



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE EFLUENTES
PROVENIENTES DE UNA INDUSTRIA FARMACÉUTICA
SOBRE *Cyprinus carpio*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

QFB. NELY SAN JUAN REYES

DIRIGIDO POR:

DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN

DRA. MARCELA GALAR MARTÍNEZ

DRA. PATRICIA VIEYRA REYES



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, 15 DE JULIO DE 2013.



Universidad Autónoma del Estado de México
UAEM

3° (EV. DE GRADO)
OFICIO NO 169/2013

Toluca, México, 07 de mayo de 2013

P. DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
NELY SAN JUAN REYES
FACULTAD DE QUIMICA
P R E S E N T E

La que suscribe Directora de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

Dr. Leobardo Manuel Gómez Olivan
PRESIDENTE

FIRMA

Dr. Enrique Morales Avila
SECRETARIO

Dra. Sandra García Medina
PRIMER VOCAL

Dra. Marcela Galar Martínez
SEGUNDO VOCAL

Dra. Angeluz Olvera Velona
TERCER VOCAL

M. en C.Q. Hariz Islas Flores
SUPLENTE

Dra. Eneida del Socorro Camarillo Romero
SUPLENTE

A T E N T A M E N T E
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2013, 50 Aniversario Luctuoso del Poeta Heriberto Enriquez"

M. en A.P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARIA GONZALEZ
DIRECTORA



U. A. E. M.
FACULTAD DE QUIMICA
DIRECCION



Gracias al CONACYT por la beca otorgada

Este trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto 151665), así como de la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN) Proyecto 20121226

GRACIAS...

A mi COMITÉ DE TUTORES:

Al Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván, Dra. Marcela Garlar Martínez
y a la Dra. Patricia Vieyra Reyes, por compartir sus conocimientos y
gran experiencia para la realización de este trabajo de investigación

AI EQUIPO DE INVESTIGACIÓN DEL LABORATORIO
DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

Daniel, Luis Ángel, Gris, Edgar, Bella, Luis Antonio, Nadia y en especial a Hariz
por su apoyo y valiosa ayuda

A Esmeralda... por su gran apoyo y amistad

DEDICADA...

A Dios:

Por darme la oportunidad de existir y estar en este mundo
para compartir mis logros con mis seres queridos

A mis PADRES:

Lucas e Isabel porque son el ejemplo más claro a seguir

A mis HERMANOS:

Jorge Luis, Sindy y Alejandro por su amor, apoyo y tolerancia

A ABRAHAM:

Por estar en cada momento conmigo

ÍNDICE

	PÁGINAS
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ABREVIATURAS	4
CAPÍTULO 1 “PROTOCOLO DE TESIS”	
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	11
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24
6. METODOLOGÍA	25
6.1 Organismo de prueba	25
6.2 Preparación del medio sintético para mantenimiento de <i>Cyprinus carpio</i>	25
6.2.1 Caracterización fisicoquímica del medio sintético para mantenimiento de <i>Cyprinus carpio</i>	26
6.3 Muestreo de los efluentes	26
6.4 Determinación de la toxicidad aguda	26
6.5 Evaluación de la toxicidad a través de biomarcadores de estrés oxidativo	27
6.5.1 Determinación del contenido de hidroperóxidos	27

6.5.2 Determinación del grado de lipoperoxidación	28
6.5.3 Determinación de proteínas carboniladas	28
6.5.4 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa	28
6.5.5 Determinación de la actividad de la catalasa	29
6.5.6 Determinación de glutatión peroxidasa	29
6.5.7 Determinación de la concentración de proteínas	30
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30

CAPÍTULO 2 “DISCUSIÓN DE RESULTADOS”

8. ARTÍCULO	32
9. CONCLUSIONES	76
10. PERSPECTIVAS	76
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINAS
Figura 1	Principales rutas de entrada de los productos farmacéuticos a las aguas residuales y al medio ambiente	12
Figura 2	Mecanismo de producción y neutralización de especies reactivas de oxígeno por las enzimas antioxidantes.	22

ABREVIATURAS

AINEs	antiinflamatorios no esteroideos
ADN	ácido desoxirribonucleico
ANOVA	análisis de varianza
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
CAT	Catalasa
CE ₅₀	concentración efectiva 50
CEM	coeficiente de extinción molar
CHP	contenido de hidroperóxidos
CL ₅₀	concentración letal 50
COX	Ciclooxigenasa
CPC	contenido de proteínas carboniladas
DBSS	dodecil bencen sulfonato de sodio
DNPH	2,4-dinitrofenilhidracina
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EO	estrés oxidativo
EROs	especies reactivas de oxígeno
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
GST	glutación-S-transferasa
HEPES	4 (2-hidroxietil) - 1 ácido piperazina etano sulfónico
HPC	hidroperóxido de cumeno
LOAEL	nivel mínimo de efectos adversos observables
LPX	Lipoperoxidación
MDA	Malondialdehído
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

PBS	amortiguador de fosfatos salino
pH	potencial de hidrógeno
PT	proteínas totales
PTAR	plantas de tratamiento de aguas residuales
RL	radicales libres
SOD	superóxido dismutasa
UI	unidades internacionales

CAPÍTULO 1
“PROTOCOLO DE TESIS”

RESUMEN

El agua es indispensable en la vida de cualquier organismo, sin embargo, ésta puede estar contaminada por la presencia de diversas sustancias tales como metales pesados, plaguicidas, hidrocarburos, solventes (etanol), detergentes (DBSS) y productos farmacéuticos, los cuales llegan a los cuerpos de agua a través de efluentes municipales, hospitalarios e industriales. En la práctica médica se emplean diferentes medicamentos, como: antibióticos, agentes citostáticos, beta-bloqueadores, antiepilépticos, AINEs, entre otros. Éstos constituyen uno de los grupos farmacológicos que más se utilizan ya que se venden sin receta médica, por lo que el consumo es sin duda aún mayor, como resultado de ello, ha aumentado la producción de AINEs en la industria farmacéutica. Estos compuestos sufren transformaciones en el ambiente ya sea por hidrólisis, fotólisis, cambios de pH y temperatura, además se biotransforman en el organismo. Diversos estudios han demostrado que los AINEs, no se eliminan en los tratamientos convencionales que utilizan las PTAR y representan una contribución continua al ambiente, ocasionando efectos significativos en la biota. El presente trabajo evaluó la toxicidad de efluentes provenientes de una industria farmacéutica sobre *Cyprinus carpio*. Se determinó la CL_{50} del efluente, y posteriormente el valor del LOAEL, se expusieron a las carpas a este valor a una cinética de 12, 24, 48, 72 y 96 h y se evaluaron los siguientes biomarcadores de EO en branquias, cerebro, hígado y sangre: CHP (Jiang et al., 1992), grado de LPX (Büege y Aust, 1978), CPC (Levine et al., 1994; Parvez y Raisuddin, 2005; Burcham, 2007). Así mismo, se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes: SOD (Misra y Fridovich, 1972), CAT (Radi et al., 1991) y GPx (Gunzler y Flohe-Clairborne, 1985; Stephensen et al., 2000). La información obtenida permitió la caracterización del daño a biomoléculas como lípidos y proteínas en branquias, cerebro, hígado y sangre, que produjeron los AINEs en combinación con DBSS y etanol de efluentes provenientes de una industria farmacéutica, sobre una especie de interés comercial en México como lo es *Cyprinus carpio*.

ABSTRACT

Water is essential in the life of any organism, however, it may be contaminated by the presence of various substances such as heavy metals, pesticides, hydrocarbons, solvents (ethanol), detergents [sodium dodecyl benzene sulfonate (SDBS)] and pharmaceutical products which reach water bodies through the discharge of municipal, hospital and industrial effluents. Medical practice using different drugs, such as antibiotics, cytostatic agents, beta-blockers, antiepileptic drugs, nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs), among others. These groups are one of the most frequently sold and used medicinal agent groups and they are sold without prescription, so that consumption is even higher as a result, has increased production of NSAIDs in the pharmaceutical industry. These compounds are influenced by changes in the environment either by hydrolysis, photolysis, pH and temperature changes, and are biotransformed in the body. Several studies have shown that NSAIDs are not removed in conventional treatments used by waste water treatment plants (WWTPs) and represent a continuing contribution to the environment, resulting in significant effects on the biota.

This study aimed at evaluating the toxicity of effluents from pharmaceutical industry on *Cyprinus carpio*. The median lethal concentration (LC_{50}) and subsequently the lowest observed adverse effect level (LOAEL) were determined. Carp were exposed to the latter value for different exposure periods (12, 24, 48, 72 and 96 h) and the following biomarkers of oxidative stress (OS) were evaluated in gill, brain, liver and blood: hydroperoxide content (HPC) (Jiang et al. 1992), lipid peroxidation (LPX) (Büege and Aust 1978), protein carbonyl content (PCC) (Levine et al. 1994; Parvez and Raisuddin 2005 Burcham 2007), and the activity of the superoxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) (Misra and Fridovich 1972), catalase (CAT) (Radi et al. 1991) and glutathione peroxidase (GPx) (Gunzler and Claiborne Flohe-1985; Stephensen et al. 2000). The information obtained allowed the characterization of damage to lipids and proteins in gills, brain, liver and blood, that produced NSAIDs in combination with SDBS and ethanol of pharmaceutical industry effluents, on a fish of commercial interest in Mexico such as *Cyprinus carpio*.

1. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural indispensable para la vida humana, sin embargo la calidad de la misma se ha alterado por la presencia de diversos contaminantes como plaguicidas, hidrocarburos, productos para cuidado personal, detergentes (DBSS), solventes (etanol) y fármacos, que tienen como destino final a los cuerpos de agua (Zuccato et al., 2005).

Dentro de los fármacos más comúnmente encontrados en cuerpos de agua se encuentran los AINEs, un grupo heterogéneo de fármacos con propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, entre los que destacan el paracetamol, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno. En México, los AINEs son uno de los grupos más vendidos y más utilizados (Gómez-Oliván et al., 2009), éstos se encuentran en varias formas farmacéuticas y se usan de forma irracional ya que se venden sin receta médica.

Estos compuestos sufren transformaciones en el ambiente principalmente por fotólisis, lo que da lugar a la formación de productos aún más tóxicos y que son también de preocupación ambiental (Lam et al., 2004). Los efluentes han sido identificados como la principal vía de entrada de los productos farmacéuticos en el ambiente acuático (Jones et al., 2001) y los organismos que ahí habitan son los más susceptibles a los efectos tóxicos, ya que están expuestos continuamente a las descargas de aguas residuales durante todo su ciclo de vida (Fent et al., 2006).

Estos efectos tóxicos se producen debido a que los contaminantes químicos son una fuente importante de producción de EROs en los sistemas biológicos. La exposición a xenobióticos produce un desequilibrio bioquímico entre la producción de EROs y los sistemas antioxidantes, a lo cual se le conoce como EO (Vlahogianni et al., 2007; Sohal et al., 2002; Finkel y Holbrook, 2000), sin embargo, los organismos han desarrollado mecanismos de defensa antioxidante destinados a prevenir el daño celular por las EROs.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad de efluentes provenientes de una industria farmacéutica sobre *Cyprinus carpio*, a través de pruebas de estrés oxidativo.

La información generada en este estudio permitió la caracterización del daño a biomoléculas como lípidos y proteínas en branquias, cerebro, hígado y sangre, que produjeron los AINEs en combinación con DBSS y etanol de efluentes provenientes de una industria farmacéutica, sobre *Cyprinus carpio*, especie de gran importancia comercial en México.

2. ANTECEDENTES

El agua es considerada como fuente de vida debido a que es esencial en los procesos biológicos, además es importante en la alimentación, higiene y las actividades del ser humano y ha sido siempre el principal vehículo empleado por el hombre para la eliminación de los residuos generados por su actividad (Monforte y Cantú, 2009).

El desarrollo de la sociedad conlleva al incremento de la actividad industrial y, por consiguiente, a la creación de una gran cantidad de sustancias químicas como plaguicidas, hidrocarburos, productos para cuidado personal, alcoholes, detergentes y fármacos (Zuccato et al., 2005). Los efluentes han sido identificados como la principal vía de entrada de los productos farmacéuticos en el ambiente acuático (Jones et al., 2001).

Un efluente está definido como el vertido de líquidos de desecho, generados por diversas actividades humanas, hacia sistemas colectores o directamente a masas o corrientes de agua (Jaquenod de Zsögön, 2007).

La industria farmacéutica genera gran cantidad de aguas residuales de características y concentraciones variables, que están en función de los procesos de fabricación utilizados y la estación del año. Los efluentes que se generan provienen principalmente del lavado de los equipos (Figura 1) (Balçioğlu y Ötker, 2003), donde además de los residuos del fármaco producido, también se incluyen otro tipo de compuestos utilizados en este proceso como los detergentes como el DBSS y los solventes (etanol).

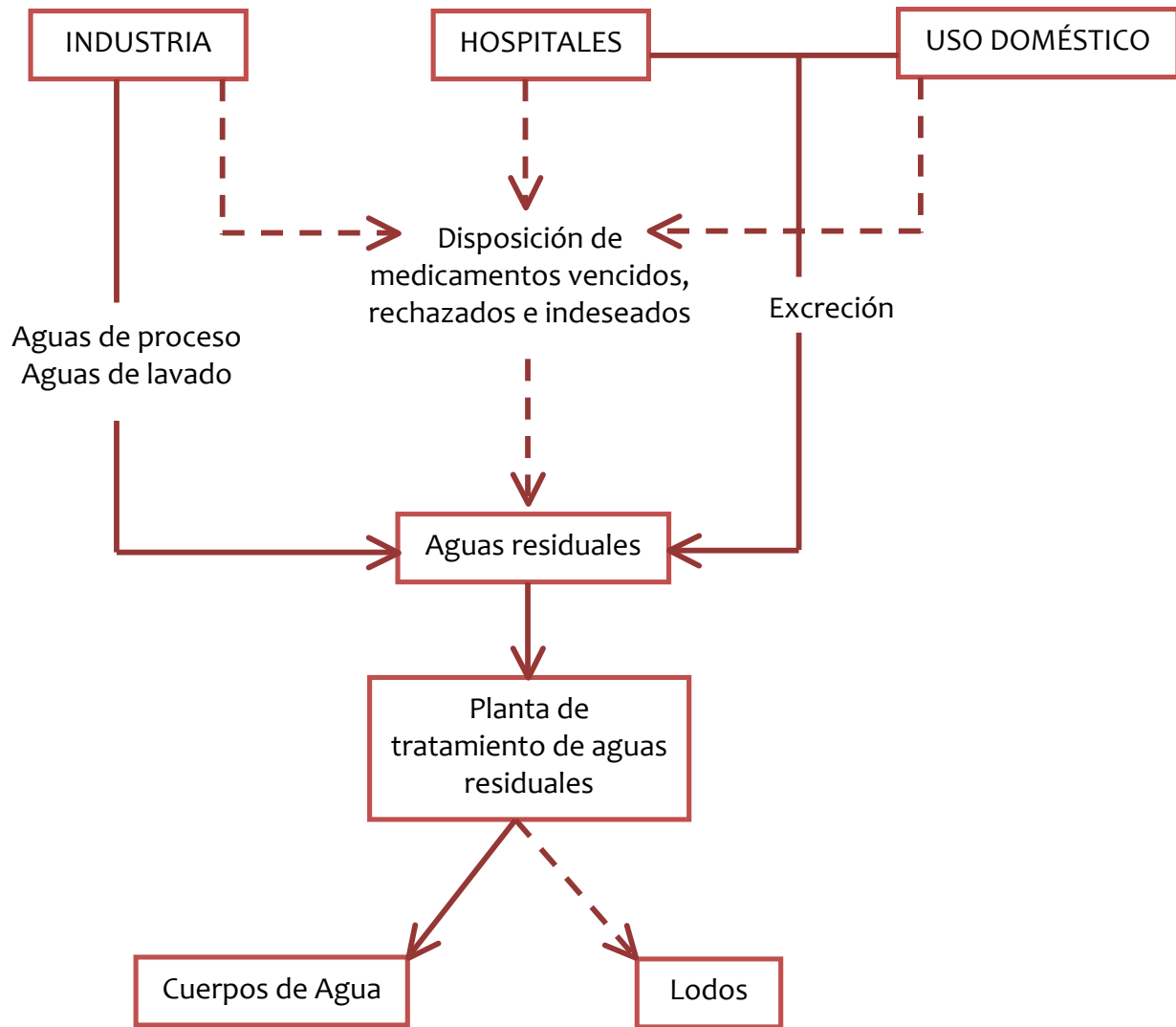


Figura 1. Principales rutas de entrada de los productos farmacéuticos a las aguas residuales y al ambiente. → Flujo primario - -> Flujo secundario (Tomada de Peñate et al., 2009).

En los últimos años diversos reportes demuestran que los fármacos representan una nueva clase de contaminantes del ambiente acuático, ocasionando daños a la salud sobre los organismos que ahí habitan e incluso al hombre, es por ello que actualmente estos productos son de preocupación ambiental a nivel mundial y han sido llamados “contaminantes emergentes” (Richardson, 2009).

Estos productos incluyen antibióticos (penicilinas), hipolipemiantes (estatinas), antineoplásicos (agentes citostáticos), antihipertensivos (beta-bloqueadores), antiepilépticos (carbamazepina), hormonales (17 α -etinilestradiol), analgésicos (AINEs) (Antonić y Heath, 2007). Estos últimos, son un grupo heterogéneo de fármacos con propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, que actúan como inhibidores selectivos de la enzima COX, inhibiendo a la COX-1 y a la COX-2, responsables de la producción de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos (Gonzalez-Rey y Bebianno, 2011; Gagné et al., 2006), entre los que se encuentran el paracetamol, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno.

En México el consumo de AINEs ha aumentado y con ello el peligro de la contaminación ambiental por éste tipo de fármacos (Antonić y Heath, 2007), ya que se encuentran en una gran variedad de formas farmacéuticas y como no requieren receta médica, son utilizados de forma irracional (Mehinto et al., 2010).

La presencia de fármacos en los efluentes de plantas de tratamiento ha sido confirmada en trabajos realizados en Alemania, Holanda, Francia, Grecia, Canadá, Brasil, Australia, Estados Unidos, España, Reino Unido, Suiza, entre otros países (Ternes et al., 2007; Gómez et al., 2007; Zuccato et al., 2006; Castiglioni et al., 2006; Hernando et al., 2006). Estos compuestos han sido encontrados en aguas superficiales, en aguas subterráneas e incluso en el agua potable a concentraciones dentro del rango de ng/L a μ g/L (Schreiber y Szewzyk, 2008; Montague, 2006).

Entre los principales fármacos identificados en cuerpos de agua se encuentran: los AINEs (diclofenaco, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, naproxeno, ketorolaco, paracetamol), estimulantes (del tipo metilxantinas como la cafeína) y carbamazepina, artovastatina, fluoxetina y 17 α -etinilestradiol (Borgmann et al., 2007; Khetan y Collins, 2007; Zuccato et al., 2006; Gagné et al., 2006; Ashton et al., 2004).

Por lo anterior resulta de interés ambiental el destacar la presencia de los contaminantes tales como fármacos en los cuerpos de agua. En una revisión de diversos artículos referidos en la literatura internacional:

- a) En el año 2003, Tixier et al., determinaron la concentración de seis fármacos: carbamazepina, ácido clofíbrico, diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno y naproxeno, en los efluentes de tres PTAR en Suiza durante un período de tiempo de tres meses, las concentraciones fueron en promedio 0.95 µg/L de carbamazepina, 0.06 µg/L de ácido clofíbrico, 0.99 µg/L de diclofenaco, 1.3 µg/L de ibuprofeno, 0.18 µg/L de ketoprofeno y 2.6 µg/L de naproxeno.
- b) En un estudio realizado por Asthon et al., (2004) se investigó la incidencia de doce compuestos farmacéuticos y sus metabolitos en PTAR y agua superficial en el Reino Unido. Diez de los doce compuestos farmacéuticos fueron detectados en muestras de PTAR: propanolol 76 ng/L, diclofenaco 424 ng/L, ibuprofeno 3 086 ng/L, ácido mefenámico 133 ng/L, dextropropoxifeno 195 ng/L, trimetoprim 70 ng/L, eritromicina menos de 10 ng/L, acetil-sulfametoxazol menos de 50 ng/L, sulfametoxazol menos de 50 ng/L, tamoxifen menos de 10 ng/L.
- c) Por otro lado, Tauxe-Wuersch et al., (2005) analizaron en tres PTAR de Suiza, la aparición y destino de cinco fármacos (ácido mefenámico, ibuprofeno, ketoprofeno, diclofenaco y ácido clofíbrico). Los resultados señalaron que los cinco fármacos eran persistentes en los efluentes de aguas residuales después del tratamiento. Las concentraciones de ibuprofeno, ácido mefenámico y diclofenaco fueron relativamente altas (150-2 000 ng/L), mostrando una posible contaminación de las aguas superficiales.
- d) En contraste, Kosjek et al., (2005) realizaron estudios para determinar la concentración de algunos AINEs (ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno y diclofenaco) en agua potable y en ríos de Eslovenia, en estos últimos el nivel de contaminación fue bajo (ng/L), en cambio, en el agua potable no se detectó la presencia de estos AINEs.

- e) Comeau et al., (2008) estudiaron la incidencia de fármacos en el efluente de PTAR en dos cuencas costeras en el océano Atlántico, Canadá. Los más predominantes fueron cafeína, naproxeno e ibuprofeno. Éstos últimos dos, el ácido salicílico, diclofenaco y gemfibrozil se detectaron en intervalos bajos de 3-47 ng/L en aguas tratadas y no tratadas.
- f) En México el único reporte de la presencia de fármacos en un cuerpo de agua fue hecho por Siemens et al., (2008), en el Valle del Mezquital, en donde detectaron la presencia de 11 fármacos, 5 de los cuales se encontraron en concentraciones iguales o mayores a 1 µg/L entre ellos se incluyen al naproxeno, ibuprofeno y diclofenaco, entre otros y los 6 restantes se detectaron a concentraciones menores a 1 µg/L.
- g) Por otra parte, Letzel et al., (2009) determinaron la concentración de diclofenaco en efluentes de PTAR de Alemania, encontrando valores mayores a 2 200 ng/L en los efluentes.
- h) En el año 2010, Sui et al., investigaron la incidencia de trece productos farmacéuticos y dos productos de consumo, incluidos los antilipémicos, antibióticos, antiinflamatorios, antihipertensivos, anticonvulsivantes, antipsicóticos y repelentes de insectos, en cuatro PTAR de Beijing, China, los cuales fueron detectados en las concentraciones de 4.4-6.6 µg/L y 2.2-320 ng/L en los afluentes y efluentes secundarios, respectivamente.

Otros de los compuestos comúnmente encontrados en cuerpos de agua son los detergentes (DBSS) y solventes (etanol). Se ha detectado la presencia de detergentes en aguas residuales industriales a concentraciones de hasta 300 mg/L (Scott y Jones, 2000), además de la presencia de solventes en PTAR a concentraciones dentro del intervalo de 0.5 a 50 µg/L (Paxéus, 1996).

Existen diversos estudios sobre los efectos tóxicos que producen los AINEs sobre los organismos acuáticos ya que son los más susceptibles a los efectos tóxicos, puesto que

están expuestos continuamente a las descargas de aguas residuales durante todo su ciclo de vida (Fent et al., 2006).

A continuación, se presentan algunos antecedentes referidos en la literatura internacional del efecto de los AINEs en organismos acuáticos:

- a) Schwaiger et al., (2004) evaluaron los efectos tóxicos del diclofenaco en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), encontraron que a concentraciones de 1 a 500 µg/L en un período de veintiocho días, se presentaron alteraciones como la degeneración de células epiteliales tubulares y la aparición de nefritis intersticial. En las branquias, se presentó necrosis de las células de la pared capilar. En contraste, el hígado, el tracto gastro-intestinal y el bazo no revelaron alteraciones histopatológicas.
- b) En el mismo año, Cleuvers, evaluó la relevancia ecotoxicológica del modo de acción de las mezclas de fármacos, para lo cual utilizó diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico, utilizando como bioindicadores a *Daphnia magna* y algas verdes (*Desmodesmus subspicatus*), concluyó que la toxicidad de cada uno de estos fármacos de manera individual fue relativamente baja, sin embargo cuando se encuentran en forma de mezcla se potencia la toxicidad. La CE₅₀ de éstos fármacos se realizó por medio de la inhibición del crecimiento, en *Daphnia magna* estuvo dentro del intervalo de 68-166 mg/L y para *Desmodesmus subspicatus* de 72 a 626 mg/L.
- c) Por otra parte, Hong et al., (2007) evaluaron los niveles de expresión del citocromo P450 1A, p53 y vitelogenina, en el pez japonés (*Oryzias latipes*), tras la exposición a diclofenaco a las concentraciones de 8 mg/L y 1 µg/L y observaron que los biomarcadores fueron altamente expresados. Estos niveles elevados de expresión sugirieron que el diclofenaco causa toxicidad celular, genotoxicidad y efectos estrogénicos, incluso a una concentración de 1 µg/L.
- d) Zhang et al., (2008) analizaron la ocurrencia en cuerpos de agua y el proceso de remoción en PTAR de carbamazepina y diclofenaco, así como un análisis ecotoxicológico de los mismos, y concluyeron que a concentraciones normalmente

encontradas en el ambiente, no se producen efectos tóxicos agudos, sin embargo los efectos crónicos que pueden ser producidos son debidos a los procesos de bioacumulación en los organismos acuáticos.

- e) En el mismo año, Quinn et al., estudiaron los efectos tóxicos de diez productos farmacéuticos (ibuprofeno, naproxeno, gemfibrozil, bezafibrato, carbamazepina, sulfametoxazol, sulfapiridina, oxitetraciclina, novobiocina y trimetoprim) previamente identificados de un efluente de una PTAR sobre la capacidad de regeneración de embriones de *Hydra attenuata* de acuerdo a la clasificación de Wilby que se basa en la morfología. Observaron inhibición de la regeneración a concentraciones de 1, 5 y 1 mg/L para gemfibrozil, ibuprofeno y naproxeno, y a concentraciones mayores de 50 mg/L para bezafibrato y trimetoprim, mientras que si hubo regeneración a las concentraciones de 25, 5, 50 y 50 mg/L de carbamazepina, sulfapiridina, oxitetraciclina y novobiocina), respectivamente. Finalmente concluyeron que dentro de los fármacos con mayor potencial teratógeno incluyen al gemfibrozil, ibuprofeno, naproxeno y bezafibrato y el que tuvo menor potencial teratógeno fue la carbamazepina, de todos los fármacos estudiados.
- f) Parolini et al., (2009) realizaron un estudio in vitro para observar el efecto citogenotóxico de diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol sobre hemocitos de *Dreissena polymorpha*, la genotoxicidad se realizó por electroforesis unicelular en gel o ensayo cometa y por el ensayo de difusión del ADN, mientras que la citotoxicidad se realizó por ensayo de retención del rojo neutro que mide la actividad lisosomal de las células. Los resultados mostraron que el potencial de citogenotoxicidad fue mayor para el paracetamol, le sigue el diclofenaco y por último el ibuprofeno.
- g) En el año 2010, Mehinto et al., evaluaron la exposición subletal a veintiún días a diclofenaco en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), observando que los niveles de expresión de ambos genes de ciclooxigenasa (COX1 y COX2) en el hígado, branquias y el riñón se redujeron a concentraciones de 1 µg/L. El diclofenaco indujo necrosis tubular en riñón e hiperplasia y fusión de las vellosidades en el intestino a concentraciones de 1 µg/L. Este estudio demostró que la exposición subcrónica a

concentraciones comúnmente encontradas en el ambiente puede interferir con las funciones bioquímicas de los peces y provocar daños en los tejidos, destacando así, la preocupación por la presencia de este fármaco en el medio acuático.

- h) Oviedo-Gómez et al., 2010 determinaron la toxicidad aguda y subletal (12, 24, 48 y 72 h) del diclofenaco sobre *Hyalella azteca*, utilizando biomarcadores de EO: grado de LPX, CPC, así como la actividad enzimática de SOD, CAT y GPx. La CL₅₀ a las 72 h que obtuvieron fue de 0.467 mg/kg, los resultados del estudio subletal mostraron incremento significativo a todos los tiempos de exposición del grado de LPX y CPC, mientras que la actividad de la SOD mostró disminución con respecto al tiempo, finalmente la actividad de la CAT Y GPx mostró un incremento con respecto al tiempo. Por lo cual los autores concluyeron que el diclofenaco induce EO en *Hyalella azteca*, y que las pruebas utilizados en este estudio pueden ser consideradas biomarcadores tempranos de daño en la evaluación de la toxicidad de los AINEs sobre especies acuáticas.
- i) Gómez-Oliván et al., (2012) evaluaron la exposición subletal a 12, 24, 48, 72 h a paracetamol a *Hyalella azteca* utilizando pruebas de EO como grado de LPX, CPC, actividad enzimática de SOD, CAT y GPx, se observó incremento estadísticamente significativo con respecto al testigo del grado de LPX y CPC, mientras que la actividad enzimática de SOD, CAT y GPx disminuyó.
- j) Islas-Flores et al., (2013) evaluaron la exposición subletal a una cinética de 12, 24, 48, 72 y 96 h a diclofenaco en branquias, sangre, hígado y cerebro de carpa común (*Cyprinus carpio*) utilizando como biomarcador al EO, los resultados mostraron un incremento estadísticamente significativo del grado de LPX en hígado y branquias con respecto al grupo testigo, la actividad de la SOD incremento con respecto a los testigos en hígado y branquias, a los diferentes tiempos de exposición, mientras que en cerebro se observó un decremento de dicha actividad. La actividad de CAT y GPx se incrementó significativamente en branquias e hígado.

Así mismo, se han reportado los efectos de otras sustancias tóxicas (etanol y detergentes) en organismos acuáticos:

- a) Bilotta et al., (2004) evaluaron en huevos fertilizados de pez cebrá (*Danio rerio*) los efectos de la exposición a etanol a concentraciones de 1.5% y 2.9% a diferentes intervalos de exposición, observaron que a la concentración de 2.9% el diámetro de los ojos y la frecuencia cardíaca aumentaban con respecto a un testigo, incluso hubo muertes a ésta concentración, los embriones expuestos al etanol a una concentración de 1.5% exhibieron efectos más sutiles, tales como el diámetro del ojo significativamente menor y menor frecuencia cardíaca, éstos parámetros fueron observados utilizando un microscopio invertido.
- b) En el año 2008, Wu et al., evaluaron en huevos fertilizados de pez japonés (*Oryzias latipes*) la toxicidad de etanol, los huevos fueron expuestos a etanol (400 mM) durante 48 horas y determinaron el EO y contenido de ARNm de cuatro enzimas antioxidantes CAT, GR, GST y SOD, observaron que el EO fue mínimo en las etapas de gástrula, blástula, néurula del desarrollo embrionario, aumentando gradualmente con el avance de la morfogénesis, alcanzando su nivel máximo en las crías en comparación con un testigo. El ARNm de enzimas antioxidantes se expresa constitutivamente en todo el desarrollo, sin embargo, el patrón de expresión no era idéntico entre las enzimas. El ARNm de la CAT y SOD fue mínimo en los huevos fertilizados, pero aumentó significativamente durante el desarrollo, la GST fue alta en los huevos fertilizados posteriormente se redujo drásticamente, finalmente el GR mantuvo un estado de equilibrio durante todo el desarrollo.
- c) Nunes et al., (2008) evaluaron la toxicidad de tres fármacos y un detergente (dodecilsulfato sódico) sobre *Gambusia holbrooki*, los peces fueron expuestos durante 96 horas a diferentes concentraciones de los fármacos y a la concentración de 15.1 mg/L del detergente, posteriormente se evaluaron biomarcadores de EO (GSH y GSSG, LPX), y la actividad enzimática de GPx, GR, SOD y GST en branquias e hígado.

Los resultados mostraron una disminución de la respuesta general de EO tanto de los fármacos como del detergente.

La respuesta tóxica se caracteriza mediante la selección adecuada de los biomarcadores. Estos son definidos como cambios cuantificables en la respuesta biológica, física o química, que pueden estar relacionados con los efectos tóxicos o la exposición a químicos ambientales, y cumplen con las siguientes características (van der Oost et al., 2003):

- a) Indican la presencia de un contaminante biodisponible, más que la forma inerte del mismo.
- b) Pueden revelar la presencia de un contaminante que no se sospecha que existe en el lugar de estudio.
- c) 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.
- d) Son más fáciles de innovar y más económicos que los análisis químicos comunes.

A su vez se clasifican en tres grupos (van der Oost et al., 2003):

- a) De exposición: el cual contempla la detección y cálculo de sustancias exógenas o sus metabolitos o el producto de una interacción entre un toxón y una molécula o célula blanco, y es calculada dentro del organismo. Este tipo de biomarcador es usado para confirmar la exposición de individuos o poblaciones a una sustancia en particular.
- b) 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. Este tipo de biomarcador ayuda a elucidar variaciones en el grado de respuestas a la exposición de un tóxico, observando diferencias entre individuos.

- c) 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.

El EO es un desequilibrio bioquímico entre la producción de especies reactivas y sistemas antioxidantes. Los AINEs, estimulan la generación de EROs en las células (Sinha et al., 2007). Las EROs son producidas en las células como resultado de los procesos metabólicos que se llevan a cabo, entre ellas se encuentran el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), su ácido conjugado, el radical hidropéroxido (HO_2^{\bullet}), los radicales hidroxilo (OH^{\bullet}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas a su vez pueden inducir daño celular al promover la LPX de las membranas celulares. Recientemente han sido implicados en la regulación de múltiples eventos celulares, tales como la activación del factor de transcripción, expresión de genes, diferenciación y proliferación celular (Vlahogianni et al., 2007, Park et al., 2007). Para contrarrestar estos efectos, la célula requiere de sistemas antioxidantes tales como la SOD, CAT, GPx, entre otros (Sinha et al., 2007). La SOD cataliza la conversión del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , este último es metabolizado a O_2 y agua por acción de las enzimas CAT y GPx (Figura 2) (Van der Oost et al., 2003). El balance entre moléculas prooxidantes y antioxidantes, y el secuestro de EROs es crucial para mantener la homeostasis celular (Valavanidis et al., 2006). Diversos estudios han demostrado que la exposición a diversos contaminantes, estimulan la generación EROs en las células (Sinha et al., 2007), produciendo incremento del CHP, del grado de LPX y CPC, así como modificaciones en la actividad de diversas enzimas antioxidantes (Vlahogianni et al., 2007, Parvez y Raisuddin, 2005).

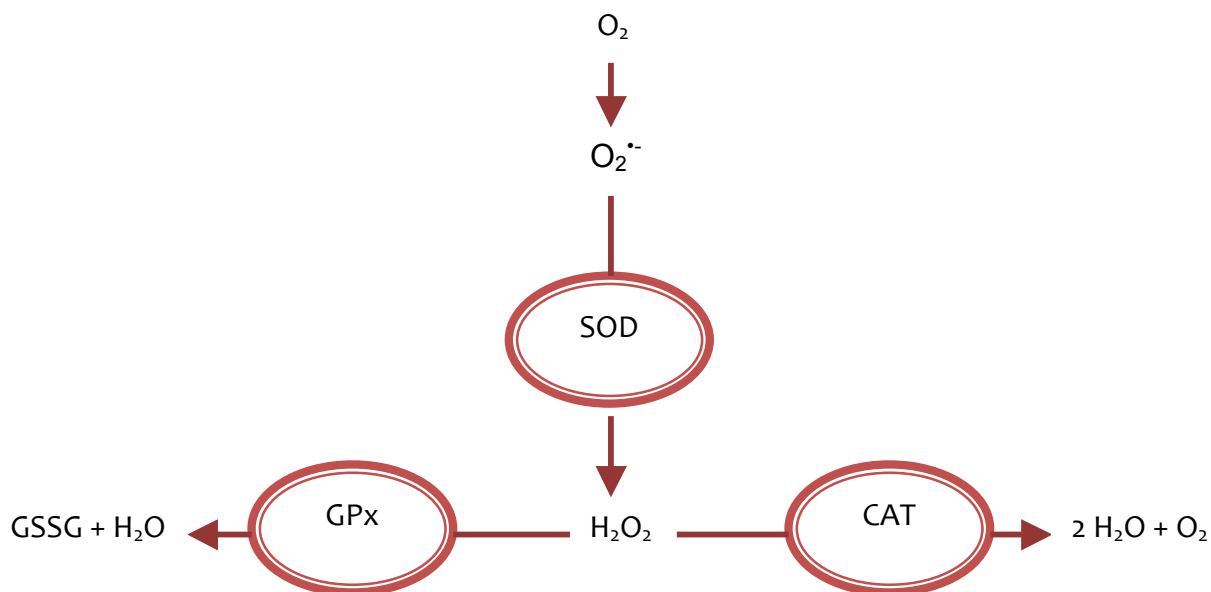


Figura 2. Mecanismo de producción y neutralización de especies reactivas de oxígeno por las enzimas antioxidantes.

Otro de los compuestos encontrados en los efluentes es el DBSS, un detergente aniónico ampliamente utilizado, con aplicaciones en productos para el hogar (jabones líquidos, champús, pastas de dientes), mezclas industriales y productos de limpieza (Sirisattha et al., 2004). Debido a sus propiedades tensoactivas, los efectos biológicos de DBSS se han relacionado con el incremento de la tensión superficial en las monocapas de fosfatidilcolina de la membrana celular modificando su permeabilidad y haciendo a la célula más susceptible a la entrada de sustancias que afectan la integridad de los organismos (Cserhati et al., 2002).

Además del DBSS, el etanol también se ha detectado en efluentes, y debido a su biotransformación se genera acetaldehído, acetato y el radical hidroxietilo ($\text{CH}_3\text{-C}'\text{HOH}$), un metabolito altamente reactivo (Wu y Cederbaum, 2005; Correa et al., 2003).

El conocimiento actual de que tales procesos de daño oxidativo se producen en los organismos acuáticos, ha impulsado el estudio del efecto de los fármacos sobre organismos centinela (Valavanidis et al., 2006).

Cyprinus carpio es un pez de agua dulce, que presenta múltiples ventajas como bioindicador de la calidad de agua, tales como su fácil reproducción y mantenimiento bajo condiciones de laboratorio, sensibilidad a diversos xenobióticos, ha mostrado tener una resistencia a altas temperaturas de hasta 37 °C. En México es una de las especies altamente comercializadas por lo que de acuerdo a estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO por sus siglas en inglés), es la especie de mayor cultivo en el mundo y de mayor consumo alimenticio en la población (FAO, 2010; SAGPyA, 2007).

En base a los antecedentes mencionados, el presente proyecto evaluó el estrés oxidativo producido por efluentes provenientes de una industria farmacéutica localizada en la ciudad de Toluca y su repercusión sobre *Cyprinus carpio*, especie de gran importancia comercial en México.

3. JUSTIFICACIÓN

Los AINEs se han posicionado entre los principales grupos de fármacos más consumidos y vendidos sin receta médica, además ha sido poca la atención que se les da al estudio de sus efectos tóxicos. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, este grupo de fármacos representan los más utilizados como analgésicos, seguidos de opioides débiles y finalmente opioides potentes. Los afluentes y efluentes de residuos de fármacos detectados en PTAR en la industria farmacéutica, han revelado que muchos productos farmacéuticos no se eliminan por completo en los procesos tradicionales de tratamiento (coagulación, floculación, sedimentación, entre otros). Por tal motivo pueden llegar nuevamente a los cuerpos de agua y a los sedimentos en donde estarán en contacto con los hidrobiontes, organismos micro y macroinvertebrados, algas y peces, los cuales servirán como

bioindicadores del efecto tóxico que pueden producir los medicamentos a través de biomarcadores de exposición, susceptibilidad y efecto. A pesar de que hace varios años se conoce la presencia de fármacos en cuerpos de agua y sus efectos tóxicos sobre la flora y la fauna, en el país no existen muchos estudios al respecto y 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, y siendo este estudio en un sistema real sobre una especie de interés comercial para el hombre como es *Cyprinus carpio*, este estudio permitirá sentar las bases para posteriores estudios de movilidad o biomagnificación en la cadena trófica, así como para la regulación de los AINEs.

4. HIPÓTESIS

Los efluentes provenientes de una industria farmacéutica pueden generar estrés oxidativo y daño biomolecular en *Cyprinus carpio*.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la toxicidad de efluentes provenientes de una industria farmacéutica sobre *Cyprinus carpio*, a través de pruebas de estrés oxidativo.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la toxicidad aguda de efluentes provenientes de una industria farmacéutica ubicada en la ciudad de Toluca.
2. Determinar el contenido de hidroperóxidos, grado de lipoperoxidación y contenido de proteínas carboniladas inducido por antiinflamatorios no esteroideos sobre

Cyprinus carpio tras la exposición a efluentes provenientes de una industria farmacéutica ubicada en la ciudad de Toluca.

3. Determinar la actividad enzimática de la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en *Cyprinus carpio* tras la exposición a efluentes provenientes de una industria farmacéutica ubicada en la ciudad de Toluca.

6. METODOLOGÍA

6.1 Organismo de prueba

Se utilizaron ejemplares de *Cyprinus carpio* (carpa común), las cuales se obtuvieron del centro acuícola ubicado en Tiacaque, Estado de México y se trasladaron al laboratorio de Toxicología de la Facultad de Química de la UAEMéx. Los organismos se mantuvieron en acuarios de 160 L de capacidad con medio sintético para cultivo de *Cyprinus carpio*, durante un período de adaptación de quince días, a temperatura ambiente con periodos de luz y oscuridad natural, con aireación continua, pH de 7.4 y alimentadas diariamente con Pedregal Silver™ para peces (Domitrovic 1997).

6.2 Preparación del medio sintético para mantenimiento de *Cyprinus carpio*

Se disolvieron en 2.85 L de agua destilada o desionizada, 120 mg/L de $MgSO_4$ (Sigma-Aldrich), 174 mg/L de $NaHCO_3$ (Sigma-Aldrich), 8 mg/L KCl (Vetec), en el orden descrito. Por otra parte, se agregaron 120 mg/L de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ (Sigma-Aldrich) a 150 mL de agua destilada o desionizada en un matraz erlenmeyer de 250 mL. Se colocó la solución sobre un agitador magnético hasta que el $CaCO_4$ se disolvió completamente. Se adicionaron a los 2.85 L preparados con anterioridad y se mezclaron perfectamente. Para valorar la calidad del agua reconstituida, se colocaron durante 24 h a 10 juveniles en una muestra; transcurrido el tiempo, no se registró mortalidad, por lo tanto el agua pudo ser utilizada.

6.2.1 Caracterización fisicoquímica del medio sintético para mantenimiento de *Cyprinus carpio*

El agua sintética se caracterizó por medio de la determinación del pH que se midió usando un potenciómetro de electrodo de vidrio (JENCO VisionPlus modelo pH6175), el oxígeno disuelto (usando un oxímetro Simpson-Electric Co. YST Modelo 51-B), la conductividad (Phmetro Conductronic Modelo TPM-PH₁₃₀).

6.3 Muestreo de los efluentes

Para el muestreo de los efluentes provenientes de la industria farmacéutica de la Ciudad de Toluca, se siguió el procedimiento que establece la NMX-AA-003-1980 Muestreo Aguas Residuales.

6.4 Determinación de la toxicidad aguda

Los sistemas de intoxicación consistieron en peceras de 120x80x40 cm. Se tuvieron seis sistemas de prueba contenían diferentes proporciones del efluente industrial (0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6%) en agua reconstituida y un séptimo sistema control libre del efluente industrial, se seleccionaron 10 carpas al azar (usando el método de número aleatorio) y se colocaron en cada sistema. Un total de 210 peces fueron utilizados en la determinación de CL₅₀. Se observaron los sistemas durante 96 horas y se determinó el número de organismos muertos al concluir el tiempo de exposición. El ensayo se realizó por triplicado. La CL₅₀ del efluente de la industria farmacéutica sobre *Cyprinus carpio* se determinó a las 96 horas (CL₅₀ 96 horas) y fue calculada por análisis de Probits (Método de unidades probabilísticas). Posteriormente se obtuvo el valor del LOAEL, el cual fue utilizado para la exposición de los organismos en el estudio subletal (determinación del EO).

6.5 Evaluación de la toxicidad a través de biomarcadores de estrés oxidativo

Para el estudio subletal se utilizó en valor del LOAEL, es decir 0.1173%, y a esta proporción del efluente se tuvieron cinco sistemas de prueba con seis peces cada uno. El tiempo de exposición fue de 12, 24, 48, 72 y 96 h. Se estableció un sistema de prueba libre del efluente industrial por cada tiempo de exposición. El estudio subletal se realizó por triplicado. En total se utilizaron 180 organismos para este estudio. Al finalizar cada tiempo de exposición, los organismos fueron retirados de los sistemas y se colocaron en una pecera que contuvo 50 mg/L de aceite de clavo, con el fin de anestésiar a los organismos (Yamanaka et al. 2011). Se obtuvieron muestras sanguíneas, de branquias, hígado y cerebro. Las muestras sanguíneas fueron tomadas en la vena caudal con una jeringa hipodérmica de 1 mL previamente heparinizada y por cada 100 μ L de sangre se le adicionaron 400 μ L de PBS pH 7.4, y para la obtención de las muestras restantes se realizó una disección en un baño de hielo, después se pesaron y homogenizaron en 2 mL de PBS pH 7.4 y se centrifugaron a 12 500 rpm a -4°C durante 15 min para la obtención del sobrenadante. Todos los biomarcadores: CHP, LPX, CPC, SOD, CAT y GPx, se realizaron con el sobrenadante.

6.5.1 Determinación del contenido de hidroperóxidos

La determinación se realizó siguiendo el método de Jiang et al. (1992). Se tomaron 100 μ L de muestra [previamente desproteinizada con ácido tricloroacético al 10% (Sigma-Aldrich)] y se agregaron 900 μ L de la mezcla de reacción [FeSO_4 0.25 mM (Sigma-Aldrich), H_2SO_4 25 mM (Sigma-Aldrich), naranja de xilenol 0.1 mM (Sigma-Aldrich) y 4 mM hidroxitolueno butilado (Sigma-Aldrich) en 90% (v/v) de metanol (Sigma-Aldrich)]. La mezcla se incubó durante 60 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 560 nm frente a un blanco que contuvo únicamente la mezcla de reacción. Los resultados se extrapolaron en una curva estándar y se expresaron en nM de HPC (Sigma-Aldrich)/mg de proteína.

6.5.2 Determinación del grado de lipoperoxidación

La determinación del grado de lipoperoxidación se realizó siguiendo el método de Büege y Aust (1978). A 100 μL de la muestra (sin centrifugar) se le añadió solución reguladora Tris-HCl 150 mM pH 7.4 (Sigma-Aldrich) hasta completar 1 mL. La muestra se incubó a 37°C por 30 min, posteriormente se le adicionó 2 mL de TCA-TBA [ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich) al 0.375% en ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich) al 15%], después se indujo un choque térmico (con ayuda de un baño maría) en agua a ebullición por 45 min. Concluido este tiempo, se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 min y se determinó la absorbancia a 535 nm. Los resultados se expresaron en mM de MDA/mg de proteína, usando el CEM de 1.56×10^5 M/cm.

6.5.3 Determinación de proteínas carboniladas

La determinación se realizó siguiendo la metodología de Levine et al. (1994) modificado por Parvez y Raisuddin (2005) y Burcham (2007). A 100 μL del sobrenadante se le adicionaron 150 μL de DNPH (Sigma-Aldrich) 10 mM en HCl (Sigma-Aldrich) 2 M. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 h en oscuridad. Después de la incubación se le adicionó 500 μL de ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich) al 20% y se dejó reposar durante 15 min a 4 °C. El precipitado se centrifugó a 11 000 rpm durante 5 min. El botón se lavó varias veces con etanol (Sigma-Aldrich)-acetato de etilo (Sigma-Aldrich) 1:1 y posteriormente se disolvió en 1 mL de una solución 6 M de guanidina (Sigma-Aldrich) pH 2.3 y se incubó a 37 °C durante 30 min. La absorbancia se determinó a 366 nm. Los resultados se expresaron en μM de carbonilos reactivos (C=O)/mg de proteína, utilizando el CEM de 21 000 M/cm.

6.5.4 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa

Se determinó desarrollando el método de Misra y Fridovich (1972). Se colocaron 40 μL del homogenizado en una celda de cuarzo y se adicionaron 260 μL de solución amortiguadora de carbonatos [carbonato de sodio (Sigma-Aldrich) 50 mM y EDTA (Vetec) 0.1 mM] a pH 10.2.

Posteriormente, se agregaron 200 μL de adrenalina (Bayer) 30 mM y se determinó la absorbancia a 480 nm a los 30 s y 5 min. La actividad enzimática se determinó usando el CEM de SOD (21 M/m). Los resultados se expresaron como UI/mg proteína.

6.5.5 Determinación de la actividad de la catalasa

Se realizó siguiendo el método de Radi et al. (1991). 20 μL del sobrenadante fueron colocados en una celda de cuarzo, se le agregó 1 mL de solución amortiguadora de aislamiento [sucrosa (Vetec) 0.3 M, EDTA (Vetec) 1 mM, HEPES (Sigma-Aldrich) 5 mM y KH_2PO_4 (Vetec) 5 mM] y 0.2 mL de una solución de H_2O_2 (Vetec) 20mM. Posteriormente, se realizaron las lecturas de absorbancia a 240 nm, a los 0 y 60 s. Los resultados se obtuvieron sustituyendo el valor de la absorbancia obtenida para cada uno de los tiempos en la fórmula: concentración de CAT = $[(A_0 - A_{60})/\text{CEM}]$, donde el CEM del H_2O_2 es 0.043 mM/cm, y se expresaron como $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ proteína.

6.5.6 Determinación de glutatión peroxidasa

Se determinó mediante el método de Gunzler y Flohe-Clairborne (1985) modificado por Stephensen et al. (2000). Se colocaron 100 μL del sobrenadante en una celda de cuarzo y se le adicionaron 10 μL de GR [2 U GR, (Sigma-Aldrich)], además de 290 μL del buffer de reacción [K_2HPO_4 (Vetec) 50 mM, KH_2PO_4 (Vetec) 50 mM pH 7.0, GSH (Sigma-Aldrich) 3.5 mM, azida de sodio (Sigma-Aldrich) 1 mM, NADPH (Sigma-Aldrich) 0.12 mM] y 100 μL de H_2O_2 (Vetec) 0.8 mM. Posteriormente se determinó la absorbancia a 340 nm, a los 0 y 60 s. Los resultados se obtuvieron usando la siguiente ecuación: concentración de GPx = $[(A_0 - A_{60})/\text{CEM}]$, donde el CEM del NADPH es 6.2 mM/cm. Los resultados se expresaron como mM NADPH/mg proteína.

6.5.7 Determinación de la concentración de proteínas

Se determinó mediante el método de Bradford (1976). A 25 μL del sobrenadante se le agregaron 75 μL de agua desionizada y 2.5 mL del reactivo de Bradford (0.05 g de azul de Cumassie (Sigma-Aldrich), 25 mL de etanol (Sigma-Aldrich) al 96% y 50 mL de H_3PO_4 (Vetec) en 500 mL de agua desionizada). Se agitaron los tubos, se dejaron reposar por 5 min y a continuación se determinó la absorbancia a 595 nm. Los resultados se extrapolaron en una curva estándar hecha con albúmina.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron por ANOVA y las diferencias significativas de cada grupo se compararon empleando la prueba de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples contra un testigo. Las diferencias fueron consideradas significativas a una $p < 0.05$.

CAPÍTULO 2
“DISCUSIÓN DE RESULTADOS”

8. ARTÍCULO

Re: Submission Confirmation

↑ ↓ ×



Dr leobardo (lmgomez@uaemex.mx) 22/04/2013 |
Para: Nely San Juan Reyes ✕

El 08/04/2013, a las 20:21, WATE <ivan.naguit@springer.com> escribió:

> Dear lmgomez,
>
> Thank you for submitting your manuscript,
> "Effluent from an NSAID-manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus carpio*", to *Water, Air, & Soil Pollution*
>
> During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:
>
> <http://wate.edmgr.com/>
>
> If your manuscript is accepted for publication in *Water, Air, & Soil Pollution*, you may elect to submit it to the Open Choice program. For information about the Open Choice program, please access the following URL: <http://www.springer.com/openchoice>
>
> Alternatively, please call us at 001-630-468-7784 (outside the US)/(630)-468-7784 (within the US) anytime from Monday to Friday.
>
> Thank you very much.
>
> With kind regards,
>
> Journals Editorial Office WATE
> Springer
> P.O. Box 990
> 3300 AZ DORDRECHT
> The Netherlands
> Fax: +31 78 657 6555

© 2013 Microsoft Términos Privacidad Desarrolladores Español

**Effluent from an NSAID-manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on
*Cyprinus carpio***

Nely SanJuan-Reyes^a, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a*}, Marcela Galar-Martínez^b, Patricia Vieyra-Reyes^c, Sandra García-Medina^b, Hariz Islas-Flores^a, Nadia Neri-Cruz^a

^a Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, México.

^b Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Plan de Ayala y Carpio s/n, 11340 México D.F., México.

^c Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Tollocan intersección Jesús Carranza s/n. Col. Moderna de la Cruz, 50180 Toluca, Estado de México, México.

*Corresponding author:

Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, México. Tel.: (52) 7222173890; fax: (52) 7222173890; e-mail: lmgomezo@uaemex.mx leobardo_gomez_olivan@yahoo.com.mx

Abstract

The development of human society entails increased industrial activity and consequently the release of a large number of chemical substances including solvents, detergents and pharmaceutical products which reach water bodies through the discharge of industrial effluents, damaging the organisms living in these ecosystems. This study aimed to determine oxidative stress induced on the common carp *Cyprinus carpio* by effluent from a pharmaceutical plant that manufactures nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The median lethal concentration (LC₅₀) and subsequently the lowest observed adverse effect level (LOAEL) were determined. Carp were exposed to the latter value (0.1173%) for different exposure periods (12, 24, 48, 72 and 96 h) and the following biomarkers were evaluated in gill, brain, liver and blood: hydroperoxide content (HPC), lipid peroxidation (LPX), protein carbonyl content (PCC), and the activity of the superoxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). Statistically significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were observed in HPC, LPX and PCC particularly in gill of effluent-exposed specimens. SOD, CAT and GPx activity in gill also increased with respect to the control group. This particular industrial effluent is therefore concluded to induce oxidative stress on *C. carpio*, this damage being most evident in gill.

Keywords

Cyprinus carpio; oxidative stress; nonsteroidal anti-inflammatory drugs; gills; brain; liver; blood

1. Introduction

Water is essential for the biological processes, diet, hygiene and activities of human beings (Monforte and Cantú 2009). However, the development of human society entails increased industrial activity with the consequent release of a large number of chemicals including pesticides, hydrocarbons, personal care products, solvents, detergents and pharmaceutical agents that eventually reach water bodies (Zuccato et al. 2005).

The pharmaceutical industry generates large quantities of wastewater varying in characteristics and concentration as a function of the manufacturing process used and the year season. These effluents originate mainly as a result of machinery cleaning (Balcioglu and Ötker 2003) and, in addition to residues of the pharmaceutical products manufactured, also contain other kinds of compounds used in the cleaning process, including solvents (ethanol) and detergents such as sodium dodecylbenzene sulfonate (SDBS).

Pharmaceuticals are designed to persist and perform their therapeutic action and, consequently, once they enter the aquatic environment, persist in it, damaging the health of organisms living in these ecosystems and even human health. Therefore, these products are currently of worldwide environmental concern and have been called “emerging contaminants” (Richardson 2009).

The latter term includes nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), a heterogeneous group of pharmaceuticals with anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties, which act as selective inhibitors of the enzyme cyclooxygenase (COX), inhibiting cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) which are responsible for

production of prostaglandins, prostacyclins and thromboxanes (Gagné et al. 2006; Gonzalez-Rey and Bebianno 2011). This group includes paracetamol (PAR), naproxen (NPX), diclofenac (DCF) and ibuprofen (IBP). In Mexico NSAIDs are among the most frequently sold and used medicinal agent groups (Gómez-Oliván et al. 2009). They are marketed in various pharmaceutical forms and are irrationally used since they are sold without prescription.

Pharmaceuticals of this type are commonly found in aquatic environments at concentrations ranging from ng/L to µg/L (Schreiber and Szewzyk 2008; Santos et al. 2010) and have been detected in wastewater treatment plant affluents and effluents (Tixier et al. 2003; Ashton et al. 2004; Tauxe-Wuersch et al. 2005; Comeau et al. 2008; Sui et al. 2010)

In Mexico the only report of presence of pharmaceuticals in a water body was made by Siemens et al. (2008), who found 11 pharmaceuticals in the Mezquital Valley, five of them at concentrations equal to or above 1 µg/L including, among others, NPX, IBP and DCF.

Diverse studies have reported NSAID-induced toxicity in aquatic organisms, since these organisms are more susceptible to toxic effects due to their continued exposure to wastewater discharges throughout the life cycle (Fent et al. 2006). NSAIDs have been shown to affect reproduction and development in fish, and to induce gill alterations as well as hepatotoxicity and nephrotoxicity (Schwaiger et al. 2004; Hoeger et al. 2005; Mehinto et al. 2010). Other authors have stated that PAR and DCF induce oxidative stress on *Hyalella azteca* and *Cyprinus carpio*, damaging biomolecules such as lipids, proteins and DNA (Oviedo-Gómez et al. 2010; Gómez-Oliván et al. 2012; Islas-Flores et al. 2013).

Another compound present in industrial effluents is SDBS, a widely used anionic detergent that has applications in household products, industrial mixtures and cleaning

products (Sirisattha et al. 2004). Its constant entry into the environment may be responsible for its high concentrations in wastewater, which range from 0.2 to 10 mg/L and induce toxicity on aquatic organisms, such as oxidative stress in *Gambusia holbrooki* (Nunes et al. 2008). The presence and toxicity of ethanol have also been evaluated in diverse water bodies; this compound has been reported to induce oxidative stress in *Oryzias latipes* (Wu et al. 2008).

The level of the damage that is induced by these contaminants on aquatic organisms depends on the concentration to which the latter are exposed (Bilotta et al. 2004).

Toxic response is evidenced with the use of an adequate selection of biomarkers. A biomarker is defined as any quantifiable change in biological, physical or chemical response that can be related to exposure to or toxicity induced by environmental chemicals (van der Oost et al. 2003).

The sequestration of reactive oxygen species (ROS) is crucial to maintain cellular homeostasis. ROS include the superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), its conjugated acid, hydroperoxide (HO_2^{\cdot}), hydroxyl radicals (OH^{\cdot}) and the radical species hydrogen peroxide (H_2O_2) (Barata et al. 2005; Lushchak 2011). Oxidative stress is defined as a biochemical imbalance between ROS production and antioxidant systems (Vlahogianni et al. 2007). It is considered one of the most important mechanisms of toxic action. Diverse studies have shown that exposure to different contaminants stimulates ROS production in cells (Ruas et al. 2008), inducing increases in lipid peroxidation (LPX), hydroperoxide content (HPC) and protein carbonyl content (PCC) as well as changes in the activity of diverse antioxidant

enzymes including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) (Valko et al. 2007; Lushchak, 2011).

Recent studies have shown that NSAIDs, solvents (ethanol) and detergents (SDBS) may induce and/or contribute to oxidative stress induction in diverse aquatic species. However, no studies have been made of the impact of this damage on commercially valuable species such as the common carp *C. carpio*. Current knowledge of the fact that this oxidative damage is induced on aquatic organisms has stimulated the study of the effects of pharmaceutical agents on sentinel organisms (Valavanidis et al. 2006). *C. carpio* shows adaptive response in contaminated aquatic environments and has been suggested for use as a bioindicator in toxicity assays (Karan et al. 1998; Dalzell and Macfarlane 1999).

Therefore, the present study aimed to evaluate the oxidative stress induced on *C. carpio* by industrial effluent from an NSAID-manufacturing plant.

2. Materials and methods

2.1 Sampling of industrial effluent

Effluent emanating from an NSAID-manufacturing plant in Toluca (State of Mexico) was sampled using the procedure stipulated in the official Mexican norm for wastewater sampling (NMX-AA-003-1980).

2.2 Specimen collection and maintenance

Common carp (*Cyprinus carpio*) 18.39 ± 0.31 cm in length and weighing 50.71 ± 7.8 g were obtained from the aquaculture facility in Tiacaque, State of Mexico. Fish were safely transported to the laboratory in well-sealed polyethylene bags containing oxygenated water, then stocked in a large tank with dechlorinated tap water (previously reconstituted with salts) and acclimated to test conditions for 30 days prior to beginning of the experiment. During acclimation, carp were fed Pedregal Silver™ fish food, and three-fourths of the tank water was replaced every 24 h to maintain a healthy environment. The physicochemical characteristics of tap water reconstituted with salts were maintained, i.e. temperature 20 ± 2 °C, oxygen concentration 80-90%, pH 7.5-8.0, total alkalinity 17.8 ± 7.3 mg/L, total hardness 18.7 ± 0.6 mg/L. A natural light/dark photoperiod was maintained.

2.3 Median lethal concentration (LC₅₀) and oxidative stress determination

Test systems consisting in 120 x 80 x 40-cm glass tanks filled with water reconstituted from the following salts: NaHCO₃ (174 mg/L, Sigma-Aldrich), MgSO₄ (120 mg/L, Sigma-Aldrich), KCl (8 mg/L, Vetec) and CaSO₄·2H₂O (120 mg/L, Sigma-Aldrich) were maintained at room temperature with constant aeration and a natural light/dark photoperiod. Static systems were used and no food was provided to specimens during the exposure period.

To establish the target concentration to be used in evaluating oxidative stress, the median lethal concentration (LC₅₀) of the industrial effluent was determined. To this end, six experimental systems containing different proportions of industrial effluent (0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6%) in reconstituted water and a seventh effluent-free control system were set up,

and ten carp randomly selected from the stock (using the random number method) were placed in each system. A total of 210 fish were used in the LC₅₀ determination.

Duration of the exposure period was 96 h, at the end of which the number of dead specimens in each system was counted. The assay was performed in triplicate. The 96-h LC₅₀ of industrial effluent and its 95% confidence limits ($P < 0.05$) were estimated by Probit analysis (EPA, v1.5). The data obtained were used to estimate the concentration to be used in the assays for oxidative stress determination.

Sublethal toxicity assays involved adding industrial effluent at a concentration equal to the lowest observed adverse effect level (LOAEL), i.e. 0.1173%, to five test systems with six carp each. A kinetics was run for the following exposure periods: 12, 24, 48, 72 and 96 h. An industrial effluent-free control system with six carp was set up for each exposure period, and sublethal assays were performed in triplicate. A total of 180 fish were used in these assays. At the end of the exposure period, fish were removed from the systems and placed in a tank containing 50 mg/L of clove oil as an anaesthetic (Yamanaka et al. 2011). Anesthetized specimens were placed in a lateral position. Blood was removed with a heparinized 1-mL hypodermic syringe by puncture of the caudal vessel performed laterally near the base of the caudal peduncle, at mid-height of the anal fin and ventral to the lateral line.

After puncture, specimens were placed in an ice bath and sacrificed. The gill, liver and brain were removed, placed in phosphate buffer solution pH 7.4 and homogenized. The supernatant was centrifuged at 12,500 rpm and $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. The following biomarkers

were then evaluated: HPC, LPX, PCC and the activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx. All bioassays were performed on the supernatant.

2.3.1 Determination of HPC

HPC was determined by the Jiang et al. (1992) method. To 100 μ L of supernatant (previously deproteinized with 10% trichloroacetic acid) (Sigma-Aldrich) was added 900 μ L of the reaction mixture [0.25 mM FeSO₄ (Sigma-Aldrich), 25 mM H₂SO₄ (Sigma-Aldrich), 0.1 mM xylenol orange (Sigma-Aldrich) and 4 mM butyl hydroxytoluene (Sigma-Aldrich) in 90% (v/v) methanol (Sigma-Aldrich)]. The mixture was incubated for 60 min at room temperature and absorbance was read at 560 nm against a blank containing only reaction mixture. Results were interpolated on a type curve and expressed as nM CHP (cumene hydroperoxide) (Sigma-Aldrich) /mg protein.

2.3.2 Determination of LPX

LPX was determined by the Buege and Aust (1978) method. To 100 mL of supernatant was added Tris-HCl buffer solution pH 7.4 (Sigma-Aldrich) to attain a volume of 1 mL. Samples were incubated at 37 °C for 30 min; 2 mL TBA-TCA reagent [0.375% thiobarbituric acid (TBA, Sigma-Aldrich) in 15% trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich)] was added and samples were shaken in a vortex. They were then heated to boiling for 45 min, allowed to cool, and the precipitate removed by centrifugation at 3,000 rpm for 10 min. Absorbance was read at 535 nm against a reaction blank. Malondialdehyde (MDA) content was

calculated using the molar extinction coefficient (MEC) of MDA (1.56×10^5 M/cm). Results were expressed as mM MDA/mg protein.

2.3.3 Determination of PCC

PCC was determined using the method of Levine et al. (1994) as modified by Parvez and Raisuddin (2005) and Burcham (2007). To 100 μ L of supernatant was added 150 μ L of 10 mM DNPH (Sigma-Aldrich) in 2 M HCl (Sigma-Aldrich) and the resulting solution was incubated at room temperature for 1 h in the dark. Next, 500 μ L of 20% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich) was added and the solution was allowed to rest for 15 min at 4 °C. The precipitate was centrifuged at 11,000 rpm for 5 min. The bud was washed several times with 1:1 ethanol:ethyl acetate (Sigma-Aldrich), then dissolved in 1 mL of 6M guanidine (Sigma-Aldrich) solution (pH 2.3) and incubated at 37 °C for 30 min. Absorbance was read at 366 nm. Results were expressed as μ M reactive carbonyls formed (C=O)/mg protein, using the MEC of 21,000 M/cm.

2.3.4 Determination of SOD activity

SOD activity was determined by the Misra and Fridovich (1972) method. To 40 μ L of supernatant in a 1-cm cuvette was added 260 μ L carbonate buffer solution [50 mM sodium carbonate (Sigma-Aldrich) and 0.1 mM EDTA (Vetec)] pH 10.2, plus 200 μ L adrenaline (30 mM, Bayer). Absorbance was read at 480 nm after 30 s and 5 min. Enzyme activity was determined using the MEC of SOD (21 M/cm). Results were expressed as IU/mg protein.

2.3.5 Determination of CAT activity

CAT activity was determined by the Radi et al. (1991) method. To 20 mL of supernatant was added 1 mL isolation buffer solution [0.3 M saccharose (Vetec), 1 mL EDTA (Vetec), 5 mM HEPES (Sigma-Aldrich) and 5 mM KH_2PO_4 (Vetec)], plus 0.2 mL of a hydrogen peroxide solution (20 mM, Vetec). Absorbance was read at 240 nm after 0 and 60 s. Results were derived by substituting the absorbance value obtained for each of these times in the formula: $\text{CAT concentration} = (A_0 - A_{60})/\text{MEC}$, where the MEC of H_2O_2 is 0.043 mM/cm, and were expressed as $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}$.

2.3.6 Determination of GPx activity

GPx activity was determined by the Gunzler and Flohe-Clairborne (1985) method as modified by Stephensen et al. (2000). To 100 μL of supernatant was added 10 μL glutathione reductase (2 U glutathione reductase, Sigma-Aldrich) plus 290 μL reaction buffer [50 mM K_2HPO_4 (Vetec), 50 mM KH_2PO_4 (Vetec) pH 7.0, 3.5 mM reduced glutathione (Sigma-Aldrich), 1 mM sodium azide (Sigma-Aldrich), 0.12 mM NADPH (Sigma-Aldrich)] and 100 μL H_2O_2 (0.8 mM, Vetec). Absorbance was read at 340 nm at 0 and 60 s. Enzyme activity was estimated using the equation: $\text{GPx concentration} = (A_0 - A_{60})/\text{MEC}$, where the MEC of NADPH = 6.2 mM/cm. Results were expressed as mM NADPH/mg protein.

2.4 Statistical analysis

In the acute toxicity assay (96-h LC₅₀ of industrial effluent), Probit analysis was performed and significance assessed by the degree of 95% LC₅₀ overlap (EPA Analysis Program v1.5). The χ^2 linear adjustment test was not significant at $P < 0.05$.

Results of sublethal toxicity assays were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA), and differences between means were compared using the Tukey-Kramer multiple comparisons test, with P set at < 0.05 . Statistical determinations were performed with SPSS v10 software (SPSS, Chicago IL, USA).

3. Results

3.1 Determination of acute toxicity

The 96-h LC₅₀ of the industrial effluent was 1.173%, with a 95% confidence interval of (1.059-1.283). The χ^2 linear adjustment test was not significant at $P < 0.05$.

3.2 Evaluation of oxidative stress

3.2.1 HPC

HPC results are shown in Figure 1. A significant increase with respect to the control group ($P < 0.05$) was observed in gill at 24, 48, 72 and 96 h, in brain at 96 h and in liver at 24 and 48 h. The highest HPC value was recorded in blood at 96 h, although significant differences were also found at 24, 48 and 72 h.

3.2.2 LPX

LPX results are shown in Figure 2. A significant increase with respect to the control group ($P < 0.05$) was found in liver at 48 h and blood at 24 h. Damage was highest in gill at 12 h. The latter organ also recorded significant differences at 24 and 48 h. The brain was the only organ in which no significant differences were observed ($P > 0.05$).

3.2.3 PCC

Figure 3 shows the results obtained for PCC. Significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were observed in brain and liver at 48 h and in blood at 12 h. The organ displaying the highest damage was gill; this damage was time dependent and was most evident at 24 h.

3.2.4 SOD activity

SOD activity results are shown in Figure 4. Significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were found in liver at 48 h and in blood at 12 and 24 h. Gill obtained the highest significant difference at 96 h, although significant differences also occurred in this organ at 48 and 72 h. No significant differences with respect to the control group ($P < 0.05$) were found in brain.

3.2.5 CAT activity

CAT activity is shown in Figure 5. Significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) occurred in gill at 24, 48, 72 and 96 h, in brain at 72 h and in blood at 96 h. The liver was the only organ in which no significant differences were observed ($P > 0.05$).

3.2.6 GPx activity

GPx activity results are shown in Figure 6. Significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were recorded in gill at 12 and 24 h, in liver at 48 h and in blood at 24

h. The brain showed no significant differences in this activity with respect to the control group ($P>0.05$).

4. Discussion

In the present study the 96-h LC_{50} of industrial effluent in *C. carpio* was 1.173%, with a 95% confidence interval of (1.059-1.283). In other species such as *Danio rerio* the LC_{50} of effluent from bulk drug production has ranged from 2.7% to 8.1% (Carlsson et al. 2010).

The LC_{50} value obtained in the present study may be due to the mechanism of action of NSAIDs, which consists in blocking the action of the enzyme COX and results in inhibition of prostaglandin synthesis, the latter compounds being involved in pain management, blood flow regulation, neurotransmission, vascular permeability, renal function and ion transport (Sali 2005).

This value may also be due to the biological effects of SDBS, which have been related to increased surface tension in phosphatidylcholine monolayers of the cell membrane modifying membrane permeability and making the cell more susceptible to the entry of substances affecting its integrity (Cserhati et al. 2002).

NSAIDs have been detected at concentrations ranging from ng/L to $\mu\text{g/L}$ in surface, ground and even drinking water (Montague 2006; Gagné et al. 2006). In combination with other contaminants such as solvents and detergents, NSAIDs elicit harmful effects on aquatic organisms, even at these concentrations (Nunes et al. 2008).

The pharmaceutical plant producing the effluent analyzed in the present study is used exclusively for NSAID manufacture, so that the manufacturing of this group of

pharmaceuticals is continuous. Since the plant does not have a wastewater treatment system, effluent emanating from it contains NSAIDs derived from the manufacturing process as well as detergents (SDBS) and solvents (ethanol) used in machinery cleaning.

NSAIDs undergo both abiotic transformations by photodegradation and biotic transformations by cytochrome P450-mediated biotransformation, which in many cases result in the formation of metabolites that are more toxic than the original pharmaceutical agent (Lam et al. 2004).

The main products of the photodegradation of PAR are: 1,4-benzoquinone, N-acetyl-*p*-benzoquinoneimine, formic acid, acetamide, oxamic acid, hydroxyacetic acid, malonic acid, butanedioic acid, malic acid, hydroquinone, N-(2,4-hydroxyphenyl) acetamide and N-(3,4-hydroxyphenyl) acetamide (Bedner and MacCrehan 2006; Yang et al. 2008). Those of the photodegradation of DCF include: 5,4-dihydroxy diclofenac, 3-hydroxy diclofenac, 4-hydroxymethyl diclofenac, 3-hydroxy 4-hydroxymethyl diclofenac, 4-hydroxy diclofenac and 5-hydroxy diclofenac (Deng et al. 2003; Stülten et al. 2008), while those of IBP and NPX are: 4-isobutyl acetophenone, 1-(6-methoxy-2-naphthyl) ethanol, and 2-acetyl-6-methoxy-naphthalene (Miranda et al. 1991). It is worth noting that ethanol evaporates rapidly due to the environmental conditions of aquatic ecosystems.

As regards the biotic transformations sustained by NSAIDs, cytochrome P450 (CYP) is present in the smooth endoplasmic reticulum of cells in different organs such as the liver, gut, kidney, gills, brain, heart and gonads (Sarasquete and Segner 2000). Different P450 gene families have been characterized in fish, such as CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP11, CYP17 and CYP19 (Stegeman and Livingstone 1998). The CYP2 family is specifically known to be

responsible for NSAID biotransformation, particularly so in the case of the subfamily CYP2C9 (Blanco et al. 2005; Zanger et al. 2008).

The main metabolites of biotransformation in mammals and in some fishes are, in the case of PAR: *p*-hydroxyacetanilide sulfate, *p*-hydroxyacetanilide glucuronide, and N-acetyl *p*-benzoquinoneimine (Mycek et al. 2004); in that of NPX: 6-O-desmethyl naproxen, naproxen acyl glucuronide, and O-desmethylnaproxen acyl glucuronide (Vree et al. 1992); in that of DCF: diclofenac-1-O-acyl glucuronide, 4-hydroxydiclofenac, 5-hydroxydiclofenac, 5-HDQI (5-hydroxydiclofenac *p*-benzoquinoneimine), and 4-HDQI (4-hydroxydiclofenac *p*-benzoquinoneimine) (Grillo et al. 2003; Stülten et al. 2008; Islas-Flores et al. 2013); and in the case of IBP: carboxy-ibuprofen, 3-carboxy-ibuprofen, *p*-carboxy-2-propionate, hydroxy-ibuprofen, and carboxy hydratropic acid (Zwiener et al. 2002; Graham and Williams 2004).

Furthermore, the biotransformation of ethanol produces acetaldehyde, acetate and the hydroxyethyl radical ($\text{CH}_3\text{-C}'\text{HOH}$) (Correa et al. 2003; Wu and Cederbaum 2005).

Benzoquinones formed in NSAID photodegradation and biotransformation are highly electrophilic molecules with a high affinity for binding to lipids, proteins and DNA (Baillie 2006; Wilhelm et al. 2009) and altering the function of these macromolecules. They are also persistent in the aquatic environment and highly toxic to organisms that live in it (Oviedo-Gómez et al. 2010).

Molecular biomarkers are used to test for oxidative damage induced in macromolecules by ROS and reactive nitrogen species (RNS) (Valavanidis et al. 2006). These species are essential for cell function in body systems and are constantly produced in cells (Halliwell and Gutteridge 1999). During LPX, polyunsaturated fatty acids with double bonds

react with ROS, particularly with the hydroxyl radical (OH^\cdot) and the reactive nitrogen species peroxynitrite (ONOO^\cdot), through a chain reaction mechanism. This permits the formation of hydroperoxides which are degraded to low-molecular-weight products, including MDA (Wilhelm Filho et al. 2005). As can be seen in Figure 1, a time-dependent increase in HPC occurred in gill, brain, liver and blood, the latter organ displaying the highest value for this biomarker. Furthermore, the level of damage to lipids is shown in Figure 2, where increased LPX is evident in all organs and is highest in gill. This may be explained by the fact that in the biotransformation by CYP2C9 of pharmaceuticals evaluated in the present study are formed ROS such as OH^\cdot and oxygenated intermediates like the oxy-cytochrome P450 complex [$\text{P450}(\text{Fe}^{3+})\text{O}^{2\cdot}$] as a result of release of the superoxide anion by reaction decoupling. The latter radical reacts rapidly with the nitric oxide (NO) derived from arginine metabolism, forming peroxynitrite (ONOO^\cdot) (Halliwell 1997; Doi et al. 2002; Jifa et al. 2006) which has a high binding affinity for proteins and lipids.

Furthermore, as a result of ethanol biotransformation due to the activity of the CYP-dependent monooxygenase system, the radical $\text{CH}_3\text{-C}^\cdot\text{HOH}$ is produced (Doi et al. 2002; Wu and Cederbaum 2005). This radical, OH^\cdot and ONOO^\cdot are responsible for damage to cell membrane lipids, with consequent formation of hydroperoxides which are transported by the bloodstream to all body tissues (Firth et al. 2007) and are eventually degraded to end products, the main ones being MDA, hexanal and 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Negre-Salvayre et al. 2010).

In freshwater fish, the gills permit gas exchange, osmoregulation, ion exchange, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste (Evans et al. 2005). Also, since they are

the first organ of contact of the fish with the environment, they have been considered the main target organ of aquatic contaminants (Cengiz and Unlu 2006). The gills are likewise known to carry out the oxidative metabolism of many toxic agents, thereby promoting production of the ROS responsible for LPX in the present study (Islas-Flores et al. 2013).

Protein damage is induced by oxidation of side chains of amino acids (Reed 1995). As can be seen in Figure 3, PCC increased in all organs evaluated. This may be due to the presence of $\text{CH}_3\text{-C}'\text{HOH}$, $\text{O}^{\cdot 2}$, OH^{\cdot} and ONOO^{\cdot} , radical species which are formed in these organs during the biotransformation of ethanol and pharmaceuticals, and in arginine metabolism, respectively. In particular, ONOO^{\cdot} is highly reactive and has a great capacity for binding to proteins and oxidizing them.

Blood is susceptible of oxidative damage since, in addition to fulfilling diverse functions such as the transport of xenobiotics throughout the body, it also transports proteins (mostly albumin and hemoglobin) and other biomolecules to all body tissues. The brain is also a target of oxidative damage since it contains a large number of proteins that are essential for brain functions and uses high quantities of O_2 with the possibility of production of ROS, which bind to proteins and oxidize them (Halliwell 2006; Eaton 2006).

ROS and RNS can remove protons from methylene groups in amino acids, leading to formation of carbonyls that tend to ligate protein amines and also induce damage to nucleophilic centers, sulfhydryl group oxidation, disulfide reduction, peptide fragmentation, modification of prosthetic groups, and protein nitration. These modifications lead to loss of protein function (Cabiscol et al. 2010; van der Oost et al. 2003; Gluszcak et al. 2007) and therefore also of body integrity (Parvez and Raisuddin 2005).

Results obtained in the present study are consistent with those reported in previous studies by our research team. Oviedo-Gómez et al. (2010) and Gómez-Oliván et al. (2012) found increases in LPX and PCC in *H. azteca* exposed to DCF and PAR respectively, while Islas-Flores et al. (2013) report increased LPX in *C. carpio* with exposure to DCF.

Antioxidant defenses can be induced by environmental contaminants under prooxidant conditions. Antioxidant levels initially increase in order to offset oxidative stress, but prolonged exposure leads to their depletion (Bebianno et al. 2005). SOD catalyzes the transformation of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) to hydrogen peroxide (H_2O_2) which is metabolized to O_2 and water by CAT and GPx (van der Oost et al. 2003).

The increases in SOD activity in liver, blood and gill (Fig. 4) were induced by release of the anion radical $O_2^{\cdot-}$ (Livingstone 2003). In contrast, SOD activity decreased in brain with respect to the control group. This may be due to the fact that when high concentrations of reactive species are present, antioxidant enzymes are inactivated, inducing major damage on cell components (Azzi et al. 2004). Islas-Flores et al. (2013) report inhibition of SOD in brain of *C. carpio* following exposure to DCF.

Figures 5 and 6 show CAT and GPx activity respectively. CAT activity did not increase in gill, brain or blood, while increased GPx activity occurred in gill, liver and blood. These increases can be attributed to the antioxidant capacity of organisms to offset H_2O_2 -induced oxidative damage. Present results are consistent with those obtained by Oviedo-Gómez et al. (2010), who report increases in the activity of CAT and GPx in *H. azteca* exposed to an NSAID.

Wu et al. (2008) found increased expression of the enzymes SOD and CAT at the messenger RNA (mRNA) level in *O. latipes* embryos exposed to ethanol.

The increases in HPC, LPX and PCC in the present study may explain the increases observed in the activity of antioxidant enzymes, as a mechanism of defense against oxidative damage.

5. Conclusions

Industrial effluent containing NSAIDs, ethanol and SDBS induces oxidative stress mainly in gill of *C. carpio*, with consequent impact on the environment. The set of assays used in the present study constitutes a reliable early warning biomarker for use in evaluating the toxicity induced by these emerging contaminants on aquatic species.

Acknowledgments

This study was made possible by support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-Mexico, Project 151665), as well as the Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN) Project 20121226.

References

- Ashton, D., Hilton, M., & Thomas, K. V. (2004). Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment*, 333(1), 167–184.
- Azzi, A., Davies, K. J., & Kelly, F. (2004). Free radical biology—terminology and critical thinking. *FEBS Letters*, 558(1), 3–6.
- Baillie, T. A. (2006). Future of toxicology metabolic activation and drug design: challenges and opportunities in chemical toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 19(7), 889–893.
- Balcioğlu, I. A., & Ötker, M. (2003). Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ processes. *Chemosphere*, 50(1), 85–95.
- Barata, C., Varo, I., Navarro, J. C., Arun, S., & Porte, C. (2005). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 140(2), 175–186.
- Bebianno, M. J., Serafim, A., Camus, L., Cosson, R. P., & Fiala-Médoni, A. (2005). Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquatic Toxicology*, 75(4), 354–373.
- Bedner, M., & MacCrehan, W. A. (2006). Transformation of acetaminophen by chlorination produces the toxicants 1, 4-benzoquinone and N-acetyl-p-benzoquinone imine. *Environmental Science & Technology*, 40(2), 516–522.

- Bilotta, J., Barnett, J. A., Hancock, L., & Saszik, S. (2004). Ethanol exposure alters zebrafish development: a novel model of fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(6), 737–743.
- Blanco, G., Martínez, C., García-Martín, E., & Agúndez, J. A. (2005). Cytochrome P450 gene polymorphisms and variability in response to NSAIDs. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 22(2), 57–81.
- Büege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302–310.
- Burcham, P. C. (2007). Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: A new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 56(1), 18–22.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2010). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 3(1), 3–8.
- Carlsson, G., Örn, S., & Larsson, D. G. (2010). Effluent from bulk drug production is toxic to aquatic vertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2656–2662.
- Cengiz, E. I., & Unlu, E. (2006). Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21(3), 246–253.
- Comeau, F., Surette, C., Brun, G. L., & Losier, R. (2008). The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. *Science of the Total Environment*, 396(2), 132–146.

- Correa, M., Arizzi, M. N., Betz, A., Mingote, S., & Salamone, J. D. (2003). Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. *Brain Research Bulletin*, 62(3), 197–202.
- Cserhati, T., Forgács, E., & Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, 28(5), 337–348.
- Dalzell, D. J. B., & Macfarlane, N. A. A. (1999). The toxicity of iron to brown trout and effects on the gills: a comparison of two grades of iron sulphate. *Journal of Fish Biology*, 55(2), 301–315.
- Deng, A., Himmelsbach, M., Zhu, Q. Z., Frey, S., Sengl, M., Buchberger, W., Niesser, R., & Knopp, D. (2003). Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS. *Environmental Science & Technology*, 37(15), 3422–3429.
- Doi, H., Iwasaki, H., Masubuchi, Y., Nishigaki, R., & Horie, T. (2002). Chemiluminescence associated with the oxidative metabolism of salicylic acid in rat liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions*, 140(2), 109–119.
- Eaton, P. (2006). Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(11), 1889–1899.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, 85(1), 97–177.

- Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 122–159.
- Firth, C. A., Yang, Y. T., & Gieseg, S. P. (2007). Lipid oxidation predominates over protein hydroperoxide formation in human monocyte-derived macrophages exposed to aqueous peroxy radicals. *Free radical research*, 41(7), 839–848.
- Gagné, F., Blaise, C., & André, C. (2006). Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(3), 329–336.
- Gluszczak, L., Miron, D. D. S., Moraes, B. S., Simões, R. R., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M., & Loro, V. L. (2007). Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(4), 519–524.
- 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.
- Gómez-Oliván, L. M., Neri-Cruz, N., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Dublán-García, O., & Corral-Avitia, A. Y. (2012). Assessing the oxidative stress induced by paracetamol spiked in artificial sediment on *Hyalella azteca*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(1), 5097–5104.
- Gonzalez-Rey, M., & Bebianno, M. J. (2011). Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) ibuprofen distresses antioxidant defense system in mussel *Mytilus galloprovincialis* gills. *Aquatic Toxicology*, 105(3), 264–269.

- Graham, G. G., & Williams, K. M. (2004). Metabolism and pharmacokinetics of ibuprofen. *Aspirin and Related Drugs*, 195.
- Grillo, M. P., Hua, F., Knutson, C. G., Joseph, 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(11), 1410–1417.
- Gunzler, W., & Flohe-Clairborne, A. (1985). Glutathione peroxidase. In R.A. Green-Wald (Ed.), *Handbook of methods for oxygen radical research* (pp. 285–290). Boca Raton FL: CRC Press.
- Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*, 55(1), S44–S49.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1634–1658.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press.
- Hoeger, B., Köllner, B., Dietrich, D. R., & Hitzfeld, B. (2005). Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic Toxicology*, 75(1), 53–64.
- Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Colín-Cruz, A., Neri-Cruz, N., & García-Medina, S. (2013). Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.025>

- Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., & Wolff, S. P. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202(2), 384–389.
- Jifa, W., Yu, Z., Xiuxian, S., & You, W. (2006). Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo [a] pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(2), 230–236.
- Jones, O. A., Lester, J. N., & Voulvoulis, N. (2005). Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends in Biotechnology*, 23(4), 163–167.
- Karan, V., Vitorović, S., Tutundžić, V., & Poleksić, V. (1998). Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40(1), 49–55.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2008). The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*, 42(13), 3498–3518.
- Lam, M. W., Young, C. J., Brain, R. A., Johnson, D. J., Hanson, M. A., Wilson, C. J., Richards, S. M., Solomon, K. R., Mabury, S.A. (2004). Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(6), 1431–1440.
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233, 346–357.
- Livingstone, D. R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire, Toulouse*, 154(6), 427–430.

- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13–30.
- Mehinto, A. C., Hill, E. M., & Tyler, C. R. (2010). Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science & Technology*, 44(6), 2176–2182.
- Miranda, M. A., Morera, I., Vargas, F., Gómez-Lechón, M. J., & Castell, J. V. (1991). *In vitro* assessment of the phototoxicity of anti-inflammatory 2-arylpropionic acids. *Toxicology in Vitro*, 5(5), 451–455.
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–3175.
- Monforte, G. G., & Cantú, M. P. C. (2009). Escenario del agua en México. *CULCyT: Cultura Científica y Tecnológica*, 6(30), 31–40.
- Montague, P. (2006). Drugs in the Water. *Rachel's Environmental Health Weekly*, 614(1), 15–22.
- Mycek, M. J., Harvey, R. A., & Champe, P. C. (2004). *Farmacología*. Mexico, DF: McGraw-Hill.
- Negre-Salvayre, A., Auge, N., Ayala, V., Basaga, H., Boada, J., Brenke, R., Chapple, S., Cohen, G., Feher, J., Grune, T., Lengyel, G., Mann, G., Pamplona, R., Poli, G., Portero-Otin, M., Riahi, Y., Salvayre, R., Sasson, S., Serrano, J., Shamni, O., Siems, W., Siow, R. C. M., Wiswedel, I., Zarkovic, K., & Zarkovic, N. (2010). Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radical Research*, 44(10), 1125–1171.

- Nunes, B., Gaio, A. R., Carvalho, F., & Guilhermino, L. (2008). Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2), 341–354.
- Oviedo-Gómez, D. G. C., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., & Gómez-Oliván, L. M. (2010). Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29(1), 39–43.
- 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(1), 112–117.
- Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., & Freeman, B. A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 22028–22034.
- Reed, D.J. (1995). Toxicity of oxygen: In F. DeMatters., L. L. Smith (Eds.), *Molecular and cellular mechanisms of toxicity*. Boca Raton: CRC Press. pp. 35–68.
- Richardson, S. D. (2009). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 81(12), 4645–4677.
- Ruas, C. B. G., Carvalho, C. D. S., de Araújo, H. S. S., Espíndola, E. L. G., & Fernandes, M. N. (2008). Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 86–93.
- Sali, T. (2005). Prostaglandins. In H. W. Vohr (Ed.), *Encyclopedic reference of immunotoxicology* (pp. 537–540). Heidelberg: Springer.

- Santos, L. H., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1), 45–95.
- Sarasquete, C., & Segner, H. (2000). Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Science of the Total Environment*, 247(2), 313–332.
- Schreiber, F., & Szewzyk, U. (2008). Environmentally relevant concentrations of pharmaceuticals influence the initial adhesion of bacteria. *Aquatic Toxicology*, 87(4), 227–233.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., & Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68(2), 141–150.
- Siemens, J., Huschek, G., Siebe, C., & Kaupenjohann, M. (2008). Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley. *Water Research*, 42(8), 2124–2134.
- Sirisattha, S., Momose, Y., Kitagawa, E., & Iwahashi, H. (2004). Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis. *Water Research*, 38(1), 61–70.
- Stegeman, J. J., & Livingstone, D. R. (1998). Forms and functions of cytochrome P450. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology*, 121(1), 1–3.

- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., & Förlin, L. (2000). Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology*, 48(4), 431–442.
- Stülten, D., Zühlke, S., Lamshöft, M., & Spiteller, M. (2008). Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Science of the Total Environment*, 405(1), 310–316.
- Sui, Q., Huang, J., Deng, S., Yu, G., & Fan, Q. (2010). Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China. *Water Research*, 44(2), 417–426.
- Taxe-Wuersch, A., De Alencastro, L. F., Grandjean, D., & Tarradellas, J. (2005). Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research*, 39(9), 1761–1772.
- Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S., & Müller, S. R. (2003). Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science & Technology*, 37(6), 1061–1068.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178–189.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84.

- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. J., & 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(9), 1361–1371.
- Vree, T. B., Van Den Biggelaar-Martens, M., & Verwey-van Wissen, C. P. W. G. M. (1992). Determination of naproxen and its metabolite O-desmethylnaproxen with their acyl glucuronides in human plasma and urine by means of direct gradient high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 578(2), 239–249.
- Wu, D., & Cederbaum, A. I. (2005). Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2), 70–76.
- Wu, M., Chaudhary, A., Khan, I. A., & Dasmahapatra, A. K. (2008). Ethanol teratogenesis in Japanese medaka: effects at the cellular level. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 149(1), 191–201.
- Wilhelm, E. A., Jesse, C. R., Leite, M. R., & Nogueira, C. W. (2009). Studies on preventive effects of diphenyl diselenide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Pathophysiology*, 16(1), 31–37.

- Wilhelm Filho, D., Torres, M. A., Zaniboni-Filho, E., & Pedrosa, R. C. (2005). Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongates* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*, 244(1), 349–357.
- Yang, L., Yu, L. E., & Ray, M. B. (2008). Degradation of paracetamol in aqueous solutions by TiO₂ photocatalysis. *Water Research*, 42(13), 3480–3488.
- Yamanaka, H., Sogabe, A., Handoh, I. C., & Kawabata, Z. (2011). The effectiveness of clove oil as an anaesthetic on adult common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(2), 210–213.
- Zanger, U. M., Turpeinen, M., Klein, K., & Schwab, M. (2008). Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(6), 1093–1108.
- Zuccato, E., Castiglioni, S., & Fanelli, R. (2005). Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), 205–209.
- Zwiener, C., Seeger, S., Glauner, T., & Frimmel, F. (2002). Metabolites from the biodegradation of pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(4), 569–575.

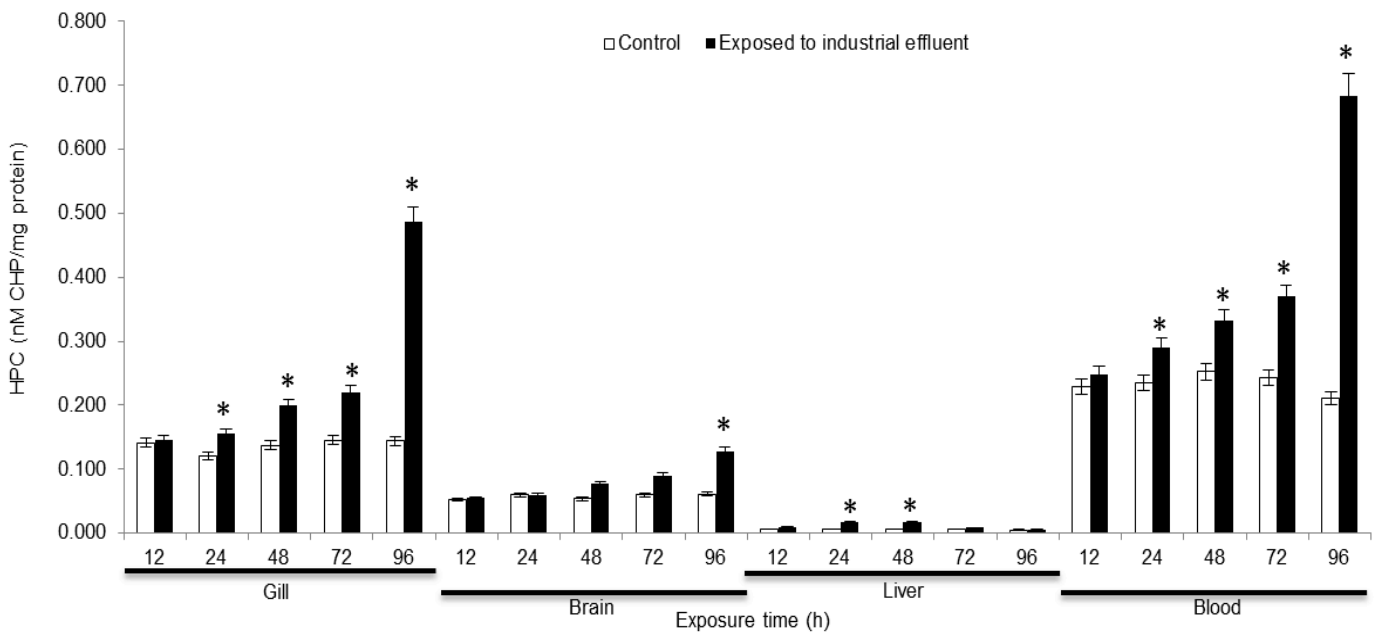


Fig. 1 Hydroperoxide content (HPC) in gill, brain, liver and blood of *C. carpio* exposed to industrial effluent for 12, 24, 48, 72 and 96 h. Values are the mean of three replicates \pm SE. CHP = cumene hydroperoxide. *Significantly different from control values, ANOVA and Tukey Kramer ($P < 0.05$).

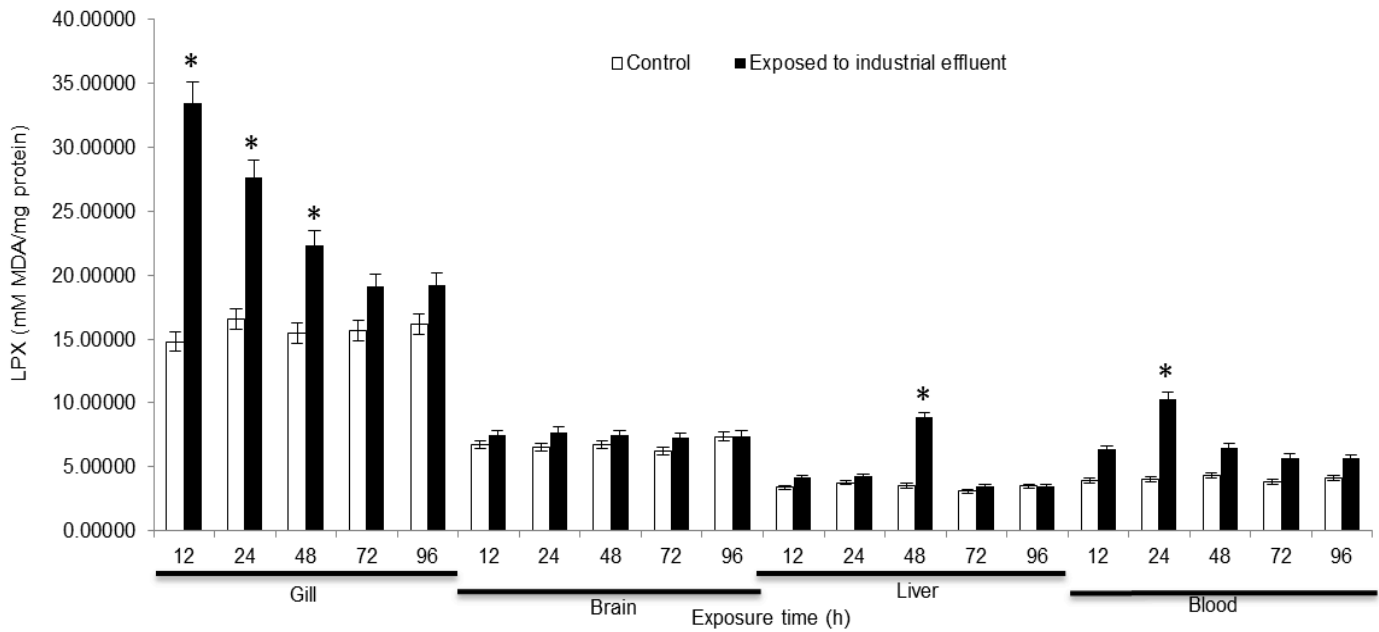


Fig. 2 Lipid peroxidation (LPX) in gill, brain, liver and blood of *C. carpio* exposed to industrial effluent for 12, 24, 48, 72 and 96 h. Values are the mean of three replicates \pm SE. MDA = malondialdehyde. *Significantly different from control values, ANOVA and Tukey Kramer ($P < 0.05$).

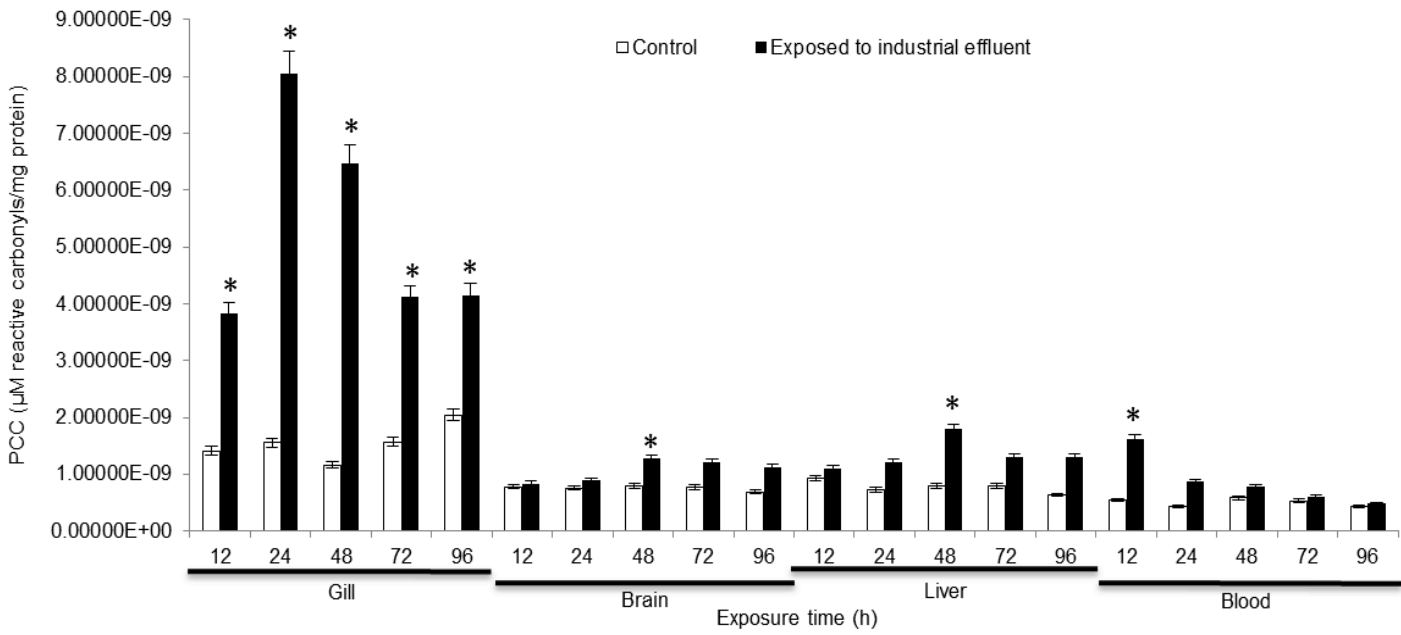


Fig. 3 Protein carbonyl content (PCC) in gill, brain, liver and blood of *C. carpio* exposed to industrial effluent for 12, 24, 48, 72 and 96 h. Values are the mean of three replicates \pm SE.

*Significantly different from control values, ANOVA and Tukey Kramer ($P < 0.05$).

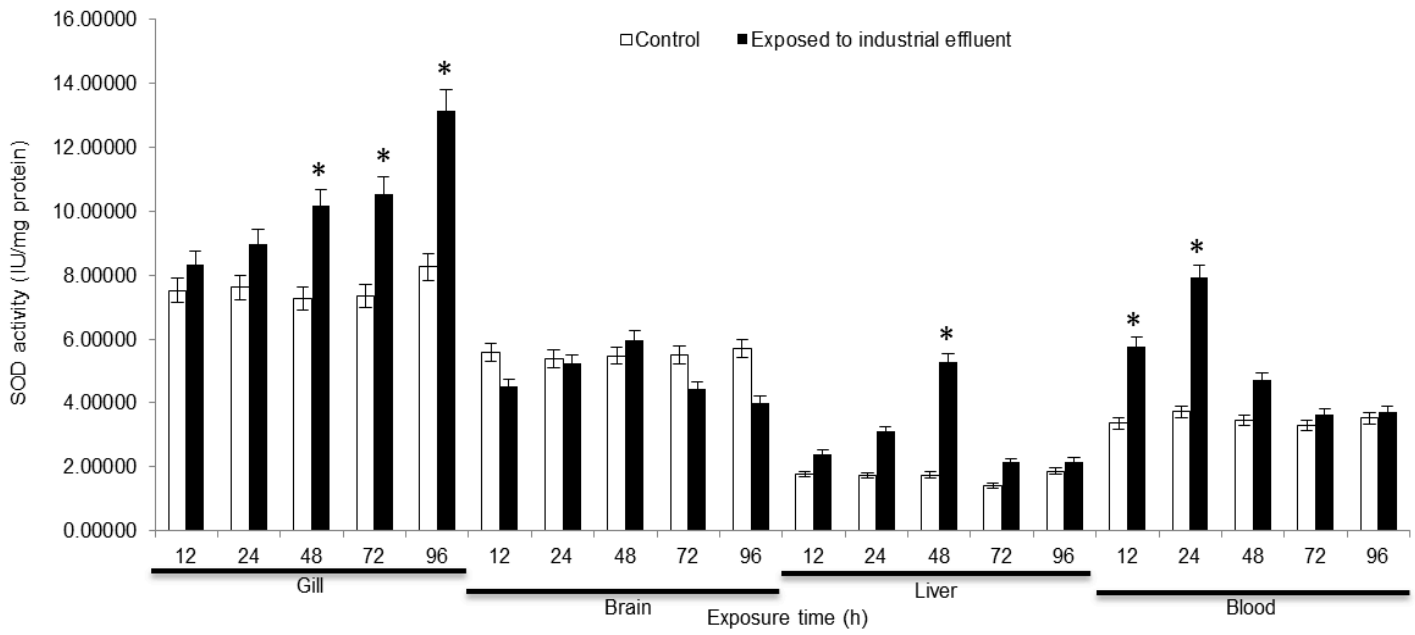


Fig. 4 Superoxide dismutase (SOD) activity in gill, brain, liver and blood of *C. carpio* exposed to industrial effluent for 12, 24, 48, 72 and 96 h. Values are the mean of three replicates \pm SE.

*Significantly different from control values, ANOVA and Tukey Kramer ($P < 0.05$).

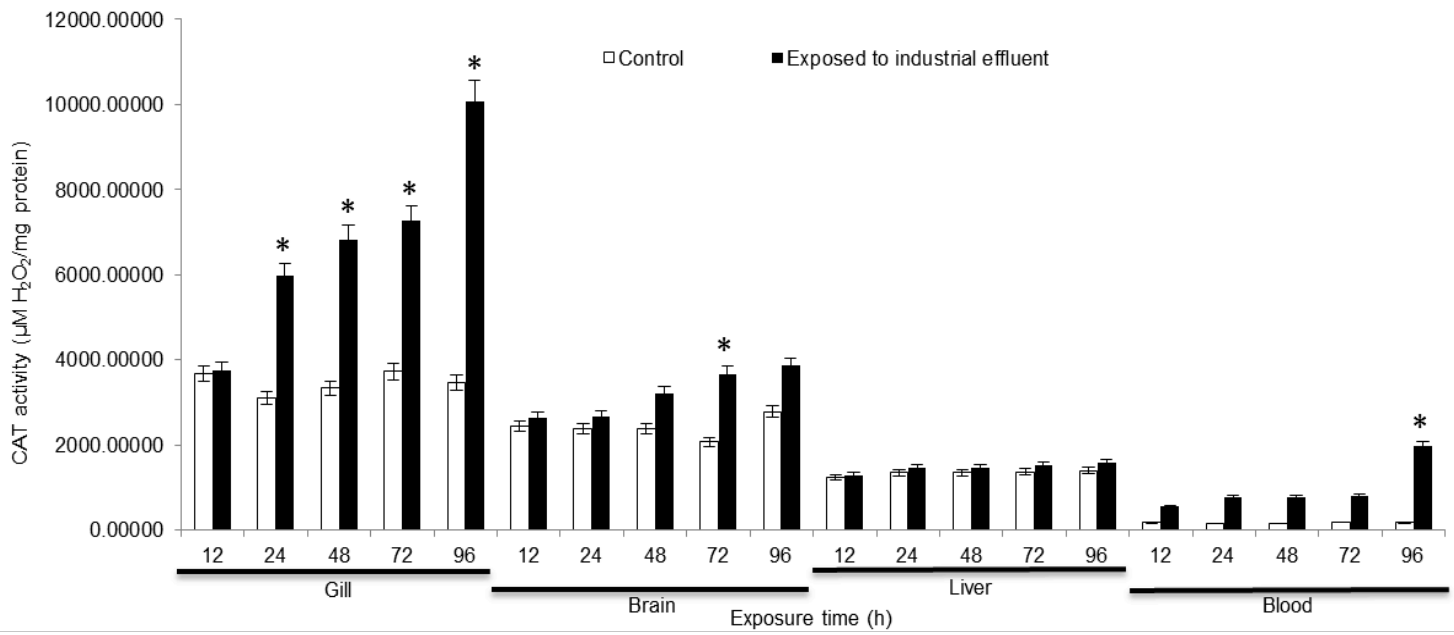


Fig. 5 Catalase (CAT) activity in gill, brain, liver and blood of *C. carpio* exposed to industrial effluent for 12, 24, 48, 72 and 96 h. Values are the mean of three replicates \pm SE. *Significantly different from control values, ANOVA and Tukey Kramer ($P < 0.05$).

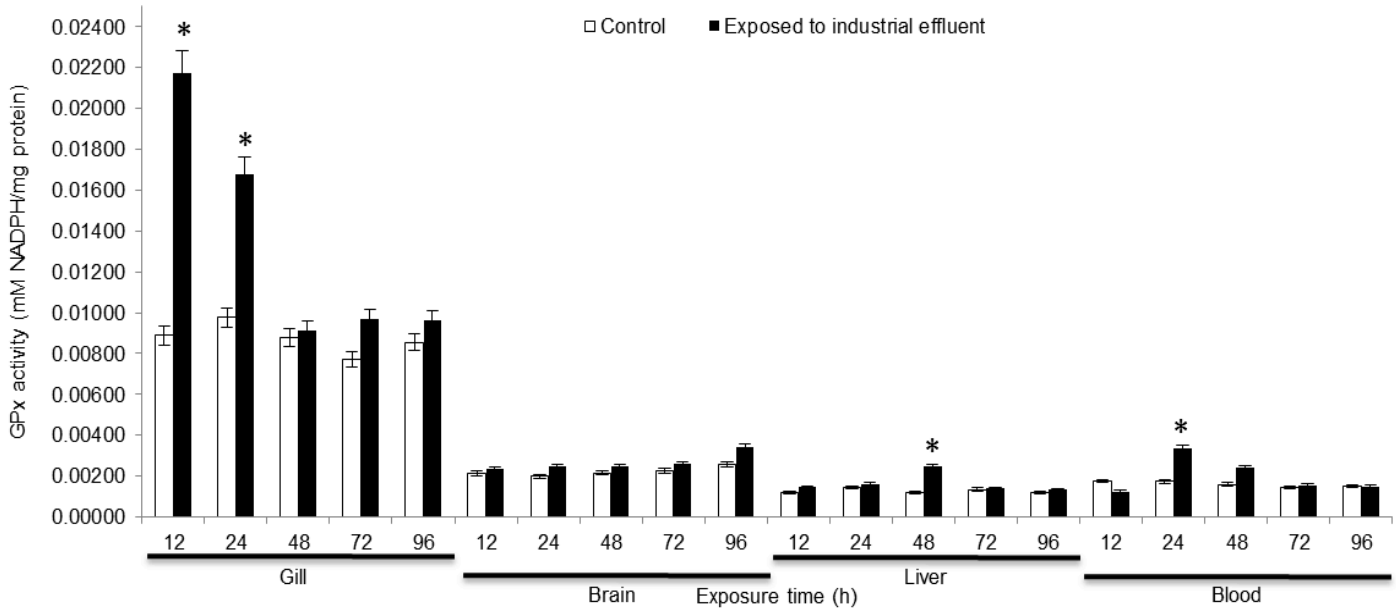


Fig. 6 Glutathione peroxidase (GPx) activity in gill, brain, liver and blood of *C. carpio* exposed to industrial effluent for 12, 24, 48, 72 and 96 h. Values are the mean of three replicates \pm SE. *Significantly different from control values, ANOVA and Tukey Kramer ($P < 0.05$).

Water, Air, & Soil Pollution

Effluent from an NSAID-manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus carpio*
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Effluent from an NSAID-manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on <i>Cyprinus carpio</i>
Article Type:	Full research paper
Keywords:	<i>Cyprinus carpio</i> ; oxidative stress; nonsteroidal anti-inflammatory drugs; gills; brain; liver; blood
Corresponding Author:	Leobardo Manuel Gómez-Oliván, Ph.D. Universidad Autónoma del Estado de México Toluca, México MEXICO
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autónoma del Estado de México
First Author:	Nely SanJuan-Reyes, MSci
Order of Authors:	Nely SanJuan-Reyes, MSci Leobardo Manuel Gómez-Oliván, Ph.D. Marcela Galar-Martínez, PhD Patricia Vieyra-Reyes, PhD Sandra García-Medina, PhD Hariz Islas-Flores, PhD Nadia Neri-Cruz, PhD
Abstract:	The development of human society entails increased industrial activity and consequently the release of a large number of chemical substances including solvents, detergents and pharmaceutical products which reach water bodies through the discharge of industrial effluents, damaging the organisms living in these ecosystems. This study aimed to determine oxidative stress induced on the common carp <i>Cyprinus carpio</i> by effluent from a pharmaceutical plant that manufactures nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The median lethal concentration (LC50) and subsequently the lowest observed adverse effect level (LOAEL) were determined. Carp were exposed to the latter value (0.1173%) for different exposure periods (12, 24, 48, 72 and 96 h) and the following biomarkers were evaluated in gill, brain, liver and blood: hydroperoxide content (HPC), lipid peroxidation (LPX), protein carbonyl content (PCC), and the activity of the superoxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). Statistically significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were observed in HPC, LPX and PCC particularly in gill of effluent-exposed specimens. SOD, CAT and GPx activity in gill also increased with respect to the control group. This particular industrial effluent is therefore concluded to induce oxidative stress on <i>C. carpio</i> , this damage being most evident in gill.
Additional Information:	
Question	Response
PLEASE READ THIS ALERT BEFORE YOU BEGIN Water, Air and Soil Pollution will not tolerate unethical submission and/or attempted publication practices. This applies to all authors listed on the articles. We have both plagiarism-detection software and other methods to detect	Yes

Powered by Editorial Manager® and Preprint Manager® from Aries Systems Corporation

such practices to ensure the highest publication standards. Serious consequences, including Informing the author's institution, may result from unethical behaviour. If you require more information about what constitutes unethical behaviour, including what constitutes plagiarism, please see the journal's author instructions on the journal's homepage before you submit to the journal. If you have read and understood this alert, please indicate YES in the response box.	
Have you read the 'Letter from the Editor-in-Chief' and the full journal author instructions, located at the journal homepage www.springer.com/11270 ?	Yes
Has this material (or data) been literally or substantially submitted (or will it be) for simultaneous consideration in another publication in English or another language? If Yes, do not continue with the submission.	No
If the article is accepted for publication, after acceptance, no changes in authorship, the order of authors, or designation of the corresponding author will be permitted. Have all authors been actively involved in making a substantial scholarly contribution to the design and completion of this research, interpretation of data and conclusions, assisted in drafting and revising the manuscript, read and approved this submission, and are aware that it is being submitted to this journal? If NO, please do not submit your manuscript. Please review the authorship guidelines on the journal's homepage for guidance (www.springer.com/11270).	Yes
Does the article report existing science applied to a local situation?	No
If yes, how is this research significant to furthering worldwide knowledge on this topic	
Is the article of local, national or international value? (Choose one.)	International
Please provide the name, affiliation and address, and e-mail address of three potential reviewers who do not pose a conflict of interest. Note that this information will be checked to ensure it is credible.	Francois Gagné: St. Lawrence Centre, Environment Canada, 105 McGill St., Montreal, Qc., Canada H2Y 2E7 Fax: +514496 7398. E-mail address: francois.gagne@ec.gc.ca Lucía Guilhermino: CIIMAR-Centro Interdisciplinar de investigação Marinha e Ambiental, Rua dos Bragas, 177, 4050-123, Porto, Portugal. E-mail address: lguilher@icbas.up.pt Philip Rainbow: The Natural History Museum, Cromwell Road, London. E-mail address: P.rainbow@nhm.ac.uk

Cover letter

[Click here to download attachment to manuscript: Cover letter \(SanJuan-Reyes et al., 2013 08042013\) .doc](#)

[Click here to view linked References](#)



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Química

April 08th, 2013

Dr. Jack T. Trevors

Editor-in-Chief

Water, Air & Soil Pollution

Dear colleague:

Enclosed please find the manuscript "Effluent from an NSAID-manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus carpio*", to be considered for publication in *Water, Air & Soil Pollution*.

Thanking you in advance for your attention, I remain,

Sincerely yours,

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván

Laboratorio de Toxicología Ambiental

Facultad de Química

Universidad Autónoma del Estado de México

Fax: (+52 722) 2173890

E-mail: imgomezo@uaemex.mx, leobardo_gomez_olivan@yahoo.com.mx

Manuscript

[Click here to download Manuscript: Manuscript \(SanJuan-Reyes et al., 2013 08042013\) .doc](#)
[Click here to view linked References](#)

Effluent from an NSAID-manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus carpio*

Nely SanJuan-Reyes^a, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a*}, Marcela Galar-Martínez^b, Patricia Vieyra-Reyes^c, Sandra García-Medina^b, Hariz Islas-Flores^a, Nadia Neri-Cruz^a

^a Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, México.

^b Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Plan de Ayala y Carpio s/n, 11340 México D.F., México.

^c Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Tollocan intersección Jesús Carranza s/n. Col. Moderna de la Cruz, 50180 Toluca, Estado de México, México.

*Corresponding author:

Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, México. Tel.: (52) 7222173890; fax: (52) 7222173890; e-mail: imgomezo@uaemex.mx
leobardo_gomez_oliván@yahoo.com.mx

9. CONCLUSIONES

- a) La CL50 del efluente industrial fue de 1.173% (1.059-1.283).
- b) Este tipo de efluente causa estrés oxidativo principalmente en branquias de *Cyprinus carpio*.

10. PERSPECTIVAS

- a) Realizar la caracterización del daño al ADN (genotoxicidad) inducida por los efluentes provenientes de una industria farmacéutica sobre *Cyprinus carpio*.
- b) Evaluar el efecto citotóxico inducido por los efluentes provenientes de una industria farmacéutica sobre *Cyprinus carpio*.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antonić, J., & Heath, E. (2007). Determination of NSAIDs in river sediment samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(4), 1337-1342.
- Ashton, D., Hilton, M., & Thomas, K. V. (2004). Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment*, 333(1), 167-184.
- Balcioğlu, I. A., & Ötker, M. (2003). Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ processes. *Chemosphere*, 50(1), 85-95.
- Bendz, D., Paxeus, N. A., Ginn, T. R., & Loge, F. J. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), 195-204.

- Bilotta, J., Barnett, J. A., Hancock, L., & Saszik, S. (2004). Ethanol exposure alters zebrafish development: a novel model of fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(6), 737-743.
- Borgmann, U., Bennie, D. T., Ball, A. L., & Palabrica, V. (2007). Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations. *Chemosphere*, 66(7), 1278-1283.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Büege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-310.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D., & Zuccato, E. (2006). Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental Science & Technology*, 40(1), 357-363.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(3), 309-315.
- Comeau, F., Surette, C., Brun, G. L., & Losier, R. (2008). The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. *Science of the Total Environment*, 396(2), 132-146.
- Correa, M., Arizzi, M. N., Betz, A., Mingote, S., & Salamone, J. D. (2003). Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. *Brain Research Bulletin*, 62(3), 197-202.
- Cserhati, T., Forgács, E., & Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, 28(5), 337-348.
- Domitrovic, H. A. (1997). El empleo de peces autóctonos para la realización de ensayos de toxicidad: evaluación de la especie *Aequidens portalegrensis*. *Revista de Ictiología*, 5, 37-42.

- FAO. 2010. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *Departamento de Pesca y Acuicultura [Online]*. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/es>. Fecha de acceso 08/05/11.
- Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 122–159.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239–247.
- Gagné, F., Blaise, C., & André, C. (2006). Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(3), 329–336.
- Gómez, M. J., Martínez-Bueno, M. J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A. R., & Agüera, A. (2007). Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 66(6), 993–1002.
- 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.
- Gómez-Oliván, L. M., Neri-Cruz, N., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Dublán-García, O., & Corral-Avitia, A. Y. (2012). Assessing the oxidative stress induced by paracetamol spiked in artificial sediment on *Hyalella azteca*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(1), 5097–5104.
- Gonzalez-Rey, M., & Bebianno, M. J. (2011). Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) ibuprofen distresses antioxidant defense system in mussel *Mytilus galloprovincialis* gills. *Aquatic Toxicology*, 105(3), 264–269.
- Gunzler, W., & Flohe-Clairborne, A. (1985). Glutathione peroxidase. In R.A. Green-Wald (Ed.), *Handbook of methods for oxygen radical research* (pp. 285–290). Boca Raton FL: CRC Press.
- Hernando, M. D., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A. R., & Barceló, D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, 69(2), 334–342.

- Hong, H. N., Kim, H. N., Park, K. S., Lee, S. K., & Gu, M. B. (2007). Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere*, 67(11), 2115-2121.
- Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Colín-Cruz, A., Neri-Cruz, N., & García-Medina, S. (2013). Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.025>
- Jaquenod de Zsögön, S. (2007). Vocabulario ambiental práctico. *Dykinson. Madrid*, p.p. 46.
- Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., & Wolff, S. P. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202(2), 384-389.
- Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., & Lester, J. N. (2001). Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review. *Environmental technology*, 22(12), 1383-1394.
- Khetan, S. K., & Collins, T. J. (2007). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chemical Reviews-Columbus*, 107(6), 2319-2364.
- Kosjek, T., Heath, E., & Krbavčič, A. (2005). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environment international*, 31(5), 679-685.
- Lam, M. W., Young, C. J., Brain, R. A., Johnson, D. J., Hanson, M. A., Wilson, C. J., Richards, S. M., Solomon, K. R., Mabury, S.A. (2004). Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(6), 1431-1440.
- Letzel, M., Metzner, G., & Letzel, T. (2009). Exposure assessment of the pharmaceutical diclofenac based on long-term measurements of the aquatic input. *Environment international*, 35(2), 363-368.
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233, 346-357.
- Mehinto, A. C., Hill, E. M., & Tyler, C. R. (2010). Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental science & technology*, 44(6), 2176-2182.

- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–3175.
- Monforte, G. G., & Cantú, M. P. C. (2009). Escenario del agua en México. *CULCyT: Cultura Científica y Tecnológica*, 6(30), 31–40.
- Montague, P. (2006). Drugs in the water. *Rachel's environment & health weekly*, 614, 15-22.
- Nunes, B., Gaio, A. R., Carvalho, F., & Guilhermino, L. (2008). Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2), 341–354.
- Oviedo-Gómez, D. G. C., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., & Gómez-Oliván, L. M. (2010). Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29(1), 39–43.
- Park, W. H., Han, Y. H., Kim, S. H., & Kim, S. Z. (2007). Pyrogallol, ROS generator inhibits As4. 1 juxtaglomerular cells via cell cycle arrest of G₂ phase and apoptosis. *Toxicology*, 235(1), 130-139.
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Riva, C., & Provini, A. (2009). An *in vitro* biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicology in vitro*, 23(5), 935-942.
- 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(1), 112–117.
- Paxéus, N. (1996). Organic pollutants in the effluents of large wastewater treatment plants in Sweden. *Water Research*, 30(5), 1115-1122.
- Peñate, I. Q., Haza, U. J. J., Wilhelm, A. M., & Delmas, H. (2009). Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 40(3), 173-179.

- Quinn, B., Gagné, F., & Blaise, C. (2008). The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of the Total Environment*, 402(1), 62-69.
- Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., & Freeman, B. A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 22028–22034.
- Richardson, S. D. (2009). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 81(12), 4645–4677.
- SAGPyA. 2007. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Carpa (*Cyprinus carpio*) [Online]. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar. Fecha de acceso 08/05/11.
- Schreiber, F., & Szewzyk, U. (2008). Environmentally relevant concentrations of pharmaceuticals influence the initial adhesion of bacteria. *Aquatic Toxicology*, 87(4), 227-233.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., & Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68(2), 141–150.
- Scott, M. J., & Jones, M. N. (2000). The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes*, 1508(1/2), 235-251.
- Siemens, J., Huschek, G., Siebe, C., & Kaupenjohann, M. (2008). Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley. *Water Research*, 42(8), 2124–2134.
- Sinha, S., Mallick, S., Misra, R. K., Singh, S., Basant, A., & Gupta, A. K. (2007). Uptake and translocation of metals in *Spinacia oleracea* L. grown on tannery sludge-amended and contaminated soils: Effect on lipid peroxidation, morpho-anatomical changes and antioxidants. *Chemosphere*, 67(1), 176-187.
- Sirisattha, S., Momose, Y., Kitagawa, E., & Iwahashi, H. (2004). Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis. *Water Research*, 38(1), 61–70.

- Sohal, R. S., Mockett, R. J., & Orr, W. C. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), 575-586.
- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., & Förlin, L. (2000). Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology*, 48(4), 431-442.
- Sui, Q., Huang, J., Deng, S., Yu, G., & Fan, Q. (2010). Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China. *Water research*, 44(2), 417-426.
- Taxe-Wuersch, A., De Alencastro, L. F., Grandjean, D., & Tarradellas, J. (2005). Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research*, 39(9), 1761-1772.
- Ternes, T. A., Bonerz, M., Herrmann, N., Teiser, B., & Andersen, H. R. (2007). Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: An option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemosphere*, 66(5), 894-904.
- Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S., & Müller, S. R. (2003). Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental science & technology*, 37(6), 1061-1068.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178-189.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. J., & 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(9), 1361-1371.

- Wu, M., Chaudhary, A., Khan, I. A., & Dasmahapatra, A. K. (2008). Ethanol teratogenesis in Japanese medaka: effects at the cellular level. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 149(1), 191–201.
- Wu, D., & Cederbaum, A. I. (2005). Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2), 70–76.
- Yamanaka, H., Sogabe, A., Handoh, I. C., & Kawabata, Z. (2011). The effectiveness of clove oil as an anaesthetic on adult common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(2), 210–213.
- Zhang, Y., Geißen, S. U., & Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73(8), 1151-1161.
- Zuccato, E., Castiglioni, S., & Fanelli, R. (2005). Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), 205–209.
- 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(1), 15-21.