



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco sobre *Daphnia magna*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

P R E S E N T A:

QFB ANALLELI VALDÉS ALANÍS

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. MARCELA GALAR MARTÍNEZ

DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN



MÉXICO DF

JUNIO 2009

La presente investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Marcela Galar Martínez y el Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván en el laboratorio de Toxicología Acuática, del departamento de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, como parte del proyecto: Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco adicionado al agua sobre *Daphnia magna* (SIP 20080580).

Agradezco el apoyo otorgado durante el desarrollo de este trabajo al programa de formación de investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional (proyecto SIP 20080580 Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco adicionado al agua sobre *Daphnia magna*).

Así mismo agradezco también al programa de becas de posgrados **CONACYT** que me apoyó durante la realización del presente trabajo de investigación (Número de becario 211858).

GRACIAS...

A Dios, por permitirme llegar a este momento de mi vida, por estar conmigo en cada momento y por todas las bendiciones que me dado.

A la Dra. Marcela Galar, por el gran apoyo incondicional en la realización del proyecto y por compartir todos sus conocimientos.

A la Dra. Ethel, Dra. Lety y el Dr. Juvencio, por la revisión de la tesis, por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

A Sandy, por tu ayuda, por ser una gran persona y sobre gracias por tu amistad.

A todas esas personas que compartieron un momento de su vida conmigo.

A mi mamá, por estar ahí desde el día en que nací, por todo el apoyo que me ha dado, por las oraciones hechas y sobre todo por ser un ejemplo de vida, GRACIAS.

A Dr. Leobardo, por participar en mi desarrollo profesional, desde la carrera y ahora en la maestría, por ser una gran persona y por su apoyo para emprender este proyecto.

A la Dra. Estela Meléndez, por la revisión de la tesis y por la ayuda brindada fuera de la escuela.

A mis amigos, por estar siempre conmigo y por haber compartido tantas experiencias a lo largo de mi posgrado.

NUNCA DESISTAS DE UN SUEÑO, SOLO TRATA DE VER LAS SEÑALES QUE TE LLEVEN A EL.

GRACIAS
Anita

Abreviaturas

AINE	antiinflamatorio no esteroideo
CAT	catalasa
CE	concentración efectiva
CL	concentración letal
DNA	ácido desoxirribonucleico
ENDO	endonucleasa III
ERO	especies reactivas de oxígeno
FPG	formamidopirimidina glicosilasa
GPx	glutación peroxidasa
GSH	glutación
GSSH	glutación reducido
LPO	lipoperoxidación
POx	proteínas oxidadas
PT	proteínas totales
RL	radicales libres
SOD	superóxido dismutasa

Índice general

Contenido	Página
Índice de tablas.....	v
Índice de figuras.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
I. Introducción.....	1
1.1 El agua.....	1
1.2 Contaminación del agua.....	1
1.3 Contaminación del agua por productos farmacéuticos.....	2
1.3.1 Comportamiento de los fármacos en el ambiente.....	4
1.3.2 Efecto de los productos farmacéuticos sobre la biota.....	5
1.3.3 Legislación y valoración del riesgo ambiental de los fármacos.....	6
1.4 Diclofenaco.....	8
1.4.1 Características generales.....	8
1.4.2 Farmacodinamia.....	9
1.4.3 Farmacocinética.....	9
1.4.4 Efectos tóxicos del diclofenaco en diversas especies.....	10
1.5 Bioensayo.....	11

1.6 Bioindicadores.....	12
1.6.1 <i>Daphnia magna</i>	13
1.7 Biomarcadores.....	14
1.8 Estrés oxidativo.....	16
1.8.1 Radicales libres.....	16
1.8.2 Especies reactivas de oxígeno.....	17
1.8.3 Efectos del estrés oxidativo sobre biomoléculas.....	18
1.8.3.1 Lipoperoxidación.....	18
1.8.3.1.1 Etapas de la lipoperoxidación.....	19
1.8.3.1.2 Efectos de la lipoperoxidación.....	20
1.8.3.2 Daño a proteínas.....	20
1.8.3.3 Daño al DNA.....	21
1.8.4 Defensas antioxidantes.....	22
1.8.4.1 Enzimas antioxidantes.....	23
1.8.4.1.1 Superóxido dismutasa	23
1.8.4.1.2 Catalasa.....	23
1.8.4.1.3 Glutación peroxidasa.....	23
1.9 Justificación.....	25
1.10 Hipótesis.....	26
1.11 Objetivo general.....	27

1.12 Objetivos específicos.....	28
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.1 Diseño experimental.....	29
2.2 Mantenimiento y cultivo de los organismos de prueba.....	30
2.3 Estudio de toxicidad aguda.....	30
2.4 Estudio de toxicidad subletal.....	31
2.4.1 Homogenización de tejido.....	31
2.4.2 Evaluación del estrés oxidativo.....	31
2.4.2.1 Determinación del grado de lipoperoxidación.....	31
2.4.2.2 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes.....	32
2.4.2.2.1 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa.....	32
2.4.2.2.2 Determinación de la actividad de la catalasa.....	33
2.4.2.2.3 Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa.....	33
2.4.3 Determinación del daño genotóxico.....	34
2.5 Análisis estadístico.....	35
III. RESULTADOS.....	36
3.1 Estudio de toxicidad aguda.....	36
3.2 Estudio de toxicidad subletal.....	37
3.2.1 Evaluación del estrés oxidativo.....	37
3.2.1.1 Evaluación del grado de lipoperoxidación.....	37

3.2.1.2 Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes.....	38
3.2.1.3 Evaluación del contenido de proteínas carboniladas.....	40
3.2.2 Evaluación del daño al material genético.....	41
3.2.2.1 Ensayo cometa.....	41
3.2.2.2 Ensayo cometa adicionando endonucleasa.....	42
3.2.2.3 Ensayo cometa adicionando formamidopiridina glicosilada.....	43
IV. DISCUSIÓN.....	45
4.1 Estudio de toxicidad aguda.....	45
4.2 Estudio de toxicidad subletal.....	46
4.2.1 Evaluación del estrés oxidativo.....	46
4.2.2 Evaluación del daño al material genético.....	49
V. CONCLUSIONES.....	52
VI BIBLIOGRAFÍA.....	53
VII ANEXOS.....	61
Anexo 1.	61
Anexo 2.....	62
Anexo 3.....	64

Índice de figuras

Contenido	Página
Figura 1. Trayecto de los productos farmacéuticos hacia el ambiente.....	3
Figura 2. Estructura química del diclofenaco.....	8
Figura 3. <i>Daphnia magna</i>	13
Figura 4. Reacciones de las enzimas antioxidantes.....	24
Figura 5. Diseño experimental.....	29
Figura 6. Grado de lipoperoxidación de <i>D. magna</i> expuesta a diclofenaco.....	37
Figura 7. Determinación de la actividad de superóxido dismutasa de <i>D. magna</i> expuesta a diclofenaco.....	38
Figura 8. Determinación de la actividad de catalasa de <i>D. magna</i> expuesta a diclofenaco.....	39
Figura 9. Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa de <i>D. magna</i> expuesta a diclofenaco.....	40
Figura 10. Determinación de proteínas carboniladas de <i>D. magna</i> expuesta a diclofenaco.....	41
Figura 11. Imágenes de las células en el ensayo cometa.....	41
Figura 12. Índice del daño al DNA producido por diclofenaco sobre <i>D. magna</i>	42
Figura 13. Índice del daño al DNA producido por diclofenaco sobre <i>D. magna</i> con la enzima ENDO.....	43
Figura 14. Índice del daño al DNA producido por diclofenaco sobre <i>D. magna</i> con la enzima FPG.....	44

Índice de tablas

Contenido	Página
Tabla 1. Clasificación de la toxicidad de productos farmacéuticos en el ambiente acuático.....	11
Tabla 2. Curva para la determinación de la SOD.....	32
Tabla 3. Concentración letal media de diclofenaco sobre <i>D. magna</i> (48 h).....	36

RESUMEN

El agua es un líquido vital para la existencia de todos los organismos vivos. Sin embargo, este recurso se encuentra amenazado por el rápido crecimiento de la población y la contaminación. La toxicidad producida por contaminantes como metales pesados, hidrocarburos y plaguicidas en ambientes acuáticos ha sido ampliamente evaluada, pero pocos son los estudios sobre el efecto de los productos farmacéuticos. El diclofenaco, un antiinflamatorio no esteroideo, es uno de los medicamentos de venta libre más utilizados en México. De acuerdo a la clasificación sueca de peligro ambiental y valoración de riesgo de ingredientes farmacéuticos, está considerado como peligroso para el ambiente, sin embargo en nuestro país no se cuenta con ninguna legislación al respecto. Diversos estudios han demostrado la toxicidad de este fármaco en mamíferos y recientemente ha sido demostrado que puede generar especies reactivas de oxígeno y radicales libres, así como apoptosis en hepatocitos humanos y de ratas. Sin embargo no existen reportes de su toxicidad en especies acuáticas. El objetivo del presente estudio fue evaluar la toxicidad producida por el diclofenaco sobre *Daphnia magna*, mediante ensayos de toxicidad aguda y subletal, valorando para este último biomarcadores de estrés oxidativo como el grado de lipoperoxidación, la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y contenido de proteínas carboniladas, así como biomarcadores de daño al material genético. Los resultados obtenidos fueron: El ensayo agudo mostró que la CL₅₀ a 48 horas fue de 116.6 y 96.6 mg/L, para neonatos y adultos de 14 días respectivamente, siendo entonces estos últimos más sensibles a la exposición al fármaco. El ensayo subletal, demostró que la exposición de *D. magna* a este medicamento produce estrés oxidativo (incremento en el grado de lipoperoxidación y contenido de proteínas carboniladas, así como modificaciones en la actividad de las enzimas antioxidantes), así como daño al DNA. En conclusión, el diclofenaco produce daño oxidativo y genético a *D. magna* y considerando que este tipo de organismo es fundamental para los ecosistemas acuáticos, este medicamento debería ser calificado como ecotóxico y su incorporación al ambiente legislada.

ABSTRACT

Water is essential for living organisms. Nevertheless, it is threaten by demographic growth and pollution. The toxicity produced by contaminants such as heavy metals, hydrocarbons and pesticides in aquatic environments has been widely studied, but there are only few studies about the effect of pharmaceutical products. The diclofenac, a non steroidal anti-inflammatory, is one of the most used drugs in México and it can be sold without medical prescription. According to the Swedish Environmental Danger and Risk Assessment of Pharmaceutical Ingredients Classification, it is considered dangerous to the environment, however in our country there is no legislation about this matter. Many studies had demonstrated that it can produce reactive oxygen species and free radicals, as well as apoptosis in human and rat hepatocytes, but no information about aquatic species are available. The aim of the present work was to assess the toxicity produced by diclofenac on *Daphnia magna*, by acute and sublethal toxicity assays, evaluating oxidative stress biomarkers such as lipid peroxidation level, antioxidant enzymes activity (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase) and carbonyl protein content, as well as genetic material biomarkers. The obtained results were: The acute assay showed that LC₅₀ at 48 h was 116.6 y 96.6 mg/L, for neonates and 14 day adults respectively, hence being the last ones more sensitive to the drug exposure. The sublethal assay demonstrated that the exposure of *D. magna* to this compound produced oxidative stress (increment in lipid peroxidation level and carbonyl protein content, as well as modification of the antioxidant enzymes activity) and DNA damage, depending on the concentration used. In conclusion, diclofenac produced oxidative and genetic damage to *D. magna* and considering that this type of organism is fundamental to the aquatic ecosystems, this drug must be qualified as ecotoxic and its incorporation to the environment legislated.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 El agua

El agua es un líquido vital para la existencia de todos los organismos vivos, ya que es indispensable en los procesos biológicos y es hábitat de múltiples comunidades acuáticas. Su extracción para uso doméstico, agrícola, minero, industrial, para la generación de energía, así como el vertido de contaminantes, puede llevar a un deterioro en su calidad y cantidad, impactando no solo al ecosistema acuático, sino también a la disponibilidad de agua segura para consumo humano (SAGAN, 2007).

1.2 Contaminación del agua

Se considera contaminación a la adición de cualquier sustancia en cantidad suficiente para que cause efectos dañinos mensurables en la flora y la fauna, debido a causas naturales o geoquímicas o a causas provocada por las actividades antropogénicas (SAGAN, 2007):

La toxicidad producida por contaminantes como metales pesados, hidrocarburos y plaguicidas en ambientes acuáticos ha sido ampliamente evaluada, pero pocos son los estudios sobre el efecto de los productos farmacéuticos.

Sustancias como aceites, grasas, breas, tinturas, productos químicos sintéticos, plaguicidas y otros afectan los procesos metabólicos de los organismos acuáticos, incluso se ha demostrado que producen estrés oxidativo. Investigaciones realizadas en anfípodos de agua dulce (*Gammarus lacustris* Sars y *Gammarus tigrinus*), expuestos a disolventes orgánicos presentes en aguas negras, mostraron una elevación significativa en los niveles de catalasa, peroxidasa,

glutación s-transferasa y en la concentración celular de peróxido de hidrógeno, lo cual puede derivar en la acumulación del H₂O₂ y provocar daño a las estructuras lipídicas derivando en una lesión celular o en la muerte del organismo (SAGAN, 2007; Timofeyey *et al.*, 2006)

Otros contaminantes como metales, ciertos plaguicidas, cianuros, hidrocarburos, arsénico y fenol provocan daños, por ejemplo, se ha demostrado que el mercurio administrado a ratas tiene la capacidad de depositarse principalmente en riñones, además de que existe una interacción entre el selenio y el mercurio, de modo que el Se disminuye los niveles de Hg en riñones, pero los aumenta en hígado y sangre, además de inhibir la actividad oxidativa del Hg (Wang *et al.*, 2008).

1.3 Contaminación del agua por productos farmacéuticos

Los fármacos son componentes biológicamente activos, empleados para restablecer la salud tanto de los seres humanos como de los animales. Estas sustancias pueden tener efectos parecidos, incluyendo los adversos, en mamíferos y no mamíferos, ya que comparten muchos receptores y moléculas blanco similares, que se han conservado a través de la evolución. Sin embargo, pueden producir respuestas inesperadas en organismos menores debido a diferencias farmacocinéticas, farmacodinámicas y fisiológicas (Fent *et al.*, 2006b).

Los fármacos pueden ser introducidos al ambiente (Figura 1) después de su uso en pacientes y animales, ya que son excretados de forma inalterada o como metabolitos a través de la orina o las heces en las descargas de agua doméstica hacia ríos y lagos. Aunque una pequeña parte de estos productos puede ser removida por plantas de tratamiento de agua, la gran mayoría no logra eliminarlos en su totalidad (SEMARNAT, 2007; Jemba, 2006; Zuccato *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2004; Lange y Dietrich, 2002; Seiler, 2002; Toledo, 2002; Kummerer, 2001).

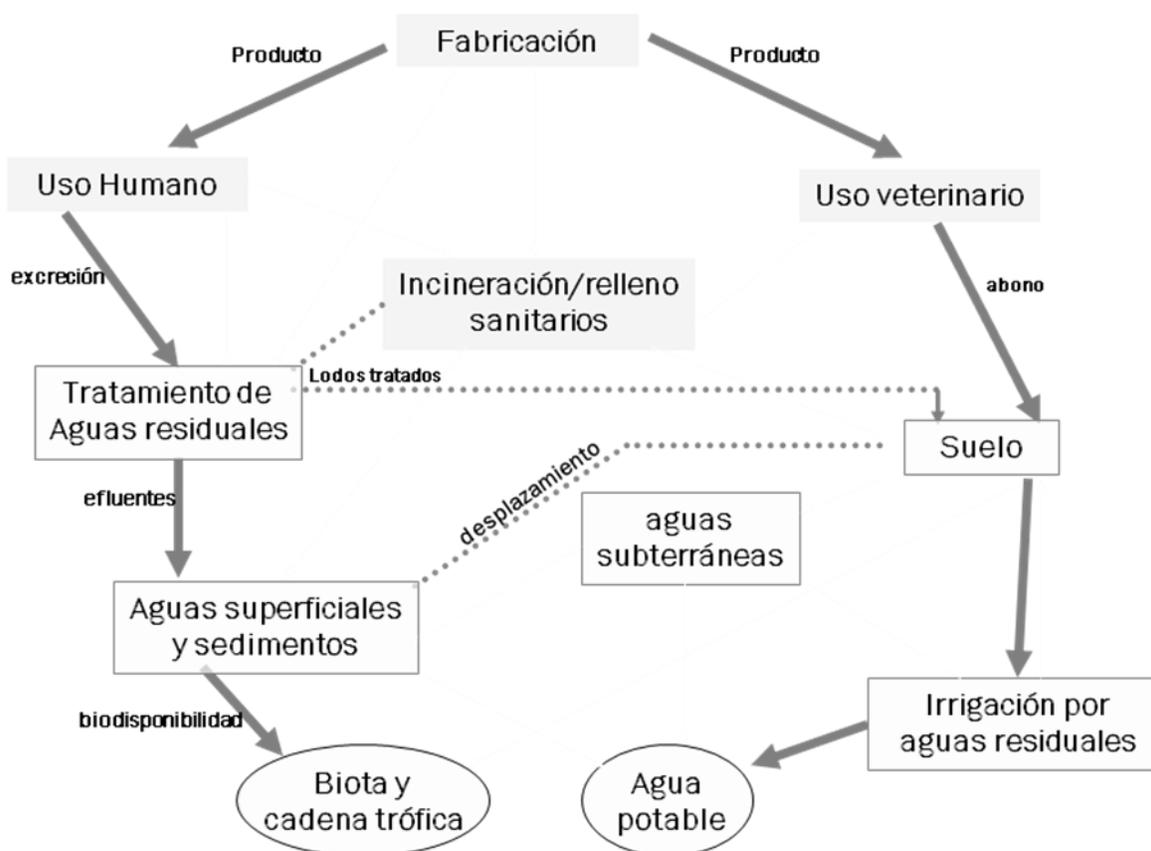


Figura 1. Trayecto de los productos farmacéuticos hacia el ambiente, tomado y modificado de Jones *et al.*, 2004.

Productos farmacéuticos, tales como analgésicos, antibióticos, anticonvulsivantes, hormonas y otros, se han encontrado en cuerpos de agua alrededor de todo el mundo. Los primeros hallazgos fueron reportados en 1970. Dentro de los primeros estudios realizados se encuentra uno realizado en Alemania entre 1996 a 1998, que reportó la presencia de 55 fármacos en efluentes de plantas de tratamiento, otra investigación similar se realizó en Estados Unidos en 1999 y 2000, en donde se detectaron 82 componentes farmacéuticos en un arroyo (Ternes *et al.*, 2004).

La contaminación por fármacos puede ocurrir en concentraciones traza (ppb y ppt), las cuales son relativamente bajas y difíciles de detectar (Jones *et al.*, 2004). Sin embargo, los antiepilépticos, carbamazepina y gemfibrozil, han sido reportados en concentraciones de ng/L en muestras de agua para consumo humano en Alemania y Canadá, respectivamente (Jones *et al.*, 2004). Por otro lado Borgmann *et al.*, (2007), detectaron paracetamol, triclosan, ibuprofeno, naproxeno, ácido salicílico y diclofenaco en agua, a concentraciones superiores a 1750 ng/L (Fent *et al.*, 2006b).

1.3.1 Comportamiento de los fármacos en el ambiente

Una vez descargados al agua, la concentración de los fármacos en la fase acuosa puede disminuir por su adsorción a la fase sólida, esto es a los sólidos en suspensión, sedimentos o biota. Sin embargo, muchos medicamentos son componentes hidrofílicos y es poco probable que su absorción sea un factor significativo en la reducción de la concentración en la fase acuosa (Jones *et al.*, 2004).

La biodegradación puede ser la principal ruta de eliminación de algunos componentes de los medicamentos. Sin embargo este proceso depende no solo del tiempo de vida media, inherente a las características fisicoquímicas de éstos, sino también de las condiciones ambientales, el flujo del cuerpo de agua, las características bióticas y abióticas, entre otras. Así, ciertos fármacos como los anticancerígenos y algunos antibióticos han mostrado que no son degradables (Jones *et al.*, 2004).

Dentro de los procesos que pueden sufrir los productos farmacéuticos en el ambiente acuático están (Gurr y Reinhard, 2006):

- **Dispersión y dilución:** la concentración del componente puede disminuir y así la concentración no será suficiente para producir un efecto en los organismos. Este proceso sucede solo en regiones que reciben volúmenes importantes de precipitaciones pluviales.
- **Volatilización:** sucede con las sustancias que tienen una constante de Henry elevada.
- **Sorción:** este proceso incluye tanto adsorción como absorción. La captación de los contaminantes por los sedimentos y por los sólidos suspendidos es una forma importante de mitigación, pero este material puede volver a la columna de agua cuando exista turbulencia en el medio.
- **Fotólisis:** es el proceso de disociación de las moléculas por efecto de la luz, y se divide en directa (cuando el tóxico absorbe la luz y como resultado directo se transforma) e indirecta (cuando otras especies excitadas transfieren energía, electrones o átomos de hidrógeno provocando una transformación).
- **Biodegradación y biotransformación:** se lleva a cabo a través de enzimas producidas por las bacterias presentes en el ambiente para su utilización como fuente de energía.

1.3.2 Efecto de los productos farmacéuticos sobre la biota

Un fármaco de uso humano no necesariamente producirá una actividad similar en otros organismos, ya que el mismo blanco puede gobernar diversos procesos en diferentes especies, esto es especialmente importante para los invertebrados (Heckmanna *et al.*, 2007; Nentwing, 2007).

Diversas investigaciones han demostrado que los fármacos y sus metabolitos en el ambiente producen efectos tóxicos sobre la biota. Así, Jones *et al.*, (2004), indican que algunos antibióticos inhiben el crecimiento de las bacterias encargadas de la degradación de la materia orgánica y por lo tanto interfieren con el proceso de nitrificación y desnitrificación (SEMARNAT, 2007). Por su parte, Nentwing (2007) reportó que la fluoxetina disminuye el crecimiento del alga *Pseudokirchneriella subcapitata* y la fecundidad de *Ceriodaphnia dubia*, por lo que este fármaco afecta a los organismos que habitan en los sedimentos así como en la columna de agua.

En peces se ha reportado que los medicamentos beta-bloqueadores tienen un efecto inhibitorio de la actividad espermática en algunas especies (Jones *et al.*, 2004). Otros estudios refieren la producción de vitelogenina en peces machos debido a componentes estrogénicos en el agua que habitan, de tal modo que afectan el contenido de sus hormonas sexuales y su homeostasis (Borgmann *et al.*, 2007; Fent *et al.*, 2006a). Adicionalmente Nentwing (2007) indica que el etilenoestradiol afecta de forma considerable la vida acuática en concentraciones de 10 ng/L, particularmente a la población de peces.

Un estudio de toxicidad crónica realizado con ibuprofeno (antiinflamatorio no esteroide) sobre *Daphnia magna* mostró la disminución del crecimiento, así como la reducción de la reproducción de los organismos (Heckmann *et al.*, 2007).

1.3.3 Legislación y valoración del riesgo ambiental de los fármacos

Los requerimientos legales en algunas regiones como Europa, Estados Unidos y Canadá, exigen una valoración del riesgo ambiental para los nuevos fármacos que van a ser introducidos al mercado, para lo cual se realizan estudios toxicológicos en tres o cuatro especies diferentes (algas, *Daphnia* sp y peces) para valorar su comportamiento en el ambiente (Lange y Dietrich, 2002).

Para estos estudios es necesario calcular la concentración de fármaco que va a ser introducida al ambiente, basada en cinco años de producción. Si la concentración del medicamento o la de alguno de sus metabolitos es menor a 1 µg/L (1 ppb), es considerado como aceptable y se le asigna una categoría de exclusión para posteriores análisis. Por el contrario si es mayor a 1 µg/L se tiene que realizar una batería de pruebas toxicológicas, las cuales incluyen efectos en la respiración microbiana y pruebas de toxicidad aguda en al menos una especie de alga, un invertebrado y un pez. Las pruebas de toxicidad crónica son necesarias si el fármaco tiene la capacidad de bioacumularse (Snyder *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2004).

La agencia Europea de medicina publicó una guía para la evaluación del riesgo ambiental de productos farmacéuticos de uso humano, en la cual se especifican las consideraciones generales y los procedimientos para su realización (EMA, 2006).

Con respecto a México, en la actualidad no se cuenta con alguna legislación que contemple la presencia de productos farmacéuticos o de cuidado personal en el agua, mucho menos límites permisibles de éstos.

1.4 Diclofenaco

1.4.1 Características generales

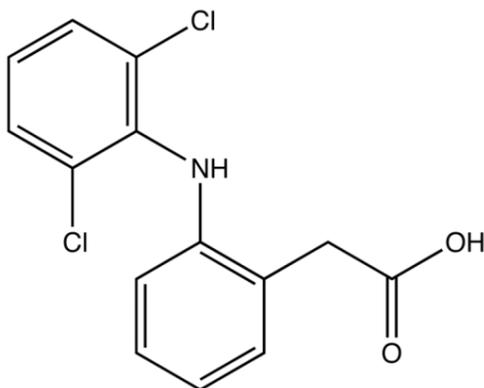


Figura 2. Estructura química del diclofenaco

Nombre químico: ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil]acético.

Fórmula química: C₁₄-H₁₁-Cl₂-N-O₂

Log K_{ow}: 1.56

Log D: 1.22

pK_a: 3.90

Solubilidad en agua (g/L): 21.3

Clasificación farmacológica: Antiinflamatorio no esteroideo (AINE)

Clasificación terapéutica: antiinflamatorio, antirreumático.

El diclofenaco (Figura 2) es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) derivado del ácido benzoacético, que posee propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Es utilizado ampliamente para el alivio del dolor en inflamaciones agudas y crónicas, síndromes reumáticos, procesos degenerativos, dolor inflamatorio agudo de tipo lumbar, postoperatorio, tendinitis, bursitis, ciática, gota, cirugía dental, dismenorrea y cefalea. En México su venta no requiere receta médica y es uno de los medicamentos más utilizados por la población (Gómez-Oliván *et al.*, 2009)

1.4.2 Farmacodinamia

El principal mecanismo de acción del diclofenaco es la inhibición competitiva de la enzima ciclooxigenasa (COX), responsable de la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico. Además bloquea la acción del glutamato, neuromodulador responsable del proceso de amplificación de la respuesta refleja de sensibilización periférica al dolor, activa la vía inhibitoria descendente serotoninérgica, es decir activa la liberación de opiodes endógenos y de serotonina, neurotransmisores involucrados en promover diversos grados de analgesia, e inhibe a la elastasa de los gránulos de los leucocitos polimorfonucleares, proteínas que participan en la degradación del cartílago en los procesos reumáticos crónicos (Roberts y Morrow, 2007; Dipiro, 2001).

1.4.3 Farmacocinética

Absorción: después de la administración oral, el diclofenaco se absorbe rápida y completamente en el duodeno.

Distribución: la concentración plasmática máxima se alcanza entre dos a tres horas después de su administración. La unión a proteínas es del 99%.

Biotransformación: se metaboliza en el hígado por acción de la isoenzima de la subfamilia CYP2C del citocromo P₄₅₀ a 4-hidroxiciclofenaco que es el metabolito principal y otras formas hidroxiladas, sufriendo posteriormente glucuronidación y sulfatación (Roberts y Morrow, 2007; Dipiro, 2001). También se ha identificado que el diclofenaco sufre una biotransformación (10 al 50 %) por medio de las enzimas CYP2C8 y 9, a través de una glucuronidación por la enzima uridin 5'-difosfoglucoronosil transferasa (UGT2B754) y diversas vías de hidroxilación. Otro metabolito generado es el 5-hidroxiciclofenaco resultado de las enzimas CYP2C8,

CYP2C18, CYP2C19 y CYP2C8, el diclofenaco glucoronizado es metabolizado por CYP2C8 (Martínez *et al.*, 2006).

Excreción: se excreta en la orina (65 %) y por la bilis (35 %). Más del 90% es excretado en 72 horas. El tiempo de vida media oscila alrededor de 2 horas. Se acumula en el líquido sinovial después de su ingestión, lo cual explica la duración del efecto terapéutico que es mucho más largo que su vida media plasmática.

Efectos adversos en humanos: En algunos pacientes se producen sangrado y ulceración de la pared gastrointestinal. Entre el 5 y 15 % de los usuarios se inducen ligeramente los niveles de transaminasas hepáticas en plasma. Es posible encontrar también efectos en el sistema nervioso central, erupciones, reacciones alérgicas, retención de líquido y edema, en raras ocasiones se presenta deficiencia en la función renal. Interfiere con el efecto antiplaquetario de la aspirina (Roberts y Morrow, 2007; Dipiro, 2001).

1.4.4 Efectos tóxicos del diclofenaco en diversas especies

En el 2004, el diclofenaco se consideró el responsable de la muerte de tres especies de buitres en la India y Pakistán. Estudios posteriores encontraron que éste produjo falla renal debido a la acumulación de ácido úrico (Fent *et al.*, 2006b). Por otro lado, Gómez-Lechón *et al.*, (2003), demostraron que este fármaco puede inducir apoptosis de hepatocitos humanos y de ratas, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno a causa de uno de sus metabolitos principales, el 5´OH-diclofenaco. Efectos similares fueron descritos en el pez japonés *Oryzias latipes*, mientras que en *Onchorynchus mykiss* produjo alteraciones en el riñón y su acumulación en órganos como hígado y tejido muscular, por lo cual se concluyó que la exposición prolongada en el ambiente produce deficiencia en la condición general del pez (Schwaiger *et al.*, 2004). Por su parte, Han *et al.*, (2007) encontraron un incremento en la expresión del gen para la producción de

vitalonogenina, por lo que el diclofenaco también puede ser un potencial agente estrogénico.

Jones *et al.* (2002) propusieron una clasificación de la toxicidad de medicamentos en función del grupo farmacéutico al que pertenecen, con base en la CE_{50} (tabla 1) para diferentes organismos de prueba, encontrándose que los analgésicos como el diclofenaco, resultan tóxicos para los crustáceos y dañinos para los peces. Por otro lado, de acuerdo a la clasificación de peligro ambiental y valoración de riesgo de ingredientes farmacéuticos en Suecia (2002), el diclofenaco está clasificado como peligroso para el ambiente, y se considera además potencialmente bioacumulable (Carlsson *et al.*, 2006; Escher *et al.*, 2005).

Tabla 1. Clasificación de la toxicidad de productos farmacéuticos en el ambiente acuático

Substancia	Extremadamente tóxico $CE_{50} < 0.1$ mg/L	Muy tóxico $CE_{50} 0.1-1$ mg/L	Tóxico $CE_{50} 1-10$ mg/L	Dañino $CE_{50} 10-100$ mg/L	No tóxico $CE_{50} > 100$ mg/L
Analgésicos			D	D,E	
Antibióticos	A	B			
Antidepresivos		D			
Antiepilépticos			C		D,E
Cardiovasculares		D			
Citostáticos		A		D,E	

donde: A-microorganismos; B-alga; C-Cnidaria; D-Crustáceos; E-Peces.

(Jones *et al.*, 2002)

1.5 Bioensayo

El efecto de los contaminantes en los organismos se valora mediante pruebas controladas de laboratorio conocidas como ensayos biológicos o "bioensayos", los cuales consisten en medir la toxicidad de los contaminantes ya sea en forma

individual o en mezcla, sometiendo deliberadamente a algún ser vivo a distintas concentraciones de éstos (Eissa *et al.*, 2003; Moreno, 2003).

Los ensayos en animales tienen múltiples ventajas. Una de ellas es que son realizados bajo condiciones rigurosamente controladas y se puede establecer una relación causal entre la exposición al agente y el efecto producido de forma concluyente (relación concentración-respuesta). Además, es posible identificar el mecanismo de acción de los tóxicos por el análisis del daño producido tanto a los animales de ensayo como a sus tejidos (Moreno, 2003).

Los bioensayos se llevan a cabo frecuentemente en especies aisladas que se eligen considerando su distribución geográfica, su importancia ecológica y económica, la duración de su ciclo de vida, su talla máxima, así como la sensibilidad de su respuesta (Espina y Vanegas, 1996; O'connor, 1994).

Los objetivos principales de los bioensayos son:

- a) Predecir los efectos tóxicos agudos y subletales de los contaminantes en los ambientes acuáticos.
- b) Comparar la sensibilidad de una o más especies a varios tóxicos o al mismo.
- c) Establecer la toxicidad de las sustancias y de los efluentes.
- d) Proporcionar elementos para la regulación de las sustancias evaluadas.

1.6 Bioindicadores

El monitoreo de la calidad del ambiente acuático se puede realizar a través del empleo de organismos de prueba, conocidos como bioindicadores. En la evaluación toxicológica del sedimento, el organismo que se emplea es *Hyallela azteca* y en el caso de la columna de agua se utiliza *Daphnia magna*.

Particularmente *D. magna* es considerada como especie de referencia internacional (EPA, 1996).

1.6.1 *Daphnia magna*

Dentro del grupo de cladóceros, las especies del género *Daphnia* (Figura 3) son las más utilizadas como bioindicadores en pruebas de toxicidad. Su amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen al interior de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (lo cual asegura una uniformidad de respuesta), su sensibilidad de respuesta a una amplia gama de tóxicos y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías, han hecho a este grupo ideal para la evaluación de toxicidad, de carácter universal (Díaz *et al.*, 2007).

A nivel internacional existen actualmente varios documentos donde señalan a esta especie para pruebas toxicológicas (EPA, 2006; OECD, 2004; APHA, 1998; ECC, 1992). En México podemos señalar la Norma Oficial Mexicana (NMX-AA-087-1995-SCFI Análisis de agua– Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna* Status (Crustácea–Cladóceras) – Método de prueba) en la que se utiliza para evaluar descargas residuales industriales.

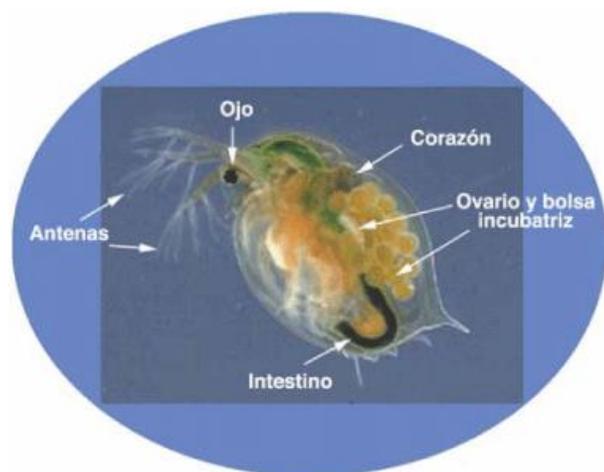


Figura 3. *Daphnia magna*

Clasificación taxonómica

Reino: animal

Phylum: artrópodo

Clase: crustácea

Orden: cladósera

Familia: Daphnidae

Género: *Daphnia*

Especie: magna

Ésta es una de las especies más utilizadas en el mundo por su sensibilidad, es un microcrustáceo, que llega a medir entre los 5 a 6 mm en su estado adulto. Su tiempo de vida media es de 40 días a 25 °C. Su ciclo de vida se compone de cuatro fases: huevo, juvenil, adolescente y adulto. Su reproducción es asexual por partenogénesis la mayor parte del año, pero puede ser sexual durante la primavera u otoño y bajo condiciones de estrés. En cada puesta se puede tener de 6 a 10 huevos. Vive en lagos y lagunas, alimentándose de algas microscópicas y sirviendo a su vez de alimento a los peces. Se puede desarrollar en agua moderadamente dura (160 a 180 mg CaCO₃ por litro) con pH óptimo entre 7 y 8.6 (Paggi y Paggi, 2007; EPA; 2006; Mount y Brungs, 1967).

1.7 Biomarcadores

Se definen como “las respuestas bioquímicas, anatómicas, fisiológicas y de comportamiento que son señales de exposición a tóxicos ya sean de naturaleza química, física o de radiaciones” (van der Oost *et al.*, 2003).

Las características de un biomarcador son:

1. Indican la presencia de un contaminante biodisponible, más que la forma inerte del mismo.

2. Pueden revelar la presencia de un contaminante que no se sospecha que existe en el lugar de estudio.
3. Persisten en algunas ocasiones en el organismo por mucho más tiempo que el toxón, de manera que se pueden detectar los efectos de un contaminante que ya no está presente.
4. Son más fáciles de innovar y más económicos que los análisis químicos comunes.

Constituyen una herramienta de evaluación de efecto tóxico, muy útil en la evaluación de riesgo toxicológico y ecotoxicológico, ya que se pueden detectar como consecuencia del contacto con los tóxicos, desde el nivel de organización molecular y celular en adelante (Schwaiger *et al.*, 2004). En los estudios de toxicología ambiental se utilizan para:

- a. Detectar la presencia de la exposición a contaminantes ambientales.
- b. Determinar las consecuencias biológicas de la exposición.
- c. Detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico producto de la exposición.
- d. Identificar a los individuos sensibles de una población.
- e. Fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

Los biomarcadores se dividen en tres (van der Oost *et al.*, 2003):

- 1) De exposición: detección y cálculo de sustancias exógenas o sus metabolitos o el producto de una interacción entre un toxón y una molécula o célula blanco, es calculada dentro del organismo. Son usados para confirmar la exposición de individuos o poblaciones a una sustancia en particular.

- 2) De efecto: incluyen la valoración bioquímica, fisiológica y otras alteraciones dentro de un tejido o fluidos corporales de un organismo que puedan ser reconocidos y asociados con una deficiencia en la salud.
- 3) De susceptibilidad: indica la habilidad adquirida por un organismo para responder a los cambios producidos por la exposición a un agente específico, incluyendo factores genéticos y cambios en receptores los cuales alteran la susceptibilidad del organismo expuesto. Ayudan a elucidar variaciones en el grado de respuestas a la exposición de un tóxico, observando diferencias entre individuos.

1.8 Estrés oxidativo

Es el desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la defensa antioxidante, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan deterioro y muerte celular (Rodríguez *et al.*, 2001).

1.8.1 Radicales libres

Se consideran radicales libres (RL) aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una inestabilidad, alta reactividad y una gran capacidad de combinarse inespecíficamente con biomoléculas como carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos. Son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de la célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de captura). Durante el proceso metabólico una pequeña parte (2 – 3 %) de los radicales libres pueden evadir el mecanismo redox y causar daño oxidativo a

los componentes celulares (Valavanidis *et al.*, 2006; Hangsber, 2002; Rodríguez *et al.*, 2001).

1.8.2 Especies reactivas de oxígeno

Se consideran ERO al oxígeno atómico (O) y al ozono (O₃), al oxígeno singulete (¹O₂) que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados del O₂ y al superóxido (O₂⁻), al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y al radical hidroxilo (·OH) que son especies parcialmente reducidas. Las ERO en bajas concentraciones estimulan el crecimiento de las células, de algunas bacterias y de otros microorganismos, además de que son indispensables para diferenciación celular y la muerte celular programada (Konigsberg, 2008).

El ¹O₂ reacciona con la mayoría de los compuestos celulares, con la membrana plasmática, los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos muy cerca del sitio donde se forma. Interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos siendo el producto principal la 8-hidroxiguanidina.

El O₂⁻ es a la vez un anión y un radical, se produce principalmente en la cadena respiratoria. Es tóxico para la célula por que a partir de él se puede originar el ¹O₂ y el H₂O₂.

El H₂O₂ se forma cuando uno de los dos electrones del O₂ se ha apareado con un electrón de giro contrario. Puede formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Es tóxico ya que puede formar ¹O₂ y ·OH, aunado a la reacción con algunos metales de transición con los que se produce el radical ·OH el cual interacciona de forma irreversible con proteínas y el DNA.

El ·OH se produce principalmente por la reacción de Fenton. Es uno de los compuestos más reactivos que existen, puede oxidar tanto las bases puricas como

las pirimídicas y también la desoxirribosa, además puede producir rupturas en el DNA. También reacciona con cualquier aminoácido en el sitio que se origina, incluso con los ácidos grasos poliinsaturados (Valavanidis *et al.*, 2006).

Otras fuentes endógenas de ERO dentro de las células son las enzimas oxidativas como triptófano dioxigenasa, xantino oxidasa y Cit P₄₅₀ reductasa, que pueden producir O₂⁻, mientras que la enzima guanidilciclasa y glucosa oxidasa generan peróxido de hidrógeno. Los contaminantes químicos son una fuente importante para la generación de ERO en los organismos, tal es el caso de los metales de transición, los herbicidas, las quinolonas y los componentes nitroaromáticos, ampliamente conocidos por su potencial para causar estrés oxidativo (Valavanidis *et al.*, 2006).

1.8.3 Efecto del estrés oxidativo sobre biomoléculas

1.8.3.1 Lipoperoxidación

Es la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados que induce disfunción de los orgánulos, la cual puede culminar en daño ultraestructural. Las membranas celulares contienen fosfolípidos que contienen ácidos grasos con varias ligaduras dobles, estos ácidos grasos poliinsaturados son más lábiles a la oxidación que los saturados y los monosaturados, ya que los metilenos entre dos dobles ligaduras pueden perder fácilmente un hidrógeno (Hangsber, 2002).

La peroxidación de los lípidos de membrana puede ocurrir tanto por la vía enzimática como por la no enzimática. Durante la no enzimática las ERO inician el daño oxidativo en los lípidos de membrana y los RL de los lípidos resultantes propagan el proceso de la peroxidación. En la lipoperoxidación enzimática los ácidos grasos oxidados son liberados de los lípidos de las membranas por fosfolipasas. El ácido araquidónico es un ácido graso liberado por la fosfolipasa A₂, el metabolismo de éste es una fuente de ERO que puede producir estrés

oxidativo por tres vías: por la de la lipooxigenasa, que hace posible la formación de prostaglandinas; por la vía de la ciclooxygenasa que permite la formación de prostaglandinas y por la vía catalizada por el citocromo P₄₅₀, que interviene en los procesos de detoxificación de diversas sustancias (Konigsberg, 2008).

1.8.3.1.1 Etapas de la lipoperoxidación

El proceso de lipoperoxidación está compuesto por un conjunto de reacciones en cadena, sobre los ácidos grasos poliinsaturados (Valavanidis *et al.*, 2006).

Iniciación de la lipoperoxidación: comienza cuando un ácido graso poliinsaturado es atacado por una ERO que es capaz de absorber o retirar un átomo de hidrógeno de un grupo metileno. El metileno queda como radical libre que se estabiliza mediante un rearrreglo molecular que da origen a un dieno que no reacciona con el singulete de oxígeno, sino con oxígeno molecular y forma el radical peroxilo.



Propagación de la lipoperoxidación: La molécula a la que se le ha abstraído un hidrógeno, hará lo mismo a la molécula de ácido graso poliinsaturado adyacente, estableciendo una reacción en cadena y de esta forma se propaga la lipoperoxidación a través de la membrana.



Terminación: la terminación de la lipoperoxidación es resultado de la interacción de los radicales lipídicos y/o la formación de especies no radicales por los radicales lipídico-peroxilo. El resultante –LOOH que puede descomponerse

fácilmente a varias especies reactivas, incluyendo radicales lípido-alcoxil (LO \cdot), aldehídos (malondialdehído), alcanos, epoxi-lípidos y alcoholes (Valavanidis *et al.*, 2006).

1.8.3.1.2 Efectos de la lipoperoxidación

Cuando reaccionan los radicales libres de ácidos grasos poliinsaturados entre sí se pueden formar dímeros por entrecruzamiento o pueden ciclizarse, creando aglomerados que conducen a la disminución de la fluidez y de la permeabilidad de la membrana, modificando su estructura y con ello la función de las células y de los tejidos. De manera indirecta los productos de lipoperoxidación pueden reaccionar con otras moléculas (aminoácidos) y dañar a la célula (Konigsberg, 2008).

1.8.3.2 Daño a proteínas

Muchas proteínas son capaces de tolerar una gran cantidad de oxidaciones sin que aparentemente se vea afectada su función. La oxidación parcial y selectiva en algunos casos produce proteínas modificadas que pueden actuar como moduladores en algunas reacciones, favoreciendo la homeostasis celular, en este caso la oxidación tiene una finalidad fisiológica. Por otro lado, existe una gran cantidad de agentes oxidantes que pueden dañar a las proteínas. Uno de los daños que es utilizado como marcador de la oxidación de las proteínas es su carbonilación, la cual se puede llevar a cabo por la oxidación directa de los residuos de lisina, arginina, prolina y treolina. También pueden ser introducidos por reacciones con aldehídos (malondialdehído, 4-hidroxi-2-nonenal) producidos durante la lipoperoxidación o al incorporar un grupo carbonilo a la proteína al reaccionar residuos de lisina con azúcares reductores o de sus productos de oxidación (Konigsberg, 2008; Hangsber, 2002).

1.8.3.3 Daño al DNA

La pérdida de bases, la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5-metilcitosina en timina y la ruptura de una o de las dos hebras del DNA, son eventos que ocurren normalmente, siendo su tasa de producción muy baja pero continua (Hangsber, 2002). Sin embargo, dichos eventos pueden ser inducidos, elevando su tasa de producción por efecto de las ERO. Así por ejemplo, el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) tiene gran reactividad y tiene la capacidad de abstraer átomos de hidrógeno de la molécula de DNA, así como pegarse a las bases formando aductos (Konigsberg, 2008).

La heterogenicidad de la molécula del DNA permite al $\cdot\text{OH}$ atacar tanto a las purinas como a las pirimidinas, así como a la desoxirribosa y además generar rupturas en su cadena. El O_2 es más selectivo y generalmente interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, siendo el producto principal la 8-hidroxi guanina. Esta última también se puede formar con el $\cdot\text{OH}$, quien es también el responsable de la ruptura en una hebra. La 8-hidroxi guanina puede hacer puentes de hidrógeno con una adenina en vez de con una citosina o con una guanina en lugar de con una timina. Otros hidroxil radicales pueden reaccionar con las uniones azúcar-fosfato del DNA causando diferentes lesiones, incluyendo sitios sin purinas, donde las bases han sido removidas, fragmentación de desoxirribosa u oxidación del azúcar (Valavanidis *et al.*, 2006).

1.8.4 Defensas antioxidantes

Los organismos cuentan con diversos sistemas de defensa que les permiten contrarrestar los efectos del estrés oxidativo generado por RL y ERO. La defensa

antioxidante puede subdividirse en antioxidantes enzimáticos y en no enzimáticos (Gregus y Klaassen, 2001). Estas defensas actúan en 5 niveles:

- a. Primer nivel: Es la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos. Se logra por la acción de la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, que es responsable de más del 90 % de la reducción del oxígeno en el organismo.
- b. Segundo nivel: Lo constituyen enzimas especializadas en captar el radical anion superóxido. La más importante es la superóxido dismutasa, metaloenzima que cataliza la disminución del radical anión superóxido para dar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.
- c. Tercer nivel. Es un grupo de enzimas especializadas en neutralizar el peróxido de hidrógeno. Entre ellas está la catalasa, que se encuentra en los peroxisomas y la glutatión peroxidasa, que catalizan la reacción de dismutación.
- d. Cuarto nivel. El radical hidroxilo puede ser neutralizado por la vitamina E, que es un antioxidante, así como la vitamina C la cual es un agente reductor o donador de electrones.
- e. Quinto nivel: está demostrado que los RL son capaces de provocar rupturas de la cadena de DNA y de inducir mutagénesis, pero existen mecanismos enzimáticos de reparación que permiten restablecer la información genética (Rodríguez *et al.*, 2001).

1.8.4.1 Enzimas antioxidantes

1.8.4.1.1 Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD), cataliza la dismutación de $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 y O_2 (Figura 4). Esta familia de enzimas está formada por tres miembros: La SOD_1 que tiene en su centro catalítico Cu^{+2} y Zn^{+2} y se encuentra en el citoplasma y el núcleo; la SOD_2 que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y en su centro catalítico tiene Mn (III) y finalmente la SOD_3 se encuentra en el exterior de la célula y también tiene Cu^{+2} y Zn^{+2} en su centro catalítico (Konigsberg, 2008; Hangsber, 2002).

1.8.4.1.2 Catalasa

Las catalasas (CAT) son enzimas capaces de descomponer el H_2O_2 a H_2O y O_2 (Figura 4) a cualquier pH entre 4 y 11. Las monofuncionales tienen una sola actividad, pero existen otras que también son capaces de oxidar algunas moléculas pequeñas como metanol y etanol. Están formadas por cuatro subunidades asociadas a un grupo hemo cada una. Emplean dos moléculas iguales de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como agente oxidante, el H_2O_2 al entrar en el sitio activo de la enzima, toma un electrón del hierro y otro del hemo para generar una molécula de agua, una segunda molécula de H_2O_2 cede un electrón al ferroxilo y otro al hemo, restituyendo el estado inicial de la enzima y liberando una molécula de dióxígeno y otra de agua (Hangsber, 2002).

1.8.4.1.3 Glutación peroxidasa

La glutación peroxidasa (GPx) es una selenoproteína, que requiere al glutación como agente reductor del H_2O_2 (Figura 4). Existen cuatro tipos de GPx, la citosólica (GPx_1), la gastrointestinal (GPx_2), la plasmática (GPx_3) y la de fosfolípidos (GPx_4). Son homotetrámeros, con la excepción de la GPx_4 que es un monómero de tamaño menor a las subunidades de las otras glutación peroxidases. La GPx de hidroperóxidos de fosfolípidos es capaz de actuar sobre los fosfolípidos

de las membranas celulares y de las lipoproteínas, además de los hidroperóxidos de timina y de ésteres de colesterol, son capaces de reducir el H_2O_2 y los hidroperóxidos de ácidos grasos (Hangsber, 2002).

En resumen, la reducción del oxígeno de electrón único produce la formación de radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) que se mantiene a concentraciones intracelulares bajas por medio de dismutación espontánea o rompimiento catalítico por la enzima SOD para forma peróxido de hidrógeno. Pueden ocurrir tres fenómenos con el peróxido de hidrógeno: en presencia de $\text{O}_2^{\bullet-}$ o metales de transición, como el hierro o cobre, se reduce hacia el radical hidroxilo ($\text{HO}\bullet$); puede catalizarse por la CAT para formar agua y oxígeno y puede detoxificarse mediante la GPx en presencia de glutatión (GSH) para formar agua y glutatión oxidado (GSSG) (Figura 4) (Gregus y Klaassen, 2001).

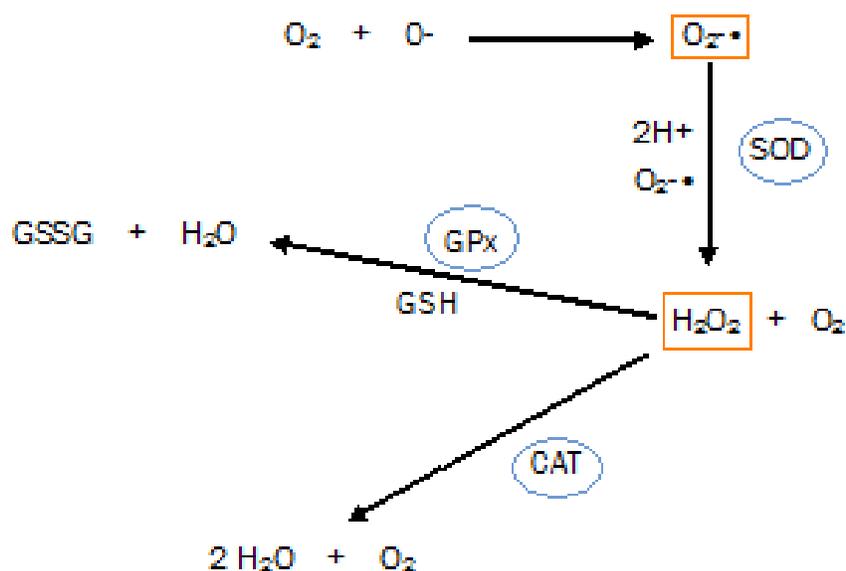


Figura 4. Reacciones de las enzimas antioxidantes (Gregus y Klaassen, 2001)

1.9 JUSTIFICACIÓN

El agua es indispensable para todos los organismos vivos y para las actividades productivas del hombre. Sin embargo, su uso desmedido y la contaminación generada por diversos procesos antropogénicos pone en riesgo la preservación de este recurso, la salud humana y la integridad de los ecosistemas.

La toxicidad producida por diversos contaminantes tales como metales pesados, hidrocarburos y plaguicidas a los ambientes acuáticos ha sido ampliamente evaluada. No obstante, son pocos los estudios relativos a los productos farmacéuticos y de higiene personal a nivel mundial y en nuestro país son prácticamente inexistentes. Cabe destacar que la comercialización de estos productos requiere la previa realización de estudios de seguridad y toxicidad preclínica y clínica, pero desafortunadamente no se incluyen pruebas para definir el impacto que ocasiona su desecho al ambiente.

En México algunos medicamentos son utilizados de forma irracional y uno de los grupos de fármacos más empleados son los AINE, entre los que se encuentra el diclofenaco. Este principio activo es encontrado en una gran variedad de formas farmacéuticas y su venta no requiere receta médica.

Debido a lo anterior, es de gran importancia realizar estudios de toxicidad para evaluar y conocer el impacto que el diclofenaco puede producir al ambiente, siendo los estudios sobre especies centinela como *D. magna*, el primer paso para lograrlo.

1.10 HIPÓTESIS

En el hombre se conoce que durante la biotransformación del diclofenaco se producen especies reactivas de oxígeno, por lo tanto es posible que en *Daphnia magna* también se produzcan, generando estrés oxidativo y en consecuencia daño a diversas biomoléculas.

1.11 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la toxicidad producida por diclofenaco sobre *Daphnia magna*.

1.12 Objetivos específicos

1.12.1 Determinar la toxicidad aguda producida por diclofenaco sobre *Daphnia magna*.

1.12.2 Determinar el daño subletal producido por diclofenaco sobre *Daphnia magna*, mediante la evaluación de estrés oxidativo utilizando los siguientes biomarcadores: grado de lipoperoxidación, proteínas carboniladas, actividad de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

1.12.3 Determinar el daño producido por diclofenaco al material genético sobre *Daphnia magna* mediante el ensayo cometa.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño experimental

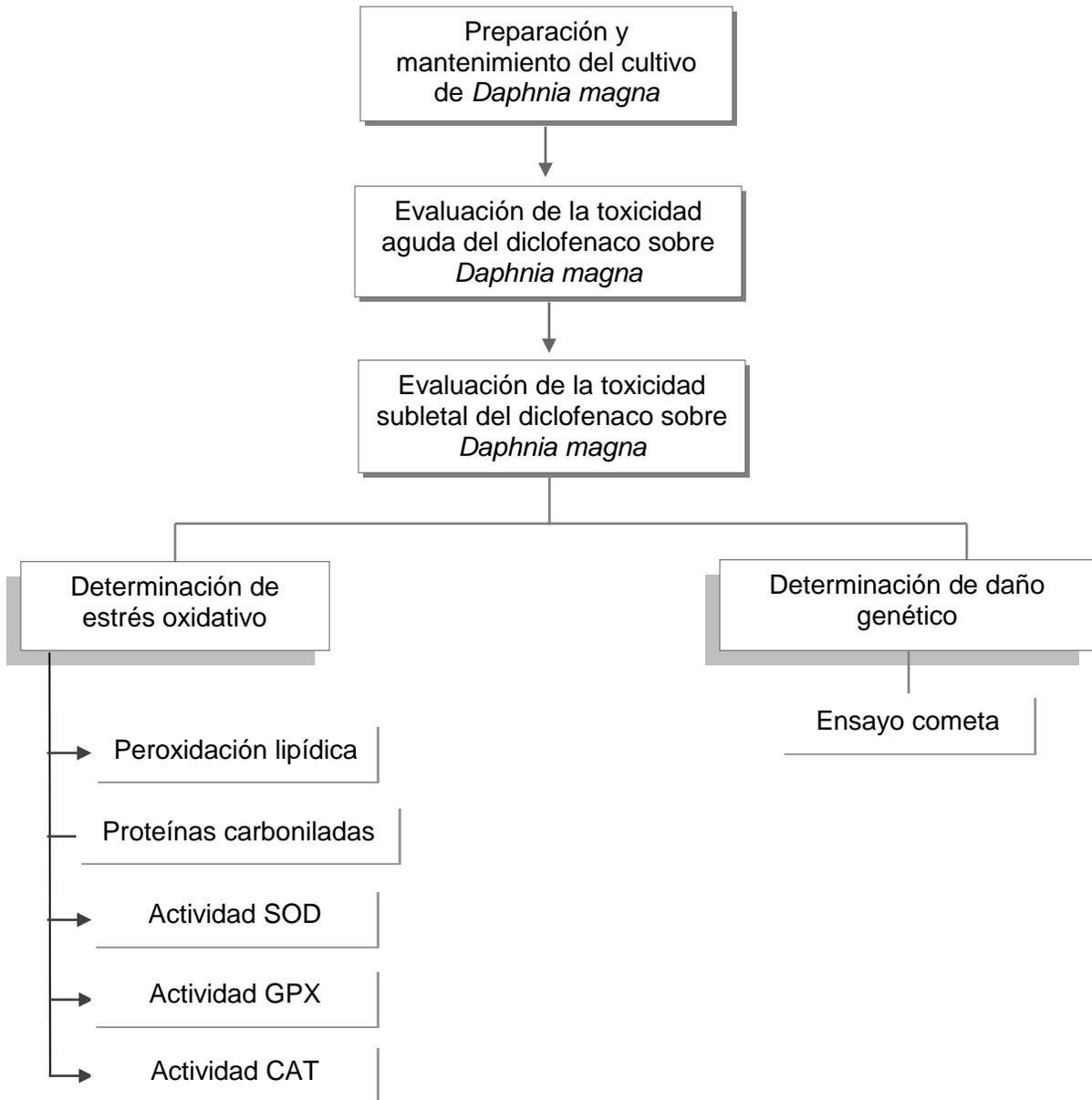


Figura 5. Diseño experimental.

2.2 Mantenimiento y cultivo de los organismos de prueba

Los organismos de prueba (*D. magna*) fueron obtenidos a partir de dos cultivos donados por el Instituto Mexicano del Petróleo y el Laboratorio de Hidrobiología de la ENCB. Éstos fueron mantenidos y cultivados en agua dura reconstituida (anexo 1), bajo las siguientes condiciones; dureza $\text{CaCO}_3 = 170 \pm 10$ mg/L, $\text{pH} = 8.2 \pm 1$, oxígeno disuelto = 5.48 ± 1 y conductividad = $510 \mu\text{ohm/cm}$ (APHA, 1998), con fotoperiodo de 16 h de luz por 18 h de oscuridad, temperatura de 20°C y alimentación *ad libitum* con *Chlorella vulgaris* (anexo 2). Una parte de los neonatos obtenidos fue separada y empleada en el estudio de toxicidad aguda, mientras que al resto se le permitió crecer hasta 14 días, a fin de ser utilizado en los estudios de toxicidad subletal.

2.3 Estudio de toxicidad aguda

Se formaron 6 lotes con 10 neonatos de *D. magna* y se expusieron durante 48 h a cinco diferentes concentraciones de diclofenaco sódico (ácido 2-(2-(2,6-diclorofenilamino)fenil)acético CAS No.15307-79-6) disuelto en agua reconstituida en recipientes de 100 mL de capacidad y mantenidos bajo las condiciones descritas en el apartado anterior. Se tomó como concentración de referencia la reportada por Cleuvers (2004), la cual fue de 68 mg/L, se utilizó su forma logarítmica y se eligieron dos valores superiores y dos inferiores, así las concentraciones ensayadas fueron 0, 43, 54, 68, 86, 108 y 136 mg/L. Transcurrido el tiempo de exposición se cuantificó el número de organismos muertos (se consideró como evidencia de muerte la inmovilización de los individuos) y se calculó la concentración letal media (CL_{50}) mediante el método de probit (EPA Probit analysis program Versión 1.5) (OECD, 2004; EPA, 1996; NMX-087, 1995). El estudio se realizó por triplicado y no se suministró alimento durante el mismo a fin de garantizar la biodisponibilidad del tóxico de prueba. El bioensayo también se realizó para organismos de 14 días de edad.

2.4 Estudio de toxicidad subletal

La evaluación de la toxicidad subletal del diclofenaco fue determinada en organismos adultos de 14 días, empleando 2 concentraciones de prueba obtenidas a partir del estudio de toxicidad aguda; 9.96 y 54.4 mg/L, equivalentes a 1/10 CL₅₀ y CL₁ respectivamente, adicionando 0.5 g de *D. magna* y con un tiempo de exposición de 48 h. Transcurrido este tiempo los organismos fueron homogeneizados y se evaluaron los siguientes biomarcadores: grado de lipoperoxidación, actividad de SOD, CAT y GPx, contenido de proteínas oxidadas (estrés oxidativo) y daño a DNA. Las condiciones de prueba fueron similares a las utilizadas en el estudio de toxicidad aguda. El ensayo se realizó por triplicado para cada concentración más el testigo.

2.4.1 Homogeneización de tejido

Se pesó cada muestra y se le adicionaron 2.0 mL de regulador de fosfatos (pH 7.2), posteriormente se homogeneizaron en forma mecánica durante un min y se ultracentrifugó durante 15 min a 12,500 rpm a 4°C. Finalmente se separó el sobrenadante para la determinación del contenido de proteínas totales por el método de Bradford (utilizado para la referencia de los resultados de las pruebas, anexo 3) y la actividad de las enzimas antioxidantes.

2.4.2 Evaluación del estrés oxidativo

2.4.2.1 Determinación del grado de lipoperoxidación (Método de Buege y Aust, 1979)

A 300 µL del homogenizado (sin centrifugar) se le adicionaron 700 µL de la solución reguladora Tris-HCl 150 mM (pH 7.4). Se incubó a 37°C por 30 min.

Después se agregaron 2 mL de la solución de ácido tiobarbitúrico al 0.375% (se preparó al momento) en ácido tricloroacético al 15% y se incubó a 37°C por 45 min. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y se determinó la absorbancia a 535 nm. Los resultados se expresaron en mM de malondialdehído/mg proteínas/g tejido, usando el coeficiente de extinción molar (CEM) el cual es de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los datos son expresados en mM MDA/mg proteína.

2.4.2.2 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

2.4.2.2.1 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (Método de Misra y Fridovich, 1972)

Se adicionaron 100 μL del homogenizado a una celda de 1 mL y se añadieron 100 μL de la solución reguladora de carbonatos (50 mM de carbonato de sodio y 0.1 mM EDTA) a pH 10.2. Se agregaron 200 μL de adrenalina 30 mM y se determinó la absorbancia a 480 nm, a los 30 seg y 5 min. Las lecturas de las muestras se extrapolaron en la curva tipo que se obtuvo utilizando los datos de la tabla 2. Los datos son expresados en U/mg proteína.

Tabla 2. Curva para la determinación de la SOD

Unidades SOD	SOD (μL)*	Adrenalina (μL)**	Regulador (μL)***
4.44	71	229	200
6.69	107	193	200
8.88	142	158	200
11.13	178	122	200
13.39	214	86	200

*De una solución de 375 U SOD. ** De una solución de 30 mM adrenalina.

***De una solución de 50 mM de NaCO_3 , 0.1 mM EDTA, pH 10.2.

2.4.2.2.2 Determinación de la actividad de la catalasa (Método de Radi *et al.*, 1991)

A 100 μL del sobrenadante del homogenizado se le agregaron 900 μL de la solución reguladora de aislamiento (0.3 M sucrosa, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES y 5 mM KH_2PO_4) y 200 μL de la solución de H_2O_2 20 mM. Posteriormente se determinó la absorbancia a 240 nm, a 0 y 60 seg. Los resultados se obtuvieron sustituyendo la absorbancia de ambos tiempos en la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de catalasa} = (A_0 - A_{60}) / \text{CEM}$$

Donde el CEM del $\text{H}_2\text{O}_2 = 0.043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; los datos son expresados en mM de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ proteína.

2.4.2.2.3 Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (Stephense *et al.*, 2000) con modificaciones.

Se tomaron 200 μL de sobrenadante y se agregaron 800 μL de solución reguladora (50 mM de fosfato de potasio pH 7.0; 3.5 mM de GSH, 1.0 mM de NaN_3 , 2 U de glutatión reductasa, y 0.12 mM NADPH / 1.0 mL). Se adicionó 0.1 mL de H_2O_2 y se registraron la lectura inicial, a los 0 y 5 min. Se calculó la actividad de la GPx por min por medio del coeficiente de extinción molar del NADPH de $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los datos son expresados en mM NADPH/min/mg proteína.

2.4.2.3 Determinación de proteínas carboniladas (Método de Floor y Wetzel, 1998; Levine *et al.*, 1994; Parvez y Raisuddin, 2005)

A 100 μL del sobrenadante se le adicionaron 150 μL de dinitrofenil hidrazina, se colocó 1 h a temperatura ambiente en obscuridad. Transcurrido el tiempo se agregaron 500 μL de ácido tricloroacético (20 %) y se dejó reposar 15 min a 4 °C.

Posteriormente se centrifugó a 11 000 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante y el botón se lavó tres veces con 1 mL de etanol- acetato de etilo 1:1 cada una. El precipitado se disolvió en 1 mL de guanidina y se incubó a 37 °C por 30 min. Finalmente se centrifugó a 1 500 rpm por 5 min y se determinó la absorbancia a 366 nm. Los resultados se calcularon mediante el coeficiente de extinción molar $21\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los datos son expresados en mmol DNPH/mg proteína.

2.4.3 Determinación del daño genotóxico. Método de electroforesis celular-ensayo cometa (Tice *et al*, 2000; Lankoff *et al.*, 2006)

Se prepararon las laminillas con una capa de agarosa de punto de fusión normal al 1 % y se dejaron secar. Se realizó el homogenizado de los organismos mediante mortero con 50 μL de PBS pH 7.2. Se colocó una segunda capa de agarosa, la cual contenía 10 μL del homogenizado y 75 μL de agarosa normal, se cubrió con un cubreobjetos y se dejaron solidificar. Las laminillas se sumergieron en la solución de lisis en un vaso coplin y se colocaron a 4 °C por 1 h sin exposición a la luz.

Transcurrido el tiempo se agregaron 20 μL de suero fetal bovino y la enzima formamidopiridina glicosilada (FPG) la cual identifica al producto de la oxidación de las bases puricas y endonucleasa III (ENDO) la cual es usada para detectar bases pirimidicas oxidadas, correspondiente para cada grupo, se incubaron por 45 min a 37° C. Posteriormente las laminillas se colocaron en la solución electroforesis (NaOH, triton), se dejaron reposar por 20 min en oscuridad, después se corrió la electroforesis (25 V, 300 mA) por 20 min. Se enjuagaron las laminillas con solución reguladora de neutralización, se dejaron secar. Las laminillas se tiñeron con 20 μL de bromuro de etidio y se observaron en un microscopio de epifluorescencia adaptado a un analizador de imágenes con un programa para medir a los núcleos.

Para evaluar el nivel de daño al DNA en cada muestra se cuantificaron 100 núcleos, en los que se midió la longitud de la cola del cometa (T) y diámetro del núcleo (N) para establecer el índice de daño (T/N).

2.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las determinaciones de estrés oxidativo fueron analizados mediante un análisis de varianza unifactorial (ANOVA) ($p < 0.05$) y la diferencia de medias evaluada por el método de Tukey-Kramer. Los resultados derivados del ensayo cometa fueron analizados con la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). Se usó el programa estadístico Sigma Stat.

III. RESULTADOS

3.1 Estudio de toxicidad aguda

Los resultados obtenidos de la exposición aguda de diclofenaco sobre los dos estadios de *Daphnia magna* se muestran en la tabla 3. Como puede observarse existen diferencias entre ambos estadios, siendo los adultos ($CL_{50} = 96.6$ mg/L) más sensibles al fármaco que los neonatos ($CL_{50} = 116.3$ mg/L).

Tabla 3. Concentración letal media de diclofenaco sobre *Daphnia magna* (48 h)

Edad de los organismos	CL_{50}
Neonatos (< 24 h)	116.3 mg/L (109.3 - 123.7 mg/L) ^a
Adultos (14 d)	96.6 mg/L (84.2 a 112.7 mg/L) ^a

^a Límite de confianza al 95%.

3.2 Estudio de toxicidad subletal

3.2.1 Evaluación del estrés oxidativo

3.2.1.1 Evaluación del grado de lipoperoxidación

En la Figura 6 se muestran los resultados referentes al grado de lipoperoxidación de *D. magna* expuesta a diclofenaco. Como puede observarse ambas concentraciones probadas provocaron un incremento significativo con respecto al testigo de este parámetro (9.96 mg/L= 1874.8 %; 54.4 mg/L= 2628.5 %) ($P < 0.05$), siendo mayor el daño producido por la concentración más elevada del fármaco.

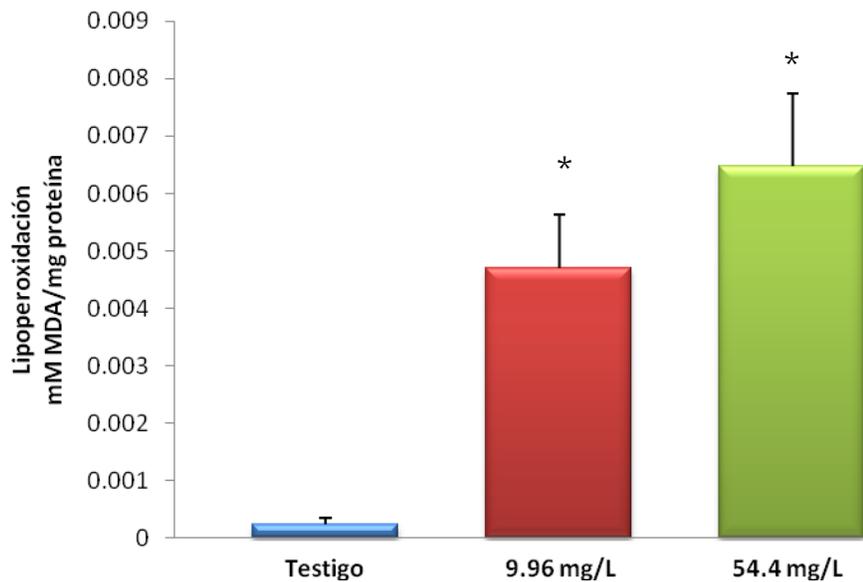


Figura 6. Grado de lipoperoxidación de *D. magna* expuesta a diclofenaco

Se presenta un incremento en el grado de lipoperoxidación de los dos grupos tratados con diclofenaco. (*) Indica diferencia estadística, $P < 0.05$ con respecto al testigo

3.2.1.2 Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes

La valoración de la actividad de la SOD (Figura 7) de *D. magna* expuesta a diclofenaco, mostró que solo la concentración más elevada (54.4 mg/L) del fármaco produce efectos significativos respecto al control (102.2 %) ($P < 0.05$), mientras que la más baja no provoca ningún cambio.

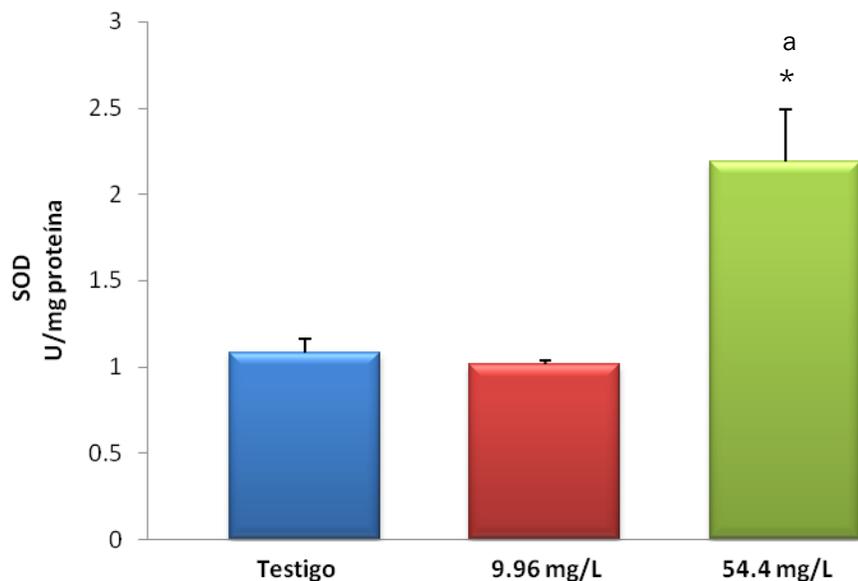


Figura 7. Determinación de la actividad de superóxido dismutasa de *D. magna* expuesta a diclofenaco

Se muestra el valor de la actividad de la SOD después de la exposición a $\frac{1}{10}$ CL₅₀ y CL₁ de

diclofenaco. (*) Indica diferencia estadística, $P < 0.05$ con respecto al testigo
(a) Indica diferencia estadística con respecto al grupo tratado con 9.96 mg/L de diclofenaco $P < 0.05$

En la Figura 8 se muestra la actividad de la CAT de *D. magna* expuesta a diclofenaco, donde se observó que ambas concentraciones indujeron un incremento de este parámetro respecto al testigo (9.96 mg/L= 187.4 %; 54.4 mg/L= 574.3 %) ($P < 0.05$), aunque solo estadísticamente significativo para la concentración de 54.4 mg/L.

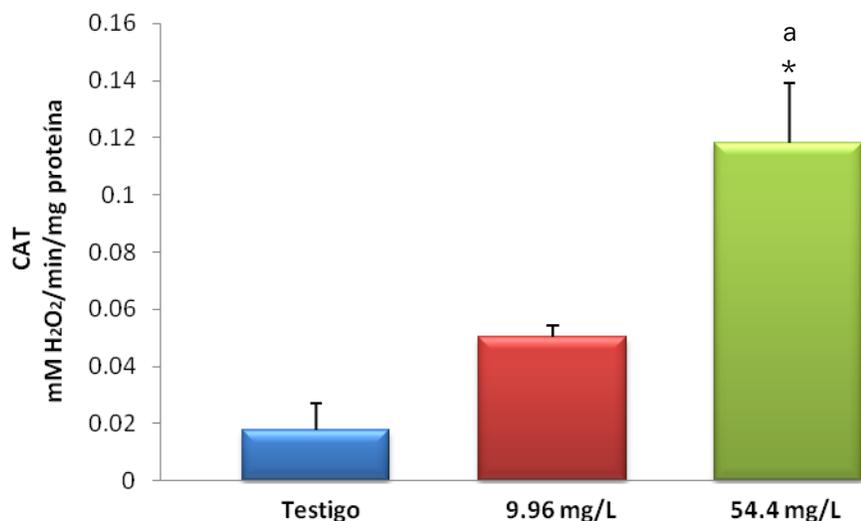


Figura 8. Determinación de la actividad de catalasa de *D. magna* expuesta a diclofenaco

Se presenta una tendencia al incremento del valor de la actividad de catalasa después de la exposición de 48 h a diclofenaco. (*) Indica diferencia estadística, $P < 0.05$ con respecto al testigo, (a) Indica diferencia estadística con respecto al grupo tratado con 9.96 mg/L de diclofenaco $P < 0.05$

En cuanto a la actividad de la GPx (Figura 9), se observa que en *D. magna* expuesta a 54.4 mg/L del fármaco se incrementa este parámetro (113.8 %) de manera significativa respecto al testigo ($P < 0.05$). Sin embargo, la exposición de este organismo a 9.96 mg/L, produjo una disminución (6.6 %), aunque sin significancia estadística.

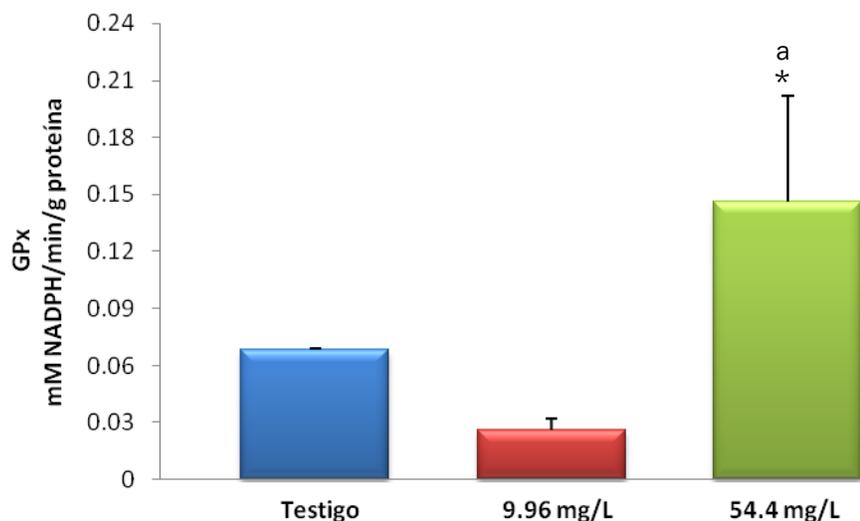


Figura 9. Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa de *D. magna* expuesta a diclofenaco

Se muestra los valores de la actividad de GPx (*) Indica diferencia estadística, $P < 0.05$ con respecto al testigo

(a) Indica diferencia estadística con respecto al grupo tratado con 9.96 mg/L de diclofenaco $P < 0.05$

3.2.1.3 Evaluación del contenido de proteínas carboniladas

En la Figura 10 se muestra la cantidad de proteínas carboniladas presentes en los organismos expuestos a diclofenaco. Como puede observarse, ambas concentraciones provocaron un incremento en el número de carbonilos protéicos (9.96 mg/L= 291.4 %; 54.4 mg/L= 1471.9 %). Sin embargo, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$) solo para *D. magna* expuesta a la concentración más elevada del fármaco.

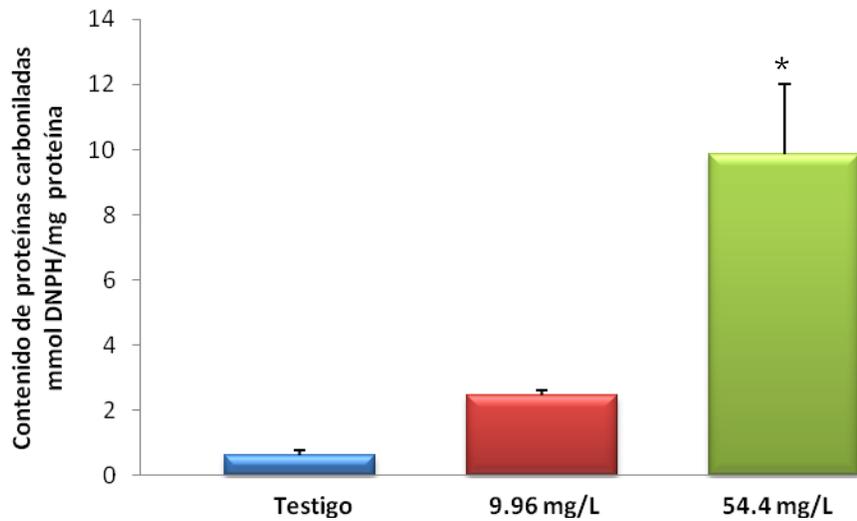


Figura 10. Determinación de proteínas carboniladas de *D. magna* expuesta a diclofenaco

Se presenta una tendencia al incremento de los valores del contenido de proteínas carboniladas de los grupos tratados. (*) Indica diferencia estadística, $P < 0.05$ con respecto al testigo

3.2.2 Evaluación del daño al material genético

3.2.2.1 Ensayo cometa

El daño al material genético se determinó mediante electroforesis celular (ensayo cometa). En la Figura 11 se observan las imágenes de una célula sana (A) y una dañada (B).

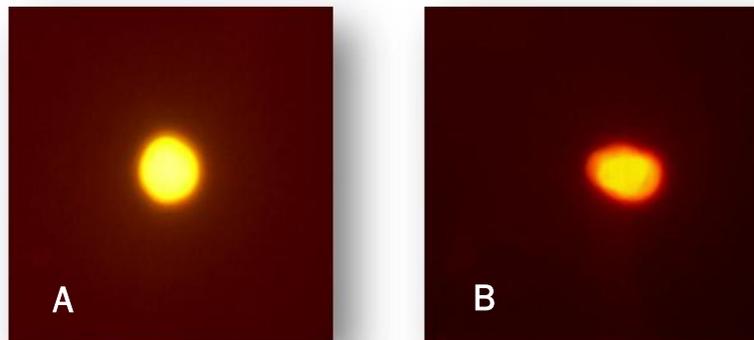


Figura 11. Imágenes de las células en el ensayo cometa

A: célula sin daño (testigo), B: célula con daño (CL₁)

En la figura 12 se observa el índice de daño producido al material genético de *D. magna* por diclofenaco. Ambas concentraciones probadas elevaron significativamente este parámetro respecto al testigo (9.96 mg/L= 9.4 %; 54.4 mg/L= 7.2 %) ($P < 0.05$).

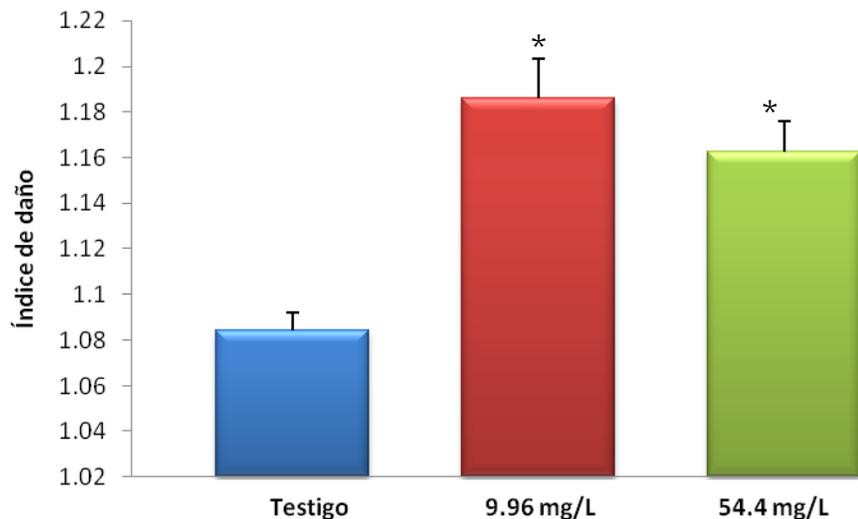


Figura 12. Índice del daño al DNA producido por diclofenaco sobre *D. magna*
Se muestra la relación (T/N) entre la longitud de la cola del cometa (T) y el diámetro del núcleo (N). (*) Indica diferencia estadística, $P < 0.05$ con respecto al testigo

3.2.2.2 Ensayo cometa adicionando endonucleasa

En la Figura 13 se observa el índice de daño producido al material genético de *D. magna* por diclofenaco, utilizando para su evaluación el ensayo de cometa adicionando ENDO. Ambas concentraciones probadas elevaron este parámetro respecto al testigo (9.96 mg/L= 6.4 %; 54.4 mg/L= 19.2 %), pero sólo la más elevada resultó estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

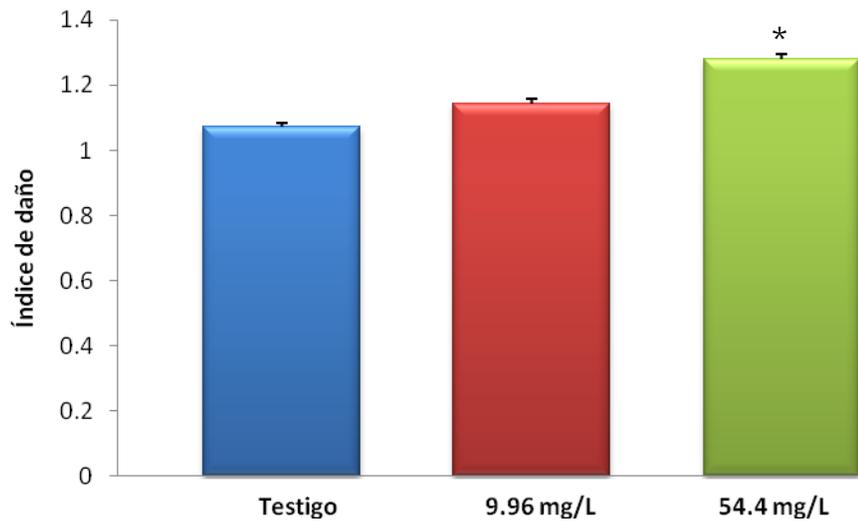


Figura 13. Índice del daño al DNA producido por diclofenaco sobre *D. magna* con la enzima ENDO¹

Se presenta la relación T/N de los grupos tratados con diclofenaco. (*) Indica diferencia estadística, $P < 0.05$ con respecto al testigo.

(a) Indica diferencia estadística con respecto al grupo tratado con 9.96 mg/L de diclofenaco $P < 0.05$. (¹) Endonucleasa

3.2.2.3 Ensayo cometa adicionando formamidopiridina glicosilada

En la Figura 14, se puede observar el índice de daño al DNA producido por el diclofenaco cuando se le adiciona la enzima FPG; ambos grupos presentaron un incremento significativo con respecto al grupo no tratado, pero no hay diferencia entre las dos concentraciones.

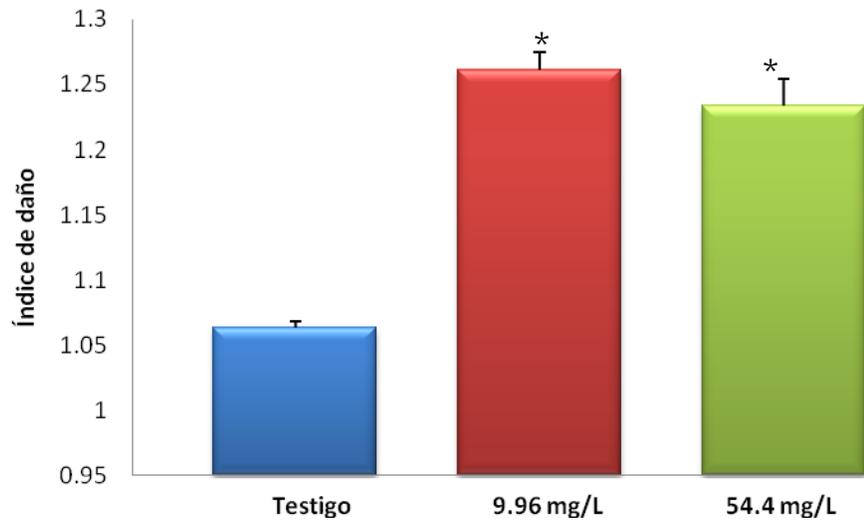


Figura 14. Índice del daño al material genético producido por diclofenaco sobre *D. magna* con la enzima FPG²

Se muestra el daño al material genético mediante el ensayo cometa. (*) Indica diferencia estadística, $P < 0.05$ con respecto al testigo

(²) Formamidopirimidina glicosilasa

IV. DISCUSIÓN

4.1 Estudio de toxicidad aguda

En el ensayo de toxicidad aguda se determinó la CL_{50} de diclofenaco sobre *D. magna*, tanto para neonatos como para adultos de 14 días, encontrándose que el valor obtenido para estos últimos es menor y por lo tanto el xenobiótico en estudio resulta más tóxico durante este estadio. De manera general se ha observado que los organismos más sensibles a cualquier tóxico son aquellos que se encuentran en los extremos de la vida, dado que los sistemas enzimáticos de los individuos más jóvenes no se encuentran totalmente desarrollados y de los viejos comienzan a fallar. Sin embargo, cuando los metabolitos son más tóxicos que el xenobiótico original, esta condición enzimática puede resultar favorable, dado que al no ser posible su completa y eficaz biotransformación dichos metabolitos no son obtenidos y por lo tanto su toxicidad decrece. Diversos estudios señalan que los metabolitos del diclofenaco (4´hidroxiciclofenaco, 5´hidroxiciclofenaco y diclofenaco-1-O-acilglucurónido, entre otros) son los responsables de su toxicidad en mamíferos (Grillo et al., 2003). Es probable que estos metabolitos también puedan ser producidos en especies no mamíferas, lo que explicaría los resultados obtenidos en el estudio agudo (Gómez-Lechón *et al*; 2003; Masubuchi *et al*; 2002).

Por otro lado, es importante mencionar que la legislación europea menciona que una sustancia puede ser potencialmente peligrosa para el ambiente, cuando en los ensayos agudos sobre *D. magna* se obtienen CE_{50} o CL_{50} menores a 100 mg/L, por lo que de acuerdo con los resultados obtenidos, el diclofenaco puede ser considerado como una sustancia potencialmente dañina para los organismos acuáticos, ya que el valor de CL_{50} para adultos de 14 días (96.6 mg/L) cumple con este requisito (Cleuvers, 2004; ECC, 1992). Otros autores han coincidido con esta consideración, tal es el caso de Jones *et al.*, (2002), quienes categorizaron como ambientalmente dañinos a los analgésicos, como el diclofenaco, dado que las CE_{50} obtenidas para este grupo de fármacos fluctuó entre 10 y 100 mg/L para crustáceos y peces. Por su parte, Cleuvers (2004), categorizó al diclofenaco como una sustancia de alto riesgo para *Daphnia magna*.

4.2 Estudio de toxicidad subletal

4.2.1 Evaluación del estrés oxidativo

En mamíferos el diclofenaco es biotransformado a diclofenaco-1-*O*-acilglucuronido y posteriormente mediante el CYP2C11, es hidroxilado produciendo 4'-hidroxidiclofenaco y 5'-hidroxidiclofenaco, que pueden ser oxidados a intermediarios de benzoquinona imina (Grillo *et al.*, 2003); un metabolito electrofílico que puede inducir la formación de ERO y RL y combinarse con grupos sulfhidrilo a nivel de citosol, proteínas de membrana o enzimas que contengan

estos grupos (Chilo, 1999). No se tienen reportes a este respecto en organismos acuáticos; sin embargo es posible que estos metabolitos también sean producidos en *D. magna*, lo que explicaría el incremento observado en el grado de lipoperoxidación.

Cada organismo cuenta con una batería de defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, las cuales previenen el daño ocasionado por la generación normal de ERO y RL evitando que afecten la integridad de las diferentes biomoléculas que lo conforman. Estas defensas, pueden ser inducidas por varios contaminantes ambientales (Vlahogianni *et al.*, 2007) bajo condiciones prooxidantes, como en el caso de la presencia de los metabolitos del diclofenaco.

La SOD es la principal enzima encargada de contrarrestar los efectos ocasionados por la presencia de ERO, particularmente del ión superóxido (van der Oost *et al.* 2003), a quien transforma a peróxido de hidrógeno y una mayor actividad de ésta puede funcionar como señal de estrés oxidativo, conduciendo a la inducción de enzimas antioxidantes asociadas a un sistema de captura de H₂O₂, como la CAT y la GPx (Konigsberg, 2008). Es posible que el incremento de la actividad de SOD, CAT y GPx encontrado en nuestro estudio se deba a un mecanismo de defensa de *D. magna* a fin de contrarrestar el estrés oxidativo (Vlahogianni *et al.* 2007). Además, Bagnyukova *et al.* (2006), mencionan que los productos de la lipoperoxidación parecen estar involucrados en la regulación de algunas enzimas antioxidantes, por lo que el incremento del grado de lipoperoxidación mostrado en

nuestro estudio explicaría también el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes encontrado, sobre todo en los organismos expuestos a la concentración más alta de diclofenaco y que presentaron diferencia significativa respecto al testigo.

Es importante mencionar que la GPx mostró una tendencia a la disminución de su actividad cuando el organismo se expuso a la concentración más baja de diclofenaco, aunque sin diferencia significativa respecto al testigo. Chadran *et al.*, (2005) mencionan que las ERO, especialmente el ión superóxido, afectan directamente la actividad de las enzimas antioxidantes, modificando su estructura (Koyu *et al.*, 2005), lo que explicaría la disminución observada en este estudio.

El daño directo a las proteínas o la modificación química de sus aminoácidos producido por estrés oxidativo puede dar lugar a un incremento en el contenido de proteínas carboniladas (Parvez y Raisuddin, 2005; Bagnyukova *et al.*, 2006) y por lo tanto de las proteínas oxidadas (Shacter, 2000). La oxidación de proteínas trae como consecuencia la pérdida de grupos sulfhídricos y reacomodo en la resonancia de los aminoácidos, modificando su función y por lo tanto la integridad del organismo (Parvez y Raisuddin, 2005). Como ya se mencionó anteriormente, el diclofenaco puede ser transformado a 4'hidroxiciclofenaco y 5'hidroxiciclofenaco y posteriormente biotransformarse a benzoquinonas (Grillo *et al.*, 2003); un metabolito electrofílico que puede inducir la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y también combinarse con grupos sulfhidrico a nivel de

citosol, proteínas de membrana o enzimas que contengan estos grupos (Chilo, 1999), lo que explica el incremento encontrado en el contenido de proteínas carboniladas de nuestro estudio.

4.2.2 Evaluación del daño al material genético

Son pocos los estudios relativos a la toxicidad ambiental producida por fármacos y más aún relacionados con el daño al material genético. Uno de los pocos trabajos corresponde al de Zegura *et al.*, (2009), quienes encontraron que efluentes provenientes de una zona de hospitales en Eslovaquia, que contenían una mezcla de diversos fármacos, produjeron genotoxicidad. Sin embargo, no se han reportado aún datos específicos sobre algún fármaco en particular.

El ensayo cometa permite detectar rupturas de una sola hebra del DNA, formación de aductos, uniones DNA-DNA y DNA-proteína, daño oxidativo de bases y sitios de reparación (Mihaljevic *et al.*, 2009; Ali, *et al.*, 2008; Fourie *et al.*, 2007) ocasionados por la interacción con xenobióticos y/o ERO y RL producidos por estos. Este tipo de ensayo fue empleado en nuestro estudio para evaluar la genotoxicidad del diclofenaco sobre *D. magna*, mostrando un incremento en el índice de daño y migración del DNA.

Diversos estudios señalan a la producción de ERO y RL como uno de los mecanismos de fragmentación del DNA, ya que tienen la capacidad de unirse al

material genético, provocando directamente su desestabilización y ruptura, o bien a las diversas enzimas encargadas de su síntesis y reparación (Valavanidis *et al.*, 2006; van der Oost, 2003). En este estudio se observó que en efecto el diclofenaco produce estrés oxidativo, elevando el grado de lipoperoxidación y el contenido de proteínas carboniladas, por lo que es posible que los RL generados, también afecten al material genético. Adicionalmente se ha demostrado que este fármaco se biotransforma por vía oxidativa generando ERO (Gómez-Lechon *et al.*, 2003; Masubuchi *et al.*, 2002), que pueden afectar al esqueleto de la desoxirribosa y producir rupturas en la cadena debido a la abstracción de un hidrógeno del azúcar y la ruptura de la unión fosfodiéster (Gregus y Klassen, 2001).

En el presente estudio para hacer más específico el ensayo cometa se introdujeron dos enzimas, las cuales identifican los nucleótidos dañados por especies oxidantes; la ENDO que detecta la oxidación de bases pirimídicas y la FPG que identifica el producto mayoritario de la oxidación de las bases púricas, la 8-oxoguanina, así como otras alteraciones púricas (Collins, 2008; Ahuja y Saran, 2001). El ensayo con ambas enzimas y concentraciones probadas mostró incrementos en el índice de daño, lo que demuestra que tanto las bases pirimídicas como las púricas se vieron afectadas.

En este sentido, otro radical posiblemente involucrado es el hidroxilo, que puede modificar a las bases púricas produciendo alteraciones oxidativas tales como la 8-hidroxi guanina, las formamidopiridinas y los desoxirribonucleósidos de 8,5'

ciclopurina, provocando un mal emparejamiento de las bases (adenina-guanina) o la presencia de sitios apurínicos, los cuales impiden la actividad de la DNA polimerasa evitando la replicación. Otro tipo de alteraciones y que también se detectaron de forma indirecta en los organismos tratados con diclofenaco fueron las alteraciones pirimídicas, las cuales se caracterizan por la pérdida del anillo imidazol, no permitiéndoles emparejarse correctamente, facilitando la fragmentación del DNA (Gregus y Klassen, 2001; Roche y Romero-Alvira, 1996).

Los resultados del estudio demuestran que el diclofenaco produce estrés oxidativo y daño al material genético de *D. magna*. Estos efectos pueden influir en el individuo iniciando una cascada de modificaciones que pueden tener consecuencias a diferentes niveles; celular, órgano, organismo y finalmente en la constitución genética de la comunidad y de la población (Park y Choi, 2007; Mihaljevic *et al.*, 2009). Considerando que este tipo de organismo es fundamental para los ecosistemas acuáticos, dado que es uno de los principales consumidores primarios, este medicamento debería ser calificado como ecotóxico y su incorporación al ambiente legislada.

V. CONCLUSIONES

- Con base en los resultados obtenidos del estudio de toxicidad aguda y a la clasificación europea, que considera peligroso ambientalmente a aquellos fármacos cuya CL₅₀ sea menor a 100 mg/L, el diclofenaco puede ser considerado dañino para los ecosistemas acuáticos, dado que la CL₅₀ para adultos de 14 días fue de 96.6 mg/L.
- El diclofenaco produce estrés oxidativo concentración dependiente sobre *D. magna*, reflejándose en un incremento en el grado de lipoperoxidación, contenido de proteínas carboniladas y actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx.
- El diclofenaco induce daño al DNA de *D. magna*, probablemente vía especies reactivas de oxígeno.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja Y, Saran R. 2001. Potential of single cell gel electrophoresis assay (comet assay) in heavy ion radiation biology. *Indian Journal of Human Genetics*, 1(2): 151-156.
- Ali D, Nagpure N, Kumar S, Kumar R, Kushwaha. 2008. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single. Cell gel electrophoresis. *Chemosphere*, 71: 1823-1831.
- APHA (American Public Health Association). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Ap. 8010G. Washington D.C. pp 8-20, 8-23.
- Bagnyukova T, Chahrak O, Lushchak V. 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquatic Toxicology*, 78: 325-331.
- Borgmann U, Bennio D, Ball A, Palabrica V. 2007. Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations. *Chemosphere*, 66: 1278-1283.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Buege J, Aust S. 1979. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52: 302-310.
- Carlsson C, Johansson A, Alvan G, Bergman, Kuhler T. 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of the Total Environment*, 364: 67–87.
- Cleuvers M. 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59: 309-315.

- Chandran K, Sivakumar R, Monadas A, Aruchami S. 2005. Effect cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod *Achamtia fulica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140: 422-426.
- Chilo N. 1999. El citocromo P450 y su rol en la hepatotoxicidad inducida por drogas. *Enfermedades del aparato respiratorio*, 2(2): 34-37.
- Collins A. 2008. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26: 249-261.
- Díaz M, Granados Y, Ronco A. 2007. Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*. Internacional Development Research Center. Disponible en http://www.idrc.ca/en/ev-84464-201-1-DO_TOPIC.html (citado 12/08/07)
- Dipiro J. 2001. *Pharmacist's Drug Handbook*, American Society of Health System Pharmacists, Springhouse. USA. pp 381–382.
- ECC (Commission of the European Communities).1992. Methods for Determination of Ecotoxicity; Annex V, C.2, *Daphnia*, Acute Toxicity to *Daphnia*. L 383A, EEC Directive 92/69/EEC. 172–178.
- Eissa L, Salibian A, Ferrari L, Porta P, Borgnia M. 2003. Evaluación toxicología no invasiva del Cadmio: modificaciones de biomarcadores conductuales en *Cyprinus Carpio*. *Biología Acuática*, 20: 221.
- EMEA (European Agency for the Evaluation of Medical Products). 2006. Guidance on environmental risk assessment of medicinal products for human use. CPMP/SWP/4447/00, London UK.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1996. Ecological effects test guidelines - aquatic invertebrate acute toxicity test, freshwater *Daphnids*. OPPTS 850.1010.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2006. Methods for measuring the acute toxicity effluents and receiving waters to freshwater and marine organism. Environmental protection agency office of water. 5th ed. USA. EPA-821-R-02-012
- Escher B, Bramaz N, Eggen R, Richter M. 2005. Monitoring the removal efficiency of pharmaceuticals and hormones in different treatment

- processes of source-separated urine with bioassays. *Environment Science Technology*, 39(9): 3090-3100.
- Espina S, Vanegas C. 1996. Ecotoxicología y contaminación. En: *Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias*. A. V.
- Fent K, Escher C, Caminada D. 2006a. Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene systems. *Reproductive Toxicology*, 22: 175–185.
- Fent K, Weston A, Caminada D. 2006b. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76: 122–159.
- Floor E, Wetzel G. 1998. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenyl hydrazine assay. *Journal of Neurochemistry*, 70: 268-275.
- Fourie F, Reinecke S, Reinecke A. 2007. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 361-368.
- Gómez-Lechón M, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Castell J, Jover R. 2003. Diclofenac induces in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochemical Pharmacology*, 66: 2155-2167.
- Gómez-Oliván L, Carmona-Zepeda F, Galar-Martínez M, Téllez-López A, Amaya-Chávez A. 2009. Estudio de automedicación en una farmacia comunitaria de la ciudad de Toluca. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(1): 5-11.
- Gregus Z, Klaassen C. 2001. Mecanismos de toxicidad. En: *Manual de toxicología*, 5ª ed, Mc Graw Hill, México DF. pp 461 – 462
- Grillo M, Hua F, Knutson G, Ware A, Li C, 2003. Mechanistic studies on the bioactivation of diclofenac: Identification of diclofenac-S-acyl-glutathione in vitro in incubations with rat and human hepatocytes. *Chemical Research in Toxicology*, 16: 1410-1417.
- Gurr C, Reinhard M. 2006. Harnessing natural attenuation of

- pharmaceuticals and hormones in rivers. *Environmental Science and Technology*, 272-276.
- Hangsber W. 2002. *Biología de las especies de oxígeno reactivas*. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. 24:19-54.
- Han H, Han K, Kyeong P, Sung-Kyu L, Man G. 2007. Analysis of the effects diclofenac on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere*, 67: 2115-2121.
- Heckmann H, Callaghan A, Hooper H, Connona R, Hutchinson T, Maund S, Sibly R. 2007. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters*, 172: 137–145.
- Jemba P. 2006. Excretion and ecotoxicology of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63:113-130.
- Jones O, Voulvoulis N, Lester J. 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*, 36: 5013-5022.
- Jones O, Voulvoulis N, Lester J. 2004. Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment. *Critical Reviews in Toxicology*, 34(4): 335–350.
- Konigsberg M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Editorial el manual moderno. México.
- Kummerer K. 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere*, 45: 957–969.
- Lange R, Dietrich D. 2002. Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substance – conceptual considerations. *Toxicology Letters*, 131: 97-104.

- Lankoff A, Banasik A, Duma A, Ochniak E, Lisowska H, Kuszewski T, Gozdz S, Wojcik A. 2006. A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology Letters*, 161: 27-36.
- Levine R, Williams J, Stadtman E, Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233: 346-57.
- Martínez C, Blanco G, García-Martín E, G-Agúndez J. 2006. Farmacogenómica clínica de CYP2C8 y CYP2C9: conceptos generales y aplicación al uso de AINE. *Farmacia Hospitalaria*, 30: 240-248.
- Masubuchi Y, Nakayama S, Horie T. 2002. Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatotoxicity in rats. *Hepatology*, 35: 544-51.
- Mihaljevic Z, Ternjej I, Stankovic I, Kerovec M, Kopjar N. 2009. Application of the comet assay and detection of DNA damage in haemocytes of medicinal leech affected by aluminium pollution: a case study. *Environmental Pollution*, 157: 1565-1572.
- Misra P, Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *Biological Chemistry*, 247:3170-3175.
- Moreno G. 2003. Toxicología ambiental evaluación de riesgo para la salud humana, Mc Graw Hill, España. pp 370.
- Mount D, Brungs W. 1967. A simplified dosing apparatus for fish toxicological studies. *Water Research*, 1: 21–29.
- Nentwing G. 2007. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: the antidepressant drug fluoxetine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52: 163–170.
- NMX-AA-087-1995-SCFI. Análisis de agua– Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna* Status (Crustácea–Cladócer) – Método de prueba.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004. Guideline for Testing of Chemicals, 202, *Daphnia sp.*, Acute

- immobilization test. Environment Directorate. Paris.
- O'Connor D. 1994. Toxic Pollution and its Impact on Receiving Waters. In: Water quality prevention identification and management of diffuse pollution. New York, EU. pp 1054.
- Paggi J, Paggi S. 2007. *Daphnia magna*: "El canario de las aguas". Instituto Nacional de Limnología (INALI). Santa Fe. Disponible en: <http://www.ceride.gov.ar/servicios/comunica/canario.htm> (citado 14/08/07).
- Park S, Choi J. 2007. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environment International*, 33: 817-822.
- Parvez S, Raisuddin S. 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20: 112-117.
- Roberts J, Morrow J. 2007. Analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios, y fármacos antigotosos. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 11ª ed, Mac Graw Hill, México DF. pp 698-699.
- Roche E, Romero-Alvira R. 1996. Alteraciones del ADN inducidas por el estrés oxidativo. *Medicina Clínica*, 106: 144-153.
- Radi R, Turrens J, Chang Y, Bush M, Capro D, Freeman A. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Biological Chemistry*, 22: 20028-22034.
- Rodríguez J, Menéndez J, Trujillo Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana Médica Militar*, 30(1): 34-44.
- SAGAN. Contaminación del agua. Disponible en: http://www.sagan-gea.org/hojared_AGUA/paginas/17agua.html (citado 08/08/2007)
- Schwaiger J, Ferling H, Mallowa U, Wintermayr H, Negele R. 2004 Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenaco. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout.

- Aquatic Toxicology, 68: 141–150.
- Seiler J. 2002. Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology – can the two be connected. *Toxicology Letters*, 131: 105–115.
- SEMARNAT (Secretaría de medio ambiente y recursos naturales). 2007. Página de la Semarnat, Comisión Nacional del Agua (CNA). (citado 08/08/2007). Disponible en: <http://www.infoagua.org/cuanta-agua-tiene-mexico.htm>.
- Shacter E. 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, 32: 307-326.
- Snyder E, Pleus R, Snyder S. 2005. Pharmaceuticas and EDCS in the US water industry-an update. *American Water Works Association*, 11: 32-36.
- Stein J. 1973. Handbook of phycological methods. Culture methods of growth measurements. Cambridge University Press.
- Stephense E, Savarsosn J, Ericsson G, Adolfsson-Erici M, Farlin I. 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Ireland. *Aquatic Toxicology*, 48:431–442.
- Ternes T, Siegrist H, Joss A. 2004. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environmental Science and Technology*, 393A-399A.
- Tice R, Anderson D, Burlinson D, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, Sasaki F. 2000. The single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221
- Timofeyey M, Shatilina Z, Kolesnichenko A, Bedulina D, Kolesnicheko A. 2006. Natural organic matter (NOM) induces oxidative stress in freshwater amphipods *Gammarus lacustris* Sars and *Gammarus tigrinus*. *Science of the Total Environmental*, 366: 673-681.
- Toledo A. 2002. El agua en México y el mundo. *Gaceta Ecológica*. Instituto Nacional de Ecología. DF, México. 64: 9-18.

- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecology and Environmental Safety*, 64: 178-189.
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.
- Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M, Valavanidis A. 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin*, 54, 1361
- Wang L, Yin S, Wang H, Chen L, Sun L. 2008. The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70 (3): 483-489.
- Zegura B, Heath E, Cernosa a, Filioic M. 2009. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere*, 75: 1453-1460.
- Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R, Reitano G, Bagnati R, Chiabrando C, Pomati F, Rossetti C, Calamari D. 2006. Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control. *Environmental Science and Pollution Research*, 13: 15–21.

VII. Anexos

Anexo 1. Formulación para preparar agua dulce reconstituida dura, de empleo como medio de cultivo y como agua de dilución para estudios de toxicología acuática.

Reactivos grado analítico, en agua destilada o desionizada	Cantidad (mg/L)
NaHCO ₃	192
CaSO ₄ .2H ₂ O	120
MgSO ₄	120
KCl	8

Las características finales deben ser:

- pH entre 7.6 a 7.8 (después de 24 horas de aireación)
- Dureza 160 a 180 mg/L de CaCO₃

Anexo 2. Preparación del medio de cultivo basal de Bold y cultivo de *Chlorella vulgaris* (Stein, 1973)

Reactivos grado analítico	Soluciones stock en 500 mL de agua destilada
1) NaNO ₃	12.5 g
2) CaCl ₂ .2H ₂ O	1.25 g
3) MgSO ₄ .7H ₂ O	3.75 g
4) K ₂ HPO ₄ (dibásico)	3.75 g
5) KH ₂ PO ₄ (monobásico)	8.75 g
6) NaCl	1.25 g
7) EDTA y KOH	25 g y 15.5 g
8) FeSO ₄ y H ₂ SO ₄	2.445 g y 0.5 mL
9) H ₃ BO ₃	5.71 g
10) NaHCO ₃	7.50 g
11) Solución de sales	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4.41 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.72 g
MoO ₃ (VI)	0.355 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.785 g
Co(NO ₃).6H ₂ O	0.245

Adicionar 10 mL de las soluciones 1,2,3,4,5 y 6 y 1 mL de las soluciones 7,8,9,10 y de la solución de sales 11. Aforar a 1 L con agua desionizada. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 a 20 PSI durante 15 min.

Para el cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*, se adicionó un inculo en condiciones asépticas y se cultivó por lotes, en matraces Erlenmeyer de 2,000 mL con 1,000 mL de volumen de trabajo, con fotoperiodo de 16 de luz por 8 de obscuridad hasta que llegó a su fase de crecimiento exponencial (8 a 10 días), después se sedimentó y se determinó la densidad celular utilizando cámara de Neubauer, se agregó 1×10^6 cél/mL al medio de cultivo.

Anexo 3. Determinación de la concentración de proteínas totales (Método de Bradford, 1976)

A 25 μL del sobrenadante se le agregó 75 μL de agua desionizada y 2.5 mL del reactivo de Bradford (0.5 g de azul de commassine, 25 mL de etanol al 96% y 50 mL de H_3PO_4 en 500 mL de agua desionizada). Se agitó, se dejó reposar por 5 min y se determinó la absorbancia a 595 nm. Las lecturas de las muestras se extrapolaron en la curva que se obtuvo utilizando los datos de la tabla 4.

Tabla 4. Curva para la determinación de proteínas totales

Tubo	Volumen de Albúmina (μL)*	Volumen de agua desionizada (μL)
1	10	90
2	25	75
3	50	50
4	75	25
5	100	0
Blanco	0	100

* de una solución de albúmina de bovina de 1 mg/mL