-HRMS) con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo-QTOF (MicrOTOF Q II Bruker Daltonics, Estados Unidos). El sistema de HPLC consistió de un desgasificador, bomba binaria, columna termostatazada, automuestreador (volumen de inyección máximo de 40 μ L) y detector de arreglo de diodos (Agilent Series 1200 LC System, Agilent, USA). La interfaz de ionización utilizada fue electrospray (ESI) en el modo correspondiente a la ionización de cada compuesto, positivo o negativo (ESI(+)) o ESI(-)).

En cuanto a la cromatografía líquida, se probaron distintas columnas con fase estacionaria reversa: C18-octadecilsilano Zorbax Eclipse XDB (3,0 x 50 mm, 1,8 μ m tamaño de partícula, Agilent, Estados Unidos), Kinetex C18 y Kinetex PFP-pentafluorofenil- (2,1 x 100 mm, 2,6 μ m tamaño de partícula, Phenomenex, Estados Unidos). Se evaluó el uso de diferentes fases móviles (metanol, acetonitrilo, agua, ácido fórmico y acetato de amonio en porcentajes variables) hasta encontrar una condición de compromiso para la separación y detección de todos los compuestos de interés.

Para la detección, se optimizaron los voltajes de capilar de ionización, escudo de ingreso a QTOF, conos de enfoque iónico, cuadrupolo, celda de colisión, tiempo de espera en TOF y voltaje del detector, así como los flujos de gases de nebulización y secado (ambos de nitrógeno). Para la optimización se utilizó infusión directa (“*flow injection analysis*”) de soluciones estándar de los compuestos individuales (5-10 mg/L) al espectrómetro de masas. Se estableció un método para la detección de un grupo de compuestos en modo positivo, y otro en modo negativo. La confirmación de la identidad de los compuestos se realizó mediante la masa exacta del ion molecular (m/z) junto al tiempo de retención (t_R). Los cromatogramas fueron procesados con el programa del equipo Compass 1.3 (Bruker Daltonics, Estados Unidos).

La linealidad de cada analito se evaluó a través del coeficiente de correlación lineal R^2 de curvas de calibración de 5 puntos (soluciones mezcla de estándares de 5, 10, 100, 500, 1000 μ g/L, disueltas en metanol/agua 15:85), preparadas e inyectadas previo a cada análisis. La precisión del método, en términos de área de pico, se expresó a través del coeficiente de variación (CV%) de medidas repetidas, en un mismo día (3 inyecciones sucesivas de solución

estándar) y entre días (solución estándar inyectada en 3 días diferentes). Los límites de cuantificación instrumentales (LQI) en unidad de picogramos inyectados (pg), se obtuvieron a partir de inyección de soluciones estándar de concentración tal que presentaran una relación de área de señal/ruido ≥ 10 . Los límites de detección instrumentales (LDI) fueron calculados a partir de los LQI, dividiendo el valor de LQI por 3,3 ($LDI = LQI/3,3$).

2.2.3 Extracción de fármacos a partir de agua superficial del Río Suquía

Se llevaron a cabo ensayos de recuperación a través de agregados de soluciones estándar mezcla de los compuestos estudiados (50-100 $\mu\text{g/L}$), sobre agua ultrapura y luego sobre agua del río Suquía (muestras del sitio Río Primero), de manera de probar las condiciones de pre-tratamiento sobre muestras reales con interferencias propias del río bajo estudio.

El pre-tratamiento de las muestras líquidas consistió en un paso de filtración con vacío (utilizando filtros de celulosa, 0,45 μm tamaño de poro), seguido de extracción en fase sólida no automatizada. La SPE se llevó a cabo en un colector (“*manifold*”) conectado a bomba de vacío, previo ajuste del pH de la muestra por agregado de NaOH 0,1 M o HCl 10%, a distintas condiciones (pH = 3, 6 o 9). Se probó la extracción utilizando distintos cartuchos, solventes de elución y volumen de muestra. Los extractos obtenidos de la SPE se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno gaseoso y temperatura no superior a 40°C. Las muestras secas se reconstituyeron en fase móvil. Los extractos resuspendidos fueron homogeneizados con un agitador vórtex, sonicados durante 1 min en caso necesario, y filtrados por membranas de 0,22 μm para la posterior inyección al cromatógrafo líquido. Una vez optimizada la metodología, los porcentajes de recuperación globales se obtuvieron a partir del agregado de solución estándar mezcla de fármacos a una muestra de agua de Río Primero (condiciones de contaminación intermedia entre las matrices analizadas) de manera de tener una concentración final de 100 $\mu\text{g/L}$ de cada compuesto en la muestra. Para el cálculo del porcentaje de recuperación se utilizó la Ecuación 2.1.

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Area}_{\text{muestra agregada}} - \text{Area}_{\text{blanco}}}{\text{Area}_{\text{estándar}}} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

Donde $\text{Area}_{\text{muestra agregada}}$ corresponde al área del analito en la muestra de agua de río con agregado de estándar al inicio del tratamiento (es decir que sufre todo el proceso de análisis), $\text{Area}_{\text{blanco}}$ es el área del analito presente en la muestra de agua de río naturalmente,

y $Area_{estandar}$ es el área del analito de una solución estándar disuelta en fase móvil inyectada directamente en el equipo HPLC (sin sufrir todo el pre-tratamiento de la muestra).

El efecto matriz se calculó de acuerdo a la Ecuación 2.2.

$$Efecto\ matriz\ (\%) = \left(\frac{Area_{matriz\ agregada} - Area_{blanco}}{Area_{estandar}} - 1 \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

Donde $Area_{matriz\ agregada}$ es el área del analito agregado en el extracto de la matriz en el momento previo a la inyección al cromatógrafo líquido, $Area_{blanco}$ es el área del analito en la matriz (si está presente naturalmente) y $Area_{estandar}$ es el área del analito en solución estándar preparada en fase móvil. Valores negativos de efecto matriz indican supresión iónica y valores positivos aumento de señal del analito por efecto matriz.

Los límites de detección y cuantificación del método (LOD y LOQ, respectivamente) se calcularon a partir de los límites instrumentales (LDI y LQI, respectivamente) corregidos por los porcentajes de recuperación y factor de concentración del método global (2000x) (Ecuación 2.3 y 2.4, respectivamente)

$$LOD = \frac{LDI}{f_{concentración}} \times \frac{100}{\%R} \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

$$LOQ = \frac{LQI}{f_{concentración}} \times \frac{100}{\%R} \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

2.2.4 Extracción de fármacos a partir de tejidos biológicos

La extracción de fármacos a partir de muestras de tejido biológico se optimizó en primera instancia en pez completo para los compuestos: atenolol (ATE) y carbamazepina (CBZ).

Debido a las dificultades encontradas con la metodología optimizada en pez completo (sección 2.2.4.1), se decidió optar por otra metodología más sensible para el análisis de peces capturados en el Río Suquía, donde se presumía que las concentraciones de fármacos serían menores. Para cumplir con este último propósito, se procedió según la metodología descrita

en Huerta *et al.*, 2013, para el análisis de 20 fármacos y metabolitos (Tabla 2.3) en homogenatos de pez completo.

Por último, se optimizó una metodología de análisis de ATE, CBZ y 2 metabolitos de CBZ en distintos órganos de pez.

2.2.4.1 Extracción de fármacos a partir de pez completo

Se colectaron individuos machos (peso promedio: 0,2 g) y hembras (peso promedio 0,3-0,5 g) adultos de *G. affinis* en la localidad “El Diquecito”, La Calera (Sur: 31°21'24,7"; Oeste: 64°23'18,7") con red de pesca. Como se describe en la sección 3.3.1.2 no se detectaron residuos de fármacos en el agua del río en este sitio de monitoreo. Los peces se transportaron al laboratorio en tanques de agua de 20 L y se aclimataron a las condiciones de acuario durante 1 mes en tanques de 100 L, alimentados dos veces al día con escamas de peces comerciales (Vita Fish, Argentina).

Para las pruebas de recuperación según los distintos protocolos, se realizaron agregados de CBZ y ATE de 100 ng/g peso seco o 1000 ng/g peso húmedo (peso húm.) de pez. En las pruebas de extracción se utilizó solución amortiguadora (“*buffer*”) formiato de sodio 0,05 M preparada a partir de formiato de sodio sólido (Cicarelli, Argentina) en agua ultrapura y ácido fórmico, ajustando el pH = 5. Se prepararon homogenatos de pez entero en distintos solventes a partir de tejido liofilizado triturado en mortero o a partir de tejido húmedo triturado por dispersión con solvente, utilizando un equipo ULTRATURRAX T18 (IKA, Alemania) a 20.000 rpm (Ramírez *et al.*, 2007). En este último caso, la homogeneización se llevó a cabo en tubos de plástico de fondo redondo de 50 mL (PP, co-polímero de polipropileno, Nalgene, Estados Unidos). Se realizó una etapa de extracción por ultrasonido con solvente (metanol/buffer formiato o metanol/ácido clorhídrico 0,05 M, Chu y Metcalfe (2007)), seguido de separación de fases en centrífuga. Se colectaron los sobrenadantes y se evaporó la fase orgánica con evaporador rotatorio a presión reducida (Büchi, Suiza). El extracto se resuspendió en fase acuosa (100 mL) y se purificó por extracción en fase sólida (SPE) siguiendo el protocolo optimizado para extracción de fármacos a partir de agua (sección 2.2.3). Se evaporaron los extractos metanólicos y se resuspendieron en 1 mL de fase móvil para ser trasvasados a viales de vidrio, filtrados e inyectados al cromatógrafo líquido. Se utilizó el método de separación y detección/cuantificación previamente optimizado (sección

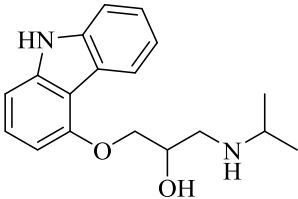
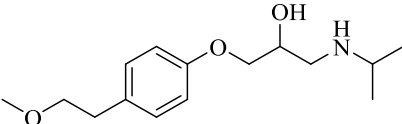
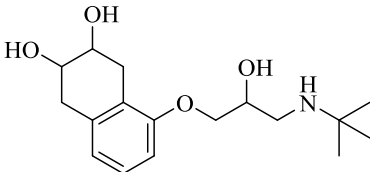
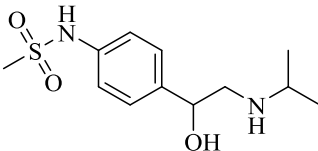
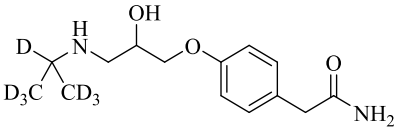
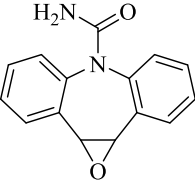
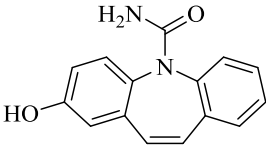
2.2.2). Se utilizaron las ecuaciones 2.1 y 2.2 para el cálculo de porcentajes de recuperación y efecto matriz y las ecuaciones 2.3 y 2.4 para el cálculo de los límites de detección y cuantificación. Con el método finalmente seleccionado, se realizaron curvas de calibración en la misma matriz de extracto de pez control, debido a los altos porcentajes de supresión iónica observados.

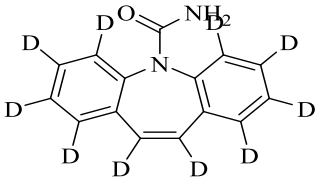
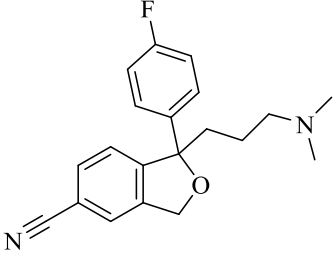
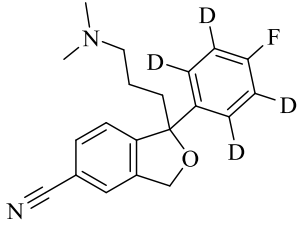
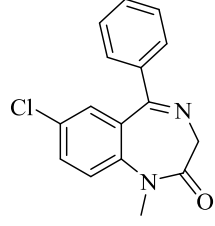
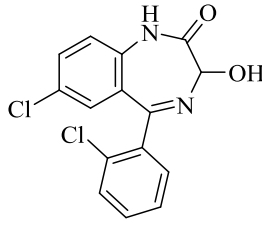
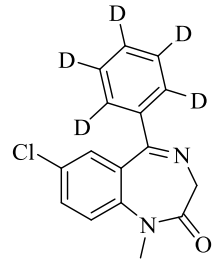
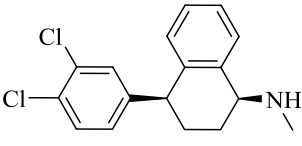
2.2.4.2 Extracción de fármacos a partir de pez completo según Huerta *et al.*, 2013

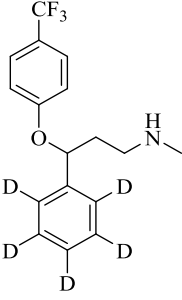
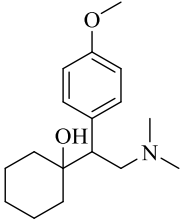
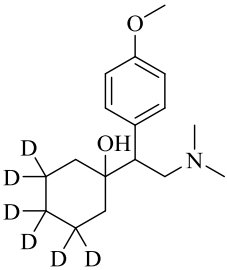
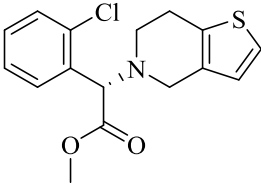
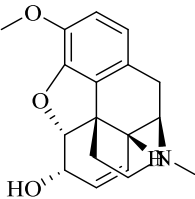
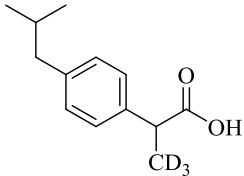
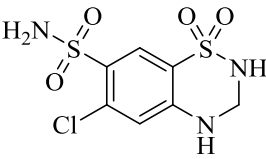
Se utilizaron los siguientes estándares analíticos (pureza >95%): diclofenac, codeína, carbamazepina, citalopram, diazepam, lorazepam, atenolol, sotalol, propanolol, nadolol, carazolol, hidroclorotiazida, clopidogrel, salbutamol y levamisol (Sigma-Aldrich), sertralina y venlafaxina (European Pharmacopeia-EP), los metabolitos 2-hidroxicarbamazepina (2-hidroxiCBZ) y carbamazepina-10,11-epóxido (10,11-epoxiCBZ) de Toronto Research Chemicals (TRC) y metoprolol (US Pharmacopeia-USP) (Tabla 2.3). En este análisis se utilizaron estándares internos marcados isotópicamente para grupos de compuestos, según Huerta *et al.* (2013): ibuprofeno-d₃, diazepam-d₅, ronidazol-d₃ y fluoxetina-d₅ (Sigma-Aldrich), atenolol-d₇, carbamazepina-d₁₀, hidroclorotiazida-d₂ y citalopram-d₄ (CDN isotopes) y venlafaxina-d₆ (TRC) (Tabla 2.3). A partir de soluciones stock individuales de 1000 mg/L de cada compuesto en metanol, se prepararon soluciones mezcla de 20 mg/L y 1 mg/L por dilución en metanol. Las soluciones de trabajo utilizadas para la curva de calibración (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 µg/L) se prepararon en metanol/agua 10:90 (V/V) previo a cada análisis. Se utilizó metanol y acetonitrilo grado HPLC, diclorometano y agua ultrapura (Merck, Alemania). Brevemente, el protocolo de extracción consistió en lo siguiente: 0,5 g de peces completos liofilizados (*G. affinis* o *J. multidentata*) triturados con mortero se sometieron a extracción líquida a presión en un equipo ASE 350[®] (Thermo Scientific Dionex, Estados Unidos) con metanol como solvente de extracción (4 ciclos de extracción de 5 min cada uno a 50°C). Los extractos se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno gaseoso y baño a 30°C y se resuspendieron en 1 mL de metanol. Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficacia con detector de arreglo de diodos HPLC-DAD Agilent 1260 Infinity (Estados Unidos) para la etapa de purificación por cromatografía de permeación en gel (GPC). Se inyectaron 500 µL del extracto metanólico en una columna EnviroPrep (300 mm × 21,2 mm × 10 µm tamaño de poro) con pre-columna PLgel Guard column (50 mm × 7,5 mm) (Agilent Technologies, Estados Unidos), usando diclorometano/metanol 90:10 (V/V) como fase móvil a 5 mL/min. Se colectaron las fracciones en las cuales eluyen los analitos de interés (entre

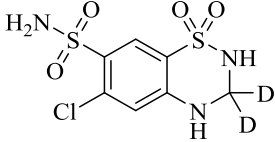
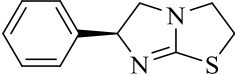
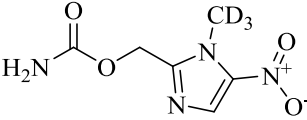
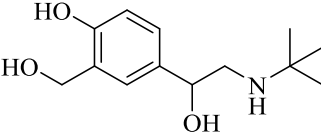
13,5 y 26,5 min), se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno gaseoso y se resuspendieron en 1 mL de metanol/agua (10:90, V/V), agregando 50 µL de mezcla de estándares internos de 1 mg/L. Se aplicó el método de detección y cuantificación descrito en Gros *et al.* (2012) y Huerta *et al.* (2013), por medio de cromatografía líquida de ultra eficacia, acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS), en un cromatógrafo de líquidos Acquity Ultra-Performance™ (Waters, Estados Unidos) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador híbrido de triple cuadrupolo-trampa iónica lineal 5500 QTRAP (ABSciex, Estados Unidos), utilizando una fuente ESI. Como criterio de identificación se comparó la abundancia relativa entre el área de dos transiciones (MS/MS) de monitoreo de reacción selectiva (SRM) en las muestras (cociente SRM1/SRM2) con el valor calculado para los estándares preparados en extracto de matriz (dentro del valor del estándar \pm 20%). Las curvas de calibración se prepararon en la misma matriz, a los niveles de concentración descritos previamente (0,1 a 100 µg/L). Los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) son los publicados en Huerta *et al.* (2013), corregidos por el cociente peso húm./peso seco promedio para las especies utilizadas en este estudio, el cual fue 4. Para evaluar la recuperación, se preparó una mezcla de iguales cantidades de homogenatos liofilizados de ambas especies de pez y se realizó un agregado de solución mezcla de estándares a una concentración final de 100 ng/g peso seco, realizando el mismo análisis que las muestras, por triplicado. Se utilizaron las ecuaciones 2.1 y 2.2 para el cálculo de porcentajes de recuperación y efecto matriz.

Tabla 2.3. Fármacos y metabolitos del método de Huerta *et al.* (2013). Atenolol, propranolol, carbamazepina y diclofenac, también incluidos dentro de este método, se encuentran en la Tabla 2.2.

Compuesto	Grupo terapéutico	Estructura química	Fórmula molecular	Ion precursor (m/z)
Carazolol	β-bloqueante (uso veterinario)		C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₂	299 [M+H] ⁺
Metoprolol	β-bloqueante		C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	268 [M+H] ⁺
Nadolol	β-bloqueante		C ₁₇ H ₂₇ NO ₄	310 [M+H] ⁺
Sotalol	β-bloqueante		C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	273 [M+H] ⁺
Atenolol-d ₇	Estándar interno β-bloqueantes y salbutamol		C ₁₄ D ₇ H ₁₅ N ₂ O ₃	274 [M+H] ⁺
10,11-epoxiCBZ	Psiquiátrico (metabolito CBZ)		C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	253 [M+H] ⁺
2-hidroxiCBZ	Psiquiátrico (metabolito CBZ)		C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	253 [M+H] ⁺

<p>Carbamazepina-d₁₀</p>	<p>Estándar interno CBZ, metabolitos y codeína</p>		<p>C₁₅D₁₀H₂N₂O</p>	<p>247 [M+H]⁺</p>
<p>Citalopram</p>	<p>Psiquiátrico</p>		<p>C₂₀H₂₁FN₂O</p>	<p>325 [M+H]⁺</p>
<p>Citalopram-d₄</p>	<p>Estándar interno citalopram</p>		<p>C₂₀H₁₇D₄FN₂O</p>	<p>329 [M+H]⁺</p>
<p>Diazepam</p>	<p>Psiquiátrico</p>		<p>C₁₆H₁₃ClN₂O</p>	<p>285 [M+H]⁺</p>
<p>Lorazepam</p>	<p>Psiquiátrico</p>		<p>C₁₅H₁₀Cl₂N₂O₂</p>	<p>321 [M+H]⁺</p>
<p>Diazepam-d₅</p>	<p>Estándar interno diazepam, lorazepam y clopidogrel</p>		<p>C₁₆H₈D₅N₂OCl</p>	<p>290 [M+H]⁺</p>
<p>Sertralina</p>	<p>Psiquiátrico</p>		<p>C₁₇H₁₇Cl₂N</p>	<p>307 [M+H]⁺</p>

Fluoxetina-d ₅	Estándar interno sertralina		C ₁₇ D ₅ H ₁₃ F ₃ NO	315 [M+H] ⁺
Venlafaxina	Psiquiátrico		C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	278 [M+H] ⁺
Venlafaxina-d ₆	Estándar interno venlafaxina		C ₁₇ H ₂₁ D ₆ NO ₂	284 [M+H] ⁺
Clopidogrel	Anticoagulante		C ₁₆ H ₁₆ ClNO ₂ S	322 [M+H] ⁺
Codeína	Analgésico-antiinflamatorio		C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	300 [M+H] ⁺
Ibuprofeno-d ₃	Estándar interno diclofenac		C ₁₃ D ₃ H ₁₅ O ₂	208 [M-H] ⁻
Hidroclorotiazida	Diurético		C ₇ H ₈ ClN ₃ O ₄ S ₂	296 [M-H] ⁻

Hidroclorotiazida-d ₂	Estándar interno hidroclorotiazida		C ₇ H ₆ D ₂ ClN ₃ O ₄ S ₂	298 [M-H] ⁻
Levamisol	Antihelmíntico (uso veterinario)		C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S	205 [M+H] ⁺
Ronidazol-d ₃	Estándar interno levamisol		C ₆ H ₅ D ₃ N ₄ O ₄	201 [M+H] ⁺
Salbutamol	Broncodilatador		C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	240 [M+H] ⁺

2.2.4.3 Extracción de fármacos a partir de órganos de pez

En esta etapa se contó con los dos estándares de metabolitos de CBZ: 2-hidroxicarbamazepina (2-hidroxiCBZ) y carbamazepina-10, 11-epóxido (10,11-epoxiCBZ) y con los estándares internos marcados isotópicamente: atenolol-d₇ y carbamazepina-d₁₀ (sección 2.2.4.2). En las pruebas de extracción se utilizó metanol (grado HPLC) y buffer citrato pH = 4, preparado a partir de ácido cítrico 0,1 M y citrato de sodio 0,1 M (Panreac, España). Las pruebas de extracción se llevaron a cabo con órganos liofilizados de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), por ser una especie de mayor masa que *J. multidentata*, lo que permitió tener suficiente masa de órganos para llevar a cabo las pruebas. Ambas especies pertenecen al superorden *Acanthopterygii*. Cuando se extrajeron órganos de *J. multidentata* se trabajó con conjunto (“pool”) de órganos para alcanzar masas similares a las utilizadas en la optimización con pejerrey, logrando un límite de detección del método razonable en muestras de órganos o tejidos individuales de peces pequeños. Se optimizó entonces una metodología de extracción para branquias, intestino, músculo, hígado y cerebro a partir de poca masa (mg). Los órganos liofilizados fueron triturados en seco. Se realizaron agregados de solución mezcla de estándares de CBZ, 10,11-epoxiCBZ, 2-hidroxiCBZ y ATE a 25 mg de branquias, intestino y músculo de pejerrey (concentración final de cada fármaco: 100 ng/g peso seco) y a 10 mg de hígado y cerebro de pejerrey (concentración final de cada fármaco: 250 ng/g peso seco). Se siguió una estrategia de extracción similar a la utilizada para pez completo (Fig. 2.1.): ultrasonificación con 1 mL de solvente en baño de hielo durante 15 min

(prueba con metanol o mezcla metanol/buffer citrato), centrifugación (8000 g durante 10 min a 4°C), recolección de sobrenadantes en tubo de vidrio, evaporación de fase orgánica (por corriente de nitrógeno en baño a 30°C) y resuspensión en 50 mL de agua para realizar una purificación (clean-up) por extracción en fase sólida. La SPE se realizó de acuerdo a Gros *et al.* (2012). Brevemente, se acondicionaron cartuchos Oasis HLB con 5 mL de metanol, seguidos de 5 mL de agua ultrapura. Se agregó la muestra resuspendida en 50 mL de agua y seguidamente 6 mL de agua ultrapura. Se dejó secar por 20 min con corriente de aire y, finalmente, se eluyeron los cartuchos con 6 mL de metanol. Los extractos obtenidos se secaron por corriente de nitrógeno hasta un volumen aproximado menor a 1 mL, y se trasvasaron a viales de vidrio de 1 mL. Estos fueron llevados a sequedad con corriente de nitrógeno y resuspendidos en 1 mL de metanol/agua 10:90 (V/V), agregando 50 µL de mezcla de estándares internos de 1 mg/L. El método de cromatografía líquida y espectrometría de masas utilizado fue el descrito por Gros *et al.* (2012) y Huerta *et al.* (2013) (UPLC-QqLiT, sección 2.2.4.2). Se realizaron curvas de calibración para cada órgano (pejerrey) y se evaluó el efecto matriz promedio en dos puntos intermedios de la curva de calibración, utilizando la ecuación 2.2. El porcentaje de recuperación se evaluó por triplicado agregando 100 ng/g peso seco de los 4 fármacos a intestino, hígado, branquias y cerebro o 40 ng/g peso seco de fármacos a músculo de pejerrey, por medio de la ecuación 2.1. Los límites de detección y cuantificación se calcularon con las ecuaciones 2.3 y 2.4.

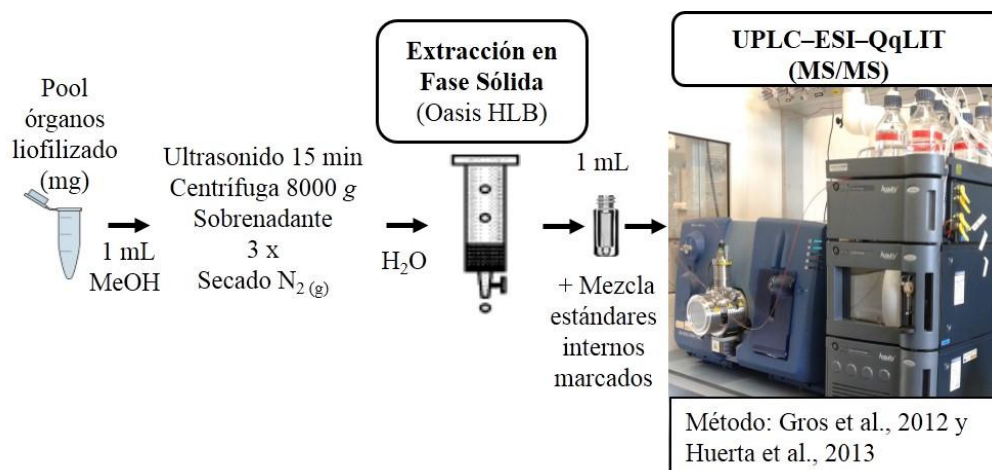


Fig. 2.1. Protocolo de extracción de fármacos en muestras de órganos de pez.

2.3 Resultados y discusión

Con el objetivo de optimizar métodos para el análisis de fármacos y compuestos relacionados a nivel de trazas en agua dulce natural (Río Suquía) y en tejidos de peces (pez completo y órganos), se optimizó en primera instancia la separación y detección de los fármacos y esteroides seleccionados, luego la extracción de los mismos a partir de agua superficial del Río Suquía y por último la extracción a partir de tejidos biológicos.

2.3.1 Separación y detección

El análisis de un grupo amplio de compuestos de distintas características físicas-químicas (peso molecular, polaridad, acidez, etc.) requiere establecer condiciones de compromiso para la extracción y detección de los mismos mediante un solo método analítico.

La mejor separación cromatográfica de los analitos se obtuvo en la columna de fase reversa Zorbax Eclipse C18 XDB, a una temperatura de 40°C. XDB es la abreviatura del fabricante para la tecnología “*eXtra Dense Bonding*” de los ligandos (octadecil-silanos) y doble protección de los grupos silanol activos (“*endcapping*”). Esta columna es útil para la separación de compuestos ácidos y básicos altamente polares por cromatografía líquida de fase reversa, como es el caso de los fármacos en estudio. Se optimizaron dos programas de elución en gradiente según el grupo de compuestos analizados, en modo de ionización positivo (IP) o negativo (IN). Las fases móviles binarias utilizadas fueron: solvente A: ácido fórmico 0,1% (para IP) o acetato de amonio 4 mM (para IN) en agua; solvente B: metanol, en ambos modos. El volumen de inyección fue 40 µL y el flujo 0,2 mL/min. El programa de gradiente en modo positivo fue: composición inicial 15% a 20% de B durante 4 min, seguido de una segunda rampa de 60% a 80% de B en 10 min, mantenida por 3 min, lavado de columna durante 15 min a 95% de B, seguido de 15 min a 15% de B para equilibrar la columna a las condiciones iniciales. En modo negativo: composición inicial 40% de B por 4 min, cambio a 80% de B en 1 min, mantenido durante 8 min, cambio a 95% de B para lavado de la columna durante 15 min y equilibrio final de la columna durante 15 min a 40% de B.

En la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), se optimizaron los parámetros de operación de la fuente de ionización (ESI) y del analizador de masas (QTOF), en ambos modos de ionización (Tabla 2.4).

Los espectros de masa exacta se obtuvieron en el rango de masa/carga 80-800 m/z , en modo barrido completo (“*full scan*”). Se inyectó un estándar de calibración interna de masas (solución de formiato de sodio 10 mM en agua/isopropanol 1:1 V/V) con una jeringa externa acoplada mediante un sistema de bombeo automático, durante 1 min en cada corrida cromatográfica, para realizar luego la calibración de masas de cada corrida (“*post-run*”).

Tabla 2.4. Parámetros de operación de la fuente ESI y del detector de masas QTOF optimizados para la detección de los 16 analitos. (V): voltios; (Vpp): voltaje pico a pico en voltios; (eV): electron-voltio.

Parámetro ESI-QTOF	Modo Positivo	Modo Negativo
Voltaje de escudo (shield) (V)	-550	550
Voltaje de capilar (V)	-6000	5000
Presión de nebulización de N _{2(g)} (bar)	2	2
Caudal de secado de N _{2(g)} (L/min)	6	6
Temperatura secado (°C)	180	180
Radiofrecuencia conos (Vpp 1° y 2°)	250-500	250-500
Radiofrecuencia Hexapolo (Vpp)	100	100
Energía del cuadrupolo (eV)	3	3
Energía de colisión (eV)	8	10
Radiofrecuencia colisión (Vpp)	400	300
Tiempo de transferencia (μs)	50	50
Tiempo de pre-pulso (μs)	5	5

La identificación positiva de los compuestos se basó en los siguientes criterios:

- masa exacta del ion molecular ($[M+H]^+$ o $[M-H]^-$ en modo IP o IN, respectivamente), o del ion producto deshidratado $[M+H-H_2O]^+$ para los estrógenos, con un error <10 ppm respecto al valor de masa exacta teórico.
- variación del tiempo de retención en HPLC del analito en la muestra dentro del rango $\pm 2\%$ en relación al estándar.

En las Figs. 2.2 y 2.3 se observan cromatogramas de solución estándar de una mezcla de 100 μg/L de los compuestos estudiados (atenolol, ciprofloxacina, propranolol, enalapril, oxcarbazepina-OxCBZ, carbamazepina-CBZ, claritromicina, androstenodiona-AND, 17β-estradiol-E₂, 17α-etinilestradiol-EE₂, estrona-E₁, testosterona-T, metiltestosterona-MT, dihidrotestosterona-DHT, furosemda y diclofenac), en modo positivo y negativo, respectivamente.

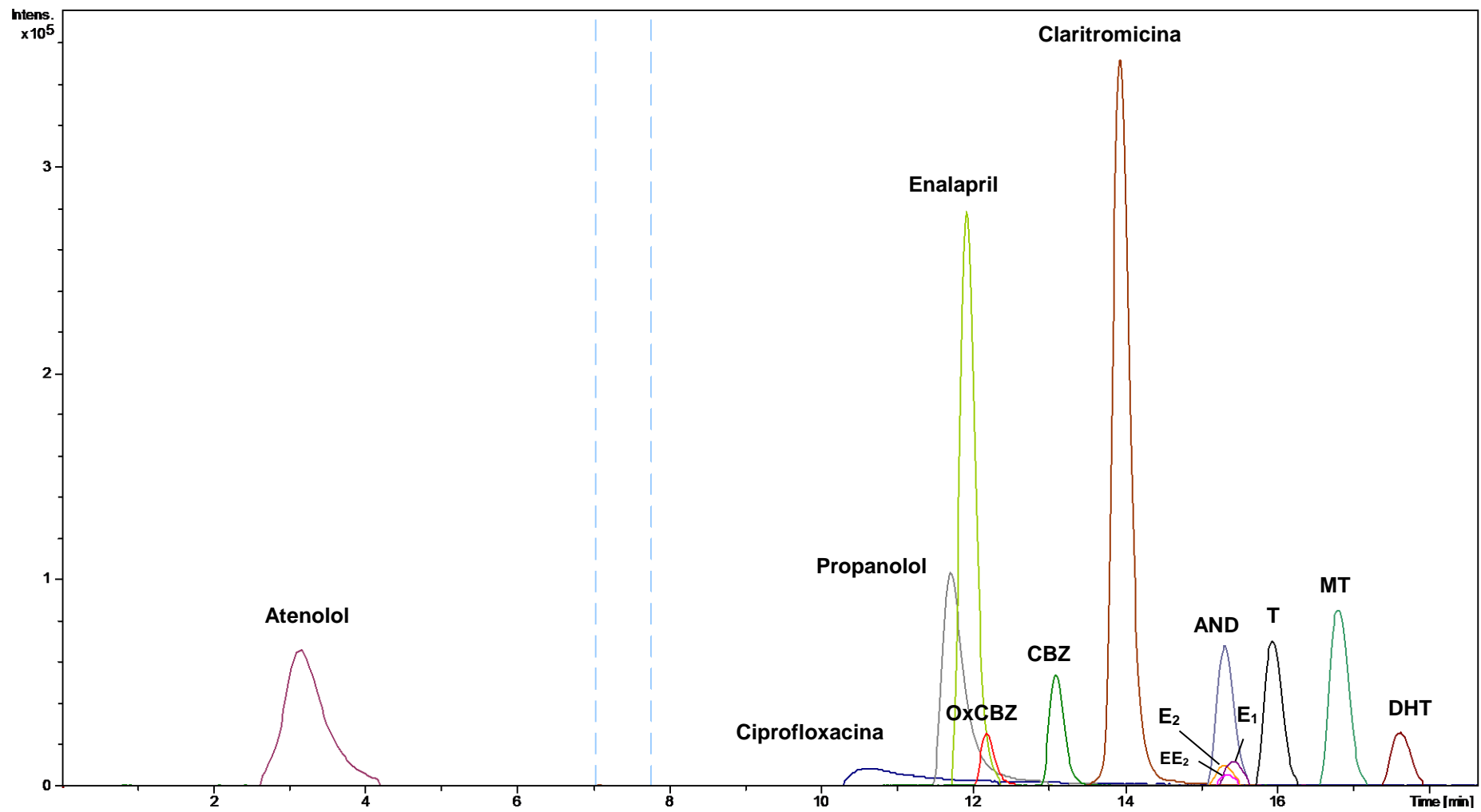


Fig. 2.2. Cromatograma de iones extraídos superpuestos de los 14 compuestos detectados en modo positivo, en una solución estándar de 100 µg/L preparada en fase móvil.

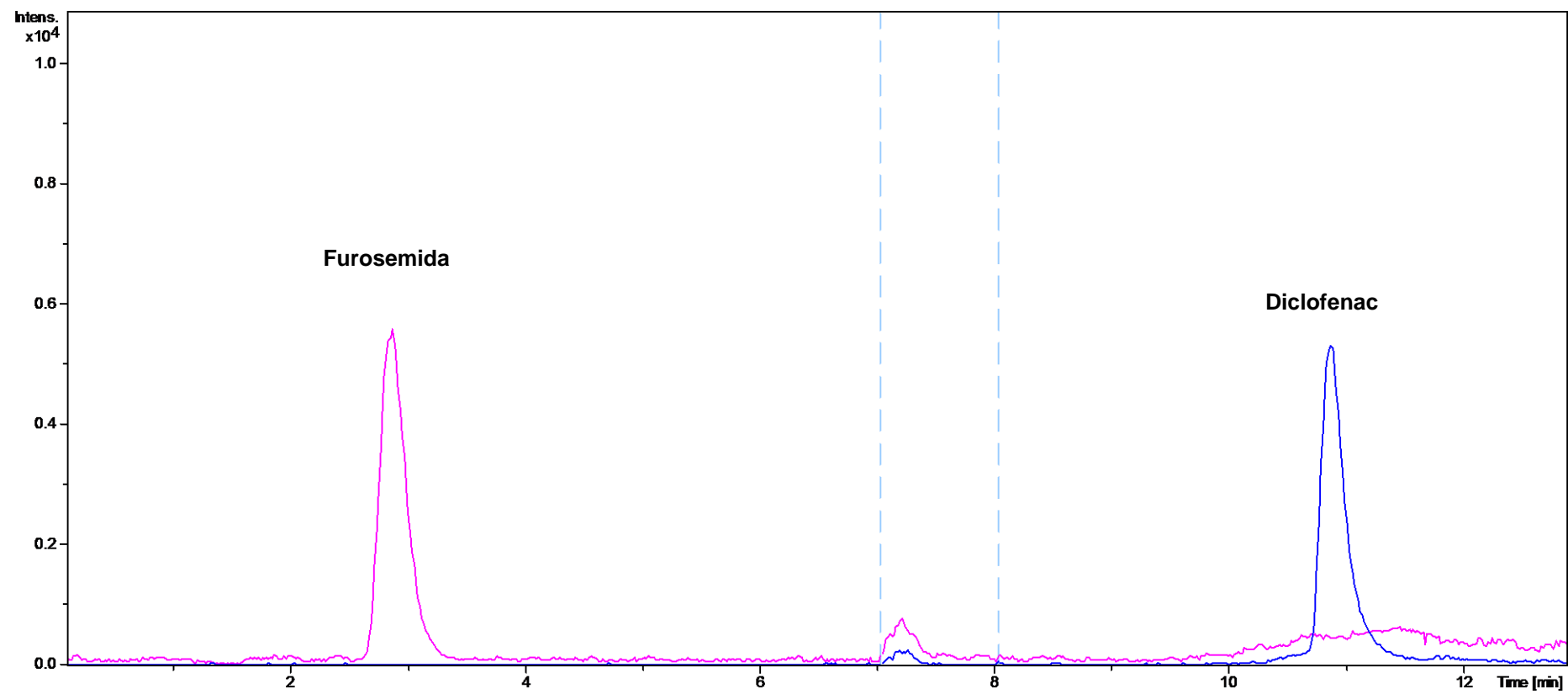


Fig. 2.3. Cromatograma de iones extraídos superpuestos de furosemida y diclofenac detectados en modo negativo, en una solución 100 $\mu\text{g/L}$ estándar en fase móvil.

Tabla 2.5. Condiciones de detección optimizadas para los 16 compuestos en el equipo HPLC-QTOF.

Compuesto	t _R ¹ (min)	Ion molecular	Fórmula molecular del ion	Masa exacta (m/z)	Masa experimental (m/z)	Error (ppm)	LDI ² (pg)	LQI ³ (pg)
Atenolol	2,9	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₂₃ N ₂ O ₃	267,1709	267,1688	7,7	12	40
Ciprofloxacina	10,6	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₉ FN ₃ O ₃	332,141	332,1386	7,4	485	1600
Propranolol	11,6	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ NO ₂	260,165	260,1638	4,8	12	40
Enalapril	11,8	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₉ N ₂ O ₅	377,2077	377,207	1,7	6	20
Oxcarbamazepina	12,1	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₃ N ₂ O ₂	253,0977	253,0965	4,8	61	200
Carbamazepina	13	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₃ N ₂ O	237,1028	237,1015	5,4	12	40
Claritromicina	13,7	[M+H] ⁺	C ₃₈ H ₇₀ NO ₁₃	748,4847	748,4862	-2	30	100
Androstediona	15,1	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₇ O ₂	287,2011	287,1998	4,5	30	100
17β-Estradiol	15,1	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₁₈ H ₂₃ O	255,1749	255,1725	9,4	121	400
17α-Etinilestradiol	15,1	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₂₀ H ₂₃ O	279,1749	279,1720	10,3	242	800
Estrona	15,2	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₃ O ₂	271,1698	271,1678	7,4	61	200
Testosterona	15,7	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₉ O ₂	289,2168	289,2155	4,3	30	100
Metiltestosterona	16,5	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	303,2324	303,2316	2,7	6	20
Dihidrotestosterona	17,3	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₃₁ O ₂	291,2324	291,2307	5,9	61	200
Furosemida	2,8	[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₀ ClN ₂ O ₅ S	328,9999	328,9978	6,4	61	200
Diclofenac	10,9	[M-H] ⁻	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NO ₂	294,0089	294,0076	4,3	30	100

¹Tiempo de retención (min). ²Límite de detección instrumental (picogramos inyectados). ³Límite de cuantificación instrumental (picogramos inyectados)

En la Tabla 2.5 se resumen los criterios de identificación y límites instrumentales para los analitos bajo estudio. Los límites de detección y cuantificación instrumentales (LDI y LQI) para la mayoría de los compuestos oscilaron entre 6-121 y 20-400 pg en inyección respectivamente. , excepto EE₂ y ciprofloxacina que presentaron límites más altos (LDI 242 y 485 pg, respectivamente). La variación observada en LDI entre distintos compuestos obedece a la mayor o menor facilidad para ionizarse en ESI. Estos valores son comparables a los límites informados por Castiglioni *et al.* (2005).

2.3.2 Extracción de fármacos a partir de agua superficial del Río Suquia

El cartucho de SPE que brindó el mejor rendimiento de extracción (mayor cantidad de compuestos de interés y menor cantidad de impurezas) de fármacos y esteroides a partir de agua superficial fue Strata-X, con elución de 10 mL de metanol. Este cartucho tiene una fase estacionaria que permite la retención de compuestos de características hidrofóbicas e hidrofílicas, lo que le proporciona una ventaja en la extracción de fármacos respecto a la fase estacionaria netamente hidrofóbica C-18. Sin embargo, hay que tener presente que la capacidad de los cartuchos disponibles utilizados en las pruebas fue diferente (distinta cantidad de masa de fase estacionaria), lo cual, si bien se tuvo en cuenta en las pruebas, pudo haber ejercido una influencia en la recuperación. La recuperación a distintos niveles de pH de la muestra fue diferente según el compuesto considerado (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Porcentajes de recuperación de fármacos y esteroides en muestras de agua (100 µg/L), con ajuste de pH a 3, 6 y 9 previo a la extracción en fase sólida (cartuchos Strata-X).

Compuesto	pH = 3	pH = 6	pH = 9
Diclofenac	64	71	46
Claritromicina	70	53	56
Ciprofloxacina	0	14	13
Atenolol	74	88	63
Propranolol	67	53	50
Enalapril	67	61	52
Furosemida	37	65	35
Carbamazepina	62	83	53
Oxcarbazepina	66	22	14
17β-Estradiol	0	89	23
Testosterona	70	91	56
Dihidrotestosterona	72	70	0
Androstenodiona	71	80	64
Metiltestosterona	69	67	71

Este resultado era esperable debido a las distintas características ácido-base de los fármacos seleccionados (constantes de acidez en Tabla 2.2). Como el objetivo fue establecer un solo método de extracción, se seleccionó pH = 6 como la condición de compromiso para obtener recuperaciones aceptables de la mayor cantidad de analitos posibles. Excepto ciprofloxacina y oxcarbazepina (14 y 22% de recuperación a pH = 6), el resto de los fármacos y esteroides presentaron recuperaciones mayores al 50%, con valores dentro de los publicados en bibliografía para muestras de agua (Hilton y Thomas, 2003; Hernando *et al.*, 2007; Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2008).

El protocolo final de análisis de muestras líquidas (Fig. 2.4) fue el siguiente: filtración de 800 mL de agua, ajuste a pH = 6 y extracción en fase sólida usando cartuchos Strata-X. Los cartuchos fueron previamente acondicionados con 10 mL de metanol, seguidos de 10 mL de agua ultrapura, a un caudal de 1 mL/min. Luego se agregaron 800 mL de muestra a 5 mL/min. Se lavaron los cartuchos con 6 mL de agua ultrapura y se dejaron secar mediante un flujo de aire constante durante 20 min. La elución se realizó con 10 mL de metanol (grado HPLC). Los extractos metanólicos fueron secados bajo corriente de nitrógeno a temperatura menor a 40°C y resuspendidos en 400 µL de una mezcla de metanol/agua 15:85. Este volumen final fue transferido a micro-insertos de vidrio, previa filtración con jeringa utilizando filtros de polifluoruro de vinilideno (PVDF, 0,22 µm). Los micro-insertos fueron colocados dentro de viales de vidrio de 2 mL para su análisis por HPLC-MS utilizando un automuestreador. El factor de concentración final de las muestras fue 2000 x. Los coeficientes de correlación lineal (R^2) obtenidos fueron mayores a 0,99 dentro del rango 5 a 500-1000 µL (Tabla 2.7). Los valores de CV% entre corridas cromatográficas sucesivas variaron entre 0,1 a 8% y entre días sucesivos de 2 a 21%. Los porcentajes de recuperación en general son cercanos o mayores al 50% (Tabla 2.7). Una de las principales limitaciones del análisis por LC-MS, como se mencionó anteriormente, es la susceptibilidad de la interfaz de ionización API a componentes de la matriz co-eluidos, lo que resulta en el efecto de “interferencia de la matriz”. El efecto matriz observado más frecuentemente fue la supresión iónica, variando entre 0 y 80% de supresión. Esta fue una de las principales razones de la disminución observada en los porcentajes de recuperación global y, como consecuencia, en los relativamente altos límites de detección para algunos compuestos. Por ejemplo, EE₂ no se logró cuantificar en muestras de Río Primero con agregado de estándar debido al problema de interferencia de matriz. Los límites de detección del método, considerando el factor de concentración de 2000x, variaron entre 0,1 y 16 ng/L. Estos valores son del mismo orden o mayores a los publicados en la

bibliografía para análisis de fármacos en muestras de agua superficial (Ternes 2001; Fatta *et al.*, 2007; Gracia-Lor *et al.*, 2011; Gros *et al.*, 2012).

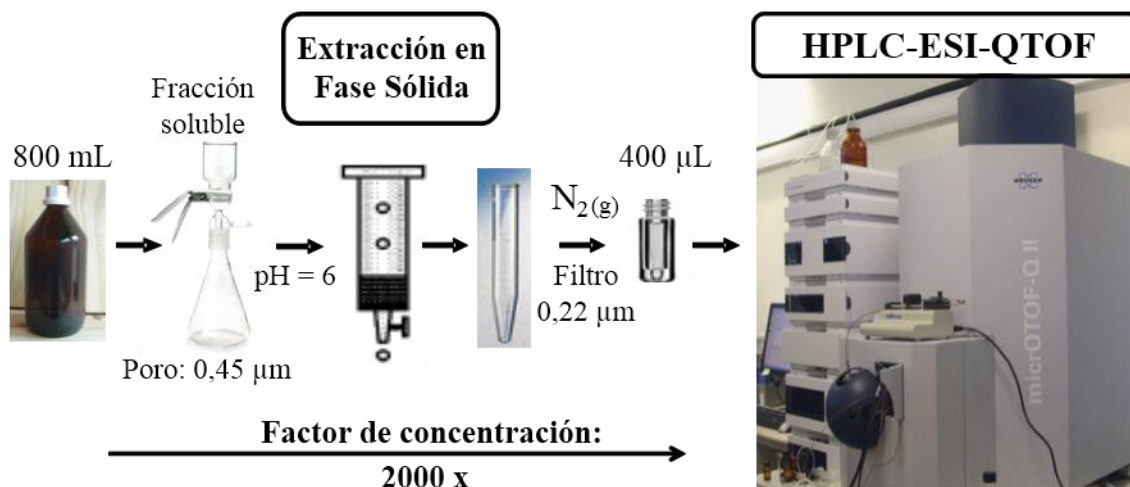


Fig. 2.4. Esquema del protocolo de análisis de compuestos de origen farmacéutico en matriz acuosa.

Tabla 2.7. Criterios de validación del método final con HPLC-QTOF utilizado para el análisis de esteroides y compuestos de origen farmacéutico en agua de río: linealidad (concentraciones de rango lineal y valor de R² de la curva), precisión (CV: Coeficiente de variación porcentual), porcentajes de recuperación (Rec.) y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).

Compuesto	Rango lineal (µg/L)	R ²	CV (%)	Rec. (%)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
Diclofenac	5-1000	0,9958	6	78	0,5	2
Claritromicina	5-500	0,9984	2	119	0,3	1
Ciprofloxacina	5-1000	0,9916	17	38	16	53
Atenolol	5-1000	0,9993	13	67	0,2	0,8
Propranolol	5-500	0,9963	6	32	0,5	2
Enalapril	5-100	0,9997	4	52	0,1	0,5
Furosemida	5-1000	0,9925	7	42	2	6
Carbamazepina	5-1000	0,9984	21	83	0,2	0,6
Oxcarbazepina	5-1000	0,9979	7	23	3	11
17β-Estradiol	5-500	0,9968	3	26	6	19
Estrona	5-1000	0,9996	12	50	2	5
Testosterona	5-500	0,9998	5	61	0,6	2
Dihidrotestosterona	5-1000	0,9975	6	45	2	6
Androstenodiona	5-1000	0,9930	3	46	0,8	3
Metiltestosterona	5-500	0,9990	5	60	0,1	0,4

2.3.3 Extracción de fármacos a partir de tejidos biológicos

2.3.3.1 Extracción de fármacos a partir de pez completo

Se probaron diferentes protocolos de extracción (métodos 1, 2 y 3) de CBZ y ATE en homogenatos de pez completo, los cuales se esquematizan en la Fig. 2.5.

En el **Método 1** a partir de 1-1,5 g peso húm. de pez entero, liofilizado y homogeneizado en seco en mortero, se llevó a cabo la extracción con una mezcla de 15 mL de solución buffer de formiato de sodio (pH = 5) y 20 mL de metanol por ultrasonido durante 15 min a 30°C. Se separó el sobrenadante por centrifugación y se repitió esta operación 3 veces. Se evaporó la fracción metanólica de los sobrenadantes colectados y se llevó a 100 mL volumen final en agua. A partir de aquí se siguió el protocolo de extracción en fase sólida (SPE) descrito para muestras líquidas (sección 2.1.3.2), con excepción de la resuspensión final en 1000 µL de metanol/agua 15:85. En el **Método 2** se probó un desgrasado por extracción en Soxhlet, utilizando mezcla diclorometano/hexano 1:1 durante 8 h, seguido del mismo protocolo de extracción utilizado en el Método 1. Por último, en el **Método 3** se realizó una homogeneización mediante dispersión previa a la extracción por ultrasonido. En este método se partió de 1 g peso húm. de pez entero, colocándolo en tubos con fondo redondo de 50 mL, agregando 10 mL de metanol para la homogeneización mediante dispersión con el equipo ULTRATURRAX T18. Luego se agregaron 10 mL de HCl 0,05 M y se volvió a homogeneizar. Los homogenatos obtenidos se sonicaron por 20 min a 30°C (Chu y Metcalfe, 2007) y se centrifugaron 15 min a 3000 g. Se repitió este procedimiento 3 veces separando los sobrenadantes. Luego de evaporar la fase orgánica (metanol) se ajustó el pH a 6 agregando NaOH 1 M. Esto permitió la decantación de material lipídico, el cual fue separado por centrifugación a 3000 g durante 20 min. Los sobrenadantes fueron transferidos a matraces de vidrio y llevados a volumen (100 mL) con agua ultrapura, para la extracción en fase sólida.

En base a la recuperación y supresión iónica observada para estos 3 métodos, la metodología que se seleccionó para extracción de CBZ y ATE de pez completo fue el **Método 3** (Tabla 2.8).

Tabla 2.8. Recuperación porcentual (Rec., %) y efecto matriz (EM, %, valores negativos indican supresión iónica), en los 3 métodos de prueba de extracción de atenolol (ATE) y carbamazepina (CBZ) de pez completo con agregados de estándar a distintas concentraciones.

Método	ATE		CBZ		Concentración (ng/g peso húm.)
	Rec. (%)	EM (%)	Rec. (%)	EM (%)	
1	14	-77	21	-81	68
2	7	-44	10	-48	100
3	nd	-60	39	-54	100
	66	-78	39	-51	1000

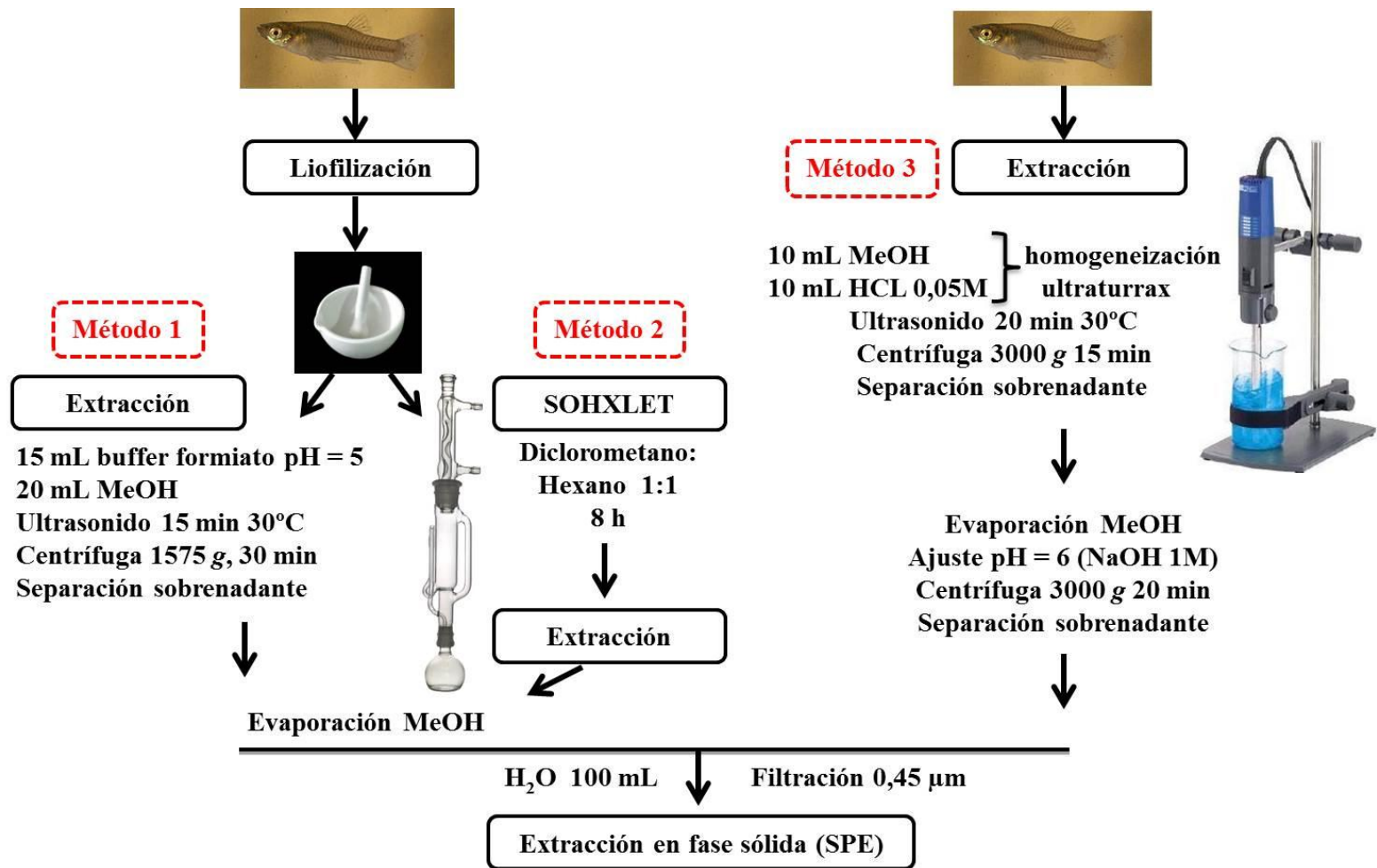


Fig.2.5. Métodos de prueba de extracción de fármacos a partir de pez completo (*Gambusia affinis*).

Debido a que los porcentajes de supresión iónica fueron elevados, la cuantificación se llevó a cabo preparando curvas de calibración en el mismo extracto de peces control (libres de fármacos), por el método de adición de estándar (“*matrix-matched calibration*”) en el rango 5–500 µg/L, equivalente a 6,25–625 ng/g peso húm. de tejido ($R^2 > 0,99$). Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron del 80% para ambos compuestos respecto al estándar preparado en el mismo extracto de pez (con igual interferencia de matriz). El límite de detección fue 2 y 4 ng/g peso húm. y el límite de cuantificación fue 6,25 y 12,5 ng/g peso húm. de CBZ y ATE, respectivamente.

Al no poder disminuir el problema de interferencia de matriz, principalmente la supresión iónica, con la metodología desarrollada, y utilizando el equipamiento disponible en el ámbito de la Universidad Nacional de Córdoba, se decidió analizar por esta metodología los peces expuestos en condiciones de laboratorio a concentraciones conocidas de fármacos (estudios de bioconcentración, sección 4.2.2.1) y optar por otra metodología más sensible para el análisis de peces capturados en el Río Suquía, donde se presumía que las concentraciones de fármacos serían menores. Para cumplir con este último propósito, se procedió según la metodología propuesta por Huerta *et al.*, 2013.

2.3.3.2 Extracción de fármacos a partir de pez completo según Huerta *et al.*, 2013

Esta parte del trabajo de Tesis Doctoral, así como la sección 2.3.3.3, se llevó a cabo en colaboración con el grupo de investigación de “Contaminación Química de las Masas de Agua” del Instituto Catalán de Investigación del Agua (ICRA, Girona, España), dirigido por el Dr. Damià Barceló Cullerés, en una estancia de investigación desarrollada en dicho instituto bajo la supervisión de la Dra. Sara Rodríguez-Mozaz y la colaboración de la doctorando Belinda Huerta. El método desarrollado por Huerta *et al.* (2013), fue aplicado en la extracción de fármacos a partir de homogenatos de pez completo de *G. affinis* y *J. multidentata*, con resultados analíticos aceptables (Tabla 2.9). Los límites de detección fueron menores a 1 ng/g peso húm. de pez (excepto para lorazepam y sertralina), los cuales resultan útiles para el análisis de fármacos en muestras de campo. El rango lineal fue entre 0,01 y 50 µg/L, equivalentes a 0,2-800 ng/g peso húm. pez ($R^2 > 0,99$). Los porcentajes de recuperación oscilaron entre 29 y 78% para los 20 analitos evaluados, con una variación (CV %) en general menor al 20%, excepto propranolol (CV% = 34%). Estos valores se encuentran dentro de los publicados por Huerta *et al.* (2013), con el mismo método en diferentes especies ícticas (*Cyprinus carpio*, *Barbus graellsii* y *Silurus glanis*), y en una recopilación de metodologías

de análisis de fármacos en biota (Huerta *et al.*, 2012). El principal efecto matriz fue supresión iónica (23 a 60% de supresión de señal), a excepción de algunos aumentos de señal en carazolol (356%), propranolol (57%), citalopram (20%), lozarepam (17%), levamisol (31%) y sertralina (2067%). Esta tendencia coincide con los resultados de Huerta *et al.* (2013), si bien los valores medios son diferentes. El efecto matriz fue corregido en la cuantificación de los fármacos mediante el uso de estándares internos en cada muestra y curvas de calibración preparadas en la misma matriz analizada.

Tabla 2.9. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) en ng/g peso húm. de pez, recuperación (Rec., valor medio \pm desvío estándar) y efecto matriz (EM) porcentual, para el método de Huerta *et al.*, 2013 aplicado a homogenatos de pez completo liofilizado, mezcla de *Gambusia affinis* y *Jenynsia multidentata*.

Compuesto	LOD (ng/g p. húm.)	LOQ (ng/g p. húm.)	Rec. (%)	EM (%)
Atenolol	0,2	0,7	64 \pm 2	-37
Carazolol	0,2	0,6	46 \pm 7	356
Metoprolol	0,8	2,7	64 \pm 3	-23
Nadolol	0,1	0,4	66 \pm 3	-33
Propranolol	0,4	1,2	74 \pm 25	57
Sotalol	1	3,5	74 \pm 5	-51
Carbamazepina	0,2	0,5	58 \pm 1	-43
10,11-epoxiCBZ	0,4	1,2	38 \pm 5	-50
2-hidroxiCBZ	0,1	0,4	37 \pm 2	-45
Citalopram	0,5	1,6	78 \pm 4	20
Diazepam	0,3	1	61 \pm 10	-49
Lorazepam	2	6,5	50 \pm 5	17
Sertralina	1,3	4,3	69 \pm 5	2067
Venlafaxina	0,2	0,6	30 \pm 0,5	-25
Clopidogrel	0,2	0,5	53 \pm 12	-60
Codeína	0,2	0,7	29 \pm 5	-55
Diclofenac	2	6,6	49 \pm 7	-44
Hidroclorotiazida	0,2	0,7	48 \pm 1	-25
Levamisol	0,2	0,5	38 \pm 2	31
Salbutamol	0,3	1	39 \pm 4	-44

2.3.3.3 Extracción de fármacos a partir de órganos de pez

La recuperación y efecto matriz obtenidos en la extracción por ultrasonido de fármacos a partir de órganos de pejerrey, agregando metanol ó mezcla metanol/buffer citrato 1:1, se muestran en la Tabla 2.10. Se optó por el solvente metanol ya que presentó en general menor efecto matriz que la mezcla con buffer citrato. Debe notarse que el espectrómetro de masas

utilizado fue un híbrido triple cuadrupolo-trampa iónica lineal (QqLiT), con el que se obtienen límites de detección instrumental entre uno y dos órdenes de magnitud menores que los obtenidos con un equipo de masas de alta resolución (QTOF).

Tabla 2.10. Porcentaje de recuperación (a) y efecto matriz (b) de atenolol (ATE), carbamazepina (CBZ), carbamazepina-10,11-epóxido (10,11-epoxiCBZ) y 2-hidroxicarbamazepina (2-hidroxiCBZ) en los 5 órganos de pejerrey, con extracción por ultrasonido utilizando metanol (MeOH) como solvente o mezcla metanol/buffer citrato 1:1 (M/B).

a) Recuperación (%)	BRANQUIAS		INTESTINO		HIGADO		CEREBRO		MUSCULO	
	MeOH	M/B	MeOH	M/B	MeOH	M/B	MeOH	M/B	MeOH	M/B
ATE	87	21	83	113	86	69	69	36	75	38
CBZ	101	91	62	108	104	114	102	118	104	121
10,11-epoxiCBZ	96	86	54	86	95	106	93	107	93	118
2-hidroxiCBZ	102	86	49	85	100	111	96	110	94	118
b) Efecto matriz (%)	MeOH	M/B	MeOH	M/B	MeOH	M/B	MeOH	M/B	MeOH	M/B
ATE	-24	-39	-74	-73	-53	-59	-3	-12	-13	-34
CBZ	-45	-62	-82	-86	-71	-74	-8	-31	-18	-24
10,11-epoxiCBZ	-51	-68	-84	-89	-71	-75	-27	-46	-32	-36
2-hidroxiCBZ	-48	-67	-84	-89	-70	-75	-17	-40	-23	-31

Los porcentajes de recuperación, efecto matriz y límites de detección y cuantificación del método final para los fármacos estudiados se observan en la Tabla 2.11. El rango lineal de trabajo fue en general entre 0,5 y 50 µg/L ($R^2 > 0,99$), es decir entre 2-200 ng de fármaco por g de peso seco para los órganos de mayor masa (branquias, intestino y músculo, a partir de 25 mg de muestra) y entre 5-500 ng/g peso seco para los órganos de menor masa (hígado y cerebro, 10 mg de muestra); debe entenderse que estos valores se modificarán de acuerdo al porcentaje de recuperación de cada compuesto para peces con distinto contenido en grasas, u otros componentes de matriz que puedan ser distintos a los utilizados durante esta optimización del método.

Tabla 2.11. Recuperación (%), efecto matriz (%), límite de detección (LOD, ng/g peso seco) y límite de cuantificación (LOQ, ng/g peso seco) del método de análisis de atenolol (ATE), carbamazepina (CBZ) y sus metabolitos: 10,11-epoxicarbamazepina (10,11-epoxiCBZ) y 2-hidroxicarbamazepina (2-hidroxiCBZ), en órganos de pejerrey (branquias, intestino, hígado, cerebro y músculo).

	Recuperación (%)					Efecto matriz (%)*				
	BR	INT	HIG	CER	MUS	BR	INT	HIG	CER	MUS
ATE	93 ± 6	95 ± 8	111 ± 41	93 ± 24	91 ± 38	-45	-59	-76	-22	-13
CBZ	98 ± 13	74 ± 7	92 ± 54	73 ± 10	59 ± 25	-50	-65	-69	10	-24
10,11-epoxiCBZ	90 ± 16	91 ± 8	105 ± 47	82 ± 7	71 ± 23	-56	-85	-84	13	-27
2-hidroxiCBZ	97 ± 18	92 ± 9	97 ± 54	77 ± 5	75 ± 27	-50	-77	-78	27	-21
	LOD (ng/g peso seco)					LOQ (ng/g peso seco)				
	BR	INT	HIG	CER	MUS	BR	INT	HIG	CER	MUS
ATE	0,6	1,2	2,4	1,5	0,6	2,0	4,0	8,0	5,0	2,0
CBZ	1,2	1,2	1,2	0,3	0,6	4,0	4,0	4,0	1,0	2,0
10,11-epoxiCBZ	0,6	6,1	6,1	1,5	0,6	2,0	20,0	20,0	5,0	2,0
2-hidroxiCBZ	1,2	6,1	1,2	1,5	0,6	4,0	20,0	4,0	5,0	2,0

*Valores negativos indican supresión iónica, valores positivo aumento de señal.

Los porcentajes de recuperación de ATE, CBZ y sus metabolitos en los 5 órganos variaron entre 59-111%, con una variación en general menor al 20% en branquias, intestino y cerebro, entre 32-42% en músculo y entre 37-59% en hígado. El efecto matriz osciló entre 85% de supresión iónica y 27% de aumento de señal. El principal problema de interferencia es la supresión iónica, siendo hígado e intestino las matrices más complicadas para el análisis de estos fármacos. Por lo tanto el uso de estándares internos marcados isotópicamente (dilución isotópica) y curvas de calibración preparadas en extractos de la misma matriz de análisis es de suma importancia para una correcta cuantificación. En la bibliografía se informa comúnmente mayor efecto matriz en hígado, lo cual puede deberse a mayor contenido lipídico y proteico (Ramirez *et al.*, 2009; Huerta *et al.*, 2013; Tanoue *et al.*, 2014). En los casos de mucha interferencia se optó por diluir el extracto final. Sin embargo, se recomienda un método de purificación más exhaustivo para analizar fármacos a partir de hígado e intestino. Los límites de detección y cuantificación de los 4 analitos obtenidos durante este trabajo se encuentran dentro de los valores publicados en la bibliografía para análisis de fármacos en peces (Ramirez *et al.*, 2007; Subedi *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2012), o bien son más altos (Huerta *et al.*, 2013; Tanoue *et al.*, 2014).

2.4 Conclusiones parciales

✓ Se optimizó una metodología de análisis de fármacos y esteroides (15 compuestos) en niveles de trazas en muestras de agua superficial, por extracción en fase sólida y separación-detección por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (equipo HPLC-QTOF). Este método resulta aplicable a muestras de agua dulce natural con niveles mayores a 0,1 ng/L de fármacos y esteroides.

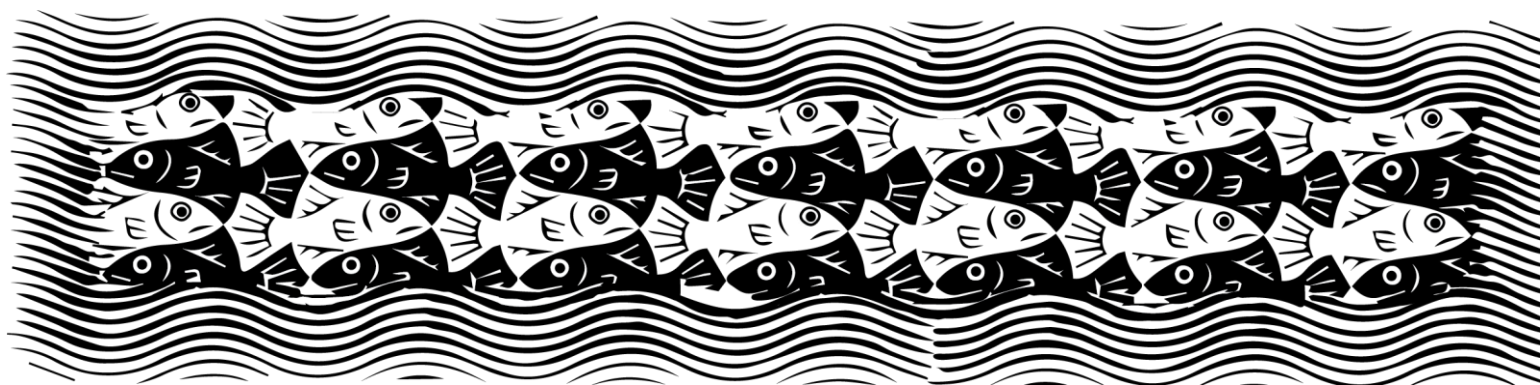
✓ Para el análisis de CBZ y ATE a partir de pez completo, se optimizó el tratamiento previo a la extracción en fase sólida del método anterior (aguas), determinándose que las mejores condiciones fueron homogeneización por dispersión (utilizando equipo ULTRATURRAX T18) con metanol/HCl 0,05 M, seguido de extracción por ultrasonido. Debido a los límites de detección obtenidos y supresión iónica observada, se considera que este método es aplicable para el análisis de ambos fármacos en peces expuestos a condiciones de laboratorio.

✓ Para la cuantificación de fármacos en peces completos capturados en el Río Suquía, se optó por un método alternativo propuesto por Huerta *et al.* (2013), el cual consiste en una metodología de extracción líquida a presión, limpieza por cromatografía de permeación en gel y detección/cuantificación por UPLC-MS/MS utilizando un espectrómetro de masas híbrido triple cuadrupolo-trampa iónica lineal (QqLiT). Con este método se obtuvieron límites de detección aceptables (0,1-2 ng/g peso húm.) para el análisis de fármacos en peces silvestres, utilizando curvas de calibración preparadas en la misma matriz de análisis (homogenato de pez) y con agregado de estándares internos marcados isotópicamente.

✓ En órganos de peces de poca masa (mg) se determinaron las condiciones de extracción de CBZ, ATE y dos metabolitos, 10,11-epoxiCBZ y 2-hidroxiCBZ, utilizando homogeneización de los órganos en seco y extracción por ultrasonido con metanol, seguida de SPE y el método de detección/cuantificación por UPLC-MS/MS (QqLiT). La cuantificación también se llevó a cabo con el agregado de estándares internos marcados isotópicamente a las muestras, utilizando curvas de calibración preparadas en cada matriz de órganos, alcanzando límites de detección aceptables para el análisis de los fármacos en branquias, cerebro y músculo (0,3-1,5 ng/g peso húm.) y límites relativamente altos en hígado e intestino (1,2-6,1 ng/g peso húm.) para los niveles detectados en peces silvestres en bibliografía

CAPITULO 3

DETERMINACION DE FARMACOS Y COMPUESTOS RELACIONADOS EN AGUA Y PECES DEL RIO SUQUIA



3.1 Introducción

Los compuestos de origen farmacéutico ingresan continuamente a los sistemas cloacales como compuestos parentales o sus metabolitos, eliminados a través de las excretas humanas (orina y heces), y por descarte de drogas vencidas o en desuso. Muchos estudios de degradación de fármacos y esteroides en plantas de tratamiento con distintos procesos han demostrado que la capacidad para degradar este tipo de microcontaminantes orgánicos depende de la infraestructura y operación de la planta, así como de la estructura y propiedades del fármaco. Además, existe la posibilidad de disociación de metabolitos conjugados (glucurónidos, sulfatos, etc., sección 4.1.2) durante el tratamiento de efluentes, lo cual retorna el compuesto a su estructura original activa, y ocasiona un aumento de la carga de contaminantes que egresan de la planta (Khetan y Collins, 2007). Ejemplo de esto lo constituyen los estrógenos, E₂ y EE₂, los cuales se excretan principalmente como conjugados glucurónidos y sufren disociación en las plantas de tratamiento (Ternes *et al.*, 1999). Se ha publicado en la bibliografía un amplio rango de porcentajes de eliminación de fármacos, medidos principalmente en la fase acuosa disuelta de plantas de tratamiento secundario (con degradación biológica en lodos activados), desde 0 a 100% (Mompelat *et al.*, 2009). Por ejemplo, paracetamol, ácido salicílico, E₂ y propranolol tienen en promedio altos porcentajes de remoción (R > 80%), mientras que ATE, CBZ, metoprolol y ácido clofíbrico tienen baja eficiencia de remoción (R < 30%) (Miège *et al.*, 2009). Estos resultados dependen en gran medida del tipo de proceso empleado en la planta de tratamiento, siendo los procesos secundarios con tratamiento de nitrógeno y los bioreactores de membrana los que muestran mayor eficiencia de remoción (Miège *et al.*, 2009). Por otra parte, hay que tener en cuenta que cuando se ve superada la capacidad de las plantas de tratamiento, como en episodios de tormenta, puede haber descargas directas de los efluentes sin tratar al agua superficial (Tamtam *et al.*, 2008).

Los compuestos que resisten el proceso de las plantas de tratamiento son descargados con sus efluentes a los cursos de agua superficial. La primera atenuación que experimentan es dilución hasta niveles de trazas (generalmente de µg/L a ng/L). Otra atenuación posible es la adsorción a los sólidos en suspensión y sedimentos, coloides y materia orgánica disuelta. Generalmente, los fármacos neutros y con grupos ácidos carboxílicos, tienen coeficientes de sorción bajos, comparados con aquellos que presentan grupos funcionales aminas (Li, 2014). Los fármacos también sufren transformaciones biológicas y físicas-químicas, si bien están

diseñados para resistir la degradación microbiana y ser químicamente estables. La degradación abiótica, principalmente fotodegradación, es el proceso más factible de ocurrir en aguas superficiales (Mompelat *et al.*, 2009). En general, los fármacos son compuestos relativamente polares, solubles en agua y poco volátiles, lo cual les otorga notable movilidad en el ambiente y moderada retención a sedimentos y lodos de plantas de tratamiento (Sarmah *et al.*, 2006).

La presencia de fármacos en el ambiente ha sido ampliamente documentada en diferentes matrices ambientales a nivel mundial. En uno de los primeros estudios de relevamiento de contaminantes orgánicos provenientes de efluentes se analizaron 95 compuestos orgánicos en 139 cursos de agua superficial susceptibles de contaminación en los Estados Unidos, en el período 1999-2000, detectando 82 compuestos de diversas fuentes de contaminación. Entre los contaminantes figuran antibióticos en el rango nd (no detectado)-1,9 µg/L, analgésicos nd-1 µg/L, reductores de lípidos séricos nd-0,79 µg/L (máx. gemfibrozil), fármacos de venta libre nd-10 µg/L (antiinflamatorios, antipiréticos), hormonas y esteroides hasta 0,831 µg/L de etinilestradiol (Kolpin *et al.*, 2002). En una recopilación más reciente de fármacos en agua dulce, publicados entre 2006-2009 en Norteamérica, Europa, Asia y Australia, el rango de concentración de antibióticos fue de 1,7-2000 ng/L, analgésicos y antiinflamatorios entre nd-360 ng/L, el antiepiléptico CBZ 2,7-157 ng/L, β-bloqueantes nd-314 ng/L y reductores de lípidos séricos nd-363 ng/L (Pal *et al.*, 2010).

Debido al continuo ingreso de los fármacos al ambiente (*pseudo-persistencia*), la exposición de la biota acuática a estos compuestos, y a los productos de degradación, es constante, así como también el riesgo de acumularlos (Ankley *et al.*, 2007). La bioacumulación es la acumulación neta de un contaminante en un organismo, como consecuencia de los procesos de entrada desde su entorno, biotransformación y eliminación desde el organismo (un balance entre lo ingresado y lo que desaparece por metabolismo y/o eliminación) (Markert *et al.*, 2003b). Se ha mencionado que la bioacumulación debería considerarse un criterio de peligro en sí mismo, ya que algunos efectos dañinos pueden manifestarse en estadios posteriores del ciclo de vida de un organismo, en eslabones superiores de la cadena trófica o bien ser multi-generacionales (van der Oost *et al.*, 2003). Los peces se consideran organismos aptos para ser utilizados en monitoreos ambientales y son susceptibles a bioacumular fármacos (van der Oost *et al.*, 2003; Huerta *et al.*, 2012). El ingreso de fármacos en los peces puede ocurrir a través de la superficie de la piel y branquias

para los fármacos disueltos y asociados a sedimentos, oralmente a través de la dieta o vía materna a través de la transferencia de contaminantes en las reservas de lípidos de los huevos (Corcoran *et al.*, 2010). El ingreso de contaminantes en la biota en general, depende de factores biológicos como ciclo de vida, estrategia reproductiva, tipo de alimentación y preferencia de hábitat, los cuales influyen de manera significativa la sensibilidad de las especies a los contaminantes (Huerta *et al.*, 2012). En los últimos 10 años, se ha informado en la bibliografía la presencia de residuos farmacéuticos en peces, generalmente colectados en sitios impactados por efluentes urbanos (Brooks *et al.*, 2005; Chu y Metcalfe, 2007; Ramirez *et al.*, 2009; Huerta *et al.*, 2013).

Las zonas de mayor preocupación respecto a la contaminación por fármacos son aquellas donde las descargas de efluentes tienen un caudal significativo respecto al caudal del curso de agua superficial o en cursos utilizados para la producción de agua potable (García *et al.*, 2012). La cuenca del Río Suquía cumple ambas condiciones. La misma está ubicada en la región semiárida centro-norte de la Provincia de Córdoba, Argentina (Fig. 3.1). El Río Suquía nace en el Dique San Roque y a partir de este punto escurre en sentido SO-NE hasta desembocar en la laguna Mar Chiquita, recibiendo como únicos afluentes al A° Saldán y al A° La Cañada. La longitud aproximada del Río Suquía es de 200 km, el ancho promedio de su cauce es de 200 m y su caudal medio anual es de 9,66 m³/s (período 1925-1981), según datos registrados en el punto de medición Dique San Roque, perteneciente a la Red Hidrológica Nacional (SSRH, 2014). El caudal del río presenta fluctuaciones debido al régimen de precipitaciones diferencial que ocurre en el año (precipitación media anual 700-900 mm, máxima en el período estival enero-marzo) (Pasquini *et al.*, 2011). Durante la temporada húmeda (de noviembre a abril) el río presenta un período de caudal alto (promedio 14,4 m³/s y máximo de 17 m³/s) y durante la temporada seca (mayo a octubre) presenta un caudal bajo (promedio de 4,5 m³/s y mínimo de 3 m³/s) (SSRH, 2014). Algunos kilómetros aguas abajo de su nacimiento, parte de su caudal es retirado hacia la Planta Potabilizadora de Aguas Cordobesas, para la provisión de agua potable a la ciudad de Córdoba, ubicada a 35 km aguas abajo. El curso del río continúa por 40 km atravesando la ciudad capital y recibiendo a la salida de la misma la descarga de la Estación Depuradora de Aguas Residuales de la Ciudad de Córdoba (EDAR-Bajo Grande). A partir de allí, el río cruza pequeños poblados que contribuyen con sus efluentes y escorrentías y que, además, utilizan el río como provisión de agua de riego para cultivos. Finalmente, 150 km aguas abajo de la ciudad de Córdoba, el río

desemboca en la laguna Mar Chiquita, declarada sitio RAMSAR (Humedal de interés internacional, Convención Ramsar, 2002).

Se ha demostrado, a través de varios estudios en la cuenca, que las actividades antrópicas impactan negativamente sobre la calidad del agua y sedimentos, afectando también a la ictiofauna autóctona, lo cual es particularmente notorio en las localidades situadas aguas abajo de la descarga de efluentes de la planta de tratamiento de la ciudad (Pesce y Wunderlin, 2000; Wunderlin *et al.*, 2001; Cazenave *et al.*, 2005; Hued y Bistoni, 2005; Merlo *et al.*, 2011; Monferrán *et al.*, 2011; Guyón *et al.*, 2012; Maggioni *et al.*, 2012; Bonansea *et al.*, 2013; Rautenberg *et al.*, 2015). De acuerdo a Mancini (2012), el cociente entre el caudal del efluente de la estación depuradora de aguas residuales (EDAR-Bajo Grande), cuyo promedio para el período 2011-2012 fue 2,45 m³/s, y el caudal del río, cuyo promedio para el mismo período fue 2,5 m³/s, es casi 1:1, lo cual excede la capacidad de purificación del río. Según el último censo nacional de 2010, la ciudad de Córdoba tiene 1.330.023 habitantes, de los cuales aproximadamente 700.000 están conectados a la red cloacal. Los efluentes cloacales son dirigidos a la EDAR, que funciona con tratamiento secundario de lechos percoladores, con digestión anaeróbica de barros. La planta tiene un conducto de desvío (“*by-pass*”) que permite derivar el líquido crudo directamente al Río Suquía sin pasar por el establecimiento depurador, el cual se acciona por desbordes en días de altas precipitaciones donde el líquido se incrementa y excede la capacidad de bombeo del sistema. Además, la planta no tiene actualmente la capacidad de tratar el caudal de ingreso que recibe y presenta reiterados problemas de falta de insumos, por lo cual el volcamiento de efluentes sin depurar directamente al Río Suquía, o solo con tratamiento de desinfección, es un serio problema desde hace muchos años, que aún no tiene soluciones concretas (<http://www.lavoz.com.ar/ciudadanos/decretan-emergencia-ambiental-por-volcamientos-en-bajo-grande>; <http://www.lavoz.com.ar/opinion/sistema-cloacal-colapsado-por-negligencia-e-imprevision>; Hued y Bistoni, 2005; Maggioni *et al.*, 2012).

El monitoreo ambiental es una herramienta útil para evaluar los riesgos de los contaminantes sobre organismos y para clasificar la calidad ambiental de los ecosistemas. Dentro de los métodos de monitoreo se encuentra el monitoreo químico (evaluación de exposición midiendo los niveles de un grupo conocido de contaminantes en compartimentos ambientales) y el monitoreo de bioacumulación (evaluación de exposición midiendo los niveles de contaminantes en la biota) (van der Oost *et al.*, 2003).

En estudios previos llevados a cabo en el Río Suquía se detectó la presencia de diversos contaminantes asociados a distintas fuentes de contaminación, además de la descarga de efluentes de la EDAR, como fuentes urbanas, agrícolas e industriales. Entre los contaminantes registrados en agua y sedimento del río, se ha mencionado la presencia de lindano, diclorobencenos, metales y pesticidas (organoclorados, organofosforados, triazinas, piretroides y cloroacetamidas), en agua y sedimento del río (Pesce y Wunderlin, 2000; Monferrán *et al.*, 2009, 2011; Merlo *et al.*, 2011; Bonansea *et al.*, 2013). Asimismo se han detectado cianotoxinas en agua y peces colectados en el Dique San Roque (Cazenave *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2013), así como pesticidas organoclorados, bifenilos policlorados (PCBs) y polibromodifenil éteres (PBDEs) en agua, material particulado, sedimento y peces de la laguna Mar Chiquita (Ballesteros *et al.*, 2014). En cuanto a la presencia de residuos de origen farmacéutico, no existen antecedentes de mediciones de los mismos en la cuenca del Río Suquía, por lo cual se consideró relevante llevar a cabo campañas de monitoreo químico de fármacos y su bioacumulación en peces, de manera simultánea.

Objetivo Específico:

- Estudiar la distribución espacial y temporal de fármacos y compuestos relacionados en agua y peces del Río Suquía.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Sitio de estudio

Se seleccionaron 6 sitios de muestreo pertenecientes a la cuenca del Río Suquía, teniendo en cuenta estudios previos de calidad de agua de la cuenca (Pesce y Wunderlin, 2000; Wunderlin *et al.*, 2001; Hued y Bistoni, 2005, 2007; Hued *et al.*, 2006; Pesca *et al.*, 2008; Merlo *et al.*, 2011; Monferrán *et al.*, 2011; Guyón *et al.*, 2012; Hued *et al.*, 2012; Maggioni *et al.*, 2012; Bonansea *et al.*, 2013). El primer sitio de muestreo, Río Yuspe (RY: 31°14'17,6" Sur; 64°31'14,7" Oeste), es un sitio previamente establecido como "sitio de referencia" localizado en un área *quasi*-prístina, 30 km aguas arriba del Lago San Roque (Fig. 3.1). El segundo sitio de muestreo, El Diquecito-La Calera (LC: 31°21'24,7" Sur; 64°23'18,7" Oeste), se encuentra en la Cuenca alta del Río Suquía (primer sitio de muestreo en el Río Suquía), previo a la toma de agua de la Planta Potabilizadora de Aguas Cordobesas. Luego de atravesar la ciudad de Córdoba (Cuenca media-baja), se encuentra Chacra de la Merced (CHM:31°25'6,5" Sur; 64°3'51,7" Oeste), sitio ubicado a 5,5 km aguas abajo de la descarga de efluentes de la EDAR-Bajo Grande, seguido de Villa Corazón de María (VCM: 31°26'50,1" Sur; 63°59'30,6" Oeste, a 16 km de la EDAR), Capilla de los Remedios (CR: 31°26'5,3" Sur; 63°49'54,1" Oeste, a 35 km de la EDAR) y Río Primero (RP: 31°20'20,5" Sur; 63°36'35,2" Oeste), aproximadamente 70 km aguas abajo de la EDAR.

3.2.2 Toma de muestras

Se llevaron a cabo dos campañas de monitoreo durante la temporada seca (octubre 2011 y julio 2012) y dos durante la temporada húmeda (marzo y abril 2012). En cada uno de los sitios se tomaron 2 muestras de agua en botellas de vidrio color caramelo previamente lavadas con agua ultrapura (sin dejar aire en las mismas), a 30 cm de profundidad aproximadamente desde la superficie, en el centro del curso del río. Se midió el pH, temperatura y conductividad del agua *in situ* con un equipo multi-paramétrico previamente calibrado en el laboratorio (Multiline F/Set 3) (APHA *et al.*, 1998). Las muestras fueron conservadas en frío (4°C) y trasladadas al laboratorio, donde fueron filtradas (filtros de celulosa 0,45 µm) dentro de las 24 h de la toma de muestra, y conservadas a 4°C. La extracción en fase sólida (SPE) se realizó dentro de las 72 h (Kot-Wasik *et al.*, 2007). Se midió la concentración de amonio [NH₄]⁺, nitrato [NO₃]⁻ y nitrito [NO₂]⁻, así como la demanda química de oxígeno (DQO) (APHA *et al.*, 1998), como indicadores químicos del deterioro en la calidad del agua en la cuenca (Pesce y Wunderlin 2000; Wunderlin *et al.* 2001).

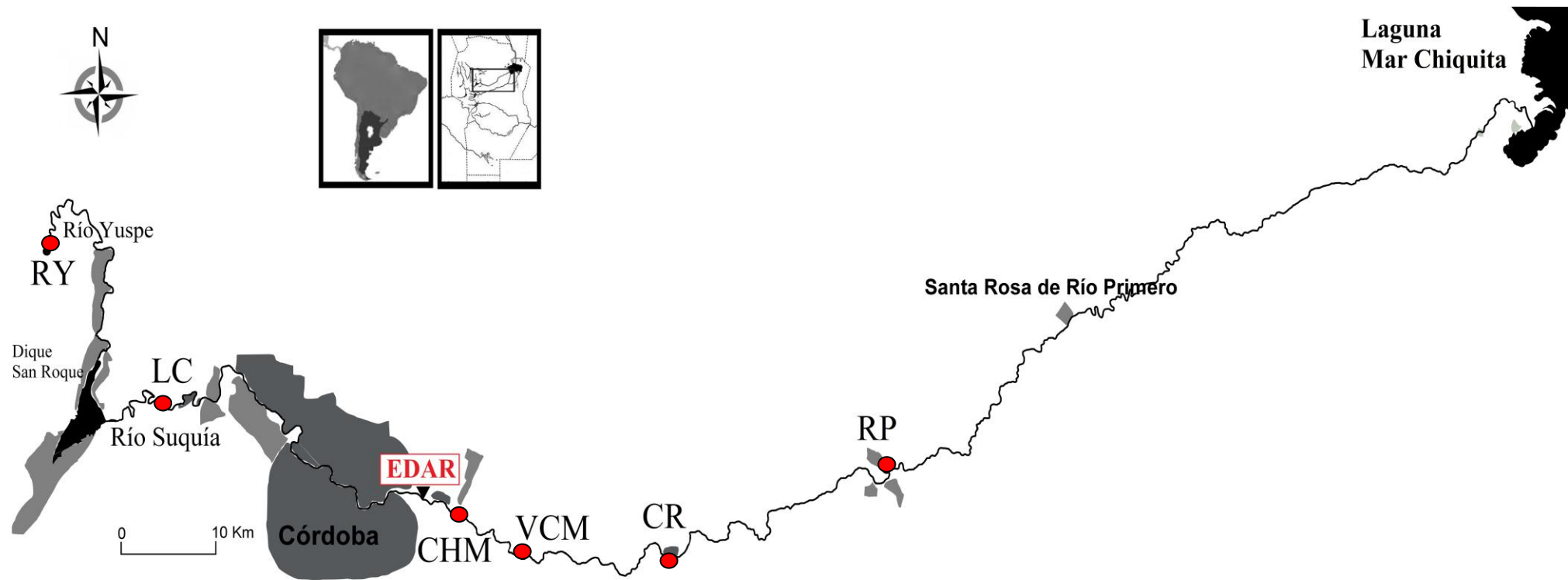


Fig. 3.1. Mapa de la zona de estudio con los sitios de muestreo: RY: Río Yuspe; LC: La Calera; CHM: Chacra de la Merced; VCM: Villa Corazón de María; CR: Capilla de los Remedios; RP: Río Primero. Los cuerpos de agua superficial Fig.n en negro. Las áreas urbanas se observan en un gradiente de colores grises de acuerdo a la densidad poblacional (desde gris claro a oscuro indicando aumento creciente de población).

Junto con las muestras de agua, en las segundas campañas de monitoreo de temporada húmeda y seca se recolectaron peces en los sitios dónde se había detectado, durante el primer monitoreo, la presencia de fármacos en las muestras de agua. En los sitios más cercanos a la EDAR, Chacra de la Merced y Villa Corazón de María, no se encontraron peces. A 35 km aguas abajo de la EDAR, en Capilla de los Remedios sólo se encontraron individuos de *G. affinis* en la temporada húmeda (hembras y machos adultos, 40 individuos en total) y recién luego de 70 km, en Río Primero se recolectaron individuos de *G. affinis* y *J. multidentata* (hembras y machos adultos, 30-40 individuos de cada especie). Ambas especies son frecuentes en la cuenca del Río Suquía, estando presentes aún en sitios contaminados (Hued y Bistoni, 2005). Los peces fueron sacrificados por corte de la medula espinal al momento de captura y transportados a 4°C. En el laboratorio, se lavaron con agua ultrapura, se envolvieron en papel de aluminio y se conservaron a -20°C hasta su análisis. La relación peso húm./seco se calculó para cada especie pesando individualmente 30 individuos (valor promedio).

3.2.3 *Análisis de fármacos en agua del Río Suquía*

Las muestras de agua de río fueron analizadas siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.3.1 y 2.3.2, para los 15 fármacos y esteroides optimizados (Tabla 2.2, excepto EE₂). Se utilizaron los mismos reactivos y materiales descritos en dichas secciones, así como el equipamiento (HPLC-QTOF). La cuantificación se realizó por calibración externa con curvas de 5 puntos (soluciones mezcla de estándares de 5, 10, 100, 500, 1000 µg/L, disueltas en metanol/agua 15:85), preparadas e inyectadas previo a cada análisis. Los porcentajes de recuperación se calcularon en cada monitoreo (debido al cambio en el caudal del río y composición de la matriz), para una muestra de Río Primero con agregado de 100 µg/L de mezcla de estándares de fármacos al inicio del análisis.

3.2.4 *Análisis de fármacos en peces*

Los peces colectados en el Río Suquía fueron liofilizados, homogeneizados en seco con mortero y procesados para el análisis de 20 fármacos y metabolitos en conjunto de peces completos, de acuerdo a la metodología de Huerta *et al.*, 2013, descrita en la sección 2.2.4.2.

3.2.5 *Análisis de datos*

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo con el programa Infostat Software Package (Di Rienzo *et al.*, 2012). Todos los valores se expresan como media ±

desviación estándar. Las diferencias entre sitios de muestreo y estaciones se evaluaron mediante análisis de la varianza a una vía (one-way ANOVA). Como los supuestos paramétricos no se cumplieron, se realizó el análisis de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn *a posteriori* para comparaciones múltiples ($P < 0,05$). Los valores de concentración menor al límite de detección (no detectados) fueron considerados como 0 para el ANOVA. Los valores menores al límite de cuantificación fueron considerados igual al límite de detección. Las diferencias de concentraciones de fármacos entre ambas especies de pez se analizaron por modelos mixtos, usando el test LSD Fisher *a posteriori* ($P < 0,05$).

Los Factores de Bioacumulación relativos a la concentración en agua disuelta (FBA, en unidades de L/kg) de los compuestos que se analizaron en agua superficial y en pez, se calcularon como el cociente entre la concentración del fármaco en pez entero ($\mu\text{g}/\text{kg}$ peso húm.) y la concentración en la fase disuelta del agua ($\mu\text{g}/\text{L}$) (Di Giulio y Hinton, 2008a).

3.3 Resultados y discusión

Se presentan a continuación los resultados del análisis de muestras de agua y peces colectados en el Río Suquía, con el objetivo de estudiar la distribución espacial y temporal de fármacos y compuestos relacionados en la cuenca.

3.3.1 Análisis de fármacos en agua del Río Suquía

3.3.1.1 Caracterización química

Los resultados de análisis químicos de calidad de agua del Río Suquía se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Caracterización química del agua del Río Yuspe (sitio referencia) y Río Suquía (5 sitios de muestreo), en temporada seca y húmeda.

Sitio	Temporada	pH	C ($\mu\text{S/cm}$)	$[\text{NH}_4]^+$ (mg/L)	$[\text{NO}_2]^-$ (mg/L)	$[\text{NO}_3]^-$ (mg/L)	DQO (mg/L)
RY	seca	8,0 (0,7)	108 ^a (58)	0,6 ^a (0,7)	<LOD ^a	2 ^a (2)	40 (44)
	húmeda	8,4 (0,3)	88,5 ^a (5)	0,2 ^a (0,1)	<LOD ^a	2 ^a (1)	123 (174)
LC	seca	8,1 (0,6)	254 ^{ab} (69)	0,5 ^a (0,3)	0,04 ^{ab*}	4 ^{ab} (1)	66 (47)
	húmeda	8,2 (0,4)	169 ^{ab} (11)	0,6 ^{ab} (0,1)	<LOD ^a	3 ^{ab} (1)	213 (52)
CHM	seca	7,7	1544 ^b	34 ^{bc} (5)	5,1 ^{c*} (0,2)	14 ^{c*} (2)	837 (920)
	húmeda	7,7	1237 ^b	11 ^{bc} (6)	0,08 ^{ab}	28 ^c (3)	520 (571)
VCM	seca	7,4 (0,3)	1523 ^{b*} (39)	42 ^{c*} (7)	1,0 ^c (0,5)	5,9 ^{bc*} (0,4)	603 (657)
	húmeda	7,9 (0,3)	1202 ^b (87)	18 ^c (7)	0,5 ^b (0,3)	13 ^{bc} (2)	411 (409)
CR	seca	7,8 (0,1)	1441 ^b (17)	28 ^{bc} (2)	0,5 ^{bc} (0,4)	6 ^{abc} (1)	223 (282)
	húmeda	7,7(0,04)	1188 ^b (120)	21 ^c (10)	0,4 ^b (0,2)	12 ^{abc} (6)	883 (1342)
RP	seca	7,7 (0,1)	1332 ^b (116)	8 ^{ab} (6)	0,6 ^{bc} (0,4)	22 ^c (7)	226(310)
	húmeda	7,9 (0,1)	1118 ^b (138)	4 ^{abc} (3)	0,4 ^b (0,1)	29 ^c (5)	316 (402)

RY: Río Yuspe; LC: La Calera; CHM: Chacra de la Merced; VCM: Villa Corazón de María; CR: Capilla de los Remedios; RP: Río Primero. C: conductividad; $[\text{NH}_4]^+$: concentración de amonio; $[\text{NO}_2]^-$: concentración de nitritos, LOD $[\text{NO}_2]^-$: 0,04 mg/L; $[\text{NO}_3]^-$: concentración de nitratos; DQO: demanda química de oxígeno. Los resultados se presentan como valor medio (desvío estándar). *: indica diferencias significativas entre temporadas, en cada sitio de muestreo. Letras iguales como superíndice indican que los valores medios no son significativamente diferentes entre los sitios de muestreos, para una misma temporada.

En general, no se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos en temporada seca y húmeda, excepto para algunos parámetros, correspondientes la mayoría al sitio Villa Corazón de María (conductividad, concentración de amonio y nitratos), el cual presentó variación temporal. En ambas temporadas, las muestras de Río Yuspe y La Calera evidenciaron mejores condiciones de calidad de agua que los sitios ubicados aguas abajo de la ciudad de Córdoba, donde se observó un marcado deterioro. Este patrón general se pone de

manifiesto en los valores de conductividad durante la temporada seca (Tabla 3.1), donde se observó un aumento de la conductividad en Chacra de la Merced que se mantuvo hasta Río Primero. Lo mismo ocurrió con la concentración de amonio, cuyos valores más altos se encontraron en Chacra de la Merced, Villa Corazón de María y Capilla de los Remedios, disminuyendo hacia Río Primero. Un comportamiento similar se registró para los nitritos. Por el contrario, la concentración de nitratos aumentó hacia Río Primero, probablemente como consecuencia de la oxidación, tanto de amonio como de nitritos (Pesce y Wunderlin, 2000). Los valores de demanda química de oxígeno no mostraron diferencias significativas entre sitios, si bien se observó una tendencia de aumento luego de la descarga de la EDAR y una disminución aguas abajo. En la temporada húmeda la tendencia general de los parámetros en relación a los sitios de muestreo se mantuvo igual, con valores menores, debido al efecto de dilución a causa del mayor caudal del río en esta temporada.

La mejor calidad del agua registrada en los dos primeros sitios de muestreo, así como la notable degradación de la calidad de agua del Río aguas abajo de la ciudad de Córdoba es un comportamiento que ya ha sido descrito en numerosos estudios previos, asociado no solo a la presencia de la EDAR, sino también a descargas de efluentes de otras plantas de tratamiento menores, descargas clandestinas, escorrentía de las ciudades y asentamientos poblacionales y zonas de cultivo que atraviesa el río (Pesce y Wunderlin, 2000; Wunderlin *et al.*, 2001; Hued y Bistoni, 2005, 2007; Hued *et al.*, 2006; Pesca *et al.*, 2008; Merlo *et al.*, 2011; Monferrán *et al.*, 2011; Guyón *et al.*, 2012; Hued *et al.*, 2012; Maggioni *et al.*, 2012; Bonansea *et al.*, 2013; Rautenberg *et al.*, 2015). Entre los parámetros medidos, las concentraciones de amonio y nitrito han sido identificadas dentro de los principales contaminantes asociados a efluentes urbanos, lo que coincide con su mayor concentración en los sitios más próximos posteriores a la EDAR (Pesce y Wunderlin, 2000; Wunderlin *et al.*, 2001). Las concentraciones de NH_4^+ superaron el límite nacional de calidad de agua para la protección de la biota acuática de 0,05-0,47 mg/L N- NH_4^+ , equivalente a 0,06-0,6 mg/L NH_4^+ (SSRH, 2003).

3.3.1.2 Distribución espacial y temporal de fármacos y esteroides

De los 15 compuestos analizados, 8 fueron detectados en las muestras de agua: ciprofloxacina, enalapril, estrona (E_1), dihidrotestosterona (DHT), oxcarbazepina (OxCBZ), CBZ, ATE y diclofenac (Fig. 3.2). Por el contrario, no fueron detectados 7 de ellos (valor debajo del límite de detección): propranolol, claritromicina, furosemida, androstenodiona,

testosterona, metiltestosterona y E₂. Los fármacos fueron detectados en muestras provenientes de los sitios ubicados aguas abajo de la EDAR, no registrando su presencia aguas arriba de la ciudad de Córdoba (Río Yuspe y La Calera), lo que denota el fuerte impacto de la ciudad sobre el Río Suquía. En La Calera se encuentra la toma de agua de la Planta Potabilizadora de Aguas Cordobesas que provee a la ciudad de Córdoba de agua potable. Por lo tanto, no habría riesgo evidente de ingesta de los fármacos y esteroides bajo estudio por el agua de red para la población de Córdoba.

Estos resultados coinciden con los obtenidos para los parámetros químicos (sección 3.3.1.1), mostrando la influencia negativa de la descarga de la EDAR sobre la calidad del agua del Río Suquía, y la preocupación que genera respecto a su uso para fines recreacionales o domésticos. Estos resultados apoyan el concepto de los efluentes urbanos de plantas de tratamiento como importantes fuentes de fármacos y esteroides en los cursos de agua superficial (Ferrari *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011).

Las concentraciones de fármacos y esteroides registradas por sitio de muestreo en ambas temporadas se informan en la Tabla 3.2.

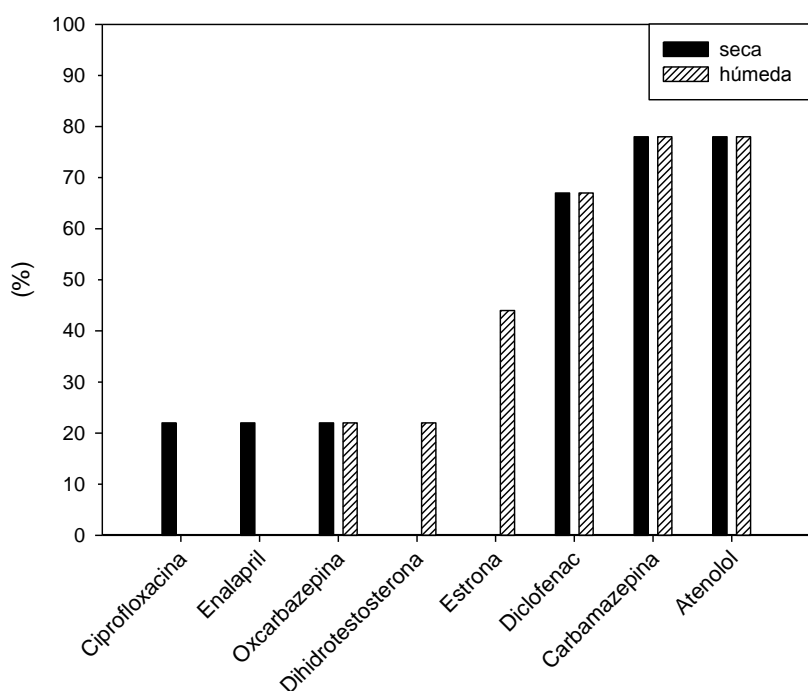


Fig. 3.2. Frecuencia de fármacos detectados en agua superficial del Río Suquía (calculadas como porcentaje de detecciones positivas en el total de muestras de La Calera, Chacra de la Merced, Villa Corazón de María, Capilla de los Remedios y Río Primero, para la temporada seca y húmeda). Propranolol, claritromicina, furosemida, 17 β -estradiol, androstenodiona, testosterona, metiltestosterona: <LOD en todas las muestras.

Tabla 3.2. Concentración de fármacos y esteroides (ng/L), informada como valor medio (desviación estándar) y rangos (valor mínimo-máximo), en los sitios de muestreo, durante la temporada seca y húmeda.

Compuesto	Temporada	RY	LC	CHM		VCM		CR		RP		Ref. ¹
				Media(DE)	Rango	Media(DE)	Rango	Media(DE)	Rango	Media(DE)	Rango	Rango
Diclofenac	seca	<LOD ²	<LOD	124(9)	117-130	100(40)	62-136	91(60)	34-145	43(49)	<LOD-88	0,4-18740
	húmeda	<LOD	<LOD	59 ^{ab} (1)	58-59	68 ^b (3)	65-73	71 ^b (29)	44-102	7 ^a (8)	<LOD-14	
Claritromicina	seca	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD		0,49-443
	húmeda	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD		
Ciprofloxacina	seca	<LOD	<LOD	<LOD		18(20)	<LOD-35	18(21)	<LOD-36	<LOD		14,36-1300
	húmeda	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD		
Atenolol	seca	<LOD	<LOD	338 ^{ab} (22)	322-353	481 ^{b*} (91)	372-581	389 ^{b*} (70)	322-453	130 ^a (139)	9-261	3,44-6167
	húmeda	<LOD	<LOD	169 ^{ab} (11)	161-177	279 ^b (20)	255-302	312 ^b (32)	289-359	31 ^a (13)	19-43	
Propranolol	seca	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD		6,18-178
	húmeda	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD		
Enalapril	seca	<LOD	<LOD	<LOD		<LOQ		2(2)	<LOD-4	<LOD		0,42-88
	húmeda	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD		
Furosemida	seca	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD		1.66-3228
	húmeda	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD		
Carbamazepina	seca	<LOD	<LOD	27 ^{ab} (5)	23-30	21 ^a (2)	18-22	20 ^a (4)	17-25	41 ^b (6)	33-47	1,2-3090
	húmeda	<LOD	<LOD	16 ^a (1)	15-16	19 ^{ab} (3)	16-21	65 ^{bc} (34)	40-113	73 ^c (39)	33-110	
Oxcarbazepina	seca	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		19(22)	<LOD-39	23(27)	<LOD-51	51-255 ³
	húmeda	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		18(20)	<LOD-35	22(25)	<LOD-44	
17β-Estradiol	seca	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD		0,11-100
	húmeda	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD		
Estrona	seca	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		<LOD		<LOQ		0,1-180
	húmeda	<LOD	<LOD	<LOD		<LOD		<LOQ ^a		6 ^b (2)	5-8	

Compuesto	Temporada	RY	LC	CHM	VCM	CR	RP	Ref. ¹
				Media(DE) Rango	Media(DE) Rango	Media(DE) Rango	Media(DE) Rango	
Testosterona	seca	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,2-214
	húmeda	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
Dihidrotestosterona	seca	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	55,3
	húmeda	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	7(3) 4-10	
Androstenodiona	seca	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,8-8,6
	húmeda	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
Metiltestosterona	seca	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,5 ³
	húmeda	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	

RY: Río Yuspe; LC: La Calera; CHM: Chacra de la Merced; VCM: Villa Corazón de María; CR: Capilla de los Remedios; RP: Río Primero. Letras iguales como superíndice indican que los valores medios no son significativamente diferentes entre los sitios de muestreos, para una misma temporada. * Indica diferencias significativas entre las estaciones, para cada sitio de muestreo. ¹Bibliografía revisada: (Kolpin *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002; Thomas y Hilton, 2004; Hernando *et al.*, 2007; Vieno *et al.*, 2007; Leclercq *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2009; Pal *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Ferrari *et al.*, 2011; Gracia-Lor *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Valcárcel *et al.*, 2011; López-Serna *et al.*, 2012; Osorio *et al.*, 2012; Elorriaga *et al.*, 2013; Li, 2014). ²<LOD: valor debajo del límite de detección, para cada compuesto (ng/L): Diclofenac: 0,5; Atenolol: 0,2; Popranolol: 0,5; Ciprofloxacina: 16; Claritromicina: 0,3; Enalapril: 0,1; Furosemida: 2; Carbamazepina: 0,2; Oxcarbazepina: 3; 17β-Estradiol: 6; Estrona: 2; Androstenodiona: 0,8; Testosterona: 0,6; Metiltestosterona: 0,1; Dihidrotestosterona: 2. ³Concentraciones informadas para efluentes de plantas de tratamiento (Leclercq *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011).

Dentro de los 8 compuestos detectados, el antibiótico ciprofloxacina y el antihipertensivo enalapril se detectaron en dos sitios aguas abajo de la EDAR durante la temporada seca (22% frecuencia en el Río Suquía, Fig. 3.2). Concentraciones similares de ambos fármacos se han detectado en el Río Ebro y sus tributarios (España), con 33-60% y 7-11% de frecuencia, respectivamente (López-Serna *et al.*, 2012) (Tabla 3.2). Los esteroides E₁ y DHT se cuantificaron durante la temporada húmeda, con 33% y 22 % de frecuencia en el Río Suquía, respectivamente (Fig. 3.2). E₁ aumentó su concentración hacia Río Primero, mientras que DHT solo se detectó en este último sitio. Los valores detectados de E₁ se encuentran dentro de los informados en la bibliografía (Tabla 3.2). La dificultad para detectar E₂ podría deberse, en parte, a la conversión de E₂ a E₁, la cual ha sido informada en experimentos de degradación aeróbicos con lodos activados, así como también por microorganismos en muestras de agua de ríos de Gran Bretaña (Yin *et al.*, 2002). Por otra parte se han publicado valores de log K_{oc} (coeficiente de partición suelo/agua, normalizado a carbono orgánico en el suelo) de estrógenos mayores a 1, indicando mayor afinidad de estos compuestos por los sedimentos en comparación con el agua (Lei *et al.*, 2009). Liu *et al.* (2012) cuantificaron DHT y E₁ en efluentes de ganado de producción láctea, y E₁ en los cursos de agua receptores en concentraciones de hasta 20,7 ng/L. En nuestro caso de estudio, la localidad de Río Primero se encuentra al comienzo del área de llanura de la zona este de la Provincia de Córdoba, caracterizada por la presencia de ganado, lo que podría estar contribuyendo a la entrada de esteroides al Río Suquía por escorrentía. En lo que respecta a los andrógenos, hay pocos estudios en aguas superficiales. Liu *et al.*, (2011) encontraron DHT en el Río Danshui (China), receptor de efluentes de plantas de tratamiento, en concentraciones similares a las del presente trabajo. Si bien con muy baja frecuencia, la detección de DHT en el Río Suquía contribuye al conocimiento general del comportamiento de los andrógenos en el ambiente. No se debe ignorar el efecto que podrían causar DHT y E₁ sobre la biota acuática, ya que Margiotta-Casaluci y Sumpter (2011) y González *et al.*, (2012) publicaron efectos de disrupción endócrina en peces a concentraciones de 20 ng/L de DHT y 1-10 ng/L de E₁.

Desde Chacra de la Merced a Río Primero, diclofenac, CBZ y ATE fueron los fármacos registrados con mayor frecuencia durante el período de estudio (67-78% de frecuencia, Fig. 3.2). OxCBZ, otra droga antiepiléptica, se detectó en ambas temporadas en Capilla de los Remedios y Río Primero (22% de frecuencia en ambas temporadas, Fig. 3.2). Las concentraciones máximas de diclofenac y CBZ se evidenciaron en Capilla de los Remedios, siendo las mismas 145 ng/L y 113 ng/L, respectivamente. La concentración más alta de un

fármaco en el Río Suquía correspondió a ATE, que alcanzó 581 ng/L en Villa Corazón de María (Tabla 3.2).

En cuanto a la comparación temporal, se encontraron concentraciones más altas de ATE y diclofenac en temporada seca, si bien solo para ATE las diferencias fueron estadísticamente significativas. La presencia de concentraciones más elevadas durante esta temporada puede estar relacionada al bajo caudal del río durante esta época del año, lo que ocasiona una menor dilución de los fármacos que en él se vuelcan.

Considerando la distribución espacial, la tendencia general para diclofenac y ATE fue una disminución en la concentración con el aumento de la distancia a la EDAR. Con CBZ se observó una distribución espacial diferente, ya que la concentración aumentó significativamente en Río Primero. Como se mencionó previamente, la zona de llanura comienza en la zona del último sitio de muestreo, con menor pendiente del río y mayor deposición de material en suspensión. Lahti y Oikari (2011) midieron fármacos en el material particulado sedimentable en ríos de Finlandia receptores de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, encontrando cantidades apreciables de CBZ (3,2–19,1 ng/g peso seco). Vazquez-Roig *et al.* (2012) también mencionan la tendencia de CBZ a acumularse en los sedimentos, ya que fue registrada con mayor frecuencia en este compartimento ambiental (100%) respecto al agua (26%) o suelo (39%) de la zona inundable del Pego-Oliva (España). Dada la capacidad del antiepiléptico de adsorberse al material sedimentable, los sedimentos del río en la zona de Río Primero podrían estar actuando como reservorios de este compuesto, manteniendo en equilibrio una fracción del mismo en la fase disuelta, lo que podría ser una de las razones del aumento observado de este fármaco en esa localidad. Más aún, los niveles de OxCBZ siguieron una distribución similar, probablemente debido a su similitud estructural. Se ha publicado la presencia de OxCBZ en efluentes (Leclercq *et al.*, 2009) en el mismo rango de concentraciones encontradas en este estudio para agua de río, no habiéndose encontrado antecedentes de este antiepiléptico en agua superficial.

En coincidencia con la alta frecuencia de detección de CBZ, ATE y diclofenac en el Río Suquía, los 3 compuestos han sido propuestos en la bibliografía como marcadores de contaminación por efluentes municipales en agua superficial (Heberer, 2002; Nakada *et al.*, 2008), debido a la baja remoción en plantas de tratamiento de efluentes (Miège *et al.*, 2009) y alta frecuencia de detección de los mismos en cursos de agua superficial impactados por

efluentes urbanos (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2008; Pal *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Valcárcel *et al.*, 2011; López-Serna *et al.*, 2012).

En el primer estudio de fármacos en efluentes cloacales y de plantas de tratamiento primario de 6 localidades en Argentina (Palo Blanco-Berisso, Chascomús y Guaminí en la provincia de Buenos Aires y Bell Ville, Monte Maíz y Río Tercero en Córdoba), Elorriaga *et al.* (2012) cuantificaron 0,2–2,3 µg/L de CBZ (equivalentes a 200-2300 ng/L), 0,2–1,7 µg/L de ATE (200-1700 ng/L) y 0,03–1,2 µg/L de diclofenac (30-1200 ng/L). Si bien los efluentes provienen de localidades con distinto nivel de urbanización al observado en Córdoba, los fármacos fueron detectados en todas las muestras analizadas, lo que indica la omnipresencia de los mismos, y su ingreso a los cursos de agua superficial receptores de efluentes urbanos en el país. Dichos autores publicaron un año después la presencia de los mismos fármacos en cursos de agua superficial (ríos, arroyos, lagos y estuario) receptores de efluentes urbanos en 10 de 11 localidades monitoreadas (con poblaciones entre 5000-500.000 habitantes), de la provincia de Buenos Aires y Córdoba (Elorriaga *et al.*, 2013a). Las muestras correspondientes a sitios localizados a menos de 1 km de la salida del efluente mostraron 75-100% de frecuencia de los fármacos analizados, mientras que los ubicados a más de 1 km tuvieron frecuencias menores y más variables (42-85%). La concentración de ATE en los sitios más cercanos a la descarga de efluentes, 0,30 µg/L, equivalente a 300 ng/L (valor máximo 0,55 µg/L = 550 ng/L), se asemeja a los valores encontrados en esta Tesis en el Río Suquía, a distancias mayores de la EDAR (5,5-35 km), en el rango 161-581 ng/L. La concentración de CBZ en el Río Suquía (15-113 ng/L) es menor que las informadas en dicho estudio, de 0,22-0,36 µg/L (equivalentes a 220-360 ng/L), mientras que la concentración de diclofenac en el Río Suquía (7-145 ng/L) es intermedia entre los valores informados en ese estudio, <0,005-0,34 µg/L (5-340 ng/L). Los autores resaltan que, si bien la vida media de CBZ en el ambiente es mayor que la de ATE, ambos compuestos se encuentran en niveles similares debido al alto consumo de ATE. Este último fármaco es el segundo más consumido dentro del grupo de los medicamentos cardiovasculares y de presión arterial en la Argentina (Elorriaga *et al.*, 2013a). En la ciudad de Córdoba, de acuerdo a los medicamentos más vendidos por las 4 farmacias de la obra social DASPU durante el año 2010 (Comisión de Medicamentos DASPU, Ciudad Universitaria), tanto ATE como diclofenac figuran entre los 20 medicamentos de mayor venta en unidades de masa, de acuerdo a la dosis diaria definida (mg) por la Organización Mundial de la Salud.

3.3.2 Análisis de fármacos en peces

En la Tabla 3.3 se muestran los resultados de concentración de fármacos (ng/g peso húm.) en homogenatos de *G. affinis* y *J. multidentata* colectados en Capilla de los Remedios y Río Primero. Los 20 fármacos analizados fueron detectados en los peces recolectados y 7 de ellos fueron registrados en todas las muestras: los β -bloqueantes ATE y nadolol, las drogas psiquiátricas diazepam, lorazepam, clopidogrel, el broncodilatador salbutamol y el diurético hidroclorotiazida. Estos fármacos fueron registrados en el rango 0,4-17 ng/g peso húm. (Tabla 3.3). El analgésico codeína presentó la concentración más alta (41 ng/g peso húm. en *G. affinis*).

Huerta *et al.* (2013) midieron valores similares de clopidogrel, carazolol, sotalol, salbutamol y diclofenac en homogenatos de otras especies de peces colectados en 4 ríos mediterráneos. Sin embargo, propranolol, venlafaxina y citalopram presentaron mayores valores en *G. affinis* y *J. multidentata*, respecto a los de dicho estudio. Los niveles de CBZ en los peces del Río Suquía fueron similares a los publicados para *G. holbrooki* expuestos a efluentes de una planta de tratamiento para reutilización (Wang y Gardinali, 2013). Teniendo en cuenta que las concentraciones de fármacos en homogenatos de pez completo no son comparables a concentraciones por órganos o tejidos, en general, 11 de los 20 fármacos analizados han sido registrados en peces colectados en cursos de agua superficial impactados por efluentes o peces expuestos directamente a efluentes de plantas de tratamiento en otras regiones del mundo (Tabla 3.3).

Si bien las diferencias no fueron significativas, se observa una tendencia a acumular mayor concentración de fármacos en *G. affinis* capturada en temporada húmeda en Capilla de los Remedios con respecto a Río Primero, con excepción de levamisol, fármaco que solo fue registrado en peces recolectados en Río Primero (Tabla 3.3). Esta tendencia sería esperable, teniendo en cuenta la menor distancia de Capilla de los Remedios a la EDAR (35 km) y las mayores concentraciones totales de fármacos en agua en este punto (sección 3.3.1.2).

Tabla 3.3. Concentración de fármacos (ng/g peso húm.) en homogenatos de pez entero (*Gambusia affinis* y *Jenynsia multidentata*) recolectados en el Río Suquíá, en Capilla de los Remedios (CR) y Río Primero (RP), en temporada seca y húmeda (2012).

Compuesto	Grupo terapéutico	Temporada	CR	RP		Frec. (%)	Log K _{ow} *	Ref. **
			<i>G. affinis</i>	<i>G. affinis</i>	<i>J. multid.</i>			
Atenolol	β-bloqueante	húmeda	8 (12)	4 (1)	4 (4)	100	0,43	
		seca	na	14 ^a (6)	3 ^b (3)			
Carazolol	β-bloqueante (uso veterinario)	húmeda	2 (3)	0,6 (0,2)	nd	80	2,71	<LOQ-3,8 ¹
		seca	na	3,3 ^a (0,1)	1 ^b (1)			
Metoprolol	β-bloqueante	húmeda	nd	<LOQ	nd	60	1,76	
		seca	na	<LOQ	nd			
Nadolol	β-bloqueante	húmeda	4 (6)	<LOQ	0,4 (0,6)	100	0,87	
		seca	na	6 (3)	1 (2)			
Propranolol	β-bloqueante	húmeda	3 (5)	nd	23 (40)	80	2,58	4,2 ¹
		seca	na	4,45 ^a (0,01)	<LOQ ^b			
Sotalol	β-bloqueante	húmeda	<LOQ	nd	<LOQ	80	0,05	<LOQ ¹
		seca	na	<LOQ	nd			
Carbamazepina	psiquiátrico	húmeda	8 (13)	2 (3)	nd	60	2,45	0,068-17,9 ^{1,2,3,4}
		seca	na	2 (3)	nd			
10,11-epoxiCBZ	psiquiátrico (metabolito)	húmeda	2 (4)	nd	nd	40	2,31	
		seca	na	1 (2)	nd			
2-hidroxiCBZ	psiquiátrico (metabolito)	húmeda	4 (8)	nd	1 (1)	60	2,46	
		seca	na	3 (2)	nd			
Citalopram	psiquiátrico	húmeda	<LOQ	13 (6)	nd	60	3,74	0,8 ¹ ; 12 ³ 0,02 ⁴ -2,2 ⁴
		seca	na	11 (2)	nd			
Diazepam	psiquiátrico	húmeda	5 (8)	7 (2)	10 (9)	100	3,08	10-110 ³
		seca	na	10 ^a (2)	2 ^b (2)			
Lorazepam	psiquiátrico	húmeda	7 (10)	<LOQ	<LOQ	100	2,53	
		seca	na	14 (7)	9 (11)			

Compuesto	Grupo terapéutico	Temporada	CR	RP		Frec. (%)	Log K _{ow} *	Ref. **
			<i>G. affinis</i>	<i>G. affinis</i>	<i>J. multid.</i>			
Setralina	psiquiátrico	húmeda seca	6 (9) na	nd 14 ^a (2)	nd 4 ^b (5)	60	5,15	0,171-545 ^{2,3,4}
Venlafaxina	psiquiátrico	húmeda seca	2 (4) na	5 (3) 9 ^a (3)	nd 1 ^b (2)	80	2,74	0,6 ¹ ; 21 ³ 0,131-3,1 ⁴
Clopidogrel	anticoagulante	húmeda seca	1 (2) na	<LOQ 3,6 (0,3)	nd 2 (2)	100	4,03	<LOQ ¹
Codeína	analgésico/ antiinflamatorio	húmeda seca	19 (33) na	nd 41 (21)	nd 12 (14)	60	1,34	
Diclofenac	analgésico/ antiinflamatorio	húmeda seca	<LOQ na	nd <LOQ	nd nd	40	4,15	4,1-8,8 ¹
Hidroclorotiazida	diurético	húmeda seca	8 (13) na	3 (1) 17 ^a (1)	1 (2) 6 ^b (6)	100	-0,58	
Levamisol	Antiparasitario (uso veterinario)	húmeda seca	nd na	6 (3) 5 (8)	3 (3) 3 (3)	80	2,36	
Salbutamol	broncodilatador	húmeda seca	6 (10) na	5 (1) 12 ^a (2)	6 (5) 2 ^b (2)	100	0,88	2,6 ¹
TOTAL		húmeda seca	90 na	47 174	52 46			

*Log K_{ow} = log P, en Huerta *et al.*, 2013. **Valores publicados en bibliografía (ng/g peso húm.): (Brooks *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2012; Grabicova *et al.*, 2014; Huerta *et al.*, 2013; Ramirez *et al.*, 2009, 2007; Schultz *et al.*, 2010; Tanoue *et al.*, 2014; Wang and Gardinali, 2013). ¹Homogenatos. ²Músculo. ³Hígado. ⁴Cerebro. <LOQ: menor al límite de cuantificación (detallados en Tabla 2.9, sección 2.3.3.2). na: no analizado. nd: no detectado. Valores medios con distinta letra son significativamente diferentes entre las especies, dentro de la misma temporada.

En general, hay una diferencia notable en el patrón de acumulación de ambas especies, con diferencias estadísticamente significativas en la temporada seca (Fig. 3.3, Tabla 3.3). *G. affinis* acumula mayor variedad de compuestos, lo cual suma una carga total de fármacos mayor que *J. multidentata* en la temporada seca, mientras que en la temporada húmeda la carga total se equipara entre las dos especies. En *G. affinis* se detectaron los 20 fármacos, al menos durante la temporada seca, mientras que en *J. multidentata* hubo 5 compuestos por debajo del límite de detección. El contenido de grasas totales en *G. affinis* fue del 4,6 % en ambas temporadas, mientras que en *J. multidentata* el tenor graso fue del 3,9% en temporada húmeda y 3,1 % en temporada seca. Sin embargo, esta diferencia en el porcentaje de grasas no explica las diferencias en la acumulación de los fármacos, ya que algunos de los compuestos con menores K_{ow} (ejemplo hidroclorotiazida, sotalol, ATE) se acumularon en mayor cantidad en *G. affinis* (con mayor porcentaje de grasa). Se ha mencionado en bibliografía que otros mecanismos relacionados a la especie, como diferencias en la biotransformación, pueden estar involucrados en la acumulación de compuestos polares como los PPCPs (Tanoue *et al.*, 2014).

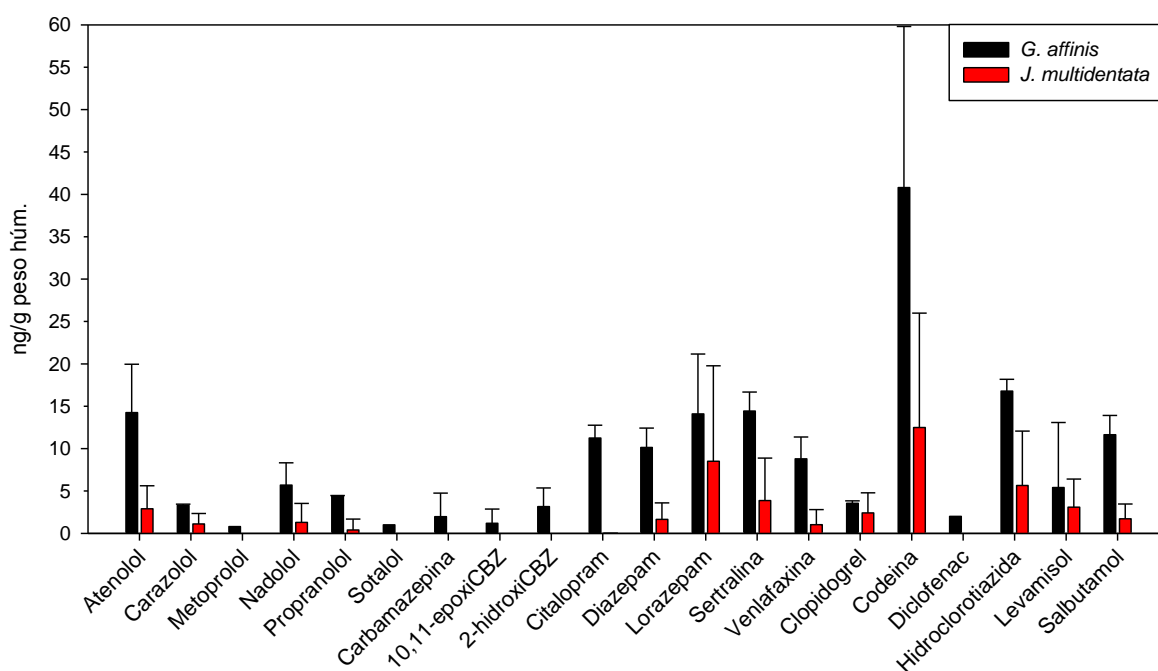


Fig. 3.3. Concentración de fármacos en ambas especies, en Río Primero durante temporada seca.

Respecto a la variación temporal, se observa una tendencia a mayor acumulación de fármacos en *G. affinis* en temporada seca. Debido al menor caudal del río en esta época del año (promedio 4,5 m³/s) comparado a la temporada húmeda (caudal promedio 14,4 m³/s), se espera una mayor concentración de fármacos en agua durante la temporada seca, y por lo

tanto mayor bioconcentración. Sin embargo, para *J. multidentata* se observa mayor variabilidad en la acumulación de fármacos en relación con las estaciones hidrológicas.

G. affinis es una especie introducida que comparte el mismo nicho ecológico que *J. multidentata* (Haro y Bistoni, 2007). Al ser una especie más resistente, con mayor capacidad para sobrevivir en ambientes contaminados (Hued y Bistoni, 2005; Pyke, 2005), se la encuentra en más cantidad de sitios a lo largo del Río Suquía, debido al aumento en la contaminación del río durante los últimos años (Merlo *et al.*, 2011). Así como el género *Gambusia* es relativamente tolerante a un amplio rango de propiedades físicas en su hábitat acuático, también son, en comparación a otros peces, altamente resistentes al efecto de toxinas y condiciones adversas. Tanto los individuos como las poblaciones pueden tolerar un amplio rango de condiciones y la capacidad de los individuos de hacerlo aumenta si tienen tiempo de aclimatarse a los cambios (Pyke, 2005). En esta Tesis, *J. multidentata* no se encontró durante la campaña de monitoreo en Capilla de los Remedios mientras que *G. affinis* si, siendo Capilla de los Remedios un sitio con peor calidad de agua respecto a Río Primero (Pesce y Wunderlin, 2000; Wunderlin *et al.*, 2001; Monferrán *et al.*, 2011; Bonansea *et al.*, 2013). Este resultado muestra como la contaminación del hábitat acuático está impactando en el ecosistema, produciendo dominancia de especies más resistentes, aun aquellas no autóctonas, por sobre las menos resistentes, incluyendo la desaparición de especies en los lugares más impactados (Hued y Bistoni, 2005).

Los Factores de Bioacumulación estimados para ATE, CBZ y diclofenac en ambas especies se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Factores de Bioacumulación (FBA, en L/kg) de atenolol (ATE), carbamazepina (CBZ) y diclofenac en *G. affinis* y *J. multidentata* del Río Suquía. CR: Capilla de los Remedios; RP: Río Primero.

Temporada	Sitio	FBA ATE		FBA CBZ	FBA diclofenac
		<i>G. affinis</i>	<i>J. multidentata</i>	<i>G. affinis</i>	<i>G. affinis</i>
húmeda	CR	27	na	208	24
húmeda	RP	100	100	50	nd
seca	RP	57	12	43	24

En todos los casos en que los peces bioacumularon el fármaco, los FBA calculados fueron mayores a 1, lo cual significa mayor concentración del fármaco en los peces respecto al valor en agua. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen otras fuentes de ingreso de los fármacos, como desde el alimento o material particulado. *G. affinis* bioacumuló los 3

fármacos (excepto diclofenac en temporada húmeda en Río Primero), mientras que *J. multidentata* solo bioacumuló ATE. Hasta el momento no se conocen registros de ATE medidos en biota silvestre en la bibliografía. Por otro lado, los valores de ATE encontrados en esta Tesis para peces capturados a campo superan a los informados en condiciones de laboratorio (Kuster *et al.*, 2009; Klosterhaus *et al.*, 2013; Steinbach *et al.*, 2014). En el caso de CBZ, los FBA en *G. affinis* son mayores a los informados por órgano en *Oreochromis niloticus* (FBA: 2,5-3,8), peces expuestos a efluentes dentro de una planta de tratamiento municipal (García *et al.*, 2012). Los FBA de diclofenac se encuentran dentro de los valores publicados (Zenker *et al.*, 2014).

3.4 Conclusiones parciales

✓ Por primera vez se detectaron fármacos en el Río Suquía, tanto en agua (8 fármacos y esteroides) como en peces (20 fármacos), en niveles del orden de ng/L para agua y ng/g peso húm. para peces.

✓ Los fármacos se encontraron en sitios ubicados aguas abajo de la EDAR de la ciudad de Córdoba, en ambas estaciones hidrológicas (temporada húmeda y seca), y hasta 70 km río abajo (localidad de Río Primero). Lo cual presupone que la EDAR, y en definitiva la ciudad de Córdoba, están siendo la principal fuente de contaminación con estos compuestos.

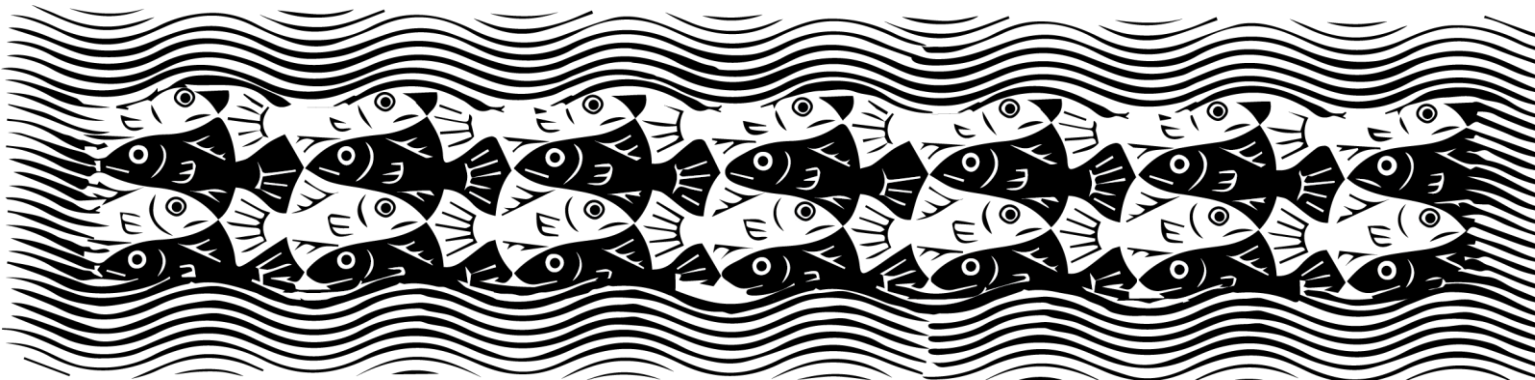
✓ Los niveles encontrados coincidieron en general con valores informados en otros estudios de ríos con influencia urbana, e incluso en peces se detectaron fármacos que no han sido aún publicados en bibliografía en biota silvestre, confirmando la distribución generalizada de estos contaminantes emergentes.

✓ El patrón de bioacumulación en *G. affinis* y *J. multidentata* fue diferente (mayor cantidad y variedad de fármacos acumulada por *G. affinis*, especialmente en estación seca) lo cual denota la necesidad de considerar varias especies al estudiar la exposición y efecto de contaminantes sobre la biota.

✓ Los factores de bioacumulación de ATE, CBZ y diclofenac en los peces fueron mayores a 1 (12-208 L/kg), evidenciando la necesidad de estudiar los efectos que estos compuestos pueden ejercer sobre la biota autóctona.

CAPITULO 4

BIOMARCADORES EN PECES EXPUESTOS A FÁRMACOS



4.1 Introducción

Los organismos acuáticos son importantes especies receptoras de compuestos de origen farmacéutico, ya que se encuentran expuestos a los mismos durante toda su vida. Dentro de estos organismos, los peces han demostrado ser modelos útiles tanto en ensayos de laboratorio como representativos del funcionamiento de los ecosistemas naturales, ya que son sensibles al impacto de xenobióticos en el ambiente acuático. Además, tienen una función ecológica importante como transportadores de energía de niveles inferiores a superiores en la cadena trófica (van der Oost *et al.*, 2003). La historia de vida y algunos aspectos fisiológicos, como vías altamente conservadas entre vertebrados, los convierten en especies susceptibles potencialmente al ingreso y efecto de fármacos (Corcoran *et al.*, 2010).

El riesgo de toxicidad aguda de los fármacos sobre organismos acuáticos es en general bajo (Ferrari *et al.*, 2003; Martín-Díaz *et al.*, 2009). En la bibliografía se informan valores de concentración letal 50 (CL₅₀) del orden de mg/L, uno o dos órdenes de magnitud mayores a los niveles encontrados en aguas superficiales (Cleuvers, 2003; Kim *et al.*, 2009). Existe un consenso en que la evaluación de riesgo de fármacos, a través del uso de biomarcadores, debería enfocarse a evaluar efectos bajo condiciones crónicas y más específicos de acuerdo al modo de acción de los mismos (Fent *et al.*, 2006).

Los biomarcadores pueden clasificarse en biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad, de los cuales los dos primeros son los más estudiados (van der Oost *et al.*, 2003). Un biomarcador de exposición es la medición de una sustancia exógena, su metabolito o el producto de su interacción con una molécula o célula blanco, dentro de un compartimento del organismo expuesto. Los biomarcadores de efecto se definen como un cambio en la estructura celular o bioquímica, función o comportamiento que es medible en un organismo o parte del mismo. Los biomarcadores de susceptibilidad son medidas atribuibles a la capacidad de respuesta inherente o adquirida de un organismo frente a la exposición a un xenobiótico, incluyendo factores genéticos y cambios en receptores que alteren la susceptibilidad del organismo a la exposición (van der Oost *et al.*, 2003; Di Giulio y Hinton, 2008b).

4.1.1 Biomarcadores de exposición: bioconcentración

Dentro de los biomarcadores de exposición, se encuentra la bioconcentración de un contaminante. La bioconcentración es la acumulación por un organismo de una sustancia desde el agua, sin considerar la vía de ingreso desde el alimento, en condiciones controladas

(Markert *et al.*, 2003b; Zenker *et al.*, 2014). El Factor de Bioconcentración (FBC) de un compuesto químico es el cociente entre la constante de velocidad de ingreso del compuesto al organismo desde el agua (k_w) y la constante de velocidad de eliminación del compuesto desde el organismo (k_B), o bien, el cociente entre la concentración del compuesto en el organismo (C_B) y la concentración en agua (C_A), en estado estacionario o equilibrio (Ecuación 4.1) (van der Oost *et al.*, 2003). El FBC calculado como cociente de constantes de velocidad es adimensional, mientras que el cociente de concentraciones tiene unidades de L/kg.

$$FBC = \frac{k_A}{k_B} = \frac{C_B}{C_A} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

La acumulación de compuestos químicos en organismos acuáticos puede ocurrir por diferentes mecanismos (Fig. 4.1): ingreso directo desde el agua a través de las branquias o la piel (bioconcentración), ingreso a partir de partículas en suspensión (ingesta) y por la ingesta de alimento contaminado. En el interior del organismo, algunos tóxicos sufren procesos de biotransformación (en su mayoría en el hígado) que favorecen la eliminación de estos compuestos. Sin embargo, el ciclo entero-hepático (circulación existente entre el intestino y el hígado) puede prolongar la vida media de los tóxicos o sus metabolitos, los cuales pueden ser re-absorbidos desde el intestino (Lahti *et al.*, 2011). La eliminación ocurre principalmente por liberación en las branquias y excreción vía fecal al agua circundante (van der Oost *et al.*, 2003). Otra forma de excreción durante la época reproductiva son los desoves, ya que en esta época ocurren movilizaciones de reservas lipídicas (donde se particionan preferencialmente los contaminantes más lipofílicos) hacia los huevos, facilitando la eliminación de los contaminantes a través de esta vía.

En la bibliografía, se han informado factores de bioconcentración de fármacos desde valores de trazas hasta 185.900 para insectos y crustáceos (Huerta *et al.*, 2012). En peces se han informado valores de FBC en pez total desde 1,4 hasta 650, y en tejidos de pez desde 0,08 a 2.732 (Huerta *et al.*, 2012; Zenker *et al.*, 2014). Valores de FBC mayores a 1 son un requisito para que ocurra biomagnificación en la cadena trófica (aumento de la concentración del xenobiótico en organismos pertenecientes a niveles tróficos superiores).

conjugación, adicionando glutatión reducido (GSH) a compuestos electrofílicos. Esta enzima se encuentra tanto en el citosol (GSTc) como en la fracción microsomal (GSTm) (Fig. 4.2).

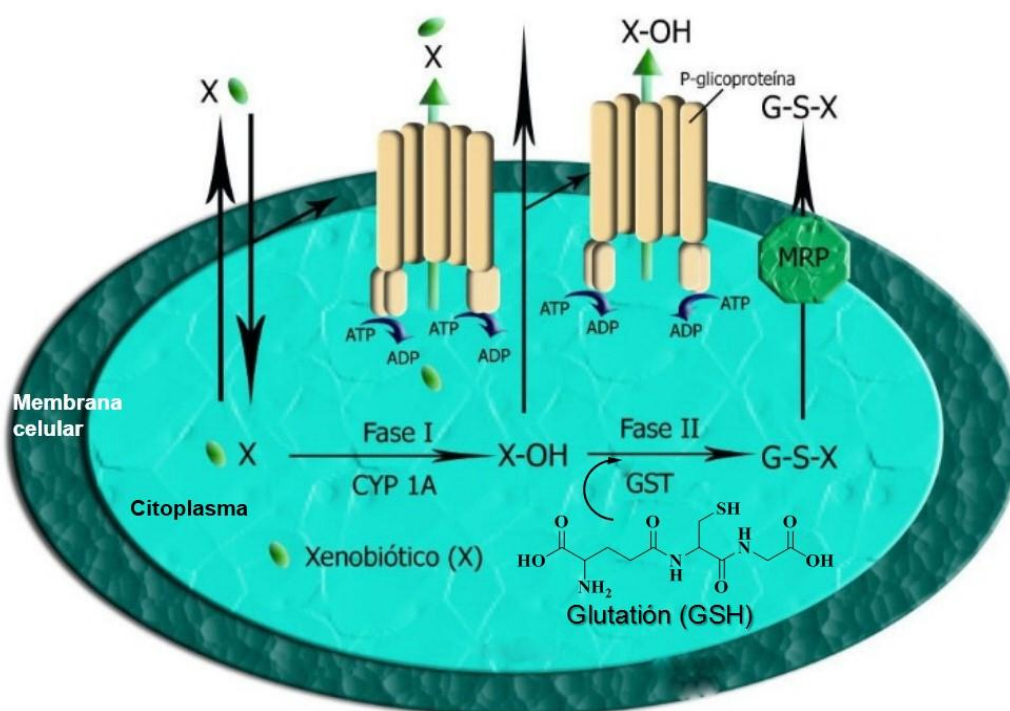


Fig. 4.2. Esquema de etapas en la biotransformación de un xenobiótico (X) dentro de una célula. Se observa la reacción de conjugación de glutatión (GSH) y un xenobiótico, catalizada por la enzima glutatión *S*-transferasa (GST), como ejemplo de reacción de Fase II.

En otro orden, debe considerarse que los mecanismos fisiológicos normales generan constantemente pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las células. Entre estas especies reactivas de oxígeno se encuentra el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroperoxilo (HOO^{\cdot}) e hidroxilo (HO^{\cdot}). Las EROs son eliminadas o bien metabolizadas e inactivadas, debido a que pueden dañar fácilmente las membranas lipídicas, proteínas y el ácido desoxirribonucleico (ADN). El organismo posee defensas contra las EROs como moléculas (vitamina E, glutatión reducido-GSH, etc.) y enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa-SOD; catalasa-CAT, etc.) (Fig. 4.3). El metabolismo de muchos xenobióticos resulta en la formación de EROs y, por lo tanto, muchos contaminantes (o sus metabolitos) pueden inducir estrés oxidativo, al producir un desbalance entre la producción de oxidantes y la remoción de los mismos (Winston y Di Giulio, 1991). Por ejemplo, el xenobiótico puede reducirse a un compuesto radicalario por medio de enzimas como la NADPH citocromo P450 reductasa, y estos intermediarios

radicalarios transferir electrones al oxígeno, formando el anión radical superóxido, el cual es convertido a peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Dos enzimas importantes consumen el peróxido de hidrógeno para evitar la formación del radical hidroxilo (altamente reactivo y tóxico para las células). Una de estas enzimas es catalasa (CAT), que reacciona rápidamente formando agua y oxígeno. La segunda es glutatión peroxidasa (GPx), la cual tiene afinidad por peróxido de hidrógeno y cataliza además la reducción de peróxidos orgánicos, oxidando glutatión reducido ($2 \text{ GSH} \rightarrow \text{GSSG}$). Para mantener el balance intracelular de glutatión oxidado y reducido, GSH:GSSG, existe la enzima glutatión reductasa (GR), que reduce el glutatión oxidado ($\text{GSSG} \rightarrow 2 \text{ GSH}$) a expensas de NADPH (Fig. 4.3) (Kelly *et al.*, 1998; Carocho y Ferreira, 2013).

Algunas isoenzimas de la familia GST también cumplen función antioxidante en la célula, ya que pueden reducir peróxidos de ácidos grasos y fosfolípidos, así como hidroperóxidos de colesterol (Yang *et al.*, 2002; Sturve *et al.*, 2008; Griboff *et al.*, 2014). Por lo tanto, cambios en la actividad de GST se relacionan tanto a funciones de detoxificación (conjugación de GSH a xenobióticos o sus metabolitos), como a funciones antioxidantes (reducción de hidroperóxidos orgánicos mediante oxidación de $2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG}$) (Yang *et al.*, 2002).

La evaluación de cambios en la actividad de enzimas antioxidantes se ha propuesto como un biomarcador efectivo de estrés oxidativo (van der Oost *et al.*, 2003; Cazenave *et al.*, 2006; Ballesteros *et al.*, 2009b; Monferrán *et al.*, 2011; Maggioni *et al.*, 2012; Galanti *et al.*, 2013; Griboff *et al.*, 2014). La evaluación de enzimas de detoxificación (por ejemplo GST) se utiliza como biomarcador para evaluar el efecto de un tóxico sobre las células; incluso se ha propuesto que una inhibición en el funcionamiento de las enzimas de detoxificación, causada por una dosis elevada de un xenobiótico, lleva a un aumento en la tasa de bioacumulación de ese xenobiótico en peces expuestos (Pesce *et al.*, 2008).

Se han descrito en bibliografía efectos relacionados al estrés oxidativo, en peces y mejillones, entre otros, causados por compuestos de origen farmacéutico (Nunes *et al.*, 2008; Sturve *et al.*, 2008; Contardo-Jara *et al.*, 2010; Brandão *et al.*, 2013).

Otro biomarcador de efecto que puede medirse en peces es el grupo de las enzimas colinesterasas, las cuales intervienen en la transmisión del impulso nervioso y la función neuromuscular, y por lo tanto tienen implicancias directas en el movimiento.

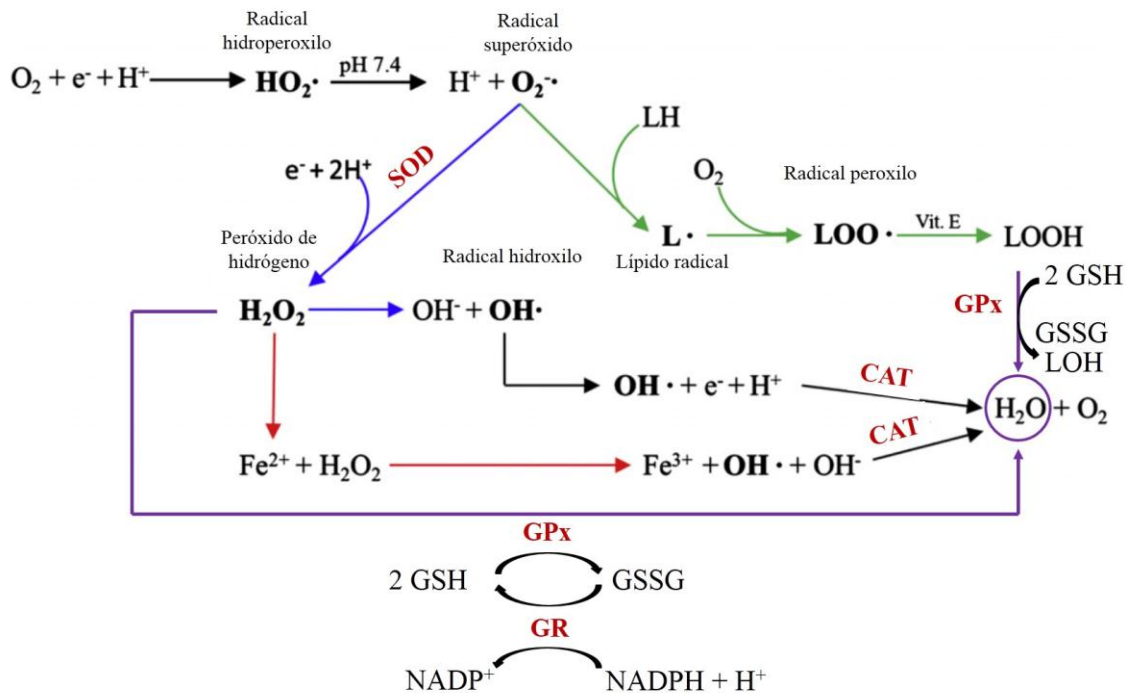


Fig. 4.3. Generación de EROs en la célula y mecanismos de remoción enzimática antioxidantes. Las flechas verdes representan la peroxidación lipídica, las flechas azules representan la reacción de Haber-Weiss, las flechas rojas corresponden a la reacción de Fenton y las flechas violetas a la reducción de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos a agua por la enzima GPx. SOD: enzima superóxido dismutasa, CAT: enzima catalasa, GPx: enzima glutatión peroxidasa, GR: enzima glutatión reductasa, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado. Adaptado de Carocho y Ferreira (2013).

Las enzimas colinesterasas están ampliamente distribuidas en los animales, razón por la cual constituyen biomarcadores de gran interés (Payne *et al.*, 1996). En vertebrados, la enzima acetilcolinesterasa (AChE) hidroliza al neurotransmisor acetilcolina (ACh) con producción de colina y ácido acético, finalizando el proceso de comunicación a nivel de las sinapsis colinérgica (Fig. 4.4). La ACh es un neurotransmisor excitatorio liberado por el sistema nervioso somático en las placas motoras del músculo esquelético. Este neurotransmisor también es liberado en distintas vías neuronales en el encéfalo y en el sistema nervioso autónomo, en las neuronas motoras pre-ganglionares de la división simpática y en las pre y post-ganglionares de la división parasimpática (Fulton y Key, 2001). Ambos sistemas cumplen funciones vitales, ya que regulan el funcionamiento de la musculatura esquelética y de los distintos sistemas de órganos del animal (Payne *et al.*, 1996).

En peces, se ha descrito la presencia de AChE en cerebro, músculo, hígado y plasma (Fulton y Key, 2001; van der Oost *et al.*, 2003; Lionetto *et al.*, 2011).

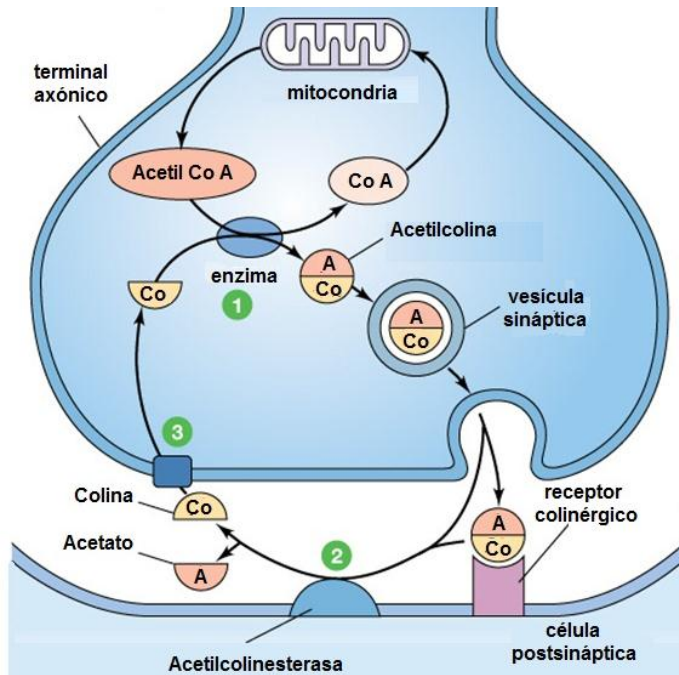


Fig. 4.4. Esquema de una sinapsis colinérgica. En la terminal pre-sináptica (terminal axónico) la acetilcolintransferasa (1) sintetiza a la acetilcolina a partir de colina y acetil coenzima A. Acetilcolina se acumula en las vesículas vía un transportador y se libera por la acción de potenciales de acción. La acetilcolina se une con receptores muscarínicos (M) o nicotínicos (N) en la terminal post-sináptica, los que transducen la señal para producir la respuesta característica del efector. La acetilcolina también puede actuar sobre receptores pre-sinápticos para modificar su propia liberación. La acción de acetilcolina es terminada por la hidrólisis a colina y acetato por acción de la acetilcolinesterasa (2) soluble o anclada a la membrana pre- y post-sináptica. La colina se recaptura por un transporte de alta afinidad presente en la membrana pre-sináptica (3) (Brunton, 2012a).

Considerando las funciones vitales que desempeñan las colinesterasas en los seres vivos, se ha profundizado su uso como biomarcadores de exposición a xenobióticos, particularmente el estudio de su inhibición por pesticidas organofosforados y carbamatos. También se han informado respuestas ante la exposición a hidrocarburos, efluentes urbanos y de pasteras, metales, detergentes, disruptores endocrinos y, recientemente, contaminantes emergentes como nanomateriales y fármacos (Payne *et al.*, 1996; Fulton y Key, 2001; Frasco *et al.*, 2005; Tu *et al.*, 2009; Lionetto *et al.*, 2011). Diversos autores han relacionado la inhibición de estas enzimas con alteraciones en el comportamiento (Scott y Sloman, 2004; Ballesteros *et al.*, 2009a; Xuereb *et al.*, 2009).

Existen fármacos que afectan en forma directa al sistema colinérgico, ejerciendo una acción anticolinérgica o estimulando su función, así como otros que modifican a este sistema por sus efectos secundarios (Rockwood *et al.*, 2011). Debido a la similitud que tienen estos sistemas en peces con el de los humanos, es de esperar alteraciones en las funciones colinérgicas por exposición a fármacos.

En un nivel biológico superior, a nivel de organismo, se pueden medir biomarcadores de comportamiento. El comportamiento consiste en una serie de actividades explícitas observables del cuerpo entero, el cual opera a través del sistema nervioso y asiste a los animales para sobrevivir, crecer y reproducirse (Beitinger, 1990). En la evaluación de la toxicidad sub-letal, las respuestas comportamentales son biomarcadores relevantes, ya que el comportamiento integra varios procesos bioquímicos, celulares y neuronales (Vogl *et al.*, 1999). Los peces son un excelente modelo para el estudio de cambios en el comportamiento, ya que muchas de sus conductas relevantes a nivel ecológico son fácilmente observables y cuantificables en un ambiente controlado. El desempeño del comportamiento normal de un pez sigue secuencias fisiológicas específicas, iniciadas por estímulos externos actuando a través de redes neuronales. La interrupción de estas secuencias antes de completarse, conducen a alteraciones en el comportamiento que pueden poner en riesgo la supervivencia del individuo y, en definitiva, de la especie (Scott y Sloman, 2004).

Un comportamiento inapropiado frente a estímulos ambientales y fisiológicos causado por efectos tóxicos de contaminantes acuáticos puede tener consecuencias graves para la supervivencia de las especies (Scott y Sloman, 2004). Esta ha sido la base para el estudio de alteraciones en la actividad natatoria de los peces, causadas por diferentes compuestos tóxicos como metales y contaminantes orgánicos (orgánicos persistentes, pesticidas, herbicidas, hormonas, cianotoxinas, etc.), así como en exposición a efluentes (Ballesteros *et al.*, 2009b; Cazenave *et al.*, 2008; Gerhardt *et al.*, 2002; Scott y Sloman, 2004; Xuereb *et al.*, 2009).

Actualmente, los peces se están empleando como modelos para el descubrimiento y estudio de drogas de uso humano, ya que los mismos exhiben una gran variedad de comportamientos, aprendizaje complejo y cambios neurobiológicos que pueden extrapolarse a las condiciones humanas (Egan *et al.*, 2009; Caramillo *et al.*, 2015). Debido a que los fármacos actúan sobre moléculas biológicas “*targets*” altamente conservadas, afectando la transmisión neuronal, se ha propuesto que el comportamiento en otras especies puede resultar útil para identificar compuestos químicos con potenciales propiedades psicoactivas en humanos (Kokel y Peterson, 2008). Tanto en peces, como en roedores, muchos de estos modelos usan el comportamiento exploratorio de un animal en un ambiente nuevo como un índice de ansiedad, controlando variables locomotoras (Maximino *et al.*, 2010). Diversos estudios realizados en pez cebra (*Danio rerio*) han demostrado que los individuos en un ambiente desconocido buscan protección, buceando y permaneciendo en el fondo hasta que se

sienten lo suficientemente seguros para explorar (“*novel tank diving test*”) (Levin *et al.*, 2007; Egan *et al.*, 2009). Al exponerlo a un estímulo que produce miedo o ansiedad, el pez cebra muestra un amplio rango de variables comportamentales cuantificables, incluyendo reducción de la exploración, aumento de escototaxis (preferencia por la oscuridad), geotaxis (buceo/preferencia por el fondo), tigmotaxis (comportamiento centrofóbico de preferencia por la periferia), inmovilidad (“*freezing*”) y movimientos erráticos (Caramillo *et al.*, 2015).

El efecto de fármacos psicoactivos y de otros grupos terapéuticos en el comportamiento de peces, como el pez cebra y otros modelos, se ha publicado en estudios recientes (Nunes *et al.*, 2008; Egan *et al.*, 2009; Nassef *et al.*, 2010; Lorenzi *et al.*, 2012; Brandão *et al.*, 2013; Brodin *et al.*, 2013; Roggio *et al.*, 2014).

Entre los compuestos emergentes más frecuentemente encontrados en el Río Suquía, y en cursos de agua superficial del mundo (sección 3.3.1), se seleccionaron los fármacos CBZ y ATE para evaluar el efecto sobre los peces a través de biomarcadores de exposición y de efecto.

El fármaco CBZ se utiliza en el tratamiento de convulsiones tonicoclónicas generalizadas (que afectan todo el cerebro) y de crisis parciales (afectan una parte del cerebro), en el tratamiento de las neuralgias del trigémino y glossofaríngeo, en el tratamiento del trastorno afectivo bipolar y de crisis maníacas (Brunton, 2012b). El modo de acción involucra una disminución en la velocidad de recuperación de los canales de Na⁺ activados por voltaje del cerebro, a partir de la inactivación. Estas acciones se manifiestan a concentraciones terapéuticas del fármaco y son selectivas a esas concentraciones, sin afectar la función cerebral (Rogawski y Löscher, 2004).

Es uno de los fármacos más frecuentemente encontrados en cursos de agua superficial con contaminación urbana y ha sido propuesto como marcador antropogénico debido a su persistencia en el ambiente (Clara *et al.*, 2004). Si bien por vía renal se excreta solo el 1-3 % del fármaco en plasma (Brunton, 2012c), su persistencia en el ambiente se debe a la baja remoción en las plantas de tratamientos de efluentes (promedio < 20% en plantas de tratamientos con lodos activados), a su relativo grado de hidrofobicidad (coeficiente de partición octanol-agua Kow: 2,45) y a su baja degradación en los ambientes acuáticos (vida media promedio 82 ± 11 días en microcosmos) (Ferrari *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2004; Miège *et al.*, 2009). Existen algunos antecedentes de acumulación de CBZ y efectos relacionados al

estrés oxidativo en peces y, en menor medida, estudios del comportamiento (Li *et al.*, 2009, 2010b, 2011; Garcia *et al.*, 2012; Brandão *et al.*, 2013). Sin embargo, no se han encontrado antecedentes de efectos en las enzimas colinesterasas *in vivo*, así como tampoco estudios en especies autóctonas de la Cuenca del Río Suquía.

Por otra parte, ATE es un fármaco del grupo de los β -bloqueantes (antagonistas de los receptores β -adrenérgicos), utilizado en el tratamiento de la hipertensión, la cardiopatía coronaria, las arritmias y la angina de pecho, así como para disminuir el riesgo de complicaciones cardíacas después de infarto del miocardio (Brunton, 2012d). Es un antagonista que muestra selectividad por los receptores adrenérgicos β_1 , particularmente del corazón (es cardiosselectivo). Es un fármaco muy hidrófilo que penetra en grado limitado al sistema nervioso central (Brunton, 2012d). La metabolización hepática es baja, y se excreta en gran medida sin cambios en la orina (94%) (Brunton, 2012c).

Se lo detecta frecuentemente en aguas superficiales debido a su alto consumo, poca retención y metabolismo, baja remoción en plantas de tratamiento de efluentes (promedio < 10% en plantas con lodos activados), estabilidad frente a la fotólisis (vida media 77-730 h), estabilidad frente a la degradación microbiana (vida media 14 a 120 días) y baja afinidad de absorción a sedimentos (Cleuvers, 2005; Miège *et al.*, 2009; Steinbach *et al.*, 2014). Se han evaluado algunos efectos en peces expuestos a ATE, como el desarrollo de larvas y efectos en la reproducción, y más recientemente cambios hematológicos, histológicos, respuestas de detoxificación y antioxidantes y bioconcentración (Winter *et al.*, 2008; Kuster *et al.*, 2009; Steinbach *et al.*, 2014). Sin embargo, hay muy pocos antecedentes en general de acumulación y efectos de atenolol en peces, lo cual motiva el estudio de diversos biomarcadores, en particular en especies autóctonas, para encontrar aquellos que respondan a la exposición al fármaco a concentraciones ambientalmente relevantes.

Objetivos específicos:

- Determinar la respuesta de biomarcadores de exposición (bioconcentración), de efecto fisiológico (respuesta de enzimas antioxidantes, detoxificación y colinesterasas) y conductual (comportamiento natatorio) en peces expuestos a carbamazepina y atenolol.
- Determinar cuál/es de los biomarcadores utilizados es el más apropiado para evaluar el efecto de los fármacos seleccionados sobre los peces.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Recolección de peces y aclimatación

Individuos adultos de los peces *J. multidentata* y *G. affinis* fueron utilizados como especies bioindicadoras. Las especies fueron seleccionadas por su alta abundancia en los cursos de la provincia de Córdoba (Haro y Bistoni, 1996), facilidad para mantenerlas en laboratorio (APHA, 1998) y por ser utilizadas previamente como modelo, tanto para ensayos de laboratorio como de campo (Ballesteros *et al.*, 2007, 2011; Cazenave *et al.*, 2008; Merlo *et al.*, 2011; Guyón *et al.*, 2012; Hued *et al.*, 2012; Maggioni *et al.*, 2012; Roggio *et al.*, 2014; Rautenberg *et al.*, 2015). Se capturaron hembras adultas de *J. multidentata* con red de pesca en el Río Yuspe (sección 3.2.1), sitio caracterizado por la buena calidad de sus aguas (Pesce y Wunderlin, 2000, Hued y Bistoni, 2005; Hued *et al.*, 2012). Debido a que *G. affinis* es muy escasa en el sitio mencionado, se capturaron machos adultos de esta especie en La Calera (sección 3.2.1), donde no se detectó presencia de fármacos o esteroides en el agua (Capítulo 3). En todos los casos, los individuos fueron transportados al laboratorio en bidones de 20 L y aclimatados a las condiciones de laboratorio por un lapso de al menos 15 días previo a la exposición, en peceras de vidrio (1 pez/litro) con agua declorada. Durante este período se mantuvieron con temperatura controlada a 21 ± 1 °C, aireación y fotoperíodo de 12:12 horas luz:sombra. Se los alimentó con alimento deshidratado en escamas diariamente (TetraMin®).

4.2.2 Bioconcentración

4.2.2.1 Pez completo

i. Diseño experimental

Veinticuatro horas antes del bioensayo 50 machos de *G. affinis* se distribuyeron al azar en 10 peceras de 5 litros (1 pez / litro; 5 individuos/pecera) con aireación y se los dejó de alimentar (para evitar efectos prandiales y deposición de heces). Se realizaron 5 tratamientos por duplicado: control con solvente (agua suplementada con 0,05 % metanol), 10 µg/L y 100 µg/L de CBZ, 100 µg/L y 1000 µg/L de ATE. La exposición duró 96 h sin alimentación.

Se evaluó previamente la estabilidad de CBZ y ATE en agua declorada en peceras, obteniendo porcentajes de recuperación mayores a 85% luego de 48 h. Por lo tanto, las soluciones acuosas fueron renovadas parcialmente (la mitad) todos los días, tomando muestras de agua de la pecera previo a la renovación del medio, de manera de determinar la concentración real de los compuestos en el medio de exposición. Se midió la concentración de

oxígeno disuelto ($7,9 \pm 0,3$ mg/L), la conductividad (720 ± 50 μ S/cm), el pH ($8,3 \pm 0,1$) y la temperatura ($19,8 \pm 0,4$ °C). Al finalizar el experimento, se midió la longitud estándar de los peces (23 ± 2 mm) y se determinó el peso corporal ($0,21 \pm 0,07$ g). Se los sacrificó por corte de la medula espinal y se conservaron 5 individuos juntos (de cada tratamiento) en papel aluminio a -20°C hasta su análisis.

ii. Extracción y medición

La extracción de fármaco desde los peces se llevó a cabo para cada conjunto (“pool”) de 5 individuos, equivalente a 1 g de pez húmedo aproximadamente ($n = 2$ para cada condición), de acuerdo al protocolo optimizado y descrito en la sección 2.3.3.1 “Pez completo” y 2.3.1 “Separación y detección”.

Las muestras de agua se analizaron de acuerdo al protocolo optimizado y descrito en la sección 2.3.1 y 2.3.2.

El Factor de Bioconcentración se calculó como el cociente entre la concentración del compuesto en el pez ($\mu\text{g}/\text{kg}$ peso húm.) y la concentración del compuesto en agua ($\mu\text{g}/\text{L}$), asumiendo estado estacionario. Para esto, se efectuó una estimación del tiempo hasta alcanzar el estado estacionario a partir del $\log K_{ow}$ de CBZ = 2,45 (OECD 305), con lo cual se puede estimar que en 2 días se alcanzaría este estado.

4.2.2.2 Órganos de pez

i. Diseño experimental

En el ensayo de bioconcentración por órganos, 60 hembras de *J. multidentata* se distribuyeron al azar en 6 peceras con 10 litros de agua (10 individuos/pecera). Se realizaron 2 tratamientos por triplicado: grupo control de solvente (0,002% de metanol en agua) y grupo de exposición a 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ de CBZ. El grupo de exposición a ATE no pudo evaluarse, debido a que los peces del control se contaminaron con el fármaco.

El experimento fue estático (sin renovación del medio), de 48 h de duración (se demostró la estabilidad de CBZ en agua previamente) y sin alimentación. Al finalizar la exposición se midió la longitud estándar (27 ± 4 mm) y peso corporal ($0,4 \pm 0,2$ g) de los peces y se los anestesió con hielo previo a su disección. Se conservaron branquias (7 ± 4 mg), intestino (8 ± 4 mg), hígado (3 ± 2 mg), cerebro (5 ± 3 mg) y músculo (107 ± 60 mg), los cuales se pesaron

individualmente y se conservaron en conjuntos de 10 órganos (provenientes de peces del mismo tratamiento) a -20°C hasta su análisis.

ii. Extracción y medición

Los órganos (conjunto de 10 individuos) se liofilizaron y extrajeron de acuerdo al protocolo optimizado y descrito en la sección 2.3.3.3 “*Extracción a partir de órganos de pez*” (n = 3 para cada condición: control y exposición a 100 µg/L de CBZ).

4.2.3 *Enzimas antioxidantes, de biotransformación y colinesterasas*

4.2.3.1 *Diseño experimental*

Para evaluar los biomarcadores enzimáticos y de comportamiento, se distribuyeron al azar 5 individuos de *J. multidentata* en peceras de vidrio de 5 litros de agua con aireación. Se realizaron 4 tratamientos para la exposición a CBZ: control de solvente (0,002% metanol en agua), 0,5, 10 y 100 µg/L de CBZ. Se realizaron 3 tratamientos para la exposición a ATE: control de solvente (0,002% metanol en agua), 1 y 50 µg/L de ATE. Se ensayaron distintos tiempos de exposición: para CBZ a 48 h y 7 días (mismo diseño experimental) y para ATE 14 días. La duración de los experimentos con CBZ se eligió considerando antecedentes publicados en bibliografía en respuestas enzimáticas y de comportamiento (Cazenave *et al.*, 2006; Ballesteros *et al.*, 2009b; Li *et al.*, 2009, 2010a; Brandão *et al.*, 2013). Dado que hay pocos datos de efectos de ATE en peces, y en general se informa menor toxicidad de este fármaco respecto a otros, se eligió mayor tiempo para simular una exposición crónica y detectar posibles efectos. El bioensayo a 48 h se realizó sin alimentación, ni recambio de agua (por la estabilidad previamente comprobada de CBZ en agua). Los bioensayos de 7 y 14 días de exposición (CBZ y ATE, respectivamente), se realizaron con renovación completa del medio cada 48 h y con alimentación (alimento deshidratado en escamas-TetraMin®). Se tomaron muestras de agua de cada tratamiento, al inicio de la exposición (tiempo = 0 h) y previo a la renovación del medio (tiempo = 48 h). Las muestras de agua se analizaron de acuerdo al protocolo optimizado y descrito en la sección 2.3.1 y 2.3.2.

Al finalizar el experimento, se filmaron 10 individuos de cada tratamiento (n = 10) para la evaluación de las variables comportamentales (descritas en apartado 4.2.4). Luego de la filmación, se midió la longitud estándar (29 ± 2 mm) y peso corporal de los individuos ($0,5 \pm 0,2$ g), se los sacrificó por corte de la medula espinal y se procedió a su disección en frío.

4.2.3.2 Extracción enzimática y medición de actividad

Cinco individuos de cada tratamiento fueron disectados para la remoción de branquias (12 ± 4 mg), intestino (11 ± 3 mg), hígado (7 ± 3 mg), cerebro (6 ± 2 mg) y músculo (62 ± 27 mg), los cuales fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y conservados individualmente a -80°C hasta su análisis.

La extracción enzimática se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Cazenave *et al.* (2006). Brevemente, los tejidos fueron homogeneizados en el mismo eppendorf que contenía el órgano a estudiar, usando buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH = 6,5), conteniendo glicerol 20% (V/V), EDTA 1 mM y ditioeritritol (DTE) 1,4 mM, hasta completar un volumen de 1,5 mL. Luego de remover los restos celulares (centrifugación a 6800 g por 10 min a 4°C , tomando el sobrenadante), se separó la fracción de membrana (microsomal) de la soluble (citosólica) por ultracentrifugación (100.000 g, 60 min a 4°C). El sobrenadante (correspondiente a la fracción soluble o citosólica) fue fraccionado en tubos plásticos de 500 μL , y almacenado a -80°C hasta las mediciones enzimáticas. El pellet (fracción microsomal) fue resuspendido y homogeneizado en potter (homogeneizador) de vidrio con 0,5 mL de buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 7, conteniendo glicerol al 20% V/V y DTE 1,4 mM, fraccionado en tubos plásticos de 500 μL y almacenado a -80°C hasta el análisis.

La actividad de la enzima GST se determinó colorimétricamente según Habig *et al.* (1974), utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzenueno (CDNB) como sustrato, en ambas fracciones celulares (citosólica-GSTc y microsomal-GSTm). La actividad de la glutatión reductasa (GR) fue establecida de acuerdo a Tanaka *et al.* (1994). Para la medición de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) se siguió la técnica de Drotar *et al.* (1985), usando H_2O_2 como sustrato. La actividad de la catalasa (CAT) fue determinada según Beutler (1982). Estas últimas 3 enzimas se determinaron en la fracción citosólica de los extractos. La actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AChE) microsomal fue determinada por el método colorimétrico propuesto por Ellman *et al.* (1961), utilizando como sustrato de la enzima acetiltiocolina. La actividad enzimática se calculó en términos del contenido de proteínas de la muestra (Bradford, 1976), y se expresó en nanokatales por miligramo de proteína (nkat/mg prot), donde 1 nanokatal es la actividad catalítica enzimática responsable de la transformación de 1 nanomol de sustrato por segundo. Cada medición enzimática y proteica fue llevada a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos (“wells”), midiendo en un espectrofotómetro con lector de placa (Synergy-Biotek, Estados Unidos).

4.2.4 Comportamiento natatorio

La medición del comportamiento natatorio se realizó inmediatamente al finalizar la exposición al fármaco, siempre en la misma franja horaria del día (9:00 a 12:00 h) para evitar fluctuaciones debido al ritmo circadiano propio de cada especie. Se filmó un pez por vez durante 10 min en una pecera angosta (30 x 20 x 10 cm, ancho x alto x espesor), con 4 litros de agua de clorada, enfrentada a una cámara filmadora digital, en una habitación aislada para evitar perturbaciones (Fig. 4.5., ítem 1). Se oscurecieron los alrededores de la pecera y todas las caras (con láminas opacas negras), excepto la que enfrenta la cámara, dejando iluminado (con lámpara) el sector de la pecera con agua (escenario de filmación). Los videos filmados fueron analizados con un software específico para medición de variables de comportamiento, ANY-Maze[®] (Stoelting, CO, USA), el cual sigue la posición del centro de gravedad del pez (esquemático en la Fig. 4.5, ítem 2), durante los 10 min (guardando hasta 10 datos de posición por segundo), en 2 dimensiones espaciales dentro del rectángulo correspondiente a las dimensiones de la columna de agua (30 x 15 cm, ancho x alto). En dicha zona, se establecieron segmentos internos para dividir la pecera por sectores: superficie (30 x 2,5 cm), fondo (30 x 2,5 cm) y centro (30 x 10 cm). Los resultados del análisis del programa se pueden visualizar como gráficos de recorrido (“*track plots*”, Fig. 4.5, ítem 3) o una tabla de datos de variables comportamentales para cada pez, en el tiempo analizado. En esta Tesis se analizaron las siguientes variables:

- distancia (m): distancia total recorrida en toda la pecera.
- velocidad promedio (m/s): velocidad media en toda la pecera.
- tiempo de permanencia en cada sector de la pecera (s): tiempo en el fondo, tiempo en la superficie y tiempo en el centro.

Debido a que en los 10 min que dura la filmación de la actividad natatoria, puede existir un comportamiento diferencial del pez en la pecera por acostumbramiento al nuevo ambiente (Maximino *et al.*, 2010), el análisis de las variables se llevó a cabo considerando dos segmentos de tiempo, de 5 min de duración cada uno. En una situación regular (pez control), el primer segmento de tiempo es considerado un período de adaptación, ya que el pez se encuentra en una situación de estrés ante un ambiente nuevo (pecera de filmación), lo que se asemeja al experimento de “*novel tank test*” (Cachat *et al.*, 2010; Maximino *et al.*, 2010). Esta situación se manifiesta con respuestas instintivas naturales en el comportamiento del pez de búsqueda de protección, como por ejemplo preferencia por la zona de fondo (“*diving*”: buceo)

y menor actividad natatoria con reducción de la exploración. El segundo segmento de 5 min corresponde a un comportamiento más exploratorio y de reconocimiento, en el cual el pez sale del fondo de la pecera incursionando en el centro y superficie. Este período suele manifestarse a través de mayor actividad locomotora y aumento del número de entradas del pez a la mitad superior de la pecera (Cachat *et al.*, 2010; Piatto *et al.*, 2011). En particular, *J. multidentata* ha sido descrita como una especie de superficie (Haro y Bistoni, 1996). En bioensayos realizados en peceras del mismo tamaño que las utilizadas en este estudio, se ha descrito que *J. multidentata* frecuenta la zona central y superior de la misma (Cazenave, 2006; Cazenave *et al.*, 2008).

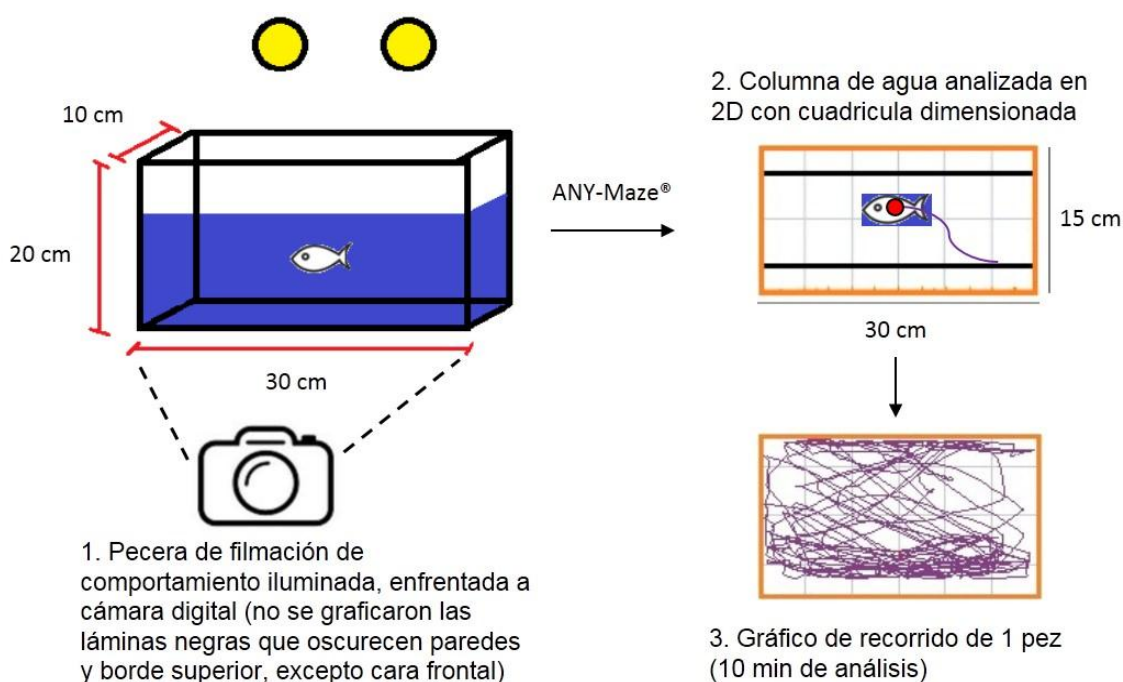


Fig. 4.5. Esquema del experimento de comportamiento. Se destaca la etapa de filmación (1), el análisis de los videos con los sectores de la pecera en línea negra- fondo, centro y superficie (2) y el resultado como gráfico de recorrido de un pez (3).

4.2.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo con los programas Infostat Software Package (Infostat 2012), SPSS Statistics 17.0 y Statistica 8.0. La distribución normal de los residuos de cada análisis se analizó mediante el test de Shapiro-Wilks, y se utilizó el test de Levene para probar la homogeneidad de varianzas.

Los resultados de actividad enzimática y de variables comportamentales se analizaron mediante modelos mixtos lineales (MML). Cuando no se cumplió el supuesto de normalidad de residuos del modelo, se transformó la variable a rangos, aplicando el modelo nuevamente con la variable transformada. Las diferencias entre las variables se analizaron por el test de Tukey ($P < 0,05$).

Se evaluó la relación entre la respuesta de actividad natatoria (distancia y velocidad promedio) y los cambios en la actividad de las enzimas colinesterasas (acetilcolinesterasa en musculo y cerebro), medidas para el mismo pez, mediante ANCOVA (análisis de covarianza), obteniendo la significancia de la covariable (P -valor) y el coeficiente de correlación.

Para determinar cuáles biomarcadores son los más apropiados para evaluar el efecto de los fármacos seleccionados sobre los peces, se efectuó un análisis discriminante (AD). El AD permite describir algebraicamente las relaciones entre dos o más poblaciones (grupos) de manera tal que las diferencias entre ellas se maximicen o se hagan más evidentes. En otras palabras, el AD permite reducir la cantidad de datos necesarios para distinguir entre grupos predeterminados, sin pérdida de información importante para el análisis. El AD se realiza frecuentemente con fines predictivos, relacionados a la asignación de nuevas observaciones a uno de los grupos existentes. Además, el AD puede ser usado con el objetivo de encontrar el subconjunto de variables que mejor explica la variabilidad entre grupos. Este último fue el objetivo principal del uso de AD en esta Tesis, es decir seleccionar aquellos biomarcadores que mejor explican la diferencia entre los distintos grupos (peces control vs. expuestos).

El AD construye una ecuación (función discriminante, Ecuación 4.2) que contiene una combinación lineal de las variables, ponderadas a partir de su importancia relativa para el comportamiento del conjunto.

$$f(G_i) = K_i + \sum_{j=1}^n W_{ij} * p_{ij} \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

Donde:

G_i : número de grupos (G), en este caso los tratamientos del bioensayo (control, concentración 1 de CBZ/ATE, concentración 2 de CBZ/ATE, etc.).

K_i : constante inherente a cada grupo.

n: número de parámetros usados para asignar el set de datos a un dado grupo, en este caso número de biomarcadores (actividad enzimática y variables de comportamiento) necesarios para lograr tal asignación.

W_j : coeficiente de peso asignado por el AD a un dado parámetro (p_j).

p_j : valor analítico de un dado parámetro.

Se trabajó con las variables estandarizadas (media cero y varianza uno), para evitar errores en la clasificación de los datos debido a los diferentes órdenes de magnitud y unidades provenientes de cada variable medida. El AD se efectuó por el método paso a paso hacia delante (“*forward stepwise*”). El método “*stepwise*” selecciona las variables de a una por vez. El modo hacia adelante implica que en cada paso se evalúa entre todas las variables cuál es la que contribuye en mayor medida a la discriminación entre los grupos. Cuando se encontró esta variable, el programa la incluye en el modelo y realiza un nuevo paso, hasta que el agregado de una nueva variable no mejora la clasificación (Wunderlin *et al.*, 2001).

4.3 Resultados y discusión

Para determinar las respuestas de biomarcadores de exposición y de efecto en *G. affinis* y *J. multidentata* frente a la exposición a fármacos, se llevaron a cabo bioensayos con CBZ y ATE.

4.3.1 CARBAMAZEPINA

Los biomarcadores de exposición evaluados corresponden a la bioconcentración de CBZ en pez completo y por órganos. Los biomarcadores de efecto, evaluados incluyen la actividad enzimática antioxidante y de biotransformación, enzimas colinesterasas, así como biomarcadores de comportamiento.

4.3.1.1 Bioconcentración

i. Pez completo

Las concentraciones de exposición medidas en las muestras de agua durante el experimento de bioconcentración a 96 h fueron: $12 \pm 1 \mu\text{g/L}$ y $105 \pm 4 \mu\text{g/L}$ de CBZ (concentraciones nominales: 10 y 100 $\mu\text{g/L}$, respectivamente). En las muestras de agua control no se detectó CBZ (límite de detección: 0,2 ng/L). Los niveles de CBZ en los peces control fueron menores al límite de detección del método (2 ng/g peso húm.). La acumulación promedio de CBZ en *G. affinis* fue 9 ± 1 y 95 ± 3 ng/g peso húm. en peces expuestos a 10 y 100 $\mu\text{g/L}$ de CBZ, respectivamente (Fig. 4.6).

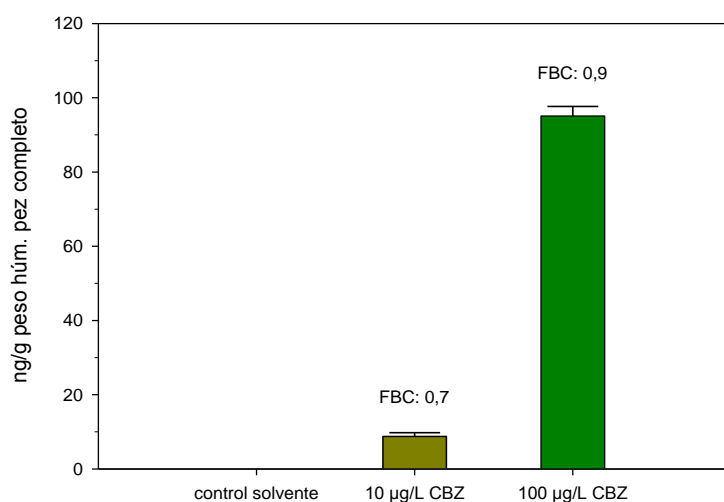


Fig. 4.6. Bioconcentración de carbamazepina (CBZ) en homogenatos de *G. affinis* (ng/g peso húm. pez completo) expuestos 96 h. La altura de la barra corresponde a la media y los límites superiores a la desviación estándar. FBC: factor de bioconcentración (L/kg), correspondiente a su condición.

El factor de bioconcentración (FBC) de CBZ fue aproximadamente 1 (0,7 y 0,9 L/kg para exposición a 10 y 100 µg/L, respectivamente). Estos valores de FBC indican que la concentración de CBZ en el pez no supera a la concentración del fármaco en agua, lo cual indicaría bajo potencial de bioacumulación para CBZ en pez total.

En línea con estos resultados, Wang y Gardinali (2013) publicaron un FBC de 0,87-1,4 para CBZ en *Gambusia holbrooki*, expuestas durante 7 días a agua reutilizada, proveniente de efluentes tratados de la Universidad Internacional de Florida, en la cual cuantificaron 1,23 µg/L promedio de CBZ. Daughton y Brooks (2011) afirman que CBZ tiene baja tendencia a bioconcentrarse y la mayoría de los FBC calculados en peces por diferentes autores, son menores o próximos a 1.

Si bien los FBC de CBZ en *G. affinis* muestran un valor bajo (entre 0,7 y 0,9 L/kg en este trabajo), el fármaco fue acumulado por esta especie bajo las condiciones de laboratorio estudiadas, posiblemente como consecuencia de una exposición constante al fármaco. Esta característica coincide con el carácter de *pseudo*-persistente de los fármacos en el ambiente, ya que al ingresar de manera continua no permiten que exista una etapa de depuración en la biota expuesta. Estos resultados de acumulación en pez completo nos motivó a analizar la acumulación diferencial por órgano y evaluar los posibles efectos sobre la ictiofauna.

ii. Órganos de pez

La concentración de CBZ y sus metabolitos, 10,11-epoxiCBZ y 2-hidroxiCBZ (Fig. 4.7) fue evaluada por órgano en individuos de *J. multidentata* expuestos a 100 µg/L de CBZ durante 48 h. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.1. Las concentraciones en peces control fueron menores al límite de detección para los 3 compuestos en todos los órganos analizados. Debido a que los niveles de 2-hidroxiCBZ y 10,11-epoxiCBZ en todas las muestras de agua de pecera, fueron menores al límite de detección, la presencia de los metabolitos en los órganos de *J. multidentata* sería mayoritariamente resultado de la biotransformación de CBZ dentro del pez.

El fármaco CBZ se acumuló en los 5 órganos, lo cual denotaría que los sistemas de biotransformación y eliminación de *J. multidentata* fueron sobrepasados durante esta exposición.

Tabla 4.1. Concentración (ng/g peso húm.) de carbamazepina (CBZ), carbamazepina-10, 11-epóxido (10,11-epoxiCBZ) y 2-hidroxycarbamazepina (2-hidroxiCBZ), sumatoria de los 3 compuestos (Σ CBZ+Met.), cociente de metabolito/compuesto parental, y factores de bioconcentración (FBC, L/kg) en branquias, intestino, hígado, cerebro y músculo de *J. multidentata*, expuestas a 100 μ g/L de CBZ durante 2 días. nd: no detectable.

Conc. (ng/g p. húm.)	BRANQUIAS	INTESTINO	HIGADO	CEREBRO	MUSCULO
CBZ	407 \pm 82	372 \pm 77	688 \pm 83	701 \pm 206	430 \pm 14
10,11-epoxiCBZ	41 \pm 9	nd	nd	nd	60 \pm 30
2-hidroxiCBZ	57 \pm 8	50 \pm 28	107 \pm 20	48 \pm 22	69 \pm 24
Σ (CBZ+Met.)	505	421	796	749	559
2-hidroxiCBZ/CBZ	0,14	0,13	0,16	0,07	0,16
10,11-epoxiCBZ/CBZ	0,1	-	-	-	0,14
FBC CBZ	5	5	9	9	6

Si bien las diferencias de concentración entre órganos para cada compuesto no fueron estadísticamente significativas, las mayores concentraciones correspondieron a CBZ en cerebro e hígado (Tabla 4.1). La presencia de CBZ en cerebro indica que el fármaco atraviesa la barrera hemato-encefálica (formación densa de células endoteliales y gliales entre los vasos sanguíneos y el sistema nervioso central, que actúa como defensa del cerebro) de *J. multidentata*. Este hecho se explicaría por el mecanismo de acción del fármaco, ya que el cerebro es el órgano blanco en humanos (Rogawski y Löscher, 2004). La concentración en hígado podría asociarse a que es el principal órgano de detoxificación en vertebrados (van der Oost *et al.*, 2003).

Los niveles de CBZ en hígado y músculo coinciden con el rango de concentraciones publicados por Garcia *et al.* (2012) en el pez *Pimephales notatus* expuesto a 298 μ g/L de CBZ en un experimento de acumulación y detoxificación de 42 días, en el cual los peces acumularon 892–1503 y 324–414 ng/g peso húm. de CBZ en hígado y músculo, respectivamente.

No se encontraron antecedentes de concentración de metabolitos de CBZ en peces, con lo cual los datos encontrados en *J. multidentata* son un aporte importante al conocimiento del metabolismo del fármaco en este grupo. El metabolito 2-hidroxiCBZ se cuantificó en los 5 órganos (rango 48 a 107 ng/g peso húm.), lo cual podría indicar que la ruta metabólica de hidroxilación se encuentra presente en esos órganos (Fig 4.7). El principal metabolito activo en humanos, 10,11-epoxiCBZ, se encontró en músculo y branquias (60 y 41 ng/g peso húm., respectivamente).

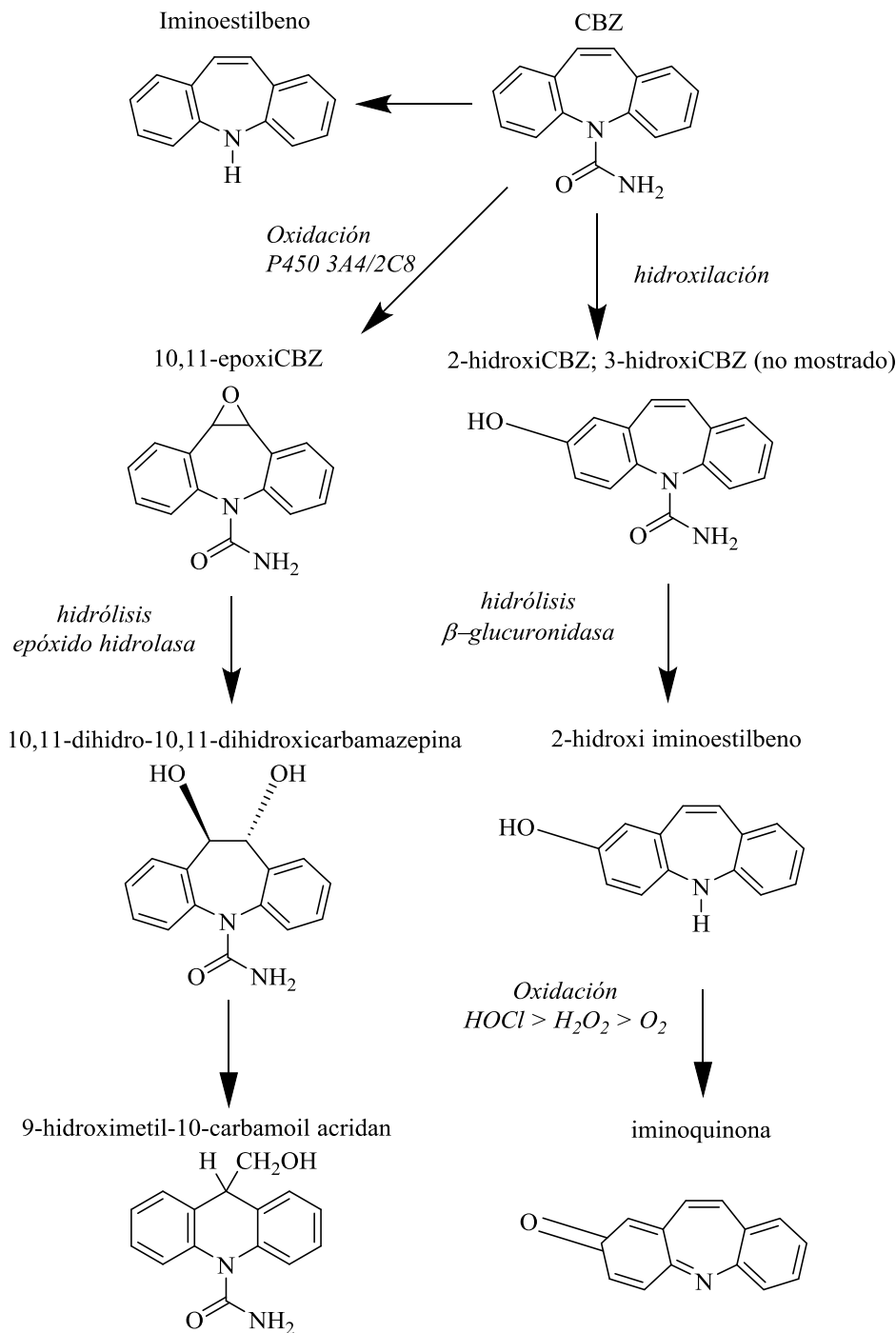


Fig. 4.7. Metabolismo de CBZ en humanos (adaptado de Breton *et al.*, 2005). De acuerdo a Kalapos *et al.*, 2002, la hidroxilación en el anillo aromático ocurre primero por la formación de epóxido llevada a cabo por el sistema CYP 1A2, y posterior formación espontánea de 2-hidroxiCBZ.

En la medicina humana, el cociente 10,11-epoxiCBZ/CBZ se utiliza generalmente para caracterizar el metabolismo de CBZ. Liu y Delgado (1995) presentan valores de este cociente de $0,137 \pm 0,052$ en suero de niños epilépticos. Este cociente coincide con los valores

encontrados en músculo y branquias de *J. multidentata* (Tabla 4.1), sugiriendo que la ruta metabólica vía epóxido podría ser similar entre esta especie y los humanos.

En cuanto al cociente 2-hidroxiCBZ/CBZ, se encontraron valores similares en todos los órganos de *J. multidentata* (0,13-0,16), excepto en cerebro (0,07), lo cual denota diferente metabolismo en este órgano.

La suma de los 3 compuestos (CBZ + metabolitos) sigue el orden HIGADO \approx CEREBRO $>$ MÚSCULO \approx BRANQUIAS \approx INTESTINO. Una tendencia similar se encontró en estudios de acumulación en peces silvestres expuestos a CBZ (Ramirez *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2012), antidepresivos y metabolitos (Brooks *et al.*, 2005; Lajeunesse *et al.*, 2011).

Los FBC calculados para CBZ por órgano oscilaron entre 5 y 9 L/kg. Estos resultados son similares a los informados por Garcia *et al.* (2012), los cuales oscilan entre 2-7 en plasma, hígado, cerebro y músculo de *Pimephales notatus* e *Ictalurus punctatus*.

4.3.1.2 Enzimas antioxidantes y de biotransformación

Las concentraciones de exposición medidas en las muestras de agua de los tratamientos del bioensayo a 2 días de exposición a tiempo 0 h fueron: $0,62 \pm 0,04$; 11 ± 3 y 76 ± 3 $\mu\text{g/L}$ de CBZ para los valores nominales 0,5; 10 y 100 $\mu\text{g/L}$ de CBZ. A las 48 h, las concentraciones fueron: $0,54 \pm 0,02$; $13,24 \pm 0,03$ y 78 ± 14 $\mu\text{g/L}$ de CBZ. En las muestras control no se detectó CBZ (LOD: 0,2 ng/L).

Las concentraciones de CBZ a 0 y 48 h son similares, lo que significa que la degradación del fármaco en 2 días en agua es despreciable, y que la cantidad de fármaco que ingresa a los peces es mínima en relación a la masa total de fármaco en la solución. Por seguridad, el agua de las peceras se cambió cada 48 h en los experimentos de mayor tiempo de exposición. En el texto se referirá a las concentraciones nominales para mencionar cada tratamiento de exposición.

La actividad de GST citosólica (GSTc) y microsomal (GSTm) en los órganos de *J. multidentata* a 2 y 7 días de exposición, se presenta en la Fig. 4.8. No se grafican los órganos en los cuales no se detectó actividad enzimática.

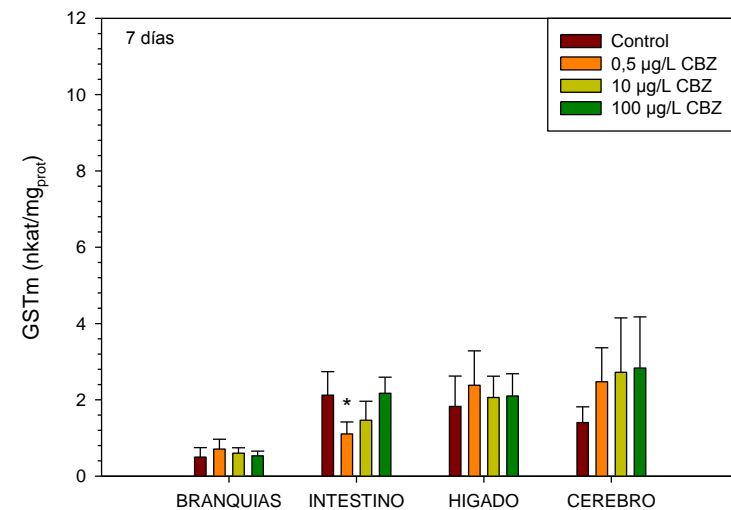
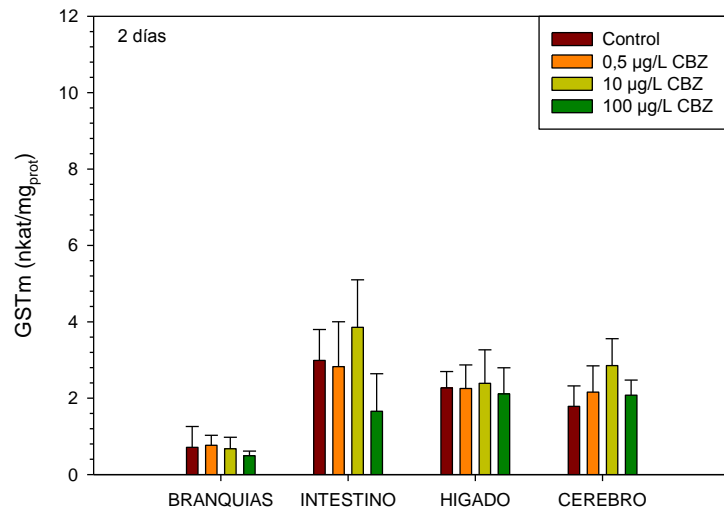
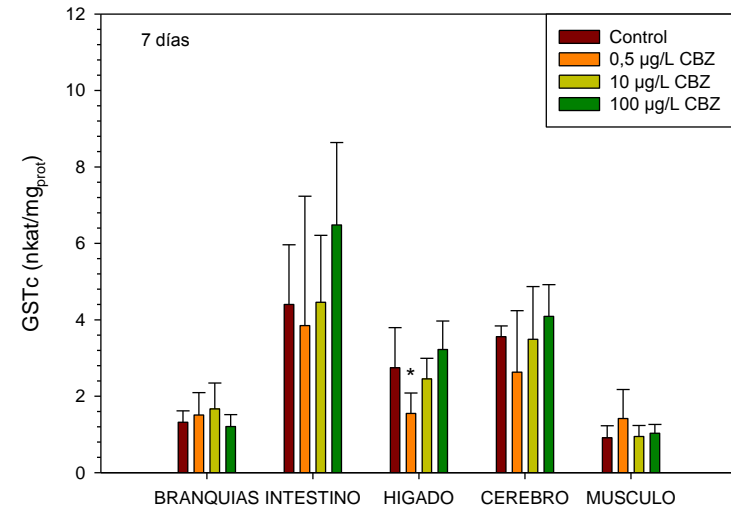
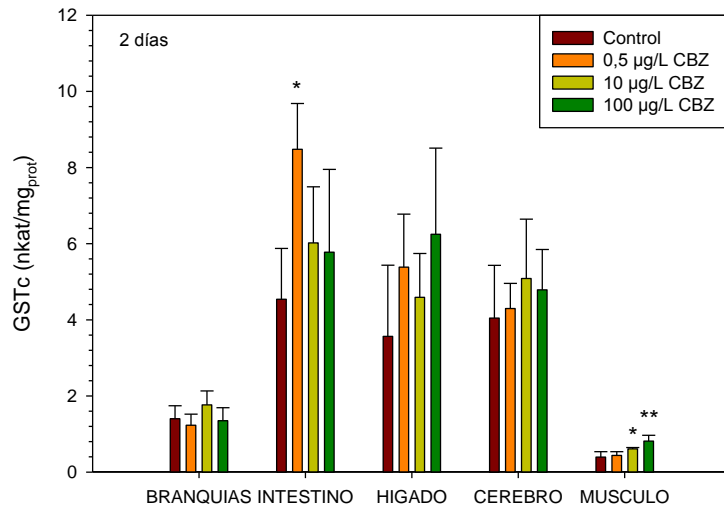


Fig. 4.8. Actividad de GSTc y GSTm (nkat/mg proteína) en los 5 órganos de *J. multidentata* expuestas a CBZ durante 2 y 7 días. La altura de la barra corresponde a la media y los límites superiores a la desviación estándar. *: indica diferencias significativas respecto al control. **: indica diferencias significativas entre concentraciones de CBZ.

La respuesta detoxificante en los órganos de peces tratados respecto a los controles es variable. A 2 días de exposición, se observó una activación significativa de GSTc en intestino (a 0,5 µg/L de CBZ) y en músculo (a 10 y 100 µg/L de CBZ). Por el contrario, las diferencias no fueron estadísticamente significativas en la actividad de GSTm en ninguno de los órganos a 2 días de exposición. A 7 días de exposición se observó una inhibición significativa de la actividad de GSTc en hígado y de GSTm en intestino (ambas a 0,5 µg/L de CBZ).

Un aumento en la actividad de GST indicaría una tasa de metabolismo más alta, mientras que una disminución de la actividad puede ser signo de una saturación de esta enzima (Burmester *et al.*, 2012). Asimismo, el método de medición de actividad de GST utilizado en esta Tesis no diferencia entre isoenzimas, por lo cual la actividad medida puede estar asociada tanto a la función detoxificante como a la función antioxidante de este grupo de enzimas (Griboff *et al.*, 2014).

Se ha mencionado que los intermediarios epóxidos de CBZ en el anillo aromático (arenos) e incluso la 10,11-epoxiCBZ pueden conjugarse con glutatión para su eliminación (Kalapos, 2002). Sin embargo, el conjunto de resultados indicaría que GST no muestra una marcada activación en peces expuestos con respecto al control. Esto podría indicar que la conjugación con glutatión no es una vía eficiente de detoxificación de CBZ en *J. multidentata*.

En acuerdo con la ausencia de respuesta enzimática de GST encontrada en este trabajo, Brandão *et al.* (2013) no encontraron diferencias significativas en branquias e hígado del pez *Lepomis gibbosus* expuesto a 62,5-1000 µg/L de CBZ durante 96 h. Sin embargo, dichos autores detectaron un aumento significativo en la actividad de GST en el tracto digestivo, a concentraciones mayores a las utilizadas en esta Tesis (250-1000 µg/L de CBZ), lo que, sumado a las diferencias entre especies, podría explicar las distintas respuestas en la actividad de la GST en intestino observadas.

Se ha mencionado en bibliografía respuestas de daño oxidativo como consecuencia de la generación de EROs en órganos de peces expuestos a CBZ (Li *et al.*, 2011, 2010a, 2010b, 2010c). La generación de EROs en los tejidos puede ser “neutralizada” por el sistema de defensa enzimático antioxidante. Cuando la actividad este sistema disminuye o la producción de EROs aumenta, se produce daño oxidativo (Li *et al.*, 2011).

Como parte de este sistema de defensa al daño oxidativo, se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, GPx y GR citosólicas, en los distintos órganos de *J. multidentata* expuestas a CBZ durante 2 y 7 días (Fig. 4.9).

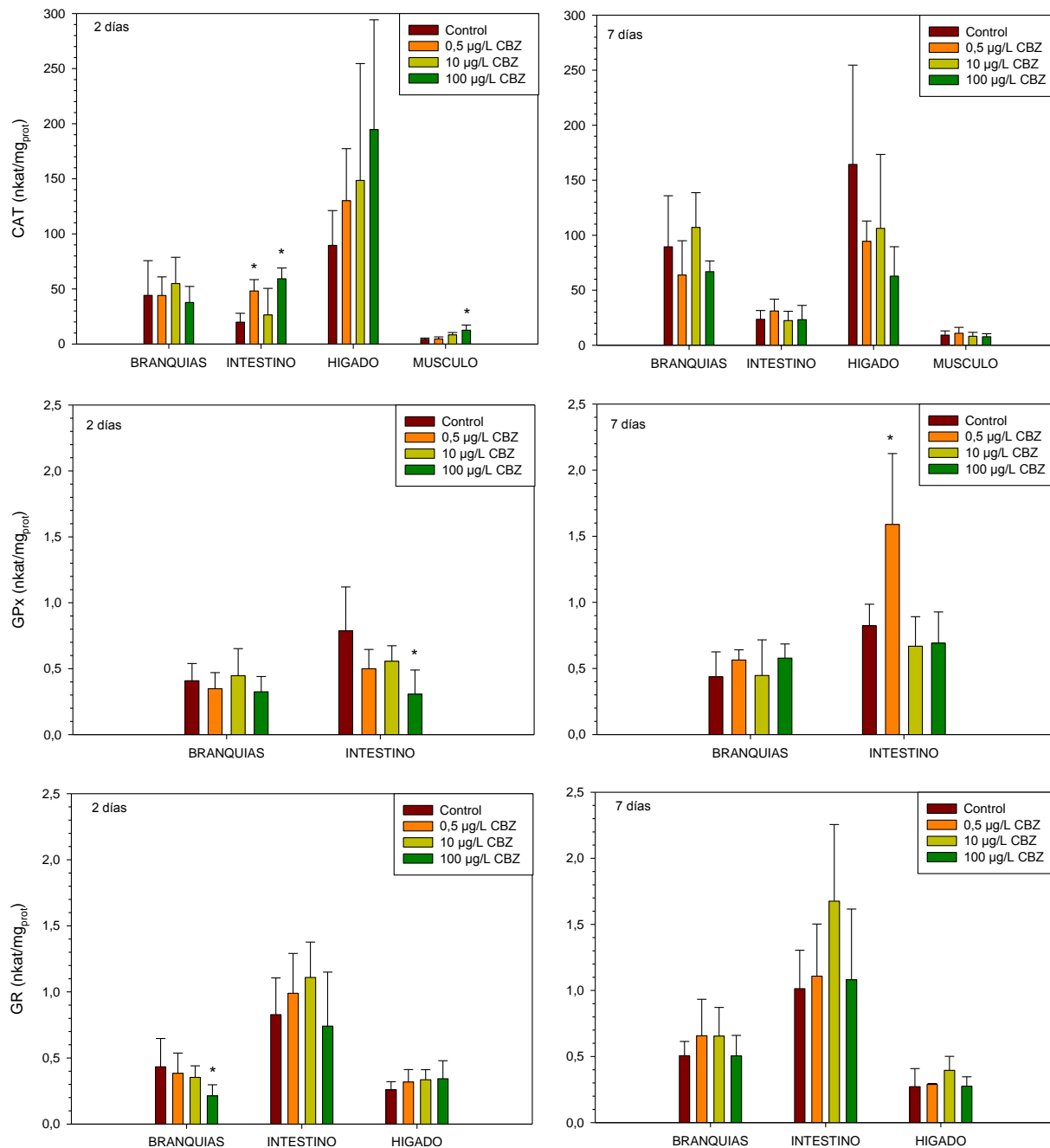


Fig. 4.9. Actividad (nkat/mg proteína) de las enzimas catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), en los órganos de *J. multidentata* expuesta a CBZ durante 2 y 7 días. La altura de la barra corresponde a la media y los límites superiores a la desviación estándar. *: indica diferencias significativas respecto al control. **: indica diferencias significativas entre concentraciones de CBZ.

La actividad de CAT se incrementó significativamente en intestino de peces expuestos a CBZ (0,5 y 100 µg/L) así como en músculo (a 100 µg/L de CBZ), luego de 2 días de

exposición. Dicha tendencia se observó también en hígado, aunque el aumento no fue estadísticamente significativo. Estos resultados coinciden con los señalados por la bibliografía, tanto en estudios agudos como crónicos. Li *et al.* (2011) registraron aumento en estos órganos en individuos de trucha expuestos durante 96 h a concentraciones elevadas (19,9 mg/L de CBZ). Por otra parte, se encontró activación de CAT en músculo de la misma especie en individuos expuestos a 200 µg/L de CBZ, concentración del mismo orden que la utilizada en esta Tesis, en bioensayos de larga duración (42 días) (Li *et al.*, 2010c). Nuestros resultados ponen en evidencia una respuesta temprana de esta enzima al encontrar activación de la misma a 48 h de exposición.

Contrariamente a lo observado en la actividad de CAT, la enzima GPx se vio inhibida en intestino de individuos de *J. multidentata* expuestos a la concentración más alta de CBZ (100 µg/L) durante 2 días, invirtiéndose esta respuesta a 7 días de exposición a 0,5 µg/L. Estos resultados se diferencian de lo registrado en individuos de trucha, donde no se evidenció cambio de la enzima GPx en intestino y se observó disminución en branquias (19,9 mg/L, 96 h) (Li *et al.*, (2011).

En cuanto a la actividad de la enzima GR, se observó inhibición en branquias de peces expuestos durante 2 días a 100 µg/L de CBZ, registrándose una tendencia de aumento en la actividad en hígado al mismo tiempo de exposición. A 7 días no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos. Se ha sugerido que la hepatotoxicidad asociada con el consumo de drogas antiepilépticas aromáticas en humanos puede estar relacionada con el estrés oxidativo, inducido por los metabolitos de los fármacos, y con alteraciones en el metabolismo de glutatión (Kalapos, 2002; Santos *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha encontrado disminución de la defensa antioxidante, evaluada a través del cociente glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG), en mitocondrias de hígado de rata incubadas con CBZ (0,025-1 mM) (Santos *et al.*, 2008). La enzima GR es la encargada de reducir GSSG a GSH (Fig. 4.3). En esta Tesis se registró una tendencia de aumento de GR en hígado de peces expuestos a CBZ, lo cual, considerando que muchos de los sistemas fisiológicos son conservados entre diferentes grupos de vertebrados, podría relacionarse a los resultados encontrados en hígado de ratas. Es decir, la activación de GR podría responder a la disminución del cociente GSH/GSSG causado por CBZ. En concordancia con lo señalado, Li *et al.* (2011) informaron un aumento de la actividad de GR en hígado e intestino de *Oncorhynchus mykiss* (trucha) expuestos a 19,9 mg/L de CBZ por 96 h. En el mismo estudio

se encontró inhibición de GR en branquias, resultados que coinciden con los encontrados para *J. multidentata*. Los autores atribuyen la inhibición de GR a la exposición directa de este órgano a la solución con CBZ, ya que es la interfase más extensa entre el pez y el ambiente acuático, y suele ser el primer órgano afectado por los contaminantes. En contraposición, los órganos internos quedan expuestos a la concentración de fármaco que ingresa al organismo después de la distribución del mismo por el torrente sanguíneo.

Las respuestas enzimáticas antioxidantes en registradas en individuos de *J. multidentata* expuestos a CBZ indicarían que este fármaco induce la presencia de EROs en branquias, intestino y músculo en esta especie. Dentro de los órganos en los que pudo cuantificarse la actividad de todas las enzimas estudiadas, el intestino mostró los mayores cambios en la actividad enzimática antioxidante (GST y CAT activadas y GPx inhibida).

Los antecedentes sobre el sistema antioxidante cerebral señalan un leve aumento de la actividad en un estudio realizado en *O. mykiss* luego de 7 días de exposición (a 200 y 2000 µg/L CBZ) (Li *et al.*, 2010b). Estos autores indican que el sistema puede regular la producción de EROs y mantener un balance normal en una “etapa adaptativa”. A 21 y 42 días observaron respuestas de daño oxidativo, por lo cual llaman a esta una “etapa inhibitoria”. En *J. multidentata* no fue posible registrar actividad de las enzimas antioxidantes en este órgano con la metodología utilizada.

En los antecedentes bibliográficos no se han encontrado diferencias significativas en el sistema antioxidante en hígado a 7 días de exposición a CBZ y en cerebro un leve aumento (Li *et al.*, 2010a, 2010b). Sin embargo, a tiempos mayores (21-42 días), se han registrado respuestas evidentes de estos sistemas (Li *et al.*, 2010a, 2010b). En individuos de *J. multidentata* el sistema antioxidante mostró mayores respuestas a 2 días de exposición con respecto a 7 días. Si bien no se tiene una explicación definitiva a este hecho, se especula que la ausencia de cambios significativos a 7 días pueda deberse a un período adaptativo en las respuestas enzimáticas, como mencionan Li *et al.* (2010a), luego del cual podrían evidenciarse nuevamente cambios en el sistema antioxidante de *J. multidentata*, a mayor tiempo de exposición. Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis.

4.3.1.3 Enzimas colinesterasas

En la Fig. 4.10 se muestran los resultados de actividad de la enzima acetilcolinesterasa microsomal (AChE) medida en cerebro, hígado y músculo de *J. multidentata* luego de 2 y 7 días de exposición a CBZ.

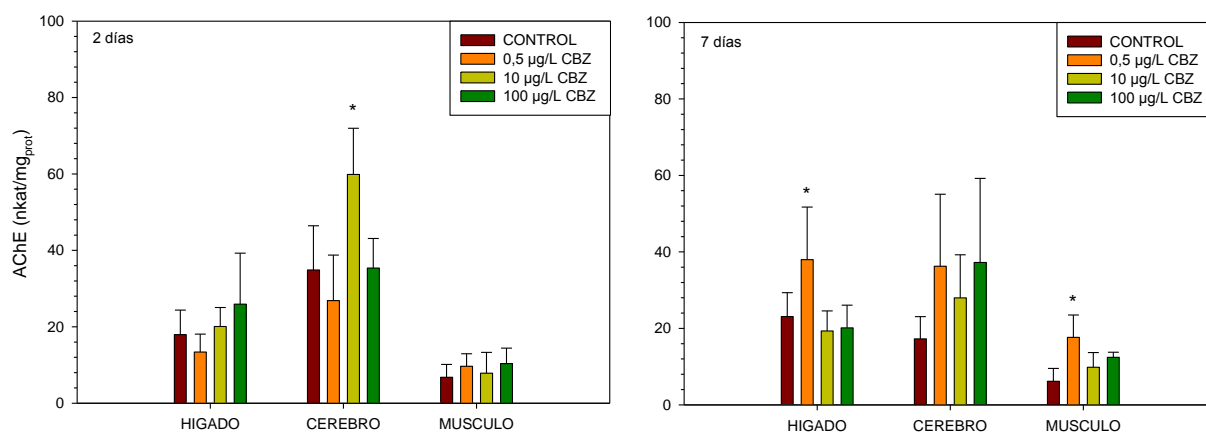


Fig. 4.10. Actividad (nkat/mg proteínas) de acetilcolinesterasa (AChE) en hígado, cerebro y músculo de *J. multidentata* expuestas a carbamazepina (CBZ) durante 2 y 7 días. La altura de la barra corresponde a la media y los límites superiores a la desviación estándar. *: indica diferencias significativas respecto al control.

Se observó activación de AChE en cerebro de *J. multidentata* expuestos a 10 µg/L de CBZ durante 2 días. Por el contrario, en la exposición durante 7 días no se registraron diferencias significativas en AChE cerebral. Por otra parte, sólo a 7 días de exposición se observaron diferencias significativas en la actividad de AChE en hígado y músculo, aumentando a 0,5 µg/L de CBZ.

Se demostró que la CBZ atraviesa la barrera hemato-encefálica de *J. multidentata* (sección 4.3.3.1), lo cual como se mencionó previamente, se encuentra en relación con el modo de acción del fármaco, ya que el cerebro es el órgano blanco. De esta manera, se observa una respuesta temprana a determinadas dosis en la actividad de AChE cerebral. En cambio, la actividad de AChE en músculo e hígado se modifica ante una exposición más prolongada a CBZ, indicando que el fármaco ejerce efectos colinérgicos más retardados en estos órganos.

Si bien el uso de la actividad de colinesterasas como biomarcador de neurotoxicidad en estudios ecotoxicológicos está ampliamente difundido, su aplicación frente a la exposición a fármacos recién se ha publicado en los últimos 10 años, en estudios con invertebrados y peces, en laboratorio y a campo (Nunes *et al.* 2004; Siebel *et al.* 2010; Lu *et al.* 2013; Rhee *et al.* 2013). Sin embargo, no se encontraron antecedentes del efecto de CBZ en la actividad de AChE en peces *in vivo*.

En estudios *in vitro* realizados con homogenatos de cerebro de pez cebra (*Danio rerio*) expuestos 10 min a concentraciones de CBZ notoriamente más elevadas en relación a las utilizadas en esta Tesis (entre 10 y 1000 μM , equivalentes a 2360 y 236.000 $\mu\text{g/L}$ de CBZ), se encontró inhibición de la enzima (Siebel *et al.*, 2010). Por el contrario, y en acuerdo con la activación enzimática encontrada en *J. multidentata*, Maranhó *et al.* (2014) informaron aumento significativo de AChE sólo a la concentración de 0,5 ng/g, en polichetos marinos (*Hediste diversicolor*) expuestos a sedimentos con agregado de CBZ (0,05-500 ng/g) durante 14 días.

La activación de AChE en cerebro de individuos de *J. multidentata* fue observada a 2 días de exposición, mientras que a 7 días no se evidenciaron cambios significativos. En la bibliografía se ha mencionado el fenómeno de respuesta adaptativa como una posible explicación de activación de AChE en cerebro de ratas. Trevisan *et al.*, (2008) detectaron activación de AChE en cerebro de ratas luego de ser inyectadas con 100 mg/kg malatión durante 3 días (pesticida organofosforado, con el cual esperaban observar inhibición de AChE). Los autores postulan que sus resultados están en acuerdo con la idea de que dosis bajas y constantes de exposición al plaguicida conducen a una respuesta adaptativa. Además agregan que luego de exposiciones más prolongadas la actividad enzimática se vería inhibida. Si ocurriera un fenómeno similar en cerebro de *J. multidentata* producto de la exposición a CBZ a 2 días, la ausencia de cambios observada a 7 días podría deberse a una etapa intermedia previa a la inhibición enzimática de AChE. Sin embargo se necesitan estudios en peces, a tiempos prolongados y con el fármaco en estudio para confirmar esta hipótesis planteada con ratas.

4.3.1.4 Comportamiento natatorio

Los peces expuestos a CBZ mostraron diferencias en el comportamiento respecto a los peces control, dependiendo dichas respuestas del tiempo de exposición (2 y 7 días).

La variable distancia recorrida, evidenció diferencias estadísticamente significativas en los peces expuestos durante 2 días a CBZ, aumentando la distancia recorrida a las concentraciones de 0,5 y 100 $\mu\text{g/L}$ CBZ y disminuyendo a 10 $\mu\text{g/L}$ CBZ con respecto a los controles (Fig. 4.11). En la exposición a 7 días se encontró la misma tendencia, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La velocidad promedio, mostró diferencias significativas en los peces expuestos durante 2 días, siguiendo el mismo patrón de

respuesta que la distancia recorrida (Fig. 4.11). A 7 días no hubo diferencias significativas respecto al control.

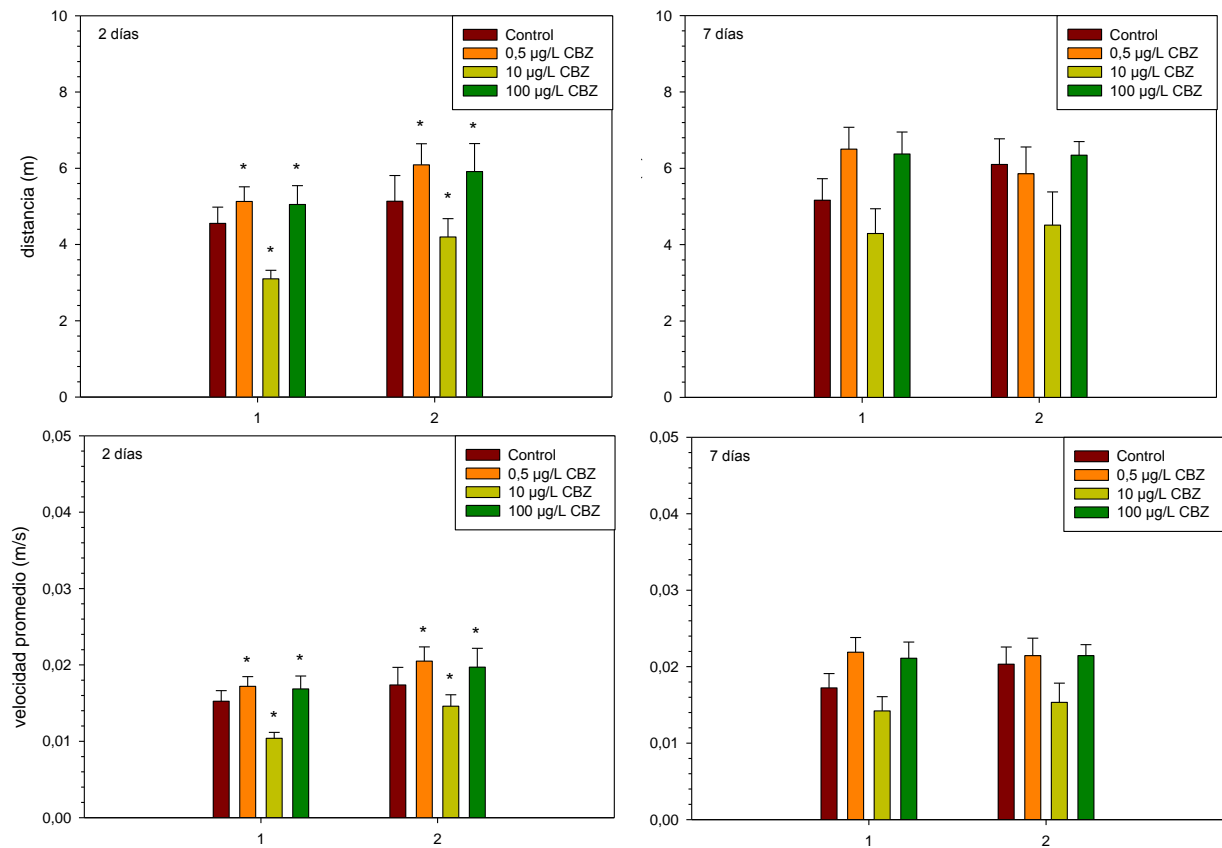


Fig 4.11. Distancia recorrida (m) y velocidad promedio (m/s) de *J. multidentata* expuestas a carbamazepina (CBZ) durante 2 y 7 días. La altura de la barra representa la media y el límite superior el error estándar. En el eje “x”, “1” indica los primeros 5 min de filmación y “2” del minuto 6 al 10. *: indica diferencias significativas respecto al control.

Los peces expuestos a CBZ por un período de 2 días no mostraron diferencias significativas en el tiempo que permanecieron en la superficie de la pecera respecto a los controles. A 7 días de exposición si se observaron diferencias significativas. A la concentración de 0,5 µg/L de CBZ aumentó el tiempo en la superficie, mientras que a 10 y 100 µg/L de CBZ disminuyó significativamente (Fig. 4.12).

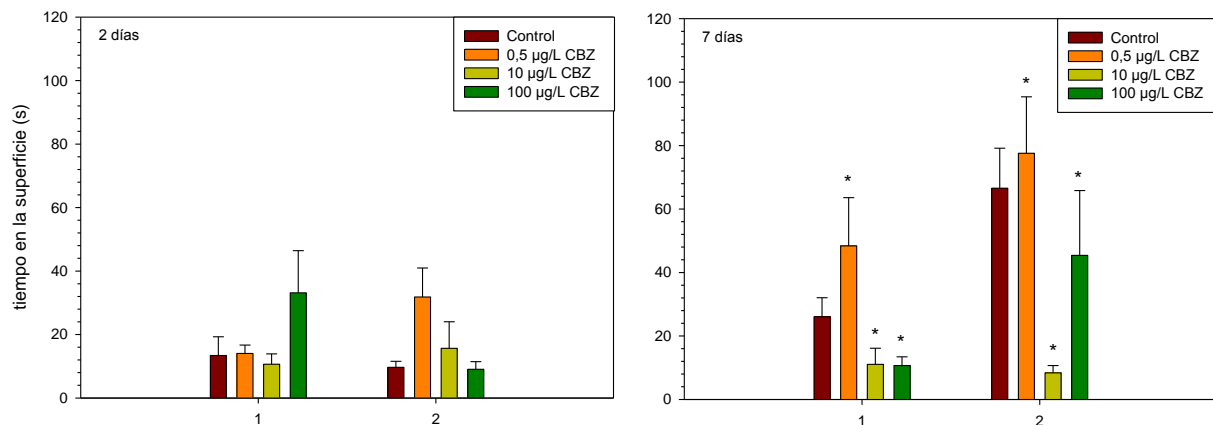


Fig. 4.12. Tiempo en la superficie (s) de *J. multidentata*, expuestas a carbamazepina (CBZ) durante 2 y 7 días. La altura de la barra representa la media y el límite superior el error estándar. En el eje “x”, “1” indica los primeros 5 min de filmación y “2” del minuto 6 al 10. *: indica diferencias significativas respecto al control.

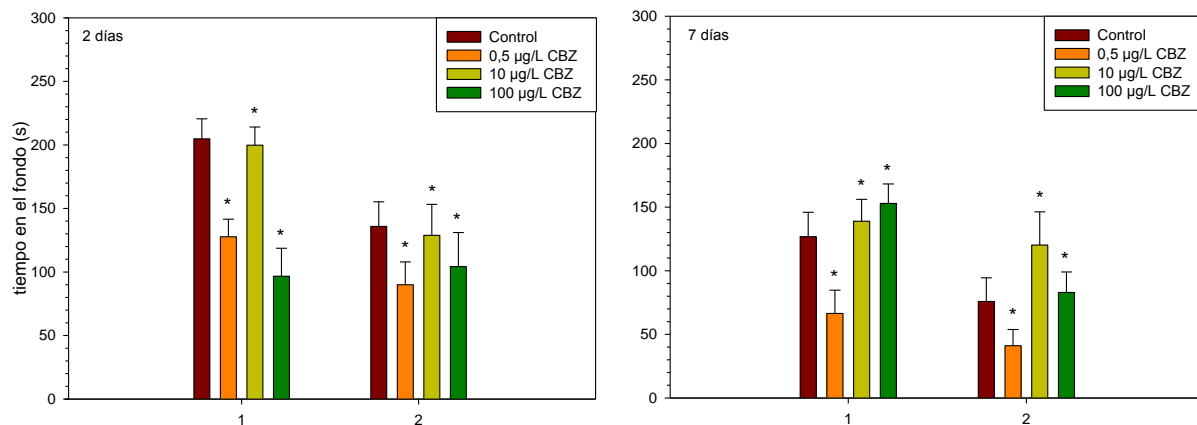


Fig. 4.13. Tiempo en el fondo (s) de *J. multidentata*, previamente expuestas a carbamazepina (CBZ) durante 2 y 7 días. La altura de la barra representa la media y el límite superior el error estándar. En el eje “x”, “1” indica los primeros 5 min de filmación y “2” del minuto 6 al 10. *: indica diferencias significativas respecto al control.

El tiempo que permanecieron los individuos en el fondo de la pecera fue significativamente diferente en los peces de 2 días de exposición, disminuyendo en todos los casos frente a los individuos control (Fig. 4.13). A 7 días de exposición sólo 0,5 µg/L de CBZ produjo ese efecto. Por el contrario, los peces expuestos a 10 y 100 µg/L de CBZ aumentaron su permanencia en el fondo.

La variable tiempo en el centro no fue significativamente diferente en los peces expuestos durante 2 y 7 días, en ninguno de los segmentos de tiempo (Fig. 4.14).

Los resultados muestran que, si bien se observaron algunos efectos en el comportamiento natatorio de *J. multidentata* expuestas a carbamazepina, dichos efectos no siguieron un patrón claro según la dosis y tiempo de exposición.

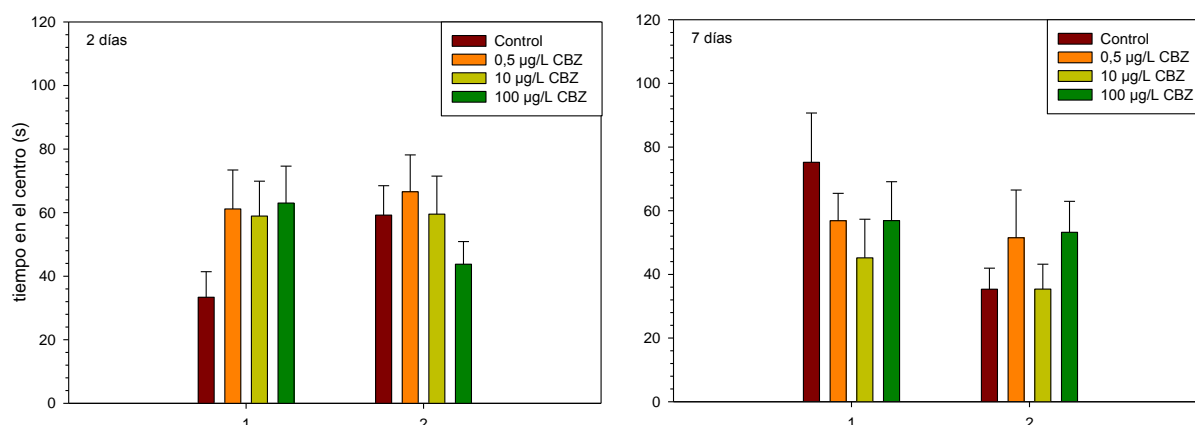


Fig. 4.14. Tiempo en el centro (s) de *J. multidentata*, previamente expuestas a carbamazepina (CBZ) durante 2 y 7 días. La altura de la barra representa la media y el límite superior el error estándar. En el eje “x”, “1” indica los primeros 5 min de filmación y “2” del minuto 6 al 10. *: indica diferencias significativas respecto al control.

En los antecedentes de actividad natatoria publicados con este fármaco se observan respuestas variables según la exposición (tiempo y dosis) y especie evaluada. Por ejemplo, Nassef *et al.* (2010) encontraron disminución en la velocidad natatoria de *Oryzias latipes* (pez medaka) expuestos a una concentración alta, 6,15 mg/L CBZ, a partir del día 8 de exposición. Mientras que Brandão *et al.* (2013), informaron una correlación positiva entre la concentración de CBZ y el tiempo en movimiento de peces *Lepomis gibbosus* expuestos durante 72 h a 62,5 y 1000 µg/L CBZ, atribuyendo en parte este efecto a una reducción de la ansiedad causada por el fármaco. Asimismo, De Lange *et al.* (2006) encontraron un patrón bifásico en las curvas dosis-respuesta del comportamiento del invertebrado *Gammarus pulex* expuesto a CBZ en agua 1,5 h (rango 1 ng/L a 1 mg/L). La exposición a concentraciones bajas (1–100 ng/L) resultó en disminución de la actividad, mientras que a altas concentraciones (1 µg/L–1 mg/L) la actividad volvió al nivel del control.

La correlación entre locomoción (distancia y velocidad promedio) y actividad de acetilcolinesterasa en músculo y cerebro no fue significativa ($P > 0,05$), en ninguno de los dos experimentos (2 y 7 días). La respuesta de acetilcolinesterasa en músculo solo fue significativa a 0,5 µg/L y en cerebro a 10 µg/L de CBZ, lo cual no se ve reflejado en las respuestas de actividad natatoria. Los antecedentes en bibliografía señalan una relación entre la inhibición de acetilcolinesterasa causada por distintos xenobióticos y efectos en el comportamiento (Scott y Sloman, 2004; Xuereb *et al.*, 2009). Sin embargo no se han registrado, según nuestro conocimiento, estudios que evalúen el efecto sobre la actividad natatoria frente a un aumento en la actividad de esta enzima

De acuerdo con lo anteriormente señalado, tanto en bibliografía como en los resultados obtenidos en este estudio sobre el efecto de CBZ en el comportamiento de peces, no es factible destacar un patrón claro de respuesta comportamental. El mismo varía según la dosis, el tiempo de exposición y la especie en estudio. Si bien se observan cambios comportamentales en diversos biomarcadores en *J. multidentata*, al no mostrar un patrón generalizado, sino muy variable en cuanto a dosis y tiempo, no nos es posible explicar el significado de las alteraciones observadas.

4.3.1.5 Análisis discriminante

Tanto los biomarcadores de exposición como los biomarcadores de efecto enzimáticos evaluados en los peces, mostraron respuestas significativas a la exposición a CBZ. Debido a que los biomarcadores de comportamiento no aportaron un patrón de respuesta claro, se excluyeron del análisis discriminante (AD).

Los resultados del AD de los biomarcadores de efecto incluyeron 5 variables como las más importantes para discriminar correctamente entre grupo control y expuestos a 0,5, 10 o 100 µg/L de CBZ durante 2 días (100% de asignaciones correctas, calculadas a partir de la matriz de clasificación, datos no mostrados). Las variables seleccionadas por AD son: glutatión *S*-transferasa y catalasa intestinal (GSTc INT y CAT INT), acetilcolinesterasa y glutatión *S*-transferasa en cerebro (AChE CER y GSTc CER) y glutatión *S*-transferasa en músculo (GSTc MUS). Los coeficientes de las funciones de clasificación de los 4 grupos se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Funciones de clasificación del AD para cada grupo, exposición a CBZ 2 días.

Variable	Control p = 0,25	0,5 µg/L CBZ p = 0,25	10 µg/L CBZ p = 0,25	100 µg/L CBZ p = 0,25
GSTc INT	-0,53315	2,74362	-0,04969	-2,17012
AChE CER	0,07392	-3,65525	5,37491	-1,76387
CAT INT	-3,60428	1,90953	-5,27755	6,96964
GSTc MUS	-1,97839	2,35049	-5,46093	5,06886
GSTc CER	1,20139	-2,04695	3,93908	-3,08679
Constante	-3,30498	-4,98303	-7,43652	-6,14201

Las 5 variables permiten discriminar peces expuestos a CBZ de peces controles, por lo cual podrían proponerse como biomarcadores de respuesta a la exposición a CBZ en un bioensayo a 2 días de exposición. De las 5 variables, GCTc INT y AChE CER son las más importantes

en la discriminación. Debido a que la bioconcentración de CBZ por órganos también resultó sensible a la exposición al fármaco, principalmente en cerebro e hígado, también se la propone como biomarcador.

Los gráficos de la Fig. 4.15 muestran diferentes patrones de comportamiento para las variables de mayor importancia en la discriminación entre grupos a 2 días de exposición a CBZ. Puede observarse que los patrones difieren para cada variable, presentando diferencias significativas entre tratamientos GSTc INT, AChE CER, CAT INT y GSTc MUS.

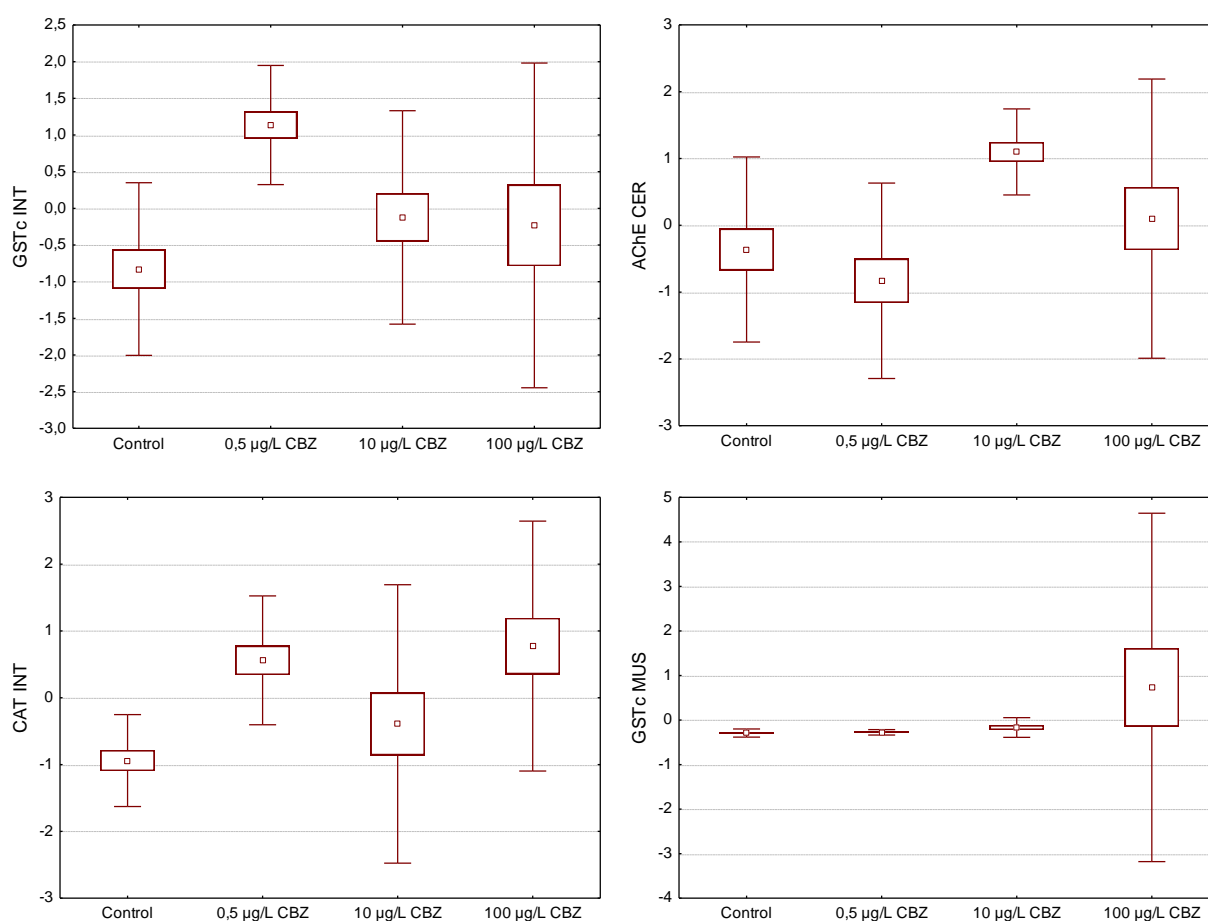


Fig. 4.15. Gráficos de caja de las variables estandarizadas seleccionadas por el AD para la diferenciación entre peces control y expuestos a CBZ 2 días (◻: promedio, ◻: error estándar, T: 2 desvíos estándar). GSTc CER sigue un patrón similar a AChE CER, no se grafica su comportamiento.

Los resultados del AD de los biomarcadores de efecto medidos en la exposición a 7 días incluyeron 4 variables en las funciones discriminantes entre tratamientos (control, 0,5, 10 o 100 µg/L de CBZ), con 85% de asignaciones correctas (datos no mostrados). Las variables son: acetilcolinesterasa de músculo e hígado (AChE MUS, AChE HIG), catalasa en hígado (CAT HIG) y glutatión peroxidasa en branquias (GPx BR). Los coeficientes de las funciones

de clasificación se muestran en la Tabla 4.3. Las 4 variables podrían proponerse como biomarcadores de exposición a CBZ en un bioensayo a 7 días de exposición.

Tabla 4.3. Funciones de clasificación del AD para cada grupo, exposición a CBZ 7 días.

Variable	Control p = 0,25	0,5 µg/L CBZ p = 0,25	10 µg/L CBZ p = 0,25	100 µg/L CBZ p = 0,25
AChE MUS	-7,58087	9,0882	-2,86067	1,33378
AChE HIG	-5,11859	7,5829	-2,70428	0,22151
CAT HIG	5,40862	-5,4754	1,67757	-1,59071
GPx BR	-4,23884	4,3219	-1,51717	1,42329
Constante	8,45864	-11,708	-2,57869	-2,19243

En la Fig. 4.16 se observan los patrones de comportamiento para las 4 variables de mayor importancia en la discriminación entre grupos, de las cuales AChE MUS y AChE HIG presentan diferencias significativas.

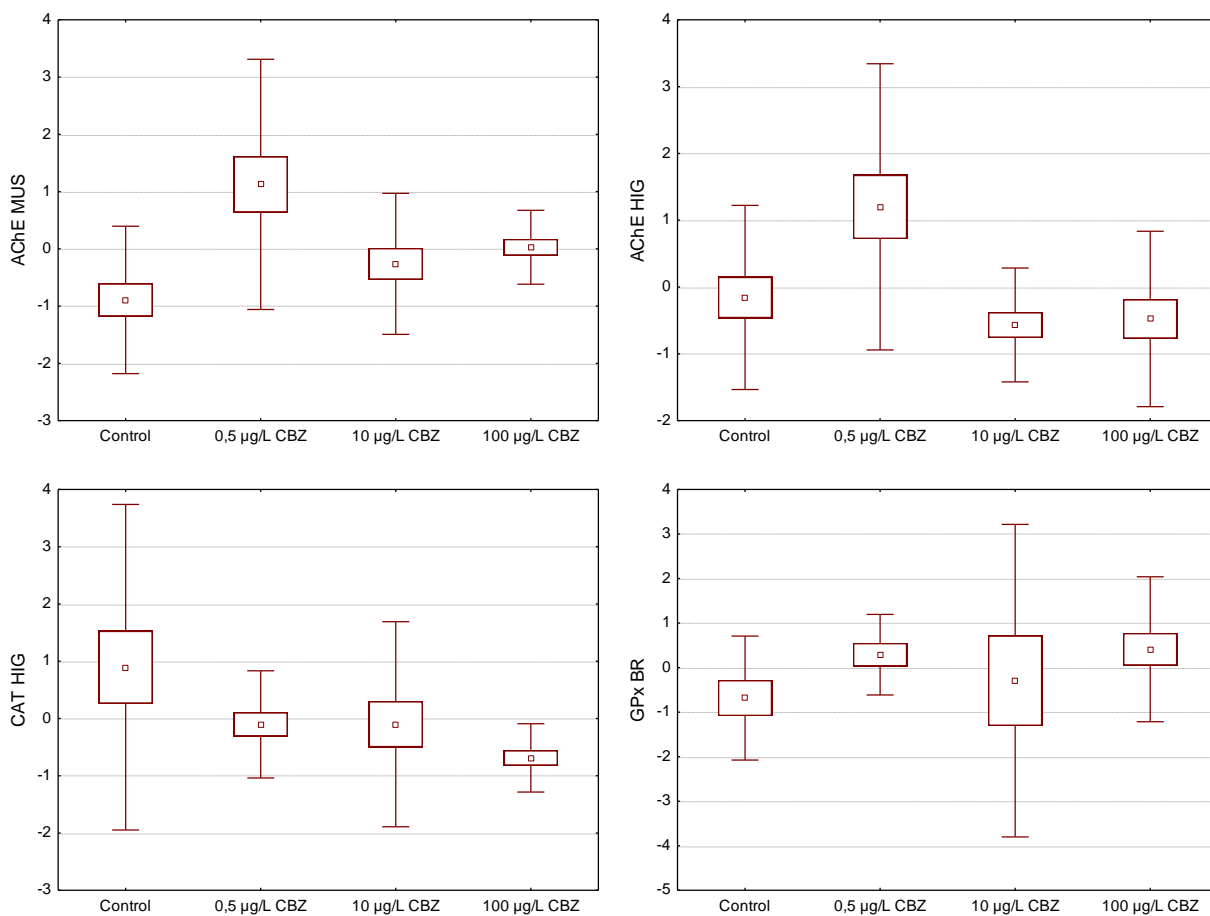


Fig. 4.16 Gráficos de caja de las variables estandarizadas seleccionadas por el AD para la diferenciación entre peces control y expuestos a CBZ 7 días (◻: promedio, ◻: error estándar, T: 2 desvíos estándar).

4.3.2 ATENOLOL

El biomarcador de exposición a ATE evaluado fue la bioconcentración en pez completo. Por su parte, los biomarcadores de efecto corresponden a las mediciones de actividad enzimática de biotransformación y respuesta antioxidante, actividad de enzimas colinesterasas, así como los biomarcadores de comportamiento.

4.3.2.1 Bioconcentración

Las concentraciones de exposición medidas en las muestras de agua durante el experimento de bioconcentración a 96 h fueron las siguientes: $94 \pm 4 \mu\text{g/L}$ y $700 \pm 200 \mu\text{g/L}$ de ATE (concentraciones nominales: 100 y 1000 $\mu\text{g/L}$, respectivamente). En las muestras control no se detectó ATE. La Fig. 4.17 muestra las concentraciones promedio de ATE (ng/g peso húm.) en homogenatos de *G. affinis* durante el experimento a 96 h. Los niveles de ATE en los peces control fueron menores al límite de detección del método (4 ng/g peso húm.). La acumulación promedio de ATE fue de 12 ± 2 y 53 ± 19 ng/g peso húm. (a 100 y 1000 $\mu\text{g/L}$ de exposición, respectivamente).

Los factores de bioconcentración calculados (0,13 y 0,08 L/kg a 100 y 1000 $\mu\text{g/L}$ de ATE, respectivamente) fueron menores a 1, indicando menor concentración de ATE en *G. affinis* respecto al agua, y, por lo tanto, bajo potencial de bioacumulación de ATE en pez completo.

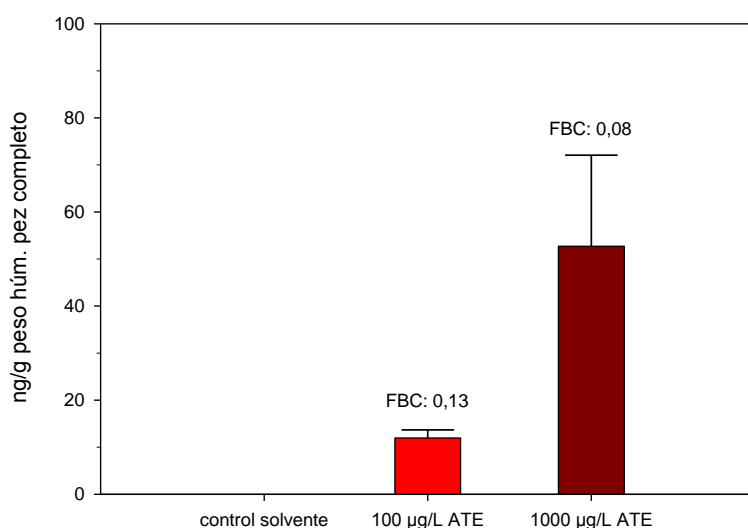


Fig. 4.17. Bioconcentración de atenolol (ATE) en homogenatos de *G. affinis* (ng/g peso húm. pez completo) expuestos durante 96 h. La altura de la barra corresponde a la media y los límites superiores al desvío estándar. FBC: factor de bioconcentración (L/kg), correspondiente a su condición.

Winter *et al.* (2008) informaron un valor de concentración de ATE en plasma de 0,0518 mg/L en la especie *Pimephales promelas* expuestos a 3,2 mg/L de ATE, lo cual resultaría en un FBC de 0,016, similar al encontrado en este trabajo. En acuerdo con estos resultados, los FBC calculados por Steinbach *et al.* (2014) oscilaron entre 0,002 y 0,27 L/kg los cuales resultan similares a los calculados en esta Tesis para pez entero.

Steinbach *et al.* (2014) evaluaron la acumulación de ATE en órganos de *Oncorhynchus mykiss* (trucha) expuestas a 1, 10 y 1000 µg/L durante 21 y 42 días, encontrando acumulación a 21 días solo en hígado, riñón y músculo de peces expuestos a 1000 µg/L (rango 3,6 a 300 ng/g promedio), mientras que a 42 días la acumulación fue evidente en los mismos órganos a 10 y 1000 µg/L (rango 2,3 a 230 ng/g promedio). Según este estudio, la acumulación de ATE en distintos tejidos de peces sigue un patrón dosis y tiempo dependiente. La acumulación encontrada en homogenatos de *G. affinis* en esta Tesis se encuentra comprendida dentro de los rangos informados en dicho estudio, siguiendo también un patrón dosis dependiente.

4.3.2.2 Enzimas antioxidantes y de biotransformación

Las concentraciones de ATE en las muestras de agua de pecera tomadas a tiempo 0 h fueron: $1,4 \pm 0,2$ y 62 ± 2 µg/L para los valores nominales 1 y 50 µg/L de ATE, respectivamente. Luego de 48 h de exposición, los mismos fueron: $1,2 \pm 0,1$ y 64 ± 1 µg/L de ATE; por consiguiente, no hay degradación apreciable de ATE en agua durante el tiempo del experimento. En las muestras control no se detectó el fármaco (LD: 0,2 ng/L). En el texto se referirá a las concentraciones nominales para mencionar cada tratamiento de exposición.

La actividad de GST citosólica (GSTc) y microsomal (GSTm) en órganos de individuos de *J. multidentata* expuestos a ATE se presenta en la Fig. 4.18. No se grafican los órganos en los cuales no se detectó actividad enzimática.

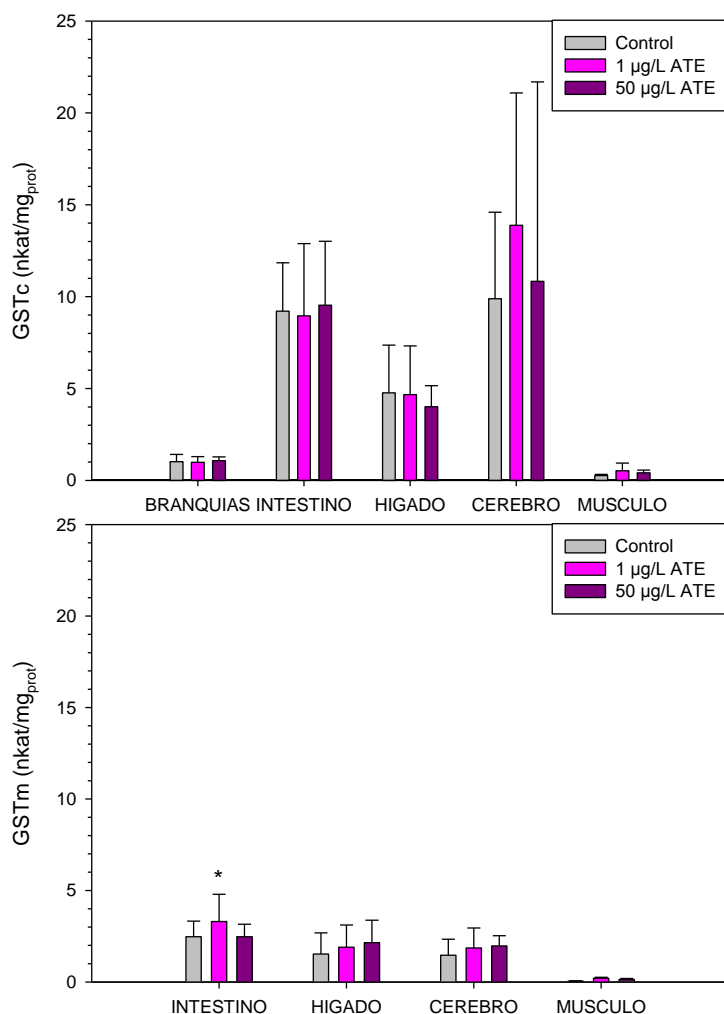


Fig. 4.18. Actividad de glutatión *S*-transferasa (nkat/mg proteína) citosólica (GSTc) y microsomal (GSTm) en los 5 órganos de *J. multidentata* expuestas a atenolol (ATE) 14 días. La altura de la barra corresponde a la media y los límites superiores a la desviación estándar. *: indica diferencias significativas respecto al control.

No se encontraron diferencias significativas en la actividad enzimática de detoxificación por GST, a excepción del aumento de GSTm en intestino a 1 µg/L de ATE. Estos resultados indicarían, en general, que ATE no estaría siendo detoxificado por esta vía enzimática en *J. multidentata*, así como tampoco ejerciendo activación de GST con función antioxidante, bajo las condiciones de estudio. Steinbach *et al.* (2014) mencionaron en su estudio de exposición crónica (21 y 42 días) a ATE (1, 10 y 1000 µg/L de exposición en agua) de trucha (*Oncorhynchus mykiss*), que el mismo estaría siendo eliminado directamente sin metabolizar, similar a lo que ocurre en humanos donde ATE es excretado mayoritariamente sin cambios vía renal (Brunton, 2012c). Si el metabolismo de *J. multidentata* responde de manera similar, sería esperable la falta de activación de las enzimas de biotransformación por conjugación con glutatión (GST).

Contrario a estos resultados, pero en diferentes condiciones experimentales, Diniz *et al.* (2015) encontraron aumento en la actividad de GST citosólica del contenido visceral total del pez *Danio rerio* expuesto a 1 mg/L de ATE durante 7 días. La mayor concentración utilizada en dicho estudio y las diferencias en la medición de actividad GST en el pez (contenido visceral total en relación a órganos individuales usados en esta Tesis) podrían explicar las diferencias observadas con los resultados en *J. multidentata*.

En cuanto a la respuesta de enzimas antioxidantes, no se encontraron diferencias significativas en la actividad de glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) en ninguno de los órganos evaluados en *J. multidentata* expuestas a ATE (Fig. 4.19). Esto indicaría que ATE no produce un aumento de especies reactivas de oxígeno (EROs) que impliquen un cambio en la respuesta de enzimas antioxidantes en los órganos en las condiciones de exposición estudiados.

Esto concuerda con lo registrado por Steinbach *et al.* (2014), quienes determinaron que la actividad de enzimas antioxidantes medidas en hígado y branquias de *O. mykiss* tampoco se vio afectada por la exposición a ATE, excepto GR, cuya actividad disminuyó en hígado a 1000 µg/L durante 42 días. La diferencia en la respuesta de GR entre el estudio mencionado y lo registrado en esta Tesis podría deberse al mayor tiempo y concentración de exposición del experimento realizado con *O. mykiss*. Contrariamente, en el estudio llevado a cabo por Diniz *et al.* (2015), se observó un aumento significativo en la actividad de CAT en la fracción citosólica del contenido visceral total de *Danio rerio* expuesto a 1 mg/L de ATE durante 7 días. Como se mencionó anteriormente, la diferencia encontrada con nuestro estudio puede deberse a las distintas condiciones experimentales utilizadas. En experimentos crónicos con ratas y ratones, ATE indujo una disminución del estrés oxidativo (Gómez *et al.*, 2014; Shahzad *et al.*, 2014), lo que estaría en acuerdo con una ausencia de activación del sistema enzimático antioxidante encontrado en esta Tesis.

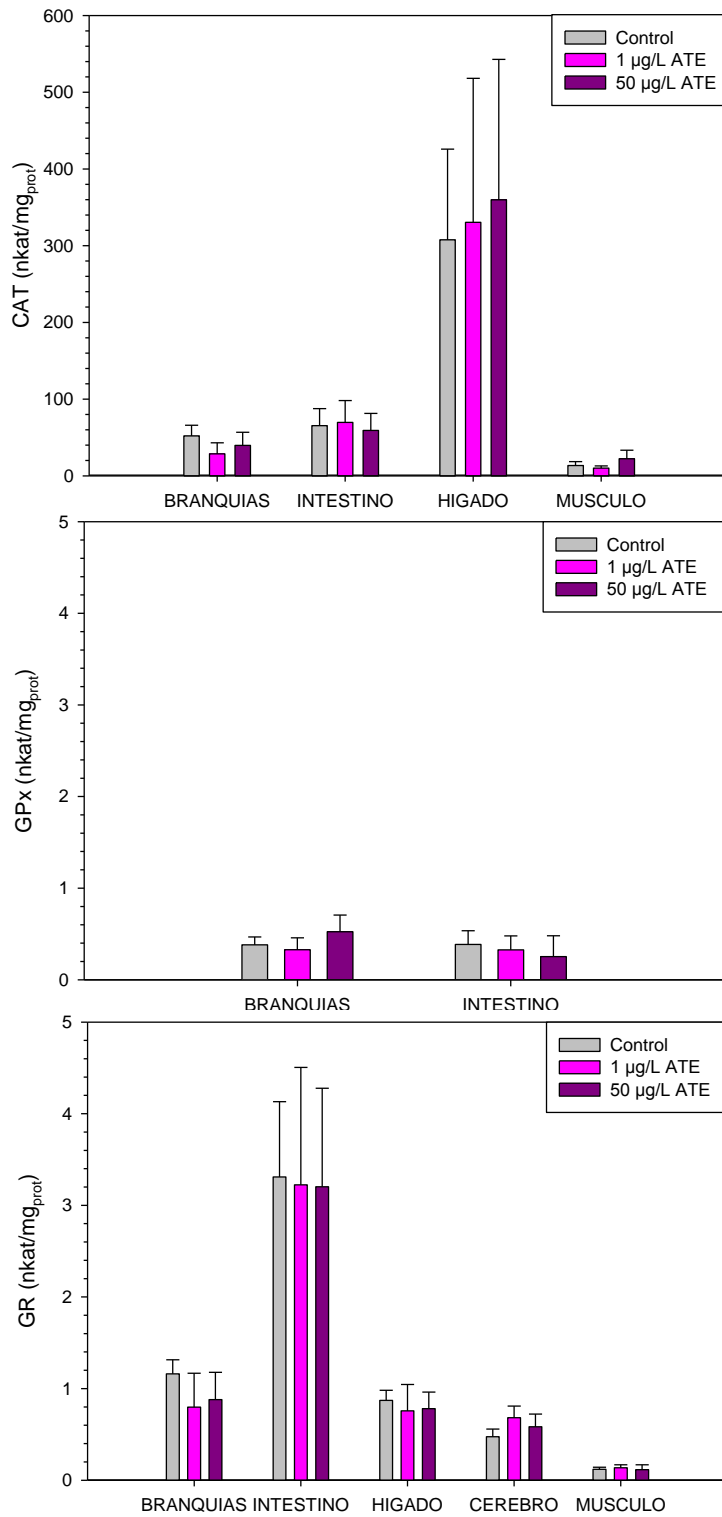


Fig. 4.19. Actividad (nkat/mg proteína) de catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), en los 5 órganos de *J. multidentata* expuestas a atenolol (ATE) 14 días. La altura de la barra corresponde a la media y los límites superiores a la desviación estándar. *: indica diferencias significativas respecto al control.

4.3.2.3 Enzimas colinesterasas

La actividad de la enzima AChE fue significativamente inhibida en cerebro e hígado en individuos de *J. multidentata* expuestos a 1 µg/L de ATE (concentración ambientalmente relevante) y a 50 µg/L además de registrarse inhibición en estos órganos, se le agrega el músculo (Fig. 4.20).

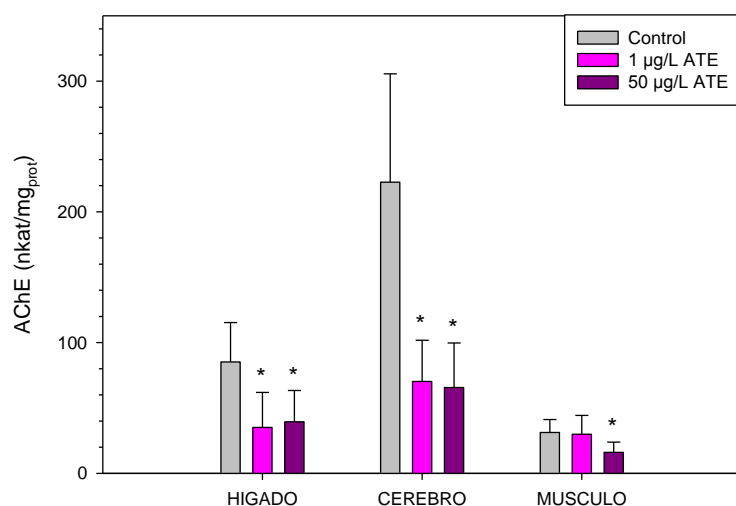


Fig. 4.20. Actividad (nkat/mg proteína) de acetilcolinesterasa (AChE) en hígado, cerebro y músculo de *J. multidentata* expuestas a atenolol (ATE) durante 14 días. La altura de la barra corresponde a la media y los límites superiores a la desviación estándar. * : indica diferencias significativas respecto al control.

La inhibición de AChE encontrada en los órganos de *J. multidentata* conduciría a un aumento de los niveles de acetilcolina y de la transmisión colinérgica. Se ha mencionado la relación entre inhibición de AChE y una variedad de alteraciones en peces, como efectos en la respiración, actividad natatoria y alimentación, por exposición a diversos xenobióticos (Payne *et al.*, 1996).

En línea con los resultados de este trabajo, se ha informado la capacidad pro-colinérgica de ATE, al inhibir la actividad de acetilcolinesterasa humana en solución (enzima comprada) en pruebas *in vitro* (Rockwood *et al.*, 2011). Asimismo, se ha mencionado la interacción existente entre el sistema β-adrenérgico periférico y el sistema colinérgico central en ratas (Ohta *et al.*, 1993). No se conocen antecedentes a la fecha, del efecto de ATE en la actividad de AChE en peces. Con lo cual, la inhibición encontrada en músculo, cerebro e hígado de *J. multidentata* representan un aporte importante al conocimiento de los efectos sub-letales de ATE en este grupo, ampliando el uso de un biomarcador de neurotoxicidad conocido y utilizado en ensayos ecotoxicológicos.

Contrariamente a estos resultados, en experimentos con invertebrados expuestos a ATE, Rhee *et al.* (2013) no encuentran cambios en la actividad de AChE del rotífero *Brachionus koreanus* (10-1000 $\mu\text{g/L}$ durante 12 y 24 h) así como tampoco en el poliqueto *Hediste diversicolor* en una exposición de mayor duración en sedimentos, (0,05-500 ng/g por 14 días) (Maranho *et al.*, 2014).

En este sentido, las respuestas colinérgicas observadas en peces denotan mayor sensibilidad ante la exposición a ATE respecto a las respuestas observadas en invertebrados. Una de las posibles causas de estas diferencias podría encontrarse en las formas de las enzimas colinesterasas. Se conoce que 2 enzimas hidrolizan ACh en vertebrados, la AChE y la butirilcolinesterasa (BChE) (Chatonnet y Lockridge, 1989). En invertebrados, por el contrario, la información respecto a las colinesterasas es más limitada, pero se ha mencionado que los mismos no tendrían ni AChE ni BChE típicas de vertebrados (Sutherland *et al.*, 1997). Se necesitan más estudios de caracterización de las diferentes formas de colinesterasas, tanto en peces como en invertebrados, para confirmar las diferencias entre las mismas y su relación con las respuestas observadas frente a exposición a fármacos.

4.3.2.4 Comportamiento natatorio

Se registró un aumento significativo en las variables distancia y velocidad promedio en individuos de *J. multidentata* expuestos a ATE a ambas concentraciones respecto a los controles, en los dos segmentos de tiempo de 5 min (Fig. 4.21).

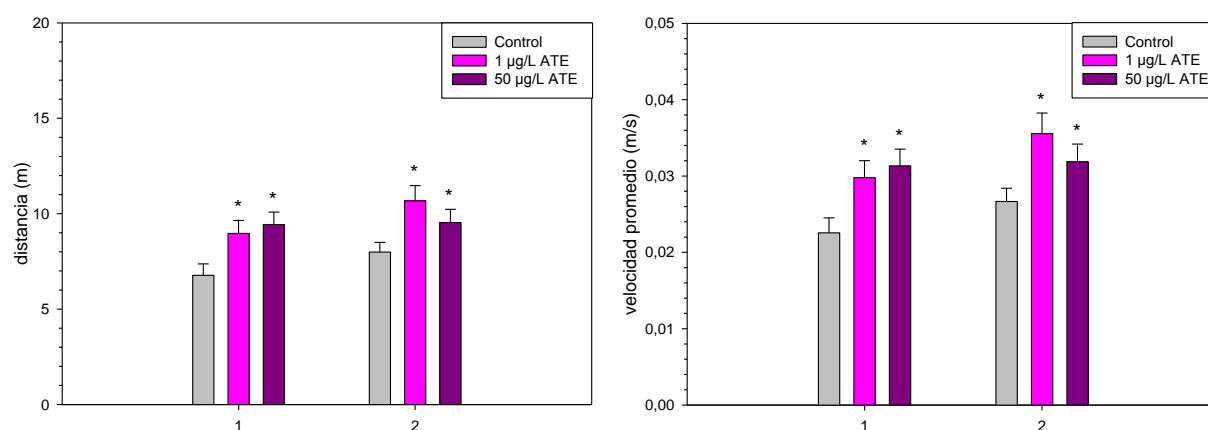


Fig. 4.21. Distancia recorrida (m) y velocidad promedio (m/s) de *J. multidentata* expuestas a atenolol (ATE) durante 14 días. La altura de la barra representa la media y el límite superior el error estándar. Los segmentos de tiempo corresponden a los primeros 5 min de filmación (1) y del minuto 6 al 10 (2). *: indica diferencias significativas respecto al control.

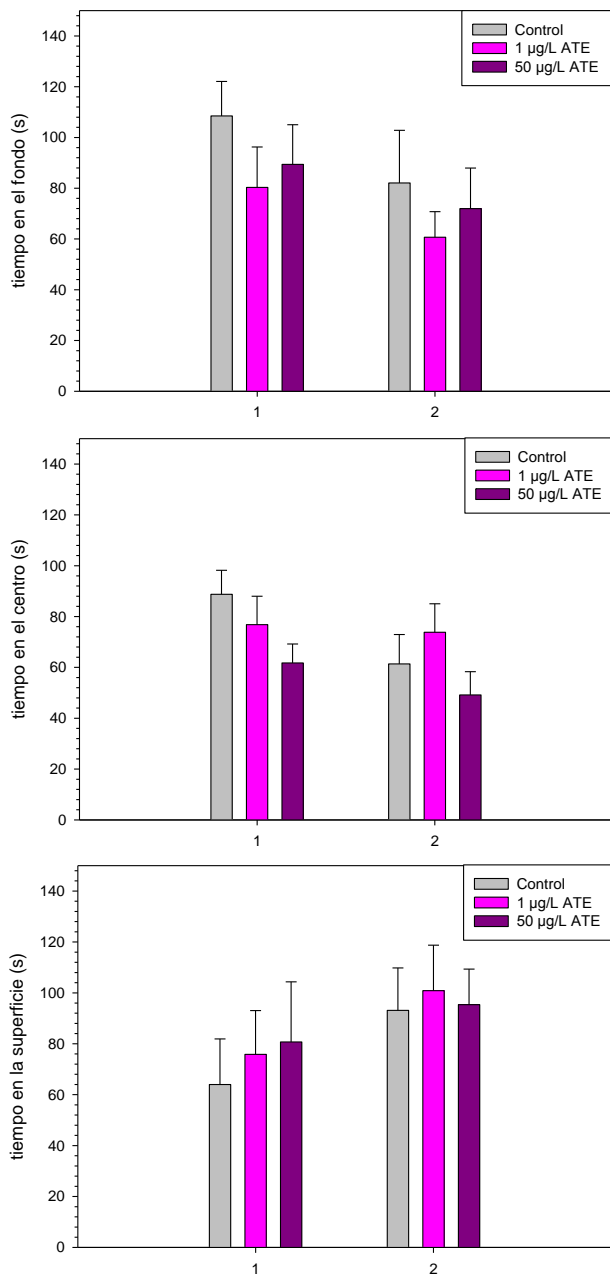


Fig. 4.22. Tiempo de permanencia (s) de *J. multidentata* en el fondo, centro y superficie de la pecera, previamente expuestas a atenolol (ATE) durante 14 días. La altura de la barra representa la media y el límite superior el error estándar. Los segmentos de tiempo corresponden a los primeros 5 min de filmación (1) y del minuto 6 al 10 (2). *: indica diferencias significativas respecto al control.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de permanencia de *J. multidentata* en cada sector de la pecera (Fig. 4.22), si bien se observa una tendencia a permanecer menor tiempo en el fondo y centro y mayor tiempo en la superficie en los individuos expuestos a ATE con respecto al control, principalmente en los primeros 5 min.

La correlación entre velocidad promedio y actividad de acetilcolinesterasa (AChE) en músculo fue significativa ($P < 0,05$), con coeficiente de correlación negativo, mostrando la

relación inversa entre la respuesta de estas variables bajo las condiciones del experimento (Tabla 4.4). Por el contrario, no se encontró correlación significativa entre actividad de AChE muscular y distancia recorrida. Lo mismo ocurrió con la actividad enzimática cerebral y las dos variables comportamentales ($P > 0,05$, Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Valores de probabilidad (p-valor) y coeficiente del análisis de covarianza entre respuestas de actividad natatoria: distancia (m) y velocidad promedio total (m/s) en los 10 min de experimento y actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en músculo y cerebro (nkat/mg proteína).

	AChE MUSCULO		AChE CEREBRO
	p-valor	coeficiente	p-valor
distancia	0,1454	-	0,2620
velocidad promedio	0,0244	-0,42	0,4429

Los receptores β -adrenérgicos se encuentran altamente conservados entre vertebrados y, en peces, se los encuentra en órganos como corazón, branquias, hígado, cerebro, bazo, riñón y músculos y en células como los eritrocitos (Owen *et al.* 2007). Se ha mencionado en bibliografía que los fármacos β -bloqueantes podrían atravesar la barrera hemato-encefálica de los peces, causando efectos en el sistema nervioso central. Esto impactaría en el comportamiento, por ejemplo con ritmos de actividad anormales, alteración del ciclo reproductivo y patrones de sueño (Owen *et al.*, 2007). Se ha mencionado que propranolol, atraviesa la barrera hemato-encefálica en los peces (Owen *et al.*, 2007), mientras que para ATE no se conocen antecedentes. Asimismo no se registraban con anterioridad antecedentes del comportamiento natatorio de peces expuestos a ATE, siendo este el primer informe de cambios comportamentales en peces.

Al enfrentar al pez a un ambiente nuevo, en este estudio la pecera de filmación, el mismo sufre una situación de estrés, manifestada por un comportamiento de disminución en la actividad natatoria y mayor tiempo de permanencia en el fondo (Cachat *et al.*, 2010; Maximino *et al.*, 2010).. Los individuos de *J. multidentata* expuestos a ATE mostraron un aumento en la distancia recorrida y mayor permanencia en la superficie de la pecera, respuestas que se asocian a un comportamiento exploratorio del pez relacionado a una disminución en el estrés.

Si bien los resultados en *J. multidentata* son a dosis mucho menores a las terapéuticas utilizadas en humanos, se ha mencionado, que el tratamiento con ATE tendría un efecto anti-

ansiedad en situaciones potencialmente estresantes (Deary *et al.*, 1991). En línea con estos resultados, en un experimento prolongado (16 meses) en ratones con suministro de ATE en agua potable (100 mg/L), se demostró que los ratones tratados con el fármaco mostraron niveles de coordinación motora y vigor muscular mayores que los ratones control (Gómez *et al.*, 2014). En el mismo estudio, en pruebas de comportamiento (“*open-field*”: campo abierto) se encontró aumento en la actividad exploratoria vertical de los ratones tratados y disminución de respuestas de ansiedad. Respuestas similares se encontraron en un experimento con ratas tratadas con ATE solo y en combinación con 2 antidepresivos, alprazolam y escitalopram, vía oral (dosis de 1 y 2 mg/kg de ATE), durante 21 días, evaluando propiedades de los fármacos en el tratamiento de ansiedad, depresión y estrés oxidativo (Shahzad *et al.*, 2014). Los autores determinaron que el tratamiento con ATE produjo respuestas en el comportamiento de las ratas de anti-ansiedad (mayor preferencia y tiempo de permanencia en los brazos abiertos del experimento de brazos cruzados elevado, “*elevated plus maze*”). Asimismo, evaluaron el estrés oxidativo en cerebro luego de los experimentos de comportamiento (anti-ansiedad y anti-depresivo), encontrando una asociación del daño oxidativo con la ansiedad y depresión, y una mejora en los biomarcadores de daño oxidativo bajo tratamiento de ATE solo y combinado con los alprazolam y escitalopram.

En cuanto a la relación entre comportamiento y actividad de AChE, se ha mencionado en bibliografía la relación entre inhibición de AChE y cambios en la actividad natatoria de peces expuestos a otros tóxicos (van der Oost *et al.*, 2003; Scott and Sloman, 2004). En esta Tesis, se encontró correlación negativa significativa entre velocidad promedio de *J. multidentata* expuestas a ATE y actividad de acetilcolinesterasa en músculo. Teniendo en cuenta estos resultados, la inhibición enzimática registrada provocaría un aumento del neurotransmisor acetilcolina en el espacio sináptico, lo cual aumentaría la activación de los receptores nicotínicos y muscarínicos. Se hipotetiza que el aumento en la respuesta de los receptores nicotínicos en el músculo estriado podría aumentar la actividad natatoria de los peces, como respuesta al aumento en la transmisión colinérgica a las dosis evaluadas, ya que la activación constante de los receptores por largo tiempo culmina generalmente en tetánea e hipoactividad (Ballesteros *et al.*, 2009a).

4.3.2.5 Análisis discriminante

La exposición a ATE generó respuestas en los biomarcadores de exposición y en algunos biomarcadores de efecto evaluados en los peces.

Los resultados del AD de los biomarcadores de efecto incluyeron 6 variables en las funciones de discriminación entre grupo control y expuestos a 1 o 50 µg/L de ATE (100% de asignaciones correctas, Tabla 4.5). Estas variables son: actividad de acetilcolinesterasa cerebral (AChE CER), actividad glutatión *S*-transferasa microsomal y catalasa en intestino (GSTm INT y CAT INT), glutatión reductasa cerebral (GR CER), glutatión peroxidasa y catalasa en branquias (GPx BR y CAT BR). Los biomarcadores AChE CER, GSTm INT y CAT INT fueron las variables más importantes para la discriminación entre grupos (mayor diferencia en los coeficientes de las funciones de clasificación de cada grupo, Tabla 4.5). El análisis discriminante realizado con el método paso a paso hacia atrás (“*backwards stepwise*”) seleccionó solo AChE CER como la variable mínima necesaria para discriminar entre los grupos con un 78% de asignaciones correctas. Esto significa que, de los biomarcadores medidos, AChE CER es el de mayor importancia en la diferenciación de peces expuestos a ATE respecto a peces control bajo las condiciones utilizadas en el experimento, con lo cual se lo propone como biomarcador de efecto para ATE en condiciones de laboratorio.

Tabla 4.5. Funciones de clasificación del análisis discriminante para cada grupo.

Variable	Control	1 µg/L ATE	50 µg/L ATE
AChE CER	13,8	12,89	-0,94
GSTm INT	-8,74	9,29	-0,53
GR CER	-7,97	8,84	-0,85
CAT INT	-8,8	10,34	-1,52
GPx BR	3,96	-5,9	1,93
CAT BR	5,77	-5,89	0,1
Constante	-15,6	-16,35	-2,47

Los gráficos de la Fig. 4.23 muestran diferentes patrones de comportamiento para las variables de mayor importancia en la discriminación entre grupos. Puede observarse que los patrones difieren para cada variable, presentando diferencias significativas entre tratamientos solamente AChE CER y GSTm INT.

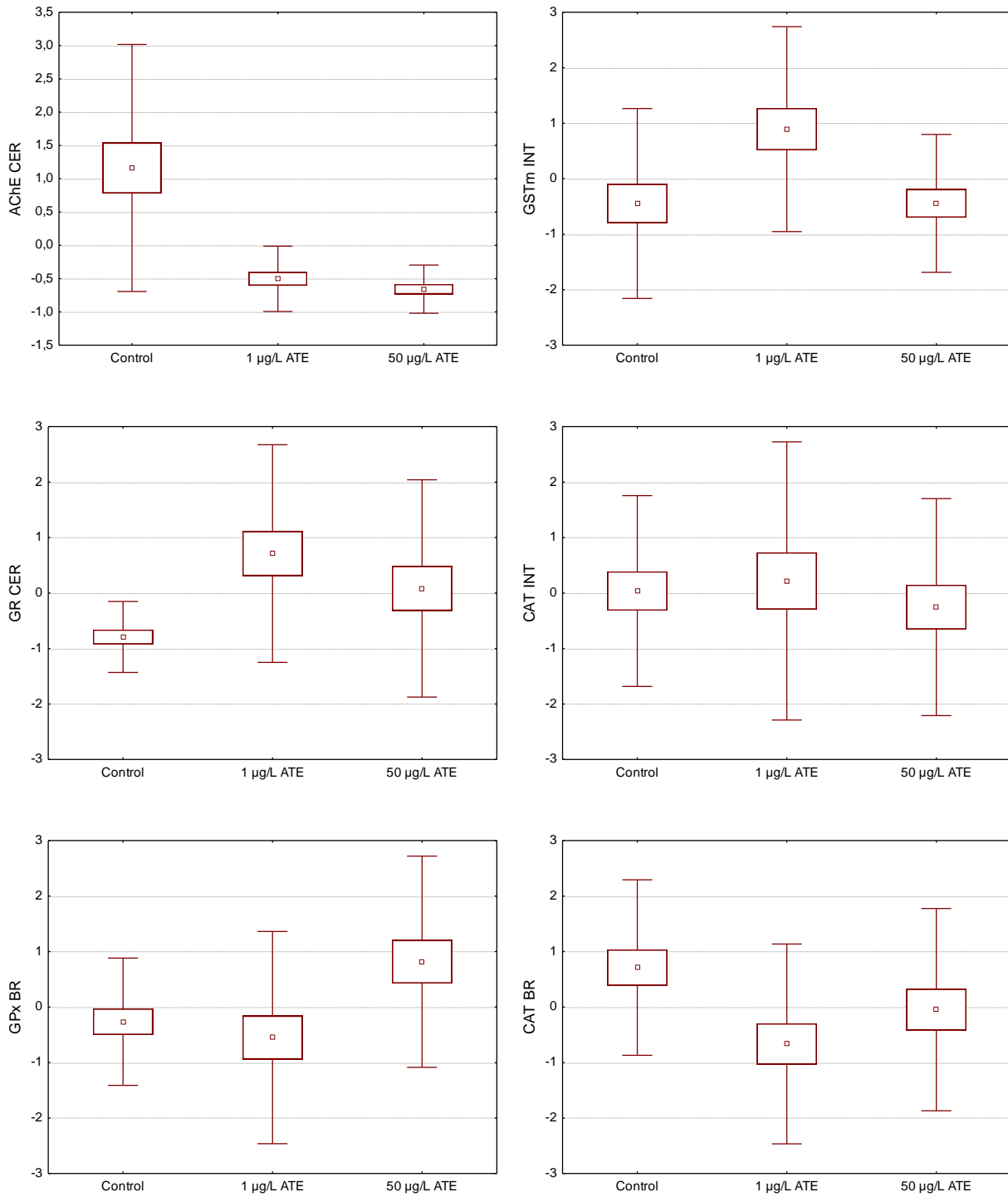


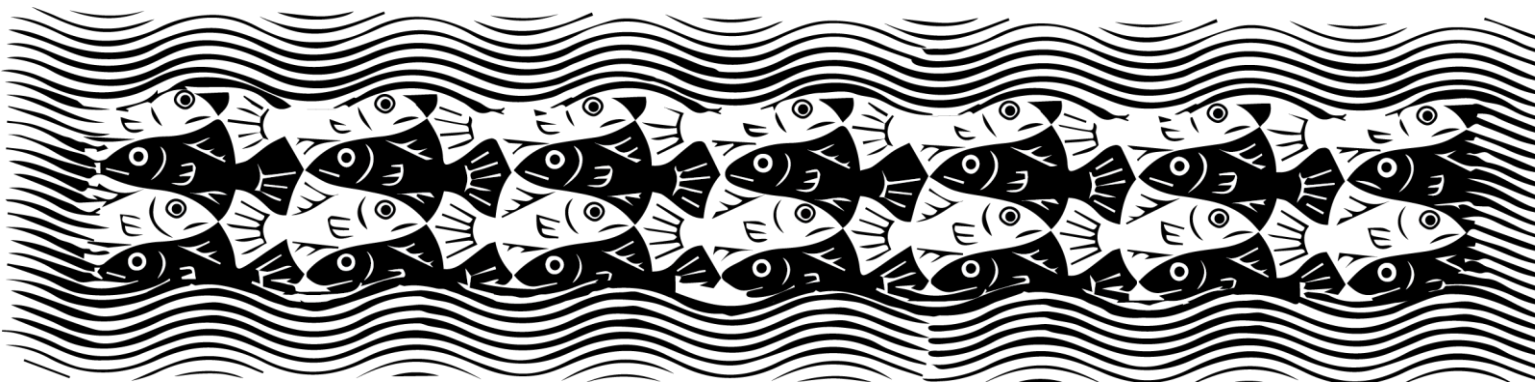
Fig. 4.23. Gráficos de caja de las variables estandarizadas seleccionadas por el AD para la diferenciación entre peces control y expuestos a atenolol (ATE) (□: promedio, □: error estándar, T: 2 desvío estándar).

4.4 Conclusiones parciales

- ✓ La bioconcentración de CBZ en *G. affinis*, mostró una respuesta dosis-dependiente, con factores de bioconcentración cercanos 1 L/kg, mientras que la bioconcentración del fármaco en órganos de *J. multidentata* fue mayor ($1 < \text{FBC} < 10 \text{ L/kg}$).
- ✓ Se encontró distribución de CBZ y en menor medida de sus metabolitos, en cerebro, hígado, músculo, intestino y branquias de *J. multidentata*, lo cual permitiría suponer que el estudio de la acumulación de CBZ por órganos, principalmente cerebro e hígado, es un buen indicador de exposición de este pez a CBZ.
- ✓ Los factores de bioconcentración de ATE en *G. affinis* fueron menores a 1 L/kg. Si bien no pudo determinarse la acumulación por órganos de ATE, la respuesta en pez total indicó que el fármaco ingresa al organismo y no logra eliminarse completamente, ya que un porcentaje del mismo se acumula en condiciones de exposición constante.
- ✓ Los biomarcadores de efecto del sistema antioxidante (GR, CAT, GPx) y de biotransformación (GST) de *J. multidentata* mostraron respuestas diferenciales en intestino, branquias, hígado y músculo, principalmente a 2 días de exposición a CBZ. Por el contrario, ATE no ocasionó respuestas en estos biomarcadores (excepto glutatión *S*-transferasa microsomal activada en intestino).
- ✓ Se encontró respuesta de activación de las enzimas colinesterasas a la concentración ambientalmente relevante de CBZ (0,5 µg/L) a 7 días de exposición en hígado y músculo, mientras que en cerebro la activación se vió a 2 días a 10 µg/L.
- ✓ Los biomarcadores de comportamiento medidos en *J. multidentata* no mostraron un patron claro dosis-respuesta, tanto a 2 como 7 días de exposición a CBZ, por lo cual no se los propone como biomarcadores de efecto bajo las condiciones utilizadas.
- ✓ La exposición a ATE produjo respuesta en los biomarcadores de efecto actividad de acetilcolinesterasa (en hígado, cerebro y músculo) y actividad natatoria/locomoción, evaluados en condiciones ambientalmente relevantes en *J. multidentata*, encontrando una correlación inversa entre la actividad de AChE muscular (inhibición) y velocidad promedio (aumento) y una tendencia similar a efectos anti-ansiedad en el comportamiento de los peces ante un ambiente nuevo.
- ✓ El análisis discriminante permitió seleccionar las enzimas acetilcolinesterasa, glutatión *S*-transferasa y catalasa, mayoritariamente, como biomarcadores de exposición a CBZ en bioensayos de laboratorio, mientras que en bioensayos de exposición a ATE el biomarcador de mayor importancia es acetilcolinesterasa cerebral.

CAPITULO 5

DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES



5.1 Discusión general

La gestión de nuestros recursos hídricos de una manera sostenible y equitativa es fundamental para el sustento de vida, la salud y la dignidad de los pueblos, y constituye una de las bases esenciales de nuestro desarrollo social y económico (PNUMA, 2012).

Los fármacos de uso humano y veterinario son contaminantes ubicuos en el agua que han demostrado tener efectos nocivos en organismos acuáticos y que podrían afectar a la salud humana (Khetan y Collins, 2007). Una estrategia integral y unificada para proteger el ciclo del agua, es mediante el uso de herramientas apropiadas (sistemas analíticos y bioanalíticos) para la detección tanto de concentraciones como de efectos (biomarcadores), los cuales proveen información adicional a nivel molecular facilitando la comprensión de los mecanismos de acción (Hernando *et al.*, 2011).

El objetivo general de esta Tesis fue evaluar la presencia y distribución espacial y temporal de fármacos en el Río Suquía (Córdoba, Argentina) y los efectos de los compuestos encontrados sobre la ictiofauna, a través del uso de biomarcadores de exposición y de efecto. Motivó a este objetivo aportar al conocimiento de la problemática de los contaminantes emergentes de origen farmacéutico en las cuencas hídricas locales y los efectos posibles que pueden ocasionar a los peces que habitan nuestros recursos.

En los sitios monitoreados en el Río Yuspe y El Diquecito-La Calera no se detectaron compuestos de origen farmacéutico en agua superficial (fase disuelta). Estos resultados son relevantes, debido a que el sitio de monitoreo de La Calera se encuentra cercano a la toma de agua de la planta potabilizadora de la Ciudad de Córdoba, lo cual indicaría que no habría riesgo de contaminación por los compuestos estudiados en la fase disuelta del agua que ingresa al sistema de potabilización.

Sin embargo, se determinó la presencia de fármacos y esteroides en el Río Suquía, aguas abajo de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR)-Bajo Grande, Córdoba, hasta la localidad de Río Primero, tanto en temporada húmeda como seca. En la fase disuelta del agua superficial, se detectaron 6 fármacos pertenecientes a 5 grupos terapéuticos (anticonvulsivo/antineurálgico, β -bloqueante, antiinflamatorio, antibiótico y antihipertensivo) y 2 esteroides naturales (estrógeno y andrógeno), en el rango de valores medios 2-481 ng/L. Las concentraciones máximas en agua correspondieron a ATE (581 ng/L), diclofenac (145 ng/L) y CBZ (113 ng/L), siendo los fármacos más frecuentes, dentro de los 15 compuestos

analizados. En peces colectados en los mismos sitios contaminados del río (*G. affinis* y *J. multidentata*), se detectaron 20 fármacos de uso humano y veterinario (psiquiátricos, β -bloqueante, analgésicos/antiinflamatorios, anticoagulante, diurético, broncodilatador y antiparasitario), en el rango 0,4-41 ng/g peso húm. Dentro de estos, se encontraron los 3 fármacos de mayor frecuencia de detección en agua (ATE, diclofenac y CBZ), calculándose, a partir de los mismos, factores de bioacumulación en los peces entre 12 y 208 L/kg. La temporada seca, de menor caudal del río, es la época de mayor contaminación por fármacos, detectada tanto en agua como en peces.

En cuanto a los biomarcadores de exposición evaluados, se determinaron factores de bioconcentración en *G. affinis* (pez completo), de 0,7-0,9 L/kg para CBZ y 0,08-0,13 L/kg para ATE, lo que indicaría bajo potencial de bioacumulación. Sin embargo la bioconcentración de CBZ en los órganos de *J. multidentata* fue mayor, con FBC entre 5-9 L/kg. Cerebro e hígado fueron los órganos de mayor acumulación del fármaco y metabolitos, lo que respondería al modo de acción, ya que cerebro es el órgano blanco, y a la biotransformación del mismo, que ocurre principalmente en hígado. En branquias e intestino también se registró la presencia del fármaco y metabolitos, indicando posibles vías de absorción y excreción del fármaco.

Los biomarcadores de efecto evaluados en *J. multidentata* mostraron respuestas significativas frente a la exposición a ambos fármacos. El fármaco CBZ causó respuestas del sistema antioxidante, principalmente en intestino y activación de colinesterasas, siendo las respuestas variables según la concentración y tiempo de exposición. ATE, por el contrario, no produjo cambios en el sistema antioxidante. Los efectos detectados fueron inhibición de colinesterasas y aumento de la actividad natatoria y comportamiento exploratorio.

En la Argentina aun no contamos con guías o normativa para la evaluación de riesgo de fármacos en el ambiente. La metodología de Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA) para los fármacos consiste en la evaluación de la exposición y la derivación de riesgo asociado por evaluación de efecto (Hernando *et al.*, 2011). Según la normativa europea de evaluación de riesgo ambiental de fármacos de uso humano, en una primera etapa se calcula la concentración ambiental esperada ("*Predicted Environmental Concentration*", PEC) del compuesto en el compartimento acuático (exposición), en función de varios factores (dosis de consumo local, tratamiento de efluentes, dilución esperada, etc.). Se evalúa si los niveles del fármaco en agua exceden un valor límite de 10 ng/L y de ser así, en una segunda etapa se

requiere un análisis de destino ambiental y efectos. El propósito de esta segunda etapa es predecir la concentración de la sustancia a la cual no se espera que ocurran efectos adversos en la biota acuática, determinando la concentración estimada de no efecto (“*Predicted No Effect Concentration*”, PNEC). Finalmente se efectúa el cociente PEC/PNEC y si el mismo es menor a 1, se concluye que la sustancia no representaría un riesgo para el ambiente acuático. Si el cociente es mayor a 1, indicando probable impacto ambiental, se continúa la evaluación más detallada para cada uno de los parámetros (EMEA/CHMP, 2006).

Siguiendo las recomendaciones de la unión europea, en el Río Suquía 5 fármacos excedieron el límite de 10 ng/L: ciprofloxacina, diclofenac, ATE, CBZ y OxCBZ, los cuales merecerían continuar con la evaluación de efectos.

Comparando los valores de efecto encontrados en esta Tesis (0,5 µg/L de CBZ y 1 µg/L de ATE) con las concentraciones más altas encontradas en el Río Suquía (peor escenario posible), 0,113 µg/L de CBZ y 0,581 µg/L de ATE, puede verse que los valores de efecto son del mismo orden que las concentraciones en agua del río, lo que indicaría que debería evaluarse en mayor profundidad el riesgo asociado a estos fármacos en la ictiofauna autóctona.

Si bien hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos en laboratorio no pueden extrapolarse directamente a las condiciones reales a campo, existe un potencial riesgo de alteración del sistema colinérgico y conductual de *J. multidentata* en el Río Suquía por la presencia de fármacos. Esto es relevante, ya que las alteraciones en la neurotransmisión colinérgica se han relacionado con cambios en el comportamiento. Las alteraciones del comportamiento pueden tener implicancias negativas en conductas importantes para la especie como escape frente a un predador, reproducción, alimentación, etc (Scott y Sloman, 2004).

A esto hay que sumar que en las condiciones reales en el Río Suquía los peces se encuentran expuestos a muchos otros contaminantes, inclusive otros fármacos que actúan con modos de acción similares a los evaluados (ejemplo oxcarbazepina/CBZ y metoprolol/ATE, Brunton, 2012), los cuales podrían presentar efectos sinérgicos, agravando las consecuencias sobre la biota. Asimismo, tanto CBZ y ATE, como los fármacos y esteroides detectados en agua y peces del Río Suquía podrían causar otros efectos sobre la ictiofauna del río descriptos

en la bibliografía y que no han sido contemplados en esta Tesis (por ejemplo aspectos reproductivos, alimentarios, etc.).

En relación a la problemática de los fármacos y compuestos relacionados en el Río Suquía evaluada en esta Tesis, surge la necesidad de realizar estudios y aplicación de mejoras en el tratamiento de efluentes urbanos para lograr disminuir la carga de contaminantes emergentes que se liberan al río. En relación a esto, numerosas publicaciones demuestran alternativas tecnológicas o condiciones de operación de las plantas de tratamiento que favorecen el aumento en la remoción de este tipo de contaminantes (Cirja *et al.*, 2007; Rivera-Utrilla *et al.*, 2013; Gadipelly *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). Estas mejoras deberían acompañarse de una gestión cuidadosa de los desechos de origen farmacéutico, tanto en el hogar como en comercios y entidades públicas, de manera de controlar la disposición final de los mismos. Asimismo, se ha mencionado la disminución y optimización personal en las dosis de medicamentos prescritos en los tratamientos medicinales, como una alternativa prometedora para disminuir costos y consumo de fármacos, residuos y efectos secundarios, integrando el contexto ambiental y al individuo en la toma de decisiones respecto a la salud humana (Daughton y Ruhoy, 2013).

5.2 Conclusiones

En relación a los objetivos generales planteados en esta Tesis Doctoral, se arribó a las siguientes conclusiones:

Objetivo 1. Evaluar la presencia y distribución de fármacos y compuestos relacionados, o sus metabolitos, en agua y peces del Río Suquía (Córdoba, Argentina):

- No se detectaron compuestos de origen farmacéutico en agua superficial (fase disuelta) de Río Yuspe y El Diquecito-La Calera, lo cual indica que no habría contaminación por fármacos y esteroides en los sitios de la cuenca alta del Río Suquía estudiados, hasta los límites de detección logrados en esta Tesis.
- Existen concentraciones trazas (ng/L, ng/g) de compuestos de origen farmacéutico en agua superficial (fase disuelta) y en peces (*Gambusia affinis* y *Jenynsia multidentata*) del Río Suquía (Córdoba, Argentina), en temporada húmeda y seca, hasta 70 km aguas abajo de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR)-Bajo Grande, Córdoba.
- Se propone *G. affinis* como especie bioindicadora de exposición a fármacos, debido a que presentó cuali y cuantitativamente mayor acumulación, y a que se encuentra en mayores sitios contaminados a lo largo del río.

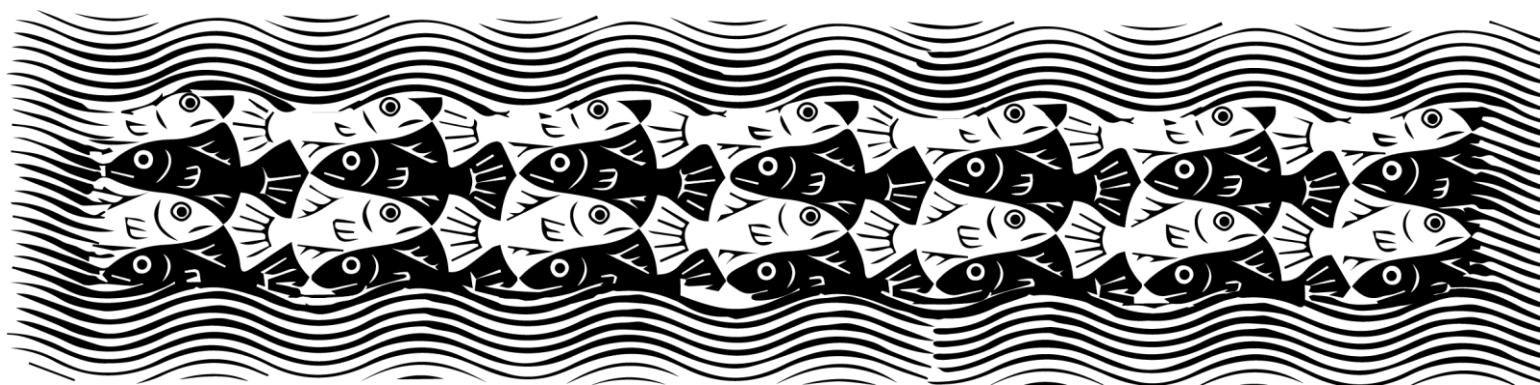
Objetivo 2. Evaluar el efecto de estos contaminantes emergentes sobre los peces, a través del análisis de diversos biomarcadores evaluados en bioindicadores propios de la cuenca:

- CBZ y su metabolito 2-hidroxiCBZ se acumulan mayoritariamente en cerebro e hígado de *J. multidentata*, y en menor grado en intestino, branquias y músculo. Asimismo, en los últimos dos órganos también se acumula el metabolito activo 10,11-epoxiCBZ.
- *J. multidentata* responde con cambios en biomarcadores de efecto fisiológicos (actividad enzimática antioxidante y de detoxificación, actividad de colinesterasas), frente a la exposición a CBZ, en condiciones de laboratorio.
- Frente a la exposición a ATE, *J. multidentata* responde con cambios en biomarcadores de efecto fisiológicos (actividad de acetilcolinesterasa) y conductuales (actividad

natatoria), en condiciones de laboratorio. Podría esperarse una respuesta similar a campo, con lo cual este pez sería un buen bioindicador de β -bloqueantes en la cuenca con implicancias ecológicas para la especie.

- A partir del análisis discriminante surge que los biomarcadores más importantes para distinguir entre peces expuestos o no-expuestos a CBZ en bioensayos de laboratorio son la actividad de acetilcolinesterasa, glutatión *S*-transferasa y catalasa, a los cuales pueden sumarse los biomarcadores de acumulación en cerebro e hígado.
- Del mismo modo, la aplicación de análisis discriminante permite ver que el biomarcador más importante en peces expuestos a ATE es la actividad de acetilcolinesterasa en cerebro.

BIBLIOGRAFÍA



- Amé, M.V., Baroni, M.V., Galanti, L.N., Bocco, J.L., Wunderlin, D.A., 2009. Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 74, 1179–86. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.068
- Ankley, G.T., Brooks, B.W., Hugget, D.B., Sumpter, J.P., 2007. Repeating History : pharmaceuticals in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 8211–8217.
- Ballesteros, M.L., Bianchi, G.E., Carranza, M., Bistoni, M.A., 2007. Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 42, 351–357. doi:10.1080/03601230701309577
- Ballesteros, M.L., Durando, P.E., Nores, M.L., Díaz, M.P., Bistoni, M. a, Wunderlin, D. a, 2009a. Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environ. Pollut.* 157, 1573–80. doi:10.1016/j.envpol.2009.01.001
- Ballesteros, M.L., Gonzalez, M., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., Miglioranza, K.S.B., 2011. Uptake, tissue distribution and metabolism of the insecticide endosulfan in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environ. Pollut.* 159, 1709–14. doi:10.1016/j.envpol.2011.02.037
- Ballesteros, M.L., Miglioranza, K.S.B., Gonzalez, M., Fillmann, G., Wunderlin, D. a, Bistoni, M. a, 2014. Multimatrix measurement of persistent organic pollutants in Mar Chiquita, a continental saline shallow lake. *Sci. Total Environ.* 490, 73–80. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.04.114
- Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2009b. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 199–205. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.01.008
- Beausse, J., 2004. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *TrAC Trends Anal. Chem.* 23, 753–761. doi:10.1016/j.trac.2004.08.005
- Beitinger, T.L., 1990. Behavioral Reactions for the Assessment of Stress in Fishes. *J. Great Lakes Res.* 16, 495–528. doi:10.1016/S0380-1330(90)71443-8
- Bonansa, R.I., Amé, M.V., Wunderlin, D.A., 2013. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquía River basin (Argentina). *Chemosphere* 90, 1860–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.10.007
- Boxall, A.B.A., Rudd, M.A., Brooks, B.W., Caldwell, D.J., Choi, K., Hickmann, S., Innes, E., Ostapyk, K., Staveley, J.P., Verslycke, T., Ankley, G.T., Beazley, K.F., Belanger, S., Berninger, J., Carriquiriborde, P., Coors, A., DeLeo, P., Dyer, S., Ericson, J., Gagné, F., Giesy, J., Guin, T., Hallstrom, L., Karlsson, M., Larsson, D., Lazorchak, J., Mastrocco, F., McLaughlin, A., McMaster, M., Meyerhoff, R., Moore, R., Parrott, J., Snape, J., Murray-Smith, R., Servos, M., Sibley, P., Straub, J., Szabo, N., Topp, E., Tetreault, G.,

- Trudeau, V., Van Der Kraak, G., 2012. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environ. Health Perspect.* 120, 1221–1229.
- Brandão, F.P., Rodrigues, S., Castro, B.B., Gonçalves, F., Antunes, S.C., Nunes, B., 2013. Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: biochemical and behavioural effects. *Aquat. Toxicol.* 144-145, 218–29. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.005
- Breton, H., Cociglio, M., Bressolle, F., Peyriere, H., Blayac, J.P., Hillaire-Buys, D., 2005. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 828, 80–90. doi:10.1016/j.jchromb.2005.09.019
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J., 2013. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science* 339, 814–5. doi:10.1126/science.1226850
- Brooks, B.W., Chambliss, C.K., Stanley, J.K., Ramirez, A., Banks, K.E., Johnson, R.D., Lewis, R.J., 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 464–9.
- Buchberger, W.W., 2007. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Anal. Chim. Acta* 593, 129–39. doi:10.1016/j.aca.2007.05.006
- Burmester, V., Nimptsch, J., Wiegand, C., 2012. Adaptation of freshwater mussels to cyanobacterial toxins: Response of the biotransformation and antioxidant enzymes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 296–309. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.11.037
- Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., Chung, K.M., Wu, N., Wong, K., Roy, S., Suci, C., Goodspeed, J., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Tan, J., Denmark, A., Gilder, T., Kyzar, E., Dileo, J., Frank, K., Chang, K., Utterback, E., Hart, P., Kalueff, A. V., 2010. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat. Protoc.* 5, 1786–99. doi:10.1038/nprot.2010.140
- Caramillo, E.M., Khan, K.M., Collier, A.D., Echevarria, D.J., 2015. Modeling PTSD in the zebrafish: Are we there yet? *Behav. Brain Res.* 276, 151–60. doi:10.1016/j.bbr.2014.05.005
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15–25. doi:10.1016/j.fct.2012.09.021
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R., Zuccato, E., 2005. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J. Chromatogr. A* 1092, 206–15. doi:10.1016/j.chroma.2005.07.012
- Cazenave, J., Bistoni, M.D.L.A., Pesce, S.F., Wunderlin, D.A., 2006. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus*

- experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat. Toxicol.* 76, 1–12.
doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.011
- Cazenave, J., Nores, M.L., Miceli, M., Díaz, M.P., Wunderlin, D. a, Bistoni, M. a, 2008. Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Res.* 42, 1299–307.
doi:10.1016/j.watres.2007.09.025
- Cazenave, J., Wunderlin, D.A., de Los Angeles Bistoni, M., Amé, M.V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study. *Aquat. Toxicol.* 75, 178–90.
doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.002
- Chatonnet, A., Lockridge, O., 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 260, 625–634.
- Christen, V., Hickmann, S., Rechenberg, B., Fent, K., 2010. Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action. *Aquat. Toxicol.* 96, 167–81. doi:10.1016/j.aquatox.2009.11.021
- Chu, S., Metcalfe, C.D., 2007. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1163, 112–8.
doi:10.1016/j.chroma.2007.06.014
- Cirja, M., Ivashechkin, P., Schäffer, A., Corvini, P.F.X., 2007. Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR). *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 7, 61–78.
doi:10.1007/s11157-007-9121-8
- Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N., 2004. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Res.* 38, 947–54.
doi:10.1016/j.watres.2003.10.058
- Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142, 185–194. doi:10.1016/S0378-4274(03)00068-7
- Cleuvers, M., 2005. Initial risk assessment for three beta-blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* 59, 199–205. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.11.090
- Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., Wiegand, C., 2010. The beta-receptor blocker metoprolol alters detoxification processes in the non-target organism *Dreissena polymorpha*. *Environ. Pollut.* 158, 2059–66. doi:10.1016/j.envpol.2010.03.012
- Corcoran, J., Winter, M.J., Tyler, C.R., 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 287–304.
doi:10.3109/10408440903373590

- Crane, M., Watts, C., Boucard, T., 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* 367, 23–41.
doi:10.1016/j.scitotenv.2006.04.010
- Daughton, C.G., Brooks, B.W., 2011. Active Pharmaceutical Ingredients and Aquatic Organisms, in: Beyer, W.N., Meador, J.P. (Eds.), *Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue Concentrations*. CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, pp. 286–347.
- Daughton, C.G., Ruhoy, I.S., 2013. Lower-dose prescribing: minimizing “side effects” of pharmaceuticals on society and the environment. *Sci. Total Environ.* 443, 324–37.
doi:10.1016/j.scitotenv.2012.10.092
- De Lange, H.J., Noordoven, W., Murk, a J., Lürling, M., Peeters, E.T.H.M., 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 78, 209–16.
doi:10.1016/j.aquatox.2006.03.002
- Deary, I., Capewell, S., Hajducka, C., Muir, A., 1991. The effects of captopril vs atenolol on memory, information processing and mood: a double-blind crossover study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 32, 347–353. doi:10.1111/j.1365-2125.1991.tb03910.x
- Diniz, M.S., Salgado, R., Pereira, V.J., Carvalho, G., Oehmen, a, Reis, M. a M., Noronha, J.P., 2015. Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis byproducts in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* 505, 282–9.
doi:10.1016/j.scitotenv.2014.09.103
- Drotar, A., Phelps, P., Fall, R., 1985. Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci.* 42, 35–40.
- Du, B., Perez-Hurtado, P., Brooks, B.W., Chambliss, C.K., 2012. Evaluation of an isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry method for pharmaceuticals in fish. *J. Chromatogr. A* 1253, 177–83. doi:10.1016/j.chroma.2012.07.026
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A. V, 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205, 38–44.
doi:10.1016/j.bbr.2009.06.022
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Elorriaga, Y., Marino, D.J., Carriquiriborde, P., Ronco, A.E., 2013a. Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina. *Int. J. Environ. Heal.* 6, 330–339.

- Elorriaga, Y., Marino, D.J., Carriquiriborde, P., Ronco, A.E., 2013b. Human Pharmaceuticals in Wastewaters from Urbanized Areas of Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 397–400. doi:10.1007/s00128-012-0919-x
- Fatta, D., Nikolaou, A., Achilleos, A., Meriç, S., 2007. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *TrAC Trends Anal. Chem.* 26, 515–533. doi:10.1016/j.trac.2007.02.001
- Fent, K., Weston, A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–59. doi:10.1016/j.aquatox.2005.09.009
- 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, 359–70.
- Ferrari, F., Gallipoli, A., Balderacchi, M., Ulaszewska, M.M., Capri, E., Trevisan, M., 2011. Exposure of the main Italian river basin to pharmaceuticals. *J. Toxicol.* 2011, 1–11. doi:10.1155/2011/989270
- Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers* 10, 360–75. doi:10.1080/13547500500264660
- Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 37–45.
- Gadipelly, C., Rathod, V.K., Marathe, K. V., 2014. Pharmaceutical Industry Wastewater : Review of the Technologies for Water Treatment and Reuse. *Ind. Eng. Chem. Res.* 53, 11571–11592.
- Galanti, L.N., Amé, M.V., Wunderlin, D.A., 2013. Accumulation and detoxification dynamic of cyanotoxins in the freshwater shrimp *Palaemonetes argentinus*. *Harmful Algae* 27, 88–97. doi:10.1016/j.hal.2013.05.007
- Garcia, S.N., Foster, M., Constantine, L. a, Huggett, D.B., 2012. Field and laboratory fish tissue accumulation of the anti-convulsant drug carbamazepine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84, 207–11. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.07.013
- Gerhardt, a, de Bisthoven, L.J., Mo, Z., Wang, C., Yang, M., Wang, Z., 2002. Short-term responses of *Oryzias latipes* (Pisces: Adrianichthyidae) and *Macrobrachium nipponense* (Crustacea: Palaemonidae) to municipal and pharmaceutical waste water in Beijing, China: survival, behaviour, biochemical biomarkers. *Chemosphere* 47, 35–47.
- Gómez, A., Sánchez-Roman, I., Gomez, J., Cruces, J., Mate, I., Lopez-Torres, M., Naudi, A., Portero-Otin, M., Pamplona, R., De la Fuente, M., Barja, G., 2014. Lifelong treatment with atenolol decreases membrane fatty acid unsaturation and oxidative stress in heart and skeletal muscle mitochondria and improves immunity and behavior, without changing mice longevity. *Aging Cell* 13, 551–60. doi:10.1111/accel.12205

- González, S., López-Roldán, R., Cortina, J.-L., 2012. Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: a review. *Environ. Pollut.* 161, 83–92. doi:10.1016/j.envpol.2011.10.002
- Grabicova, K., Lindberg, R.H., Ostman, M., Grabic, R., Randak, T., Larsson, D.G.J., Fick, J., 2014. Tissue-specific bioconcentration of antidepressants in fish exposed to effluent from a municipal sewage treatment plant. *Sci. Total Environ.* 488-489, 46–50. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.04.052
- Gracia-Lor, E., Sancho, J. V, Hernández, F., 2011. Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 2264–75. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.026
- Griboff, J., Morales, D., Bertrand, L., Bonansea, R.I., Monferrán, M.V., Asis, R., Wunderlin, D.A., Amé, M.V., 2014. Oxidative stress response induced by atrazine in *Palaemonetes argentinus*: The protective effect of vitamin E. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 1–8. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.06.025
- Gros, M., Petrović, M., Barceló, D., 2009. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Anal. Chem.* 81, 898–912. doi:10.1021/ac801358e
- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2012. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem. *J. Chromatogr. A* 1248, 104–121. doi:10.1016/j.chroma.2012.05.084
- Guyón, N.F., Bistoni, M.A., Wunderlin, D.A., Amé, M.V., 2012. Inhibition of the brain cytochrome P450 aromatase isoform expression in *Jenynsia multidentata* reflects changes in water quality. *J. Brazilian Soc. Ecotoxicol.* 7, 97–104. doi:10.5132/jbse.2012.01.014
- Guyón, N.F., Roggio, M.A., Amé, M. V, Hued, A.C., Valdés, M.E., Giojalas, L.C., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2012. Impairments in aromatase expression, reproductive behavior, and sperm quality of male fish exposed to 17 β -estradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 935–40. doi:10.1002/etc.1790
- Habig, W., Pabst, M., Jakoby, W., 1974. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Halling-Sorensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützholt, H.C., Jorgensen, S.E., 1998. Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment- A Review. *Chemosphere* 36, 357–393.
- Heberer, T., 2002. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J. Hydrol.* 266, 175–189. doi:10.1016/S0022-1694(02)00165-8

- Hernando, M.D., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2007. LC-MS analysis of basic pharmaceuticals (beta-blockers and anti-ulcer agents) in wastewater and surface water. *TrAC Trends Anal. Chem.* 26, 581–594. doi:10.1016/j.trac.2007.03.005
- Hernando, M.D., Rodríguez, a., Vaquero, J.J., Fernández-Alba, a. R., García, E., 2011. Environmental Risk Assessment of Emerging Pollutants in Water: Approaches Under Horizontal and Vertical EU Legislation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41, 699–731. doi:10.1080/10643380903140224
- Hilton, M.J., Thomas, K. V, 2003. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1015, 129–141. doi:10.1016/S0021-9673(03)01213-5
- Hued, A.C., Bistoni, M.D.L.Á., 2005. Development and validation of a Biotic Index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiologia* 543, 279–298. doi:10.1007/s10750-004-7893-1
- Hued, A.C., Bistoni, M.D.L.Á., 2007. Abundancia y distribución de la fauna íctica en la cuenca del río Suquía (Córdoba, Argentina). *Iheringia* 97, 286–292.
- Hued, A.C., Caruso, M.N., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2006. Field and in Vitro Evaluation of Ammonia Toxicity on Native Fish Species of the Central Region of Argentina. *Environ. Contam. Toxicol.* 76, 984–991. doi:10.1007/s00128-006-1015-x
- Hued, A.C., Lo Nostro, F.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2013. Reproductive impairment of a viviparous fish species inhabiting a freshwater system with anthropogenic impact. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 281–90. doi:10.1007/s00244-012-9826-8
- Hued, A.C., Oberhofer, S., Bistoni, M. de los Á., 2012. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 107–17. doi:10.1007/s00244-011-9686-7
- Huerta, B., Jakimska, a, Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2013. Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1288, 63–72. doi:10.1016/j.chroma.2013.03.001
- Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2012. Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 2611–24. doi:10.1007/s00216-012-6144-y
- Kalapos, M.P., 2002. Carbamazepine-provoked hepatotoxicity and possible aetiopathological role of glutathione in the events. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* 21, 123–141.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res.* 42, 3498–518. doi:10.1016/j.watres.2008.04.026

- Kelly, S. a., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D., 1998. Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ. Health Perspect.* 106, 375–384. doi:10.1289/ehp.98106375
- Khetan, S.K., Collins, T.J., 2007. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to Green Chemistry. *Chem. Rev.* 107, 2319–64. doi:10.1021/cr020441w
- Kim, J.-W., Ishibashi, H., Yamauchi, R., Ichikawa, N., Takao, Y., Hirano, M., Koga, M., Arizono, K., 2009. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *J. Toxicol. Sci.* 34, 227–32.
- Klosterhaus, S.L., Grace, R., Hamilton, M.C., Yee, D., 2013. Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. *Environ. Int.* 54, 92–9. doi:10.1016/j.envint.2013.01.009
- Kokel, D., Peterson, R.T., 2008. Chemobehavioural phenomics and behaviour-based psychiatric drug discovery in the zebrafish. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 7, 483–90. doi:10.1093/bfpg/eln040
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–11.
- Kot-Wasik, A., Dębska, J., Namieśnik, J., 2007. Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. *TrAC Trends Anal. Chem.* 26, 557–568. doi:10.1016/j.trac.2006.11.004
- Kuster, A., Alder, A.C., Escher, B.I., Duis, K., Fenner, K., Garric, J., Hutchinson, T.H., Lapen, D.R., Péry, A., Jörg, R., Snape, J., Ternes, T., Topp, E., Wehrhan, A., Knacker, T., 2009. Environmental Risk Assessment of Human Pharmaceuticals in the European Union : A Case Study with the β -Blocker Atenolol. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 6, 514–523. doi:10.1897/IEAM
- Lahti, M., Brozinski, J.-M., Jylhä, A., Kronberg, L., Oikari, A., 2011. Uptake from water, biotransformation, and biliary excretion of pharmaceuticals by rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1403–11. doi:10.1002/etc.501
- Lahti, M., Oikari, A., 2011. Pharmaceuticals in settleable particulate material in urban and non-urban waters. *Chemosphere* 85, 826–31. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.06.084
- Lajeunesse, A., Gagnon, C., Gagné, F., Louis, S., Cejka, P., Sauvé, S., 2011. Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment--evidence of biological effects. *Chemosphere* 83, 564–71. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.026

- Lam, M.W., Young, C.J., Brain, R. a, Johnson, D.J., Hanson, M. a, Wilson, C.J., Richards, S.M., Solomon, K.R., Mabury, S. a, 2004. Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1431–40.
- Leclercq, M., Mathieu, O., Gomez, E., Casellas, C., Fenet, H., Hillaire-Buys, D., 2009. Presence and fate of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites at wastewater treatment plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 408–15.
doi:10.1007/s00244-008-9202-x
- Lei, B., Huang, S., Zhou, Y., Wang, D., Wang, Z., 2009. Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area, China. *Chemosphere* 76, 36–42.
doi:10.1016/j.chemosphere.2009.02.035
- Levin, E.D., Bencan, Z., Cerutti, D.T., 2007. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol. Behav.* 90, 54–8. doi:10.1016/j.physbeh.2006.08.026
- Li, W.C., 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ. Pollut.* 187, 193–201. doi:10.1016/j.envpol.2014.01.015
- Li, Y., Zhu, G., Ng, W.J., Tan, S.K., 2014. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism. *Sci. Total Environ.* 468-469, 908–32. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.09.018
- Li, Z.-H., Velisek, J., Zlabek, V., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Randak, T., 2010a. Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. *Chem. Biol. Interact.* 183, 98–104.
doi:10.1016/j.cbi.2009.09.009
- Li, Z.-H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Li, P., Randak, T., 2011. Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 319–27. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.09.008
- Li, Z.-H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Randak, T., 2009. Responses of antioxidant status and Na⁺-K⁺-ATPase activity in gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, chronically treated with carbamazepine. *Chemosphere* 77, 1476–81.
doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.031
- Li, Z.-H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Randak, T., 2010b. Modulation of antioxidant defence system in brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after chronic carbamazepine treatment. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 151, 137–41. doi:10.1016/j.cbpc.2009.09.006
- Li, Z.-H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Randak, T., 2010c. Physiological condition status and muscle-based biomarkers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), after long-term exposure to carbamazepine. *J. Appl. Toxicol.* 30, 197–203.
doi:10.1002/jat.1482
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Calisi, A., Schettino, T., 2011. Acetylcholinesterase inhibition as a relevant biomarker in environmental biomonitoring: new insights and perspectives,

in: Visser, J.E. (Ed.), *Ecotoxicology around the Globe*. Nova Science Publishers, Inc, Lecce, pp. 87–115.

- Liu, H., Delgado, M.R., 1995. Interactions of phenobarbital and phenytoin with carbamazepine and its metabolites' concentrations, concentration ratios, and level/dose ratios in epileptic children. *Epilepsia* 36, 249–254.
- Liu, S., Ying, G., Zhang, R., Zhou, L., Lai, H., Chen, Z., 2012. Fate and occurrence of steroids in swine and dairy cattle farms with different farming scales and wastes disposal systems. *Environ. Pollut.* 170, 190–201. doi:10.1016/j.envpol.2012.07.016
- Liu, S., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Chen, F., Yang, B., Zhou, L.-J., Lai, H.-J., 2011. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 1367–78. doi:10.1016/j.chroma.2011.01.014
- López-Serna, R., Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., Petrović, M., Barceló, D., 2013. Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. *Environ. Pollut.* 174, 305–15. doi:10.1016/j.envpol.2012.11.022
- López-Serna, R., Petrović, M., Barceló, D., 2012. Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro river basin (NE Spain). *Sci. Total Environ.* 440, 280–9. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.06.027
- Lorenzi, V., Mehinto, A.C., Denslow, N.D., Schlenk, D., 2012. Effects of exposure to the β -blocker propranolol on the reproductive behavior and gene expression of the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquat. Toxicol.* 116–117, 8–15. doi:10.1016/j.aquatox.2012.03.001
- Lu, G., Yang, X., Li, Z., Zhao, H., Wang, C., 2013. Contamination by metals and pharmaceuticals in northern Taihu Lake (China) and its relation to integrated biomarker response in fish. *Ecotoxicology* 22, 50–9. doi:10.1007/s10646-012-1002-4
- Maggioni, T., Hued, A.C., Monferrán, M.V., Bonansea, R.I., Galanti, L.N., Amé, M.V., 2012. Bioindicators and biomarkers of environmental pollution in the middle-lower basin of the Suquía River (Córdoba, Argentina). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 337–53. doi:10.1007/s00244-012-9785-0
- Maranho, L. a, Baena-Nogueras, R.M., Lara-Martín, P. a, DelValls, T. a, Martín-Díaz, M.L., 2014. Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete *Hediste diversicolor* as bioindicator species. *Environ. Res.* 134C, 353–365. doi:10.1016/j.envres.2014.08.014
- Margiotta-Casaluci, L., Sumpter, J.P., 2011. 5 α -Dihydrotestosterone is a potent androgen in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 171, 309–18. doi:10.1016/j.ygcen.2011.02.012

- Martin-Diaz, L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2009. Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 94, 177–85. doi:10.1016/j.aquatox.2009.06.015
- Maximino, C., de Brito, T.M., da Silva Batista, A.W., Herculano, A.M., Morato, S., Gouveia, A., 2010. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behav. Brain Res.* 214, 157–71. doi:10.1016/j.bbr.2010.05.031
- Merlo, C., Abril, a, Amé, M. V, Argüello, G. a, Carreras, H. a, Chiappero, M.S., Hued, a C., Wannaz, E., Galanti, L.N., Monferrán, M. V, González, C.M., Solís, V.M., 2011. Integral assessment of pollution in the Suquía River (Córdoba, Argentina) as a contribution to lotic ecosystem restoration programs. *Sci. Total Environ.* 409, 5034–45. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.08.037
- Miège, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., Coquery, M., 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants--conception of a database and first results. *Environ. Pollut.* 157, 1721–6. doi:10.1016/j.envpol.2008.11.045
- Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O., 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ. Int.* 35, 803–14. doi:10.1016/j.envint.2008.10.008
- Monferrán, M.V., Galanti, L.N., Bonansea, R.I., Amé, M.V., Wunderlin, D.A., 2011. Integrated survey of water pollution in the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *J. Environ. Monit.* 13, 398–409. doi:10.1039/c0em00545b
- Monferrán, M. V., Cortina, P.R., Santiago, A.N., Wunderlin, D.A., 2009. Study of the distribution of dichlorobenzenes in sediment and water of Suquia River basin (Córdoba-Argentina) by an optimised SPME-GC-MS procedure. *Int. J. Environ. Heal.* 3, 363–378.
- Nakada, N., Kiri, K., Shinohara, H., Harada, A., Kuroda, K., Takizawa, S., Takada, H., 2008. Evaluation of pharmaceuticals and personal care products as water-soluble molecular markers of sewage. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6347–53.
- Nassef, M., Matsumoto, S., Seki, M., Khalil, F., Kang, I.J., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Honjo, T., 2010. Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 80, 1095–100. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.04.073
- Neale, P. a, Escher, B.I., Schäfer, A.I., 2009. pH dependence of steroid hormone--organic matter interactions at environmental concentrations. *Sci. Total Environ.* 407, 1164–73. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.09.035
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2004. Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on the enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *Chemosphere* 57, 1581–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.09.018

- Nunes, B., Gaio, A., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2008. Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 341–54. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.12.006
- Ohta, H., Matsumoto, K., Watanabe, H., 1993. The interaction between central cholinergic and peripheral β -adrenergic systems on radial maze performance in rats. *Brain Res.* 622, 353–356. doi:10.1016/0006-8993(93)90844-D
- Osorio, V., Marcé, R., Pérez, S., Ginebreda, A., Cortina, J.L., Barceló, D., 2012. Occurrence and modeling of pharmaceuticals on a sewage-impacted Mediterranean river and their dynamics under different hydrological conditions. *Sci. Total Environ.* 440, 3–13. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.08.040
- Owen, S.F., Giltrow, E., Huggett, D.B., Hutchinson, T.H., Saye, J., Winter, M.J., Sumpter, J.P., 2007. Comparative physiology, pharmacology and toxicology of β -blockers: Mammals versus fish. *Aquat. Toxicol.* 82, 145–162.
- 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, 6062–9. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.09.026
- Pasquini, A.I., Formica, S.M., Sacchi, G. a., 2011. Hydrochemistry and nutrients dynamic in the Suquia River urban catchment's, Córdoba, Argentina. *Environ. Earth Sci.* 65, 453–467. doi:10.1007/s12665-011-0978-z
- Payne, J.F., Mathieu, a., Melvin, W., Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 225–231. doi:10.1016/0025-326X(95)00112-Z
- Pesce, S.F., Cazenave, J., Monferrán, M. V, Frede, S., Wunderlin, D. a, 2008. Integrated survey on toxic effects of lindane on neotropical fish: *Corydoras paleatus* and *Jenynsia multidentata*. *Environ. Pollut.* 156, 775–83. doi:10.1016/j.envpol.2008.06.016
- Pesce, S.F., Wunderlin, D. a, 2002. Reply to comment on “Use of water quality indices to verify the impact of Cordoba city (Argentina) on Suquia River”. *Water Res.* 36, 4940–1.
- Pesce, S.F., Wunderlin, D.A., 2000. Use of water quality indices to verify the impact of Córdoba city (Argentina) on Suquia River. *Water Res.* 34, 2915–2926.
- Piato, Â.L., Capiotti, K.M., Tamborski, A.R., Osés, J.P., Barcellos, L.J.G., Bogo, M.R., Lara, D.R., Vianna, M.R., Bonan, C.D., 2011. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 561–7. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.12.018
- Pyke, G.H., 2005. A Review of the Biology of *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 339–365. doi:10.1007/s11160-006-6394-x

- Ramirez, A.J., Brain, R.A., Usenko, S., Mottaleb, M.A., O'Donnell, J.G., Stahl, L.L., Wathen, J.B., Snyder, B.D., Pitt, J.L., Perez-Hurtado, P., Dobbins, L.L., Brooks, B.W., Chambliss, C.K., 2009. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2587–2597.
- Ramirez, A.J., Mottaleb, M. a, Brooks, B.W., Chambliss, C.K., 2007. Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 79, 3155–63. doi:10.1021/ac062215i
- Rautenberg, G.E., Amé, M.V., Monferrán, M.V., Bonansea, R.I., Hued, A.C., 2015. A multi-level approach using *Gambusia affinis* as a bioindicator of environmental pollution in the middle-lower basin of Suquia River. *Ecol. Indic.* 48, 706–720. doi:10.1016/j.ecolind.2014.09.025
- Rhee, J.-S., Kim, B.-M., Jeong, C.-B., Park, H.G., Leung, K.M.Y., Lee, Y.-M., Lee, J.-S., 2013a. Effect of pharmaceuticals exposure on acetylcholinesterase (AChE) activity and on the expression of AChE gene in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 158, 216–24. doi:10.1016/j.cbpc.2013.08.005
- Rhee, J.-S., Kim, B.-M., Jeong, C.-B., Park, H.G., Leung, K.M.Y., Lee, Y.-M., Lee, J.-S., 2013b. Effect of pharmaceuticals exposure on acetylcholinesterase (AChE) activity and on the expression of AChE gene in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 158, 216–24. doi:10.1016/j.cbpc.2013.08.005
- Ribeiro, C., Tiritan, M.E., Rocha, E., Rocha, M.J., 2009. Seasonal and spatial distribution of several endocrine-disrupting compounds in the Douro River Estuary, Portugal. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 1–11. doi:10.1007/s00244-008-9158-x
- Richardson, S.D., Ternes, T. a, 2011. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 83, 4614–48. doi:10.1021/ac200915r
- Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M.Á., Prados-Joya, G., Ocampo-Pérez, R., 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* 93, 1268–87. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.07.059
- Rockwood, K., Walsh, R., Martin, E., Darvesh, S., 2011. Potentially procholinergic effects of medications commonly used in older adults. *Am. J. Geriatr. Pharmacother.* 9, 80–7. doi:10.1016/j.amjopharm.2011.02.003
- Rodriguez-Mozaz, S., López De Alda, M.J., Barceló, D., 2004. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1045, 85–92. doi:10.1016/j.chroma.2004.06.040
- Rogawski, M. a, Löscher, W., 2004. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 553–64. doi:10.1038/nrn1430
- Roggio, M. a, Guyón, N.F., Hued, a C., Amé, M. V, Valdés, M.E., Giojalas, L.C., Wunderlin, D. a, Bistoni, M. a, 2014. Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinyloestradiol on

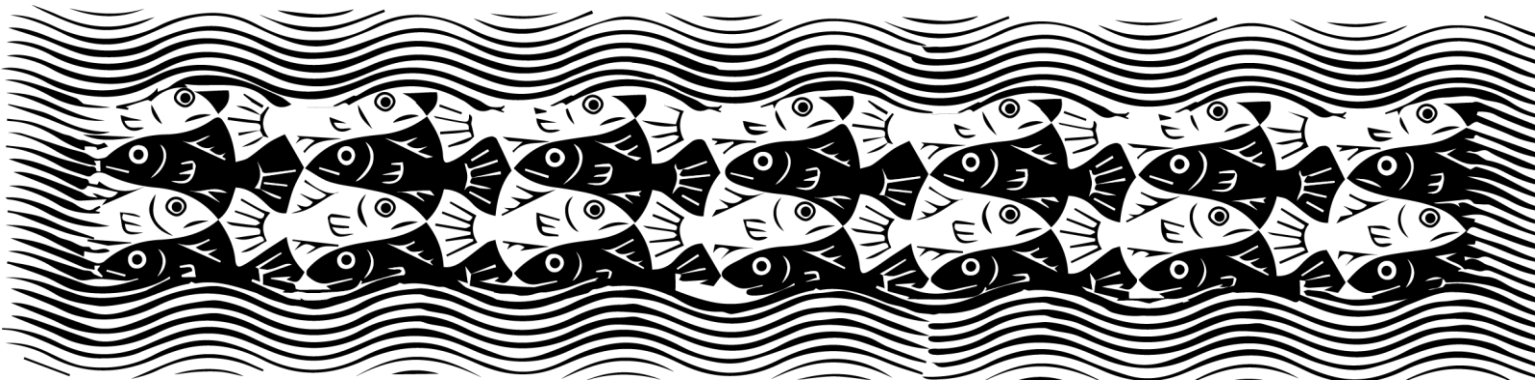
- aromatase expression, reproductive behavior and sperm quality in the fish *Jenynsia multidentata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 579–84. doi:10.1007/s00128-013-1185-2
- Ruiz, M., Galanti, L., Ruibal, A.L., Rodriguez, M.I., Wunderlin, D.A., Amé, M.V., 2013. First Report of Microcystins and Anatoxin-a Co-occurrence in San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina). *Water, Air, Soil Pollut.* 224, 1593. doi:10.1007/s11270-013-1593-2
- Sabourin, L., Duenk, P., Bonte-Gelok, S., Payne, M., Lapen, D.R., Topp, E., 2012. Uptake of pharmaceuticals, hormones and parabens into vegetables grown in soil fertilized with municipal biosolids. *Sci. Total Environ.* 431, 233–6. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.05.017
- 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. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.10.100
- Santos, N.A.G., Medina, W.S.G., Martins, N.M., Carvalho Rodrigues, M.A., Curti, C., Santos, A.C., 2008. Involvement of oxidative stress in the hepatotoxicity induced by aromatic antiepileptic drugs. *Toxicol. In Vitro* 22, 1820–4. doi:10.1016/j.tiv.2008.08.004
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B. a, 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725–59. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.026
- Sauvé, S., Desrosiers, M., 2014. A review of what is an emerging contaminant. *Chem. Cent. J.* 8, 1–7. doi:10.1186/1752-153X-8-15
- Schultz, M.M., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L., Barber, L.B., Blazer, V.S., Norris, D.O., Vajda, A.M., 2010. Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1918–25. doi:10.1021/es9022706
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–92. doi:10.1016/j.aquatox.2004.03.016
- Shahzad, N., Ahmad, J., Khan, W., Al-Ghamdi, S.S., Ain, M.R., Ibrahim, I.A.A., Akhtar, M., Khanam, R., 2014. Interactions of atenolol with alprazolam/escitalopram on anxiety, depression and oxidative stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 117, 79–84. doi:10.1016/j.pbb.2013.12.015
- Shenker, M., Harush, D., Ben-Ari, J., Chefetz, B., 2011. Uptake of carbamazepine by cucumber plants--a case study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chemosphere* 82, 905–10. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.10.052
- Siebel, a M., Rico, E.P., Capiotti, K.M., Piato, a L., Cusinato, C.T., Franco, T.M. a, Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2010. In vitro effects of antiepileptic drugs on acetylcholinesterase

- and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicol. In Vitro* 24, 1279–84. doi:10.1016/j.tiv.2010.03.018
- Silva, B.F., Jelic, A., López-Serna, R., Mozeto, A. a, Petrovic, M., Barceló, D., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere* 85, 1331–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.051
- Sim, W.-J., Lee, J.-W., Oh, J.-E., 2010. Occurrence and fate of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and rivers in Korea. *Environ. Pollut.* 158, 1938–47. doi:10.1016/j.envpol.2009.10.036
- Steinbach, C., Burkina, V., Fedorova, G., Grabicova, K., Stara, A., Velisek, J., Zlabek, V., Schmidt-Posthaus, H., Grabic, R., Kocour Kroupova, H., 2014. The sub-lethal effects and tissue concentration of the human pharmaceutical atenolol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Total Environ.* 497-498C, 209–218. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.111
- Sturve, J., Almroth, B.C., Förlin, L., 2008. Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 446–52. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.12.004
- Subedi, B., Mottaleb, M.A., Chambliss, C.K., Usenko, S., 2011. Simultaneous analysis of select pharmaceuticals and personal care products in fish tissue using pressurized liquid extraction combined with silica gel cleanup. *J. Chromatogr. A* 1218, 6278–84. doi:10.1016/j.chroma.2011.07.031
- Sutherland, D., McClellan, J.S., Milner, D., Soong, W., Axon, N., Sanders, M., Hester, A., Kao, Y.U.H., Poczatek, T., Routt, S., Pezzementi, L., 1997. Two cholinesterase activities and genes are present in amphioxus. *J. Exp. Zool.* 277, 213–229. doi:10.1002/(SICI)1097-010X(19970215)277:3<213::AID-JEZ3>3.0.CO;2-R
- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Tuc Dinh, Q., Clément, M., Chevreuil, M., 2008. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Sci. Total Environ.* 393, 84–95. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.12.009
- Tanaka, K., Sano, T., Ishizuka, K., Kitta, K., Kawamura, Y., 1994. Comparison of properties of leaf and root glutathione reductases from spinach. *Physiol. Plant.* 91, 353–358.
- Tanoue, R., Nomiyama, K., Nakamura, H., Hayashi, T., Kim, J.W., Isobe, T., Shinohara, R., Tanabe, S., 2014. Simultaneous determination of polar pharmaceuticals and personal care products in biological organs and tissues. *J. Chromatogr. A* 1355, 193–205. doi:10.1016/j.chroma.2014.06.016
- Ternes, T. a, 2001. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* 20, 419–434. doi:10.1016/S0165-9936(01)00078-4

- Ternes, T. a, Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., Servos, M., 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.* 225, 81–90.
- Thomas, K. V, Hilton, M.J., 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 436–44. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.02.028
- Tu, H.T., Silvestre, F., Scippo, M.-L., Thome, J.-P., Phuong, N.T., Kestemont, P., 2009. Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1463–70. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.04.008
- Valcárcel, Y., Alonso, S.G., Rodríguez-Gil, J.L., Maroto, R.R., Gil, a, Catalá, M., 2011. Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain. *Chemosphere* 82, 1062–71. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.10.041
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Vazquez-Roig, P., Andreu, V., Blasco, C., Picó, Y., 2012. Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments, soils and waters of the Pego-Oliva Marshlands (Valencia, eastern Spain). *Sci. Total Environ.* 440, 24–32. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.08.036
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Zambello, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment--a review. *Sci. Total Environ.* 429, 123–55. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.04.028
- Vieno, N.M., Härkki, H., Tuhkanen, T., Kronberg, L., 2007. Occurrence of pharmaceuticals in river water and their elimination in a pilot-scale drinking water treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5077–84.
- Vogl, C., Grillitsch, B., Wytek, R., Spieser, O.H., Scholz, W., 1999. Qualification of spontaneous undirected locomotor behavior of fish for sublethal toxicity testing. Part I. Variability of measurement parameters under general test conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2736–2742.
- Wang, J., Gardinali, P.R., 2013. Uptake and depuration of pharmaceuticals in reclaimed water by mosquito fish (*Gambusia holbrooki*): a worst-case, multiple-exposure scenario. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1752–8. doi:10.1002/etc.2238
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161. doi:10.1016/0166-445X(91)90033-6
- Winter, M.J., Lillcrap, A.D., Caunter, J.E., Schaffner, C., Alder, A.C., Ramil, M., Ternes, T. a, Giltrow, E., Sumpter, J.P., Hutchinson, T.H., 2008. Defining the chronic impacts of atenolol on embryo-larval development and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 86, 361–9. doi:10.1016/j.aquatox.2007.11.017

- Wu, C., Spongberg, A.L., Witter, J.D., Sridhar, B.B.M., 2012. Transfer of wastewater associated pharmaceuticals and personal care products to crop plants from biosolids treated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 85, 104–9. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.08.007
- Wunderlin, D.A., Díaz, M. del P., Amé, M.V., Pesce, S.F., Hued, A.C., Bistoni, M.D.L.Á., 2001. Pattern recognition techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality. A case study: Suquía River basin (Córdoba-Argentina). *Water Res.* 35, 2881–2894.
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., Geffard, O., 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquat. Toxicol.* 94, 114–22. doi:10.1016/j.aquatox.2009.06.010
- Yang, Y., Sharma, R., Zimniak, P., Awasthi, Y., 2002. Role of α Class Glutathione S-Transferases as Antioxidant Enzymes in Rodent Tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 105–115. doi:10.1006/taap.2002.9450
- Yin, G.-G., Kookana, R.S., Ru, Y.-J., 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.* 28, 545–51.
- Zenker, A., Cicero, M.R., Prestinaci, F., Bottoni, P., Carere, M., 2014. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *J. Environ. Manage.* 133, 378–87. doi:10.1016/j.jenvman.2013.12.017
- Zhao, X., Metcalfe, C.D., 2008. Characterizing and compensating for matrix effects using atmospheric pressure chemical ionization Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry: analysis of neutral pharmaceuticals in municipal wastewater. *Anal. Chem.* 80, 2010–2017.

TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS



Durante la realización de esta Tesis Doctoral se publicaron los siguientes trabajos científicos:

1. Guyón, N., Roggio, M.A., Amé, M.V., Hued, A.C., Valdés, M.E., Giojalas, L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2012. Impairments on aromatase expression, reproductive behavior and sperm quality of male fish exposed to 17 β -estradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 935–940.
2. Valdés M.E., Amé M.V., Bistoni, M.A., Wunderlin, D.A., 2014. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Sci. Total Environ.* 472, 389–396.
3. Roggio, M.A., Guyón, N.F., Hued, A.C., Amé, M.V., Valdés, M.E., Giojalas, L.C., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2014. Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on aromatase expression, reproductive behavior and sperm quality in the fish *Jenynsia multidentata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 579–584.
4. Valdés M.E., Marino D.J., Wunderlin D.A., Somoza G. M., Ronco A.E., Carriquiriborde P., 2015. Screening concentration of E1, E2 and EE2 in sewage effluent and surface waters of the "Pampas" region and the "Río de la Plata" estuary (Argentina). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94(1), 29–33.

Parte del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral recibió las siguientes distinciones:

1. Valdés M.E., Bistoni M.A., Wunderlin D.A., Huerta B., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D. "Bioaccumulation of pharmaceuticals in fish of Suquía River Basin (Córdoba, Argentina)". "10th Annual LC/MS/MS Workshop on Environmental applications and food safety". Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC-Barcelona.España), Instituto Catalán de Investigaciones en Agua (ICRA-Girona, España) e Instituto de Estudios Catalanes (Barcelona, España). Barcelona. 1-3 Julio 2014. Póster. Premio Waters Corporation.
2. Valdés M.E., Rodríguez-Mozaz S., Bonansea R.I., Huerta B., Barceló D., Bistoni M.A., Wunderlin D.A. Bioacumulación de Carbamazepina en *Jenynsia Multidentata* y su Relación con Biomarcadores Enzimáticos. V° Congreso Argentino SETAC, Neuquén Octubre 2014. Premio Mejor Póster de su área.
3. Valdés M.E., Bistoni M.A., Huerta B., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D., Wunderlin D.A. Análisis de Fármacos en Peces por UHPLC-MS/MS: Estudios a Campo y Laboratorio. II° Congreso Argentino de Espectrometría de Masas (CAEM), Los Cocos, Córdoba, 9-11 Noviembre 2014. Premio Mejor Póster de su área.

