

# Toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre larvas del camarón salino *Artemia franciscana* (Crustacea: Artemiidae)

Iannacone, JJ<sup>1,2\*</sup>, Alvariño, L<sup>2</sup>, Valle Riestra, V<sup>1</sup>, Ymaña, B<sup>1</sup>, Argota G<sup>3</sup>, Fimia, F<sup>4</sup>, Carhuapoma M<sup>5</sup>, Castañeda, L<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú.

<sup>2</sup> Universidad Nacional Federico Villarreal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Lima, Perú.

<sup>3</sup> Laboratorio de Ecotoxicología. Grupo de Estudios Preclínicos. Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED). Universidad de Ciencias Médicas. Santiago de Cuba, Cuba.

<sup>4</sup> Facultad de Tecnología de la Salud "Julio Trigo López". Universidad de Ciencias Médicas "Dr. Serafín Ruiz de Zárate Ruiz" de Villa Clara, Cuba.

<sup>5</sup> Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

**Resumen:** *Artemia franciscana* "camarón salino", es un crustáceo sensible a un amplio rango de compuestos químicos, de fácil manejo en el laboratorio, y con un cultivo relativamente sencillo y barato. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre *A. franciscana* para establecer la concentración prevista que no causa efectos (PNEC) sobre los organismos marinos y obtener los niveles guía para la protección de la vida acuática. Con los nauplios II de *A. franciscana*, dentro de las 24 h de eclosión, se procedió a realizar los bioensayos de toxicidad calculando la Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) a 24 h y 48 h de exposición. Se observó la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad a 48 h de exposición para tres agentes antiparasitarios comerciales: Mebendazol > Albendazol > Metronidazol. Con relación al efecto tóxico letal de seis agentes antimicrobianos comerciales se vio la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad a 48 h de exposición: Triclosan > Clotrimazol > Itraconazol > Ketoconazol > Oxitetraciclina > *Mimosa*. El camarón salino mostró efectos de mortalidad por acción de cinco sustancias con propiedades insecticidas, encontrándose el siguiente orden de mayor a menor mortalidad a 48 h de exposición: Cipermetrina > Rotenona > Carbaryl > Canela > Malation. Las tres sustancias químicas calificadas como muy tóxicas y que presentaron los niveles guía más bajos para la protección de la vida acuática fueron Triclosan (0,72 ug·L<sup>-1</sup>), Cipermetrina (0,84 ug·L<sup>-1</sup>) y Clotrimazol (0,97 ug·L<sup>-1</sup>). Se observó que diez (71,42%) de las sustancias químicas mostraron fuerte actividad citotóxica.

**Palabras clave:** antimicrobiano; antiparasitario; insecticida; letalidad; toxicidad.

**Abstract:** *Toxicity of antiparasitic, antimicrobial agents and insecticides on larvae of brine shrimp Artemia franciscana (crustacea: artemiidae)*

*Artemia franciscana* "brine shrimp", is sensitive to a wide range of chemical structures, and easy handling in the laboratory and with a relatively simple and inexpensive crustacean culture. The aim of this study was to evaluate the toxicity of parasiticides agent, antimicrobials agent and insecticides on *A. franciscana* to establish Predicted No-Effect Concentration (PNEC) on marine organisms and obtain guidance levels for the protection of aquatic life. With *A. franciscana* nauplii II, within 24 h of hatching, we proceeded to perform toxicity bioassays calculating the average lethal concentration (LC<sub>50</sub>) at 24 h and 48 h of exposure. The following sequence of high to low toxicity to 48 h of exposure to three commercial antiparasitic agents were observed: Mebendazole > Albendazole > Metronidazole. Regarding the lethal toxic effect of six commercial antimicrobial agents about *A. franciscana*, the following sequence of toxicity at 48 h of exposure was observed: Triclosan > Clotrimazole > Itraconazole > Ketoconazole > oxytetracycline > *Mimosa*. The brine shrimp mortality showed effects on five substances with insecticidal properties, meeting the following order

from highest to lowest mortality at 48 h of exposure Cipermethrin > Rotenone > Carbaryl > Cinnamon > Malathion. The three chemicals were classified as very toxic and presented lower levels guidance for the protection of aquatic life were Triclosan (0,72 ug·L<sup>-1</sup>), Cipermetrina (0,84 ug·L<sup>-1</sup>) y Clotrimazol (0,97 ug·L<sup>-1</sup>). Ten of chemicals (71.42%) showed strong cytotoxic activity.

**Keywords:** antimicrobial; antiparasitic; insecticide; lethality; toxicity.

## Introducción

Los productos farmacéuticos se utilizan cada vez más en medicina humana y veterinaria, su consumo es considerable en los últimos tiempos; así cerca de 3000 diferentes sustancias son usadas en medicina humana en la Unión Europea (Fent et al., 2006; Pérez et al., 2008). Los productos farmacéuticos humanos comúnmente utilizados son los anti-inflamatorios no esteroideos, analgésicos, antifúngicos, antibióticos, reguladores de lípidos, beta bloqueadores, esteroides y hormonas relacionadas (Halling-Sorensen et al., 1998; Daughton y Ternes, 1999; Charriel, 2003; Fent et al., 2006; Thomas & Barber, 2011). Entre estos, los antimicrobianos y los antiparasitarios incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción (Jurado, 1989). La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros; de acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción (Gregory, 2005).

Gartenstein et al. (2006) señalan que a pesar que los insecticidas son útiles, existe un creciente interés en el efecto tóxico y en el destino ambiental de estos insecticidas al llegar al ambiente acuático, pudiendo ocasionar un riesgo en los estadios tempranos de crustáceos zoopláctónicos no objetivos y en la cadena trófica que son componentes (Varó et al., 1998; Lee et al., 2011; Iannacone et al., 2014).

Muchos de estos productos químicos orgánicos emergentes aplicados con propósitos de salud pública, veterinaria o agrícola pueden llegar finalmente al ambiente marino por rutas directas o indirectas (Iannacone y Alvariño, 2007; Iannacone et al., 2014). Por ende, la presencia y la evaluación de los productos químicos antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas en el ambiente acuático es un área de investigación emergente a nivel global (Halling-Sorensen et al., 1998; Daughton & Ternes, 1999; Jjemba, 2006). La industria química somete sus compuestos químicos a diferentes tipos de bioensayos para determinar su toxicidad. Muchas pruebas involucran protocolos que trabajan sobre líneas celulares específicas humanas, células de animales o en animales de laboratorio (Treviño et al., 2012; Angelina et al., 2014; Naidu et al., 2014).

Por medios de los bioensayos de ecotoxicidad se determinan los estándares de calidad ambiental o los niveles guía para cada agente químico para la protección de la vida acuática al establecer la concentración prevista que no causa efectos (PNEC) sobre los

\*e-mail: joseiannaconeoliver@gmail.com

organismos marinos (Iannacone et al., 2000; Iannacone y Alvaríño, 2002; Burton y Nordstrom, 2004; Iannacone et al., 2011).

Se han desarrollado bioensayos económicos, rápidos, reproducibles, fáciles de llevar a cabo, y que no necesita de condiciones extremas de asepsia ni un manipuleo especializado como la prueba que emplea al microcrustáceo para la detección y aislamiento de sustancias químicas bioactivas/o tóxicas, denominadas como “mortalidad aguda de los nauplios de *Artemia franciscana*” (Carballo et al., 2002; Onocha y Ali, 2010; Luigi et al., 2012; Treviño et al., 2012).

*Artemia franciscana* (Crustacea: Artemiidae) “camarón salino” o “camarón de salmuera” es un crustáceo ampliamente usado para evaluar compuestos con actividad biológica y con diversas estructuras químicas (Michael et al., 1956; Varó et al., 1998; Cisneros y Vinatea, 2009; Asem et al., 2010; Pino y Jorge, 2010; Borroto et al., 2011; Dvorak et al., 2012; Nwauzoma et al., 2013). Se ha propuesto su uso con diversas modificaciones para diferentes pruebas de toxicidad (Vanhaecke et al., 1981; González et al., 2007; Gutiérrez et al., 2007; Praveen et al., 2012; Sharma et al., 2013) debido a su fácil manejo en el laboratorio y su cultivo relativamente sencillo y barato. *A. franciscana* “camarón salino” es el microcrustáceo autóctono del continente americano más empleado como alimento vivo para peces y crustáceos marinos en cultivo por su alto valor nutricional (Varó et al., 1998; Molina-Salinas y Said-Fernández, 2006). Esta especie puede ser considerada una herramienta preliminar para evaluar la toxicidad de: (1) toxinas fúngicas, (2) extractos de plantas, (3) metales pesados, (4) cianobacterias, (5) algas, y (6) materiales dentales (Gartenstein et al., 2006; Molina-Salinas y Said-Fernández, 2006; Bustos-Obregón y Vargas 2010; Angelina et al., 2014).

A la fecha, no se tiene ninguna base de datos sistematizada en el Perú que evalúe el efecto letal de los antiparasitarios (Albendazol, Metronidazol y Mebendazol), los antimicrobianos (Ketoconazol, Clotrimazol, Triclosán, Itraconazol, Oxitetraciclina y *Mimosa*) y de los insecticidas (Cipermetrina, Carbaril, Malation, Canela y Rotenona), para su empleo en toxicología, farmacología, medicina y biología. Solo algunas entidades del estado peruano tienen información básica y genérica sobre los agentes antiparasitarios, agentes antimicrobianos e insecticidas con registro vigente, pero con muy escasa información sobre los efectos ecológicos (DIGEMID 2015, SENASA 2015). Al ser las larvas de *A. franciscana* ampliamente empleadas como una herramienta en pruebas de toxicidad, nos permitirá tener un registro actualizado de tres agentes antiparasitarios, seis agentes antimicrobianos y cinco insecticidas para su empleo en la evaluación de riesgos en el ambiente marino, al determinar los niveles que en base la PNEC pueden tolerarse de un contaminante en un cuerpo de agua, sin producir efectos adversos y proteger a la vida acuática. Estos resultados son como un punto de partida para establecer y reajustar los estándares de calidad de agua para agentes antiparasitarios, agentes antimicrobianos e insecticidas que podrían ser incluidos en la normativa ambiental de calidad de agua de mar, que son escasos para estas sustancias químicas sintéticas y naturales.

En el presente estudio, las sustancias químicas sintéticas y naturales seleccionadas se probaron *in vivo* para evaluar su efecto citotóxico sobre los nauplios del camarón salino. La prueba de letalidad con *A. franciscana* ha sido utilizada con éxito como un estudio preliminar o de tamizaje de agentes citotóxicos activos y potentes. En la literatura especializada el bioensayo con *A. franciscana* es denominado prueba de evaluación de citotoxicidad con el camarón salino (Baravalia et al., 2012; Nguta et al., 2012; Olowa y Nuñez, 2013). Nguta et al. (2012) propone una división en cuatro categorías de citotoxicidad de las sustancias químicas empleando al camarón salino.

Recientemente, Olivero-Verbel et al. (2009) proponen el índice de vulnerabilidad ( $\gamma$ ) en base a la relación entre la  $CL_{50}$  a 24 h/  $CL_{50}$  a

48 h del camarón salino y calculado para cada sustancia química evaluada para sugerir efectos dependientes en el desarrollo por sustancias químicas en base a la relación entre la  $CL_{50}$  a 24 h/  $CL_{50}$  a 48 h del camarón salino.

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre las larvas del camarón salino *A. franciscana* para establecer el PNEC sobre los organismos marinos y obtener los niveles guía para la protección de la vida marina.

## Material y métodos

### *Agentes antiparasitarios, agentes antimicrobianos e insecticidas*

Las catorce sustancias químicas fueron seleccionadas en base a ser agentes antiparasitarios, agentes antimicrobianos e insecticidas de amplio uso y con diferentes mecanismos de acción en la Salud Pública y Veterinaria en el Perú (Upcroft y Upcroft, 2001; Sarikaya, 2009; Nisticò et al., 2011; Thomas y Barber, 2011; Silva et al., 2013; DIGEMID, 2015; DrugBank, 2015; SENASA, 2015; Xu, 2015). Se tomaron en cuenta los criterios de selección de sustancias químicas sintéticas y naturales propuesto por Jjemba (2006).

Agentes Antiparasitarios: (1) Albendazol (químico sintético) comercializado por Glaxosmithkline Peru S.A., (2) Metronidazol (químico sintético) comercializado por Sanofi Aventis Perú y (3) Mebendazol (químico sintético) comercializado por Laboratorios Naturales Y Genéricos S.A.C. Agentes Antimicrobianos: (4) Ketoconazol (químico sintético) comercializado por Laboratorios Naturales Y Genéricos S.A.C, (5) Clotrimazol (químico sintético) comercializado por Bayer Perú S.A., (6) Triclosan (químico sintético) comercializado por Colgate-Palmolive Company Perú, (7) Itraconazol (químico sintético) comercializado por Instituto Quimioterápico S.A., (8) Oxitetraciclina (químico sintético) comercializado por Medifarma Perú y (9) *Mimosa* (mezcla de origen natural) comercializado por Atlántica Agrícola Perú S.A.C. Insecticidas: (10) Cipermetrina (químico sintético) comercializado por Servicios y Formulaciones Industriales S.A -SERFI S.A., (11) Carbaril (químico sintético) comercializado por Farmex S.A., (12) Malation (químico sintético) comercializado por Farmagro S.A., (13) Canela (mezcla de origen natural) comercializado por Atlántica Agrícola Perú S.A.C y (14) Rotenona (origen natural) comercializado por Demeterry, S.A.C. (Tabla 1). Para cada sustancia química sintética y natural se indica su CAS químico, su nombre comercial en el mercado nacional del Perú, las cinco a seis concentraciones de los antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas, su uso y su mecanismo de acción (Tabla 1).

Las sustancias químicas sintéticas y naturales se utilizaron más un control con cuatro repeticiones por concentración (Tabla 1). Las diluciones de los agentes antiparasitarios, agentes antimicrobianos e insecticidas calculados usaron un factor de 0,5 (APHA, 1995). El medio de dilución empleado fue agua de mar filtrada. Para asegurar la máxima disolución de cada una de las sustancias químicas sintéticas y naturales en el agua de mar se empleó un agitador orbital por 30 min y posteriormente se realizaron las 6-7 diluciones según el caso.

### *Artemia franciscana*

Los huevos de *A. franciscana* se obtuvieron de Sera-Artemia Mix, Salt Lake USA, comercializado por Zoofarma® Lima, Perú, Laboratorio-Acuario de la ciudad de Lima, Perú. Se procedió a preparar las condiciones para la eclosión de los huevos, con el fin de obtener los individuos en estadio nauplio II, los cuales fueron usados en el presente experimento (Naidu et al., 2014). Se incorporaron los huevos en un vaso de precipitado de 500 mL conteniendo agua destilada y se expuso a luz intensa por un periodo de tiempo de 1 h. Luego, se utilizó hipoclorito de sodio (lejía Clorox®) a una concentración de 5,25%. En proporción 100 mL por 900 mL de agua, se agitó constantemente por espacio de 30 min con el fin de facilitar la eclosión de los huevos. Se apreció el cambio de coloración de los huevos de una coloración marrón inicial a una coloración naranja.

**Tabla 1.** Sustancia química, Número CAS químico, Nombre comercial en Perú, concentraciones, uso y mecanismo de acción de los agentes químicos antiparasitarios, agentes antimicrobianos e insecticidas usados en el bioensayo con *A. franciscana*.

Sustancia Química	CAS	Nombre Comercial en Perú	Concentraciones mg·L <sup>-1</sup>	Uso y mecanismo de acción
Albendazol	54965-21-8	Zentel 400 mg	37,5; 75; 150; 300; 600	Antiparasitario. Se emplea para el control de platelmintos, nematodos y <i>Giardia</i> . Causa alteraciones degenerativas en las células del tegumento y del intestino de vermes al unirse a un sitio de unión específico de la tubulina, inhibiendo así la polimerización y ensamblaje de los microtúbulos (Upcroft y Upcroft 2001)
Metronidazol	14;	Flagyl 5 g/100 mL	312,5; 625; 1250; 2500 y 5000	Antiparasitario. Se emplea contra protozoos: <i>Trichomonas</i> , Amebas y <i>Giardia</i> . Desestabiliza la estructura hélica del ADN en los protozoos, inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos (Upcroft y Upcroft, 2001).
Mebendazol	31431-39-7	Mebendazol Genérico	45; 90, 180; 360 y 720	Antiparasitario. Antihelmíntico (Upcroft y Upcroft, 2001).
Ketoconazol	65277-42-1	Ketoconazol Genérico	12,5; 25; 50; 100 y 200	Antimicótico. Disminuye el ergosterol y altera la permeabilidad de las membranas de los hongos lo que lleva a una desestructuración de los orgánulos intracelulares y de la capacidad de división (DrugBank, 2015).
Clotrimazol	23593-75-1	Baycuten N Crema	1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 y 50	Antimicótico. Inhibe la división y crecimiento de hongos. Altera la permeabilidad de la pared celular fúngica e inhibe la actividad de enzimas dentro de la célula (Thomas y Barber, 2011).
Triclosán	3380-34-5	Colgate Total 12®. Triclosan 0,3%. Fluoruro de Sodio 0,32%.	0,18; 0,37; 0,75; 1,5 y 3	Antibacteriano y Antimicótico. El triclosán se difunde a través de la membrana citoplásmica bacteriana e interfiere en el metabolismo lipídico. Actúa como un biocida, y en dosis menores tiene efecto bacteriostático (Neumegen <i>et al.</i> , 2005; Chalew y Halden, 2009).
Itraconazol	84625-61-6	Itraconazol 100 mg	6,25; 12,5; 26; 50 y 100	Antimicótico. Inhibe la enzima CYP51A1, y la formación del ergosterol que forma parte de la pared celular de los hongos (DrugBank, 2015).
Oxitetraciclina	79-57-2	Tetrasona 250	312; 625; 1250; 2500 y 5000	Antibacteriano. Bacteriostático. Inhibidor de la síntesis proteica bacteriana (DrugBank, 2015).
Mimosa (Extracto de <i>Mimosa tenuiflora</i> )	500-44-7	Mimoten 80%	200; 400; 800; 1600 y 3200	Antimicótico y Bactericida. Provoca cambios en la permeabilidad de la membrana e inhibidores de sensores "quorum" (QS) de la bacteria (Silva <i>et al.</i> , 2013).
Cipermetrina	52315-07-8	Ciper 10 10%	0,41; 0,83; 1,66; 3,33; 6,66	Insecticida. Estimula el sistema nervioso central, posiblemente por interferencia competitiva con la conductancia catiónica en la capa lipídica de las células nerviosas, bloqueando la transmisión del impulso nervioso (Sarıkaya, 2009).
Carbaril	63-25-2	Carvadin® 5% DP	0,75; 1,5; 3,6 y 12	Insecticida. Inhibe competitivamente la acción de la acetilcolinesterasa (DrugBank, 2015).
Malation	121-75-5	Extrathion 57% EC	12,5; 25; 50; 100 y 200	Insecticida. La toxicidad del malation se produce por la unión de su metabolito activo, malaoxón, con la acetilcolinesterasa (AChE), la cual se encuentra en los mamíferos, anfibios, peces, reptiles, aves e insectos (Xu, 2015).
Canela (Extracto de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )	84649-98-9	Canelys 70%	87,5; 175; 350; 700; 1400	Insecticida. Acaricida. Fungicida. Actúa por contacto de bajo efecto residual (Abbasipour <i>et al.</i> , 2012).
Rotenona (Extracto de <i>Lonchocarpus nicou</i> )	83-79-4	Extracto 40%	6,25; 12,5; 25; 50 y 100	Insecticida. La acción tóxica de la rotenona radica en su acción sobre la cadena de electrones mitocondrial, ya que tiene la capacidad de inhibir al complejo I de dicha cadena (el complejo NADH-ubiquinona reductasa) y bloquea pues la respiración celular (Nisticò <i>et al.</i> , 2011).

Seguido se enjuagaron los huevos con agua destilada, se trasladaron a un vaso de precipitado de 1000 mL conteniendo agua de mar filtrada y 7,5 g de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), y luego se llevó este a la incubadora a 27°C durante un periodo de 24 h. Pasado el tiempo de incubación se sometieron los huevos a una fuerte aireación hasta su eclosión, y eclosionaron a temperatura ambiente (entre 19 °C a 22 °C), dos días después de haber comenzado la fase de aireación (Maguiña y Iannacone, 2000; Iannacone y Pérez 2008; Pérez *et al.*, 2010). Se verificó y seleccionó para los bioensayos solo los nauplios II de *A. franciscana* dentro de las 24 h de eclosión, por la presencia de la perforación anal que está ausente en el nauplio I, y la ausencia de un sistema digestivo lineal que solo está presente en el nauplio III (Bustos-Obregón y Vargas 2010).

## Procedimientos

### Bioensayos

Una vez obtenidos los nauplios II de *A. franciscana* se procedió a realizar los bioensayos preliminares de toxicidad aguda por 8 h de exposición para determinar las concentraciones de los ensayos definitivos (USEPA 2002). Para los ensayos definitivos se siguieron las recomendaciones de la USEPA (2002) para las pruebas de toxicidad aguda con *A. salina*. Sin embargo, se realizaron algunos ajustes según el procedimiento estandarizado en nuestro Laboratorio

para una adecuada obtención de la Concentración Letal media (CL<sub>50</sub>) (Maguiña y Iannacone, 2000). Por lo que se utilizaron mayormente un total de 240 individuos de *A. franciscana* para cada una de los agentes químicos evaluados, a excepción de Clotrimazol que se empleó 280 individuos; distribuyéndose al azar diez nauplios de II estadio en cada envase de 25 mL de capacidad con 20 mL de solución y en cada una de las cuatro replicas, las cuales contuvieron las seis a siete diferentes diluciones de los agentes antiparasitarios, agentes antimicrobianos e insecticidas (Tabla 1). Los nauplios II no se alimentaron durante el bioensayo y no fueron observados signos de canibalismo. Se contó el número de nauplios vivos y muertos en cada una de las diluciones a las 24 h y 48 h de exposición. Los ensayos fueron considerados válidos cuando la mortalidad en el control no fue mayor al 10% según el criterio estandarizado (Calow, 1993). Se usó como criterio de mortalidad la carencia de movilidad a 15 s de observación a la lupa estereoscópica. Antes de efectuar las lecturas se agitaron los envases en forma circular para reactivar el movimiento de los organismos que se posan inmóviles en el fondo (Castillo, 2004). Se empleó el bicromato de potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) como control positivo determinándose una CL<sub>50</sub> con rangos entre 8 a 15 mg·L<sup>-1</sup> (Brugés *et al.*, 2007).

### Tratamiento de datos

Las pruebas de toxicidad aguda se evaluaron en cinco-seis



concentraciones, más un control o testigo con cuatro repeticiones, en un diseño en bloque completamente aleatorio (DBCA) de 6-7x4. La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno, con el fin de ajustar los datos a la normalidad. Para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos y entre las repeticiones se realizó la prueba de Tukey. Los cálculos de la mortalidad corregida se realizaron mediante la fórmula de Abbott en caso de muerte natural en el grupo testigo cuando fue menor al 20% (Macedo et al., 1997). La CL<sub>50</sub> se calculó usando el programa computarizado EPA-Probit versión 1.5. El modelo de regresión fue verificado usando el estadístico Chi-cuadrado. Los valores de CL<sub>50</sub> para los agentes antiparasitarios, agentes antimicrobianos e insecticidas fueron comparados y ordenados de mayor a menor toxicidad tomando en consideración sus límites de confianza inferior y superior al 95%. Con el fin de determinar la Concentración prevista sin efecto (PNEC) en  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de los tres agentes antiparasitarios, los seis agentes antimicrobianos y los cinco insecticidas comerciales. Se utilizó la siguiente fórmula:  $\text{PNEC} = \text{CL}_{50} \text{ en } \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ a } 48 \text{ h} / \text{Factor de seguridad (ECT, 2015)}$ . Siendo el Factor de seguridad o de evaluación igual a 1000. Este último valor es utilizado para datos de toxicidad aguda en base a la CL<sub>50</sub> para una sola especie ensayada (ECT, 2015) y determinar los niveles de seguridad que puede tolerarse de una sustancia química sintética o natural en un cuerpo de agua, sin producir efectos adversos y proteger a la vida acuática. Los resultados para los estadísticos descriptivos e inferenciales se analizaron mediante el paquete estadístico IBM-SPSS versión 21.0. Se empleó el bioensayo con *A. franciscana* como una alternativa preliminar viable al ensayo con ratones, los cuales son más caros y están relacionados con restricciones éticas (Nguta et al., 2012).

Se calculó para cada sustancia química evaluada el índice de vulnerabilidad ( $\gamma$ ) para el desarrollo en base a la relación entre la CL<sub>50</sub> a 24 h/ CL<sub>50</sub> a 48 h del camarón salino, indicando que valores mayores a 3 sugieren un efecto de las sustancias químicas dependientes del desarrollo (Olivero-Verbel et al., 2009). La actividad citotóxica de las catorce sustancias químicas sobre *A. franciscana* a 48 h de exposición fue clasificada en cuatro categorías en base a su CL<sub>50</sub>: (1) Fuerte actividad citotóxica < 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; (2) Moderada actividad citotóxica entre 100 y 500  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; (3) Débil actividad citotóxica 500 y 1000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y (4) ausencia de toxicidad > 1000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Nguta et al., 2012; Naidu et al., 2014).

## Resultados

La Tabla 2 nos muestra los efectos tóxicos letales (CL<sub>50</sub>) de tres agentes antiparasitarios comerciales sobre *A. franciscana* a 24 h y 48 h de exposición. Se observó una secuencia de mayor a menor toxicidad a 48 h de exposición para los agentes antiparasitarios en base a la CL<sub>50</sub> y a la ausencia de superposición de sus límites de confianza al 95% inferior y superior: Mebendazol > Albendazol > Metronidazol. Con relación al efecto tóxico letal (CL<sub>50</sub>) de seis agentes antimicrobianos comerciales sobre *A. franciscana* se vio la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad a 48 h de exposición en base a la CL<sub>50</sub> y a la ausencia de superposición de sus límites de confianza al 95% inferior y superior: Triclosan = Clotrimazol > Itraconazol > Ketoconazol > Oxitetraciclina > Mimosina (Tabla 2). El camarón salino *A. franciscana* mostró efectos de mortalidad por acción de cinco sustancias con propiedades insecticidas, encontrándose el siguiente orden de mayor a menor mortalidad en términos de CL<sub>50</sub> ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a 48 h de exposición en base a la CL<sub>50</sub> y a la ausencia de superposición de sus límites de confianza al 95% inferior y superior: Cipermetrina > Rotenona > Carbaryl > Canela = Malation (Tabla 2).

Entre las 14 sustancias químicas ensayadas sobre *A. franciscana*, las tres que presentaron la mayor mortalidad en términos de CL<sub>50</sub> ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a 48 h de exposición en base a la CL<sub>50</sub> y a la ausencia de superposición de sus límites de confianza al 95% inferior y superior, y los valores más bajos de Concentración prevista sin efecto (PNEC)

fueron Triclosan, Cipermetrina y Clotrimazol (Tabla 2).

**Tabla 2.** Concentración Letal media (CL<sub>50</sub>) en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , Concentración Letal media inferior al 95% (CL<sub>50</sub>inf) en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , Concentración Letal media superior al 95% (CL<sub>50</sub>sup) en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y Concentración prevista sin efecto (PNEC) en  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de tres agentes antiparasitarios, seis antimicrobianos y cinco insecticidas comerciales sobre *Artemia franciscana* a 24 h y 48 h de exposición. ND = No determinado. PNEC = CL<sub>50</sub> en  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a 48 h / Factor de seguridad. Factor de seguridad = 1000

Sustancias	24h ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )			48 h ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )			(PNEC a 48 h)
	CL <sub>50</sub>	CL <sub>50</sub> inf	CL <sub>50</sub> sup	CL <sub>50</sub>	CL <sub>50</sub> inf	CL <sub>50</sub> sup	
<b>Agentes antiparasitarios</b>							
Albendazol	508,1	408,8	680,6	346,4	297,3	415,1	346,4
Metronidazol	5707	4114	6883	925,3	421,4	2396	925,3
Mebendazol	616,7	494,9	829,5	49,3	18,9	83,36	49,3
<b>Agentes antimicrobianos</b>							
Ketoconazol	38,5	14,7	78,1	9,6	6,5	12,4	9,6
Clotrimazol	37,1	26,9	60,1	0,97	0,54	1,23	0,97
Triclosan	1,34	0,81	3,05	0,72	0,16	2,35	0,72
Itraconazol	19,8	9,41	32,1	4	3,02	5,66	4
Oxitetraciclina	923	644	1125	763	707	823	763
Mimosina	2959	2440	3905	2185	1103	5416	2185
<b>Insecticidas</b>							
Cipermetrina	1,3	0,94	1,8	0,84	0,59	1,52	0,84
Carbaryl	11,1	8,8	15,1	6,92	6,1	10,1	6,92
Malation	86,9	77,7	95,9	41,9	17,7	71,8	41,9
Canela	36,9	18,6	59,0	25,6	13,8	46,5	25,6
Rotenona	6,89	0,10	17,52	4,4	2,7	5,28	4,4

La Tabla 3 nos muestra los valores del índice de Vulnerabilidad para el desarrollo en base a la relación entre la CL<sub>50</sub> a 24 h/ CL<sub>50</sub> a 48 h, indicando que cinco valores de 14 fueron mayores a 3 por lo que se sugiere un efecto de las sustancias químicas dependiente del desarrollo (Tabla 3).

Con relación a las categorías citotóxicas sobre *A. franciscana* se observó que diez mostraron fuerte actividad citotóxica, uno moderada actividad citotóxica, dos débil actividad citotóxica y uno ausencia de actividad citotóxica (Tabla 3).

## Discusión

Entre las 14 sustancias químicas evaluadas sobre *A. franciscana*, las tres que presentaron la mayor mortalidad (< 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en términos de CL<sub>50</sub> a 48 h de exposición fueron Triclosan, Cipermetrina y Clotrimazol. Estas tres sustancias son clasificadas por Mischke y Avery (2013) como altamente tóxicas para el ambiente acuático por presentar valores entre 0,1 a 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en una escala de cinco niveles.

La toxicidad del disruptor endocrino Triclosan sobre *A. franciscana* presentó un valor de CL<sub>50</sub> de 0,72  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , el cual fue numéricamente mayor al observado para peces (de 0,26 a 0,60  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a 96 h de exposición) y para otros microcrustáceos acuáticos (*Daphnia magna* y *Ceriodaphnia* sp. de 0,18 a 0,39  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Neumegen et al., 2005; Chalew y Halden, 2009; Thomaidi et al., 2015). Varios autores sugieren para el Triclosan efectos ecológicos adversos en el medio acuático (Neumegen et al., 2005; Chalew y Halden, 2009; Thomaidi et al., 2015).

La toxicidad de la cipermetrina sobre *A. franciscana* fue de 0,84  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a 48 h de exposición. La Cipermetrina es un insecticida piretroide, que controla intensamente una amplia gama de plagas en el ámbito agropecuario y es altamente tóxica para los invertebrados acuáticos (Sarikaya, 2009). Para los microcrustáceos, a las 48 h de exposición, la Concentración Efectiva media (CE<sub>50</sub>) para *D. magna* fue de 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , y a las 24 h de exposición, la CL<sub>50</sub> para *Gammarus pulex* (Linnaeus, 1758) fue de 0,05  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La cipermetrina es altamente tóxica para los peces, con valores de CL<sub>50</sub> a 96 h que oscilan entre 0,7

**Tabla 3.** Índices de vulnerabilidad ( $\gamma$ ) para el desarrollo de nauplios de *Artemia franciscana* bajo el efecto de antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas comerciales. Valores mayores a 3 indican efecto dependiente del desarrollo. Categorías de Actividad citotóxica. 1= Fuerte actividad citotóxica < 100 mg·L<sup>-1</sup>; 2=Moderada actividad citotóxica entre 100 y 500 mg·L<sup>-1</sup>; 3=Débil actividad citotóxica 500 y 1000 mg·L<sup>-1</sup> y 4=No tóxica > 1000 mg·L<sup>-1</sup> (Nguta et al., 2012).

Sustancia Química	CL <sub>50</sub> 24 h	CL <sub>50</sub> 48 h	Índice de Vulnerabilidad	Interpretación	Categoría Ciotóxica
<b>Agente Antiparasitario</b>					
Albendazol	508,1	346,4	1,47	Efecto independiente del desarrollo	2
Metronidazol	5707	925,3	6,17	Efecto dependiente del desarrollo	3
Mebendazol	616,7	49,3	12,51	Efecto dependiente del desarrollo	1
<b>Agente Antimicrobiano</b>					
Ketoconazol	38,5	9,6	4,01	Efecto dependiente del desarrollo	1
Clotrimazol	37,1	0,97	38,25	Efecto dependiente del desarrollo	1
Triclosan	1,34	0,72	1,86	Efecto independiente del desarrollo	1
Itraconazol	19,8	4	4,95	Efecto dependiente del desarrollo	1
Oxitetraciclina	923	763	1,21	Efecto independiente del desarrollo	3
Mimosa	2959	2185	1,35	Efecto independiente del desarrollo	4
<b>Insecticida</b>					
Cipermetrina	1,3	0,84	1,55	Efecto independiente del desarrollo	1
Carbaryl	11,1	6,92	1,60	Efecto independiente del desarrollo	1
Malation	86,9	41,9	2,07	Efecto independiente del desarrollo	1
Canela	36,9	25,6	1,44	Efecto independiente del desarrollo	1
Rotenona	6,89	4,4	1,57	Efecto independiente del desarrollo	1

y 350 ug·L<sup>-1</sup> (Sarıkaya, 2009). Nuestros resultados muestran que a pesar de ser la cipermetrina una de las sustancias químicas más tóxicas para *A. franciscana*, presentó una menor sensibilidad que otros invertebrados acuáticos y peces, y también a que en el presente ensayo se empleó un producto químico formulado comercial. Sarıkaya (2009) señala que para superar las discrepancias y los posibles efectos sinérgicos/antagónicos de los componentes de las formulaciones de los piretroides, las pruebas de toxicidad con formulaciones deben ser incluidas en conjunto con los ensayos de los ingredientes activos. El empleo de únicamente el ingrediente activo del piretroide en las pruebas de toxicidad no es suficiente (Sarıkaya, 2009).

El clotrimazol pertenece a un grupo de fungicidas inhibidores de la 14 alfa-desmetilasa y es ampliamente utilizado en la medicina humana y veterinaria, por lo que ha sido identificado como un contaminante prioritario para el medio acuático (Porsbring et al., 2009). La aromatasa convierte los andrógenos en estrógenos, los cuales participan en la diferenciación sexual en los vertebrados. El

clotrimazol inhibe esta enzima (Gyllenhammar et al., 2009) y es usado como sustancia de referencia para evaluar productos antifúngicos al inhibir la síntesis del ergosterol (Islam et al., 2003). Escher et al. (2011) consideran al clotrimazol como un tóxico prioritario en ecotoxicología y en la evaluación de riegos de productos farmacéuticos en hospitales. El efecto letal del clotrimazol en *A. franciscana* con un valor de CL<sub>50</sub> a 48 h de exposición de 0,97 mg·L<sup>-1</sup>, es menos tóxico que la CE<sub>50</sub> observada en el alga *Desmodesmus subspicatus* a 72 h de exposición de 0,098 mg·L<sup>-1</sup>, que al del microcrustáceo *D. magna* con un valor de CE<sub>50</sub> a 48 h de exposición de 0,02 mg·L<sup>-1</sup> y que al del pez *Danio rerio* a 96 h de exposición de 0,29 mg·L<sup>-1</sup> (OSPAR et al., 2013). González-Ortegón et al. (2015) indicaron que el clotrimazol en el crustáceo *Palaemon serratus* puede ocasionar reducción de la supervivencia, anomalías morfológicas, menor tasa de crecimiento y reducción del número de estadios que siguen a la larva.

Los resultados de toxicidad observados con las sustancias químicas ensayadas muestran una menor sensibilidad de la especie *A. franciscana* a varios agentes químicos o físicos en comparación con otros organismos acuáticos usados en bioensayos. En adición en las pruebas con las diferentes sustancias químicas no se utilizó DMSO con el fin de incrementar la solubilidad de las mismas (Gartenstein et al., 2006; Nunes et al., 2006; Pérez et al., 2010; Dvorak et al., 2012).

Entre los productos naturales botánicos se observó la siguiente secuencia de toxicidad en orden decreciente en términos de CL<sub>50</sub>: Rotenona >Canela >*Mimosa* (Tablas 2 y 3). La rotenona es un isoflavonoide empleando como plaguicida agrícola y como ictiocida. Es un potente inhibidor del complejo I que afecta la NADH-ubiquinona reductasa a nivel mitocondrial (Vehovszky et al., 2010). Se ha encontrado un valor de toxicidad letal aguda (CL<sub>50</sub>) de la rotenona a base de barbasco en la pulga de agua *D. magna* (3,7 ug·L<sup>-1</sup>) a 48 h de exposición, y en *Artemia salina* un valor de 0,134 mg·L<sup>-1</sup> (Vehovszky et al., 2010) y con una mayor sensibilidad que la *A. franciscana*. Unos pocos estudios en humanos han relacionado la enfermedad de Parkinson con la exposición a la rotenona y otros pesticidas neurotóxicos (Nisticó et al., 2011). Fuertes et al. (2010) indicaron el efecto del extracto liofilizado rotenona empleando el ensayo de *A. salina*, atribuyendo el resultado a la presencia principalmente de saponinas, terpenoides, alcaloides y flavonoides, principalmente Kukulkanins A and B. Entre las tres plantas ensayadas el menor efecto tóxico sobre *A. franciscana* fue para la *Mimosa*. Sin embargo, se han observado efectos molusquicidas de *Mimosa tenuiflora* sobre *Biomphalaria glabrata* (CL<sub>50</sub> = 20,22 mg·L<sup>-1</sup>) (Santos et al., 2012). Silva et al. (2013) han encontrado ausencia de efectos genotóxicos y mutagénicos de los extractos de *M. tenuiflora* en base a los ensayos de micronúcleo y ensayo de mutación reversa bacteriana con *Salmonella typhimurium*.

El índice de Vulnerabilidad ( $\gamma$ ) para el desarrollo en base a la relación entre la CL<sub>50</sub> a 24 h/ CL<sub>50</sub> a 48 h para *A. franciscana*, indicó que cinco sustancias químicas de 14: Metronidazol, Mebendazol, Ketoconazol, Clotrimazol e Itraconazol sugieren un efecto por estas sustancias químicas dependiente del desarrollo. Estos cinco productos farmacéuticos son catalogados en relación a su riesgo ambiental por la SCC (2014) en base a una ponderación de tres criterios (persistencia, bioacumulación y toxicidad) como de riesgo insignificante, no puede ser excluido el riesgo, riesgo bajo, no puede ser excluido el riesgo y de riesgo insignificante, respectivamente.

Se observó que diez de las sustancias químicas mostraron una fuerte actividad citotóxica según la clasificación de Nguta et al. (2012), incluyeron a la mayoría de los agentes antimicrobianos (Ketoconazol, Clotrimazol, Triclosan, Itraconazol) e insecticidas (Cipermetrina, Carbaril, Malation, Canela y Rotenona).

### Conclusiones

Se observó la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad a 48 h de exposición sobre el camarón salino *A. franciscana* para tres agentes antiparasitarios comerciales: Mebendazol > Albendazol

>Metronidazol. Para los seis agentes antimicrobianos comerciales sobre *A. franciscana* se vio la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad a 48 h de exposición: Triclosan > Clotrimazol > Itraconazol > Ketoconazol > Oxitetraciclina > *Mimosa*. Para las cinco sustancias con propiedades insecticidas, se encontró el siguiente orden de mayor a menor mortalidad a 48 h de exposición: Cipermetrina > Rotenona > Carbaryl > Canela > Malation. En base al factor de seguridad, las tres sustancias químicas calificadas como muy tóxicas y que presentaron los niveles o guía más bajos para la protección de la vida acuática fueron Triclosan (0,72 ug·L<sup>-1</sup>), Cipermetrina (0,84 ug·L<sup>-1</sup>) y Clotrimazol (0,97 ug·L<sup>-1</sup>).

## Bibliografía

1. Abbasipour H, Mahmoudvand M, Rastegar F, Hosseinpour M. Chemical composition, fumigant toxicity and oviposition deterrence of *Cinnamomum zeylanicum* essential oils to three stored-products insects. Arch. Sci. (Geneva). 2012; 65: 533-542.
2. Angelina M, Dewijanti ID, Hartati S, Meilawati, L (2014) Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of *Pterocarpus indicus* standardized ethanol extract. Int. J. Pharm Tech Res. 2014; 6: 676-685.
3. APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Pollution Control Federation). Standard methods for examination of water and wastewater. 19th Ed. American Health Association. Washington, D.C. 1995.
4. Asem A, Rastegar-Pouyani N, De Los Rios-Escalante P. The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda). I. True and false taxonomical descriptions. Lat. Am. J. Aquat. Res. 2010; 38: 501-506.
5. Baravalia Y, Vaghasiya Y, Chnadra S. Brine shrimp cytotoxicity, anti-inflammatory and analgesic properties of *Woodfordia fruticosa* Kurz flowers. Iran. J. Pharm. Res. 2012; 11: 851-861.
6. Borroto J, Trujillo R, De La Torre Y, Waksman N, Hernández M, Salazar R. Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L. Rev. Cubana Plant. Med. 2011; 16: 34-42.
7. Brugés K, Reza, MTR. Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. Rev. Colomb. Biote. 2007; 9: 5-13.
8. Burton GA, Nordstrom JE. An in situ toxicity identification evaluation method part I: Laboratory validation. Environ. Toxicol. Chem. 2004; 23:2844-2850.
9. Bustos-Obregon E, Vargas A. Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. Biol. Res. 2010; 43: 357-362.
10. Calow PP. Handbook of Ecotoxicology. Vol. 1. Blackwell Scientific. Oxford. 1993. 478 pp.
11. Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. BMC Biotechnol. 2002; 2:17. 472-6750/2/17.
12. Castillo G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA. México. 2004.
13. Chalew TEA, Halden RU. Environmental exposure of aquatic and terrestrial biota to Triclosan and triclocarban. J. Am. Wat. Res. Ass. 2009; 45: 4-13.
14. Charriel G. Investigación de la actividad de un nuevo antifúngico de interés clínico. Tesis doctoral, Universidad de Cordova. 2003. [Acceso 10 de noviembre del 2013] Disponible en: <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/378/13208548.pdf?sequence=1>
15. Cisneros R, Vinatea E. Producción de biomasa de *Artemia franciscana* Kellog 1906 utilizando diferentes dietas. Ecol. Apl. 2009; 8: 9-14.
16. Daughton CG, Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. Environ. Health Perspect. 1999; 107: 907-938.
17. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID). Registro de productos farmacéuticos. 2015 [Acceso 20 de julio del 2015] Disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/Main.asp?Seccion=448>
18. Drovak P, Benova K, Vitek J. Alternative biotest on *Artemia franciscana*. Ecotoxicology. Begum, g. (Ed.). InTech, 2012 [Acceso 15 de enero del 2016] Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/ecotoxicology/alternative-biotest-on-artemia-franciscana>.
19. Drugbank. Drugbank. 2015. [Acceso 16 de diciembre del 2016] Disponible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00772>.
20. ECT (Edinburgh Centre for Toxicology). Environmental Risk Assessment. UNEP/IPCS Training Module No 3. Section B. 2015. pp. 107-175. [Acceso 25 de julio del 2015] Disponible en: <http://www.chem.unep.ch/irptc/Publications/riskasse/B2text.pdf>.
21. Escher BI, Baumgartner R, Koller M, Treyer K, Lienert J, Mc Ardell, CS. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. Wat. Res. 2011; 45: 75-92.
22. Fent K, Weston A, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquat. Toxicol. 2006; 76: 122-159.
23. Fuertes, CM, Jurado, B, Gordillo, GC, Negrón, LP, Núñez, E, Esteban, M, Távara VA. Estudio integral de plantas biocidas del algodónero. Ciencia e Investigación (Lima) 2010; 13: 34-41.
24. Gartenstein S, Quinell RG, Larkum AWD. Toxicity effects of diflubenzuron, cypermethrin and diazinon on the development of *Artemia salina* and *Heliocidaris tuberculata*. Australas. J. Ecotol. 2006; 12: 83-90.
25. González A, Presa M, La Torre M, Lurá M. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. Rev. Iber. Micol. 2007; 24: 59-61.
26. González- Ortegón E, Giménez L, Blasco J, Le Vay L. Effects of food limitation and pharmaceutical compounds on the larval development and morphology of *Palaemon serratus*. Sci. Total Environ. 2015; 503-504: 171-178.
27. Gregory BS. Estructura y actividad de los antifúngicos. Rev. Cubana Farmacol. 2005; 39: [Acceso 10 de diciembre del 2015] Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v39n2/far12205.pdf>.
28. Gutiérrez H, Gutiérrez R, Herles E, Hernández M, Horna P, Hoyos P, Huby C, Jiménez M, Jiménez L, Kollmann A, Castañeda B, Ibáñez L, Scotto C. Análisis comparativo de la toxicidad del extracto acuoso en cocimiento de la harina de maca (*Lepidium meyenii*, Walp) en tres especies de animales modelos: *Artemia franciscana* (Crustácea, Anostraca), pez Guppy (*Poecilia reticulata*) y ratón (*Mus musculus*). Rev. Hor. Méd. 2007; 7: 103-109.
29. Gyllenhammar I, Eriksson H, Söderqvist A, Lindberg R, Fick J, Berg C. Clotrimazole exposure modulates aromatase activity in gonads and brain during gonadal differentiation in *Xenopus tropicalis* frog. Aquat. Toxicol. 2008; 159: 170-177.
30. Halling-Sørensen B, Nor Nielsen S, Lanzky PPF, Ingerslev F, Lützhøft HC, Jørgensen, SE. Occurrence, fate, and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review.



- Chemosphere, 1998; 36: 357-393. Iannacone J, Alvaríño L. Efecto del detergente domestico Alquil Sulfonato de Sodio Lineal (LAS) sobre la mortalidad de tres caracoles dulceacuícolas en el Perú. Ecol. Apl. 2002; 1:81-87.
31. Iannacone J, Alvaríño L. Ecotoxicidad acuática de dos colorantes y de tres antiparasitarios de importancia en acuicultura en *Daphnia magna*. Ecol. Apl. 2007; 6: 101-110.
  32. Iannacone JA, Alvaríño L, Paredes C, Alayo M, Mamani N, Bonifacio J, Mariano M, Miglio MC. Evaluación del riesgo ambiental de carbofurano en bioensayos con organismos no blanco. Acta Toxicol. Argent. 2011; 19: 19-31.
  33. Iannacone J, Dale W, Alvaríño, L. Monitoreo ecotoxicológico del río Rímac (Lima-Perú) empleando a *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae). Rev. Chil. Entomol. 2000; 27: 25-34.
  34. Iannacone J, Ayala H, Alvaríño L, Paredes EC, Villegas W, Alomía J, Santos S, Nolazco N, Cruces L. Riesgo ecotoxicológico acuático y terrestre del bioplaguicida catahua, *Hura crepitans* (Euphorbiaceae). Rev. Toxicol. 2014; 31: 50-62.
  35. Iannacone J, Pérez D. Efectos tóxicos de cuatro plantas amazónicas sobre *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905 (Diptera: Chironomidae) y *Artemia franciscana* Kellog 1906 (Anostraca: Artemiidae). Rev. Bras. Toxicol. 2008; 21: 25-32.
  36. Islam A, Ali M, Sayeed A, Salam S, Islam A, Rahman M, Khan G, Khatum S. An antimicrobial terpenoid from *Caesalpinia pulcherrima* Swartz.: Its characterization, antimicrobial and cytotoxic activities. Asian J. Plant Sci. 2003; 2: 1162-1165.
  37. Jjemba PK. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2006; 63: 113-130.
  38. Jurado C. Toxicología Veterinaria. 2ª ed., Barcelona: Editorial Salvat. 1989.
  39. Lagarto, A, Vega R. Manual de ensayos de toxicología alternativa. CIDEM. Cuba. 1990.
  40. Lee JH, Park BJ, Park SW, Kim WI, Hong SM, Im G, Hong MK. Ecological risk assessment of pesticide residues in agricultural lake: risk quotients and probabilistic approach. Korean J. Environ. Agr. 2011; 30: 316-322.
  41. Luigi P, Chiara A, Elisabetta G, Alessandra S, Luigi MG. Utilization of marine crustaceans as study models. A new approach in marine ecotoxicology for European (REACH) regulation, Ecotoxicology. Begum, G. (ed.). In Tech, 2012. [Acceso 15 de enero del 2015] Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/ecotoxicology/utilization-of-marine-crustaceans-as-study-models-a-new-approach-in-marine-ecotoxicology-for-European>.
  42. Macedo ME, Consoli RA, Grande, TS, Dos Anjos, AM, De Oliveira, AB, Mendes, NM, Queiroz, RO, Zani, CL. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). Mem. I. Oswaldo Cruz. 1997; 92: 565-570.
  43. Maguiña A, Iannacone J. *Artemia franciscana* Kellog, 1906 "Camarón salino" como agente de bioensayo para evaluar cinco extractos crudos de plantas con propiedades antiparasitarias. Bol. Soc. Quím. Perú, 2000; 66: 154-169.
  44. Michael AS, Thompson CG, Abramovitz M. *Artemia salina* as test organims for a bioassay. Science, 1956; 123: 464.
  45. Mischke C, Avery J. Toxicities of agricultural pesticides to selected aquatic organisms. Southern Regional Aquaculture Center Publication No 4600. Revision. 2013. p. 1-9.
  46. Molina-Salinas GS, Said-Fernández S. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). Pharmacologyonline, 2006; 3: 633-638.
  47. Naidu RJ, Ismail R, Sasidharan S. Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of methanol extract of *Mentha spicata* L (Lamiaceae). Trop. J. Pharm. Res. 2014; 13: 101-107.
  48. Neumegen RA, Fernández-Alba AR, Chisti Y. Toxicities of Triclosan, Phenol, and Copper Sulfate in activated sludge. Environ. Toxicol. 2005; 20:160-164.
  49. Nguta JM, Mbaria JM, Gakuya DW, Gathumbi PK, Kabasa JD, Kiama SG. Evaluation of acute toxicity of crude plant extracts from Kenyan Biodiversity using shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). Open Conf. Proc. J. 2012; 3: 30-34.
  50. Nisticò R, Mehdaawy B, Piccirilli S, Mercuri N. Paraquat- and rotenone-induced models of Parkinson's Disease. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2011; 24: 313-322.
  51. Nunes BS, Carvalho FD, Guihermino LM, Van Stappen GV. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicology testing. Environ. Poll. 2006; 144: 453-462.
  52. Nwauzoma AB, Choudhary MI, Zulfiqar A, Olaiya CO. Biological activity of crude extracts of Citrus species from Nigeria. Nat. Sci. 2013; 1: 135-139.
  53. Olivero-Verbel J, Guette-Fernandez J, Stashenko E. Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat. 2009; 8: 419-427.
  54. Olowa LF, Nuñez OM. Brine shrimp lethality assay of the ethanolic extracts of three selected species of Medicinal plants from Iligan city, Philippines. Int. Res. J. Biological Sci. 2013; 2: 74-77.
  55. Onocha PA, Ali SM. Insecticidal, antimicrobial, phyto- and cytotoxicity of *Chassalia kolly* plant extract. Arch. Appl. Sci. Res. 2010; 2: 151-156.
  56. OSPAR Convention (The Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic. Background Document on Clotrimazole (2013 update). OSPAR Commission. United Kingdom. 2013. 52 p.
  57. Pérez D, Iannacone J, Tueros A. Toxicidad de *Paullinia clavifera* (Sapindaceae) y *Chondrodendron tomentosum* (Menispermaceae) sobre el piojo saltador del Camu Camu *Tuthillia cognata* (Hemiptera: Psyllidae). Gayana Bot. 2008; 65: 145-152.
  58. Pérez D, Iannacone J, Pinedo H. Toxicological effect from stem cortex of the amazonian plant soapberry *Paullinia clavifera* (Sapindaceae) upon three arthropods. Cien. Inv. Agr. 2010; 37: 133-143.
  59. Pino O, Jorge F. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. Rev. Protec. Veg. 2010; 25: 34-43.
  60. Porsbring T, Black H, Tjellström H, Blackhaus, T. Toxicity of the pharmaceutical clotrimazole to marine microalgal communities. Ind. J. Pharm. Sci. 2009; 71: 547-551.
  61. Praveen M, Radha K, Kumar RH, Padmaja V, Mathew A, Kumar, PA. Preliminary phytochemical, antimicrobial and toxicity studies on *Clerodendrum paniculatum* Linn leaves. Hygeia J. D. Med. 2012; 4: 41-50.
  62. Santos EA, Carvalho CM, Costa, ALS, Conceição AS, Moura FBP, Santana AEG. Bioactivity evaluation of plant extracts used in indigenous medicine against the snail, *Biomphalaria glabrata*, and the larvae of *Aedes aegypti*. J. Evid. Based Complementary Altern. Med. 2012; Article ID 846583, 9 p.
  63. Sarikaya, R. Investigation of acute toxicity of alpha-Cypermethrin

on adult Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Turk. J. Fish. Aquat. Sc.* 2009; 9: 85-89.

*Stenocereus pruinosis* y *Echinocereus stramineus*. *Rev. mex. cienc. farm.* 2012; 43: 42-48.

64. SCC (Stockholms County Council). Environmental Classified Pharmaceuticals. 2014-2015. Stockholms Läns Landsting. 2014.
65. SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria). Registro y Control de plaguicidas agrícolas. 2015. [Acceso 25 de julio del 2015] Disponible en: <http://www.senasa.gob.pe/senasa/registro-y-control-de-plaguicidas-agricolas>.
66. Sharma N, Gupta PC, Singh A, Rao CV. Brine shrimp bioassay of *Pentapetes phoenicea* Linn. and *Ipomaea carnea* jacq. leaves. *Der Pharm. Lett.* 2013; 5: 162-167.
67. Silva VA, Gonçalves GF, Pereira MSV, Gomes IF, Freitas AFR, Diniz MFFM, Pessôa HLF. Assessment of mutagenic, antimutagenic and genotoxicity effects of *Mimosa tenuiflora*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2013; 23: 329-334.
68. Thomaidi VS, Stasinakis AS, Borova VL, Thomaidis NS. Is there a risk for the aquatic environment due to the existence of emerging organic contaminant in treated domestic wastewater? Greece as a case-study. *J. Hazard. Mater.* 2015; 283: 740-747.
69. Thomas R, Barber K. Fungal Guide: Clotrimazole. 2011. [Acceso 10 de diciembre del 2015] Disponible en: <http://www.fungalguide.ca>.
70. Treviño JF, Rodríguez, GRG, Verde SJ, Morales RME, Garza PRA, Rivas MC, Aranday CA. Actividad antifúngica de
71. Upcroft, P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14: 150-164.
72. USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). Acute Toxicity to Freshwater and Marine Organisms. Office of Water (4303T) 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460 EPA-821. 5th Ed. October 2002. EPA-821-R-02-012. 2002.
73. Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotox. Environ. Saf.* 1981; 5: 382-387.
74. Varo I, Serrano R, Navarro JC, López FJ, Amat F. Acute lethal toxicity of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos to different species and strains of *Artemia*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1998; 61: 778-785.
75. Vehovszky A, Szabó H, Acs A, Gyori J, Farkas A. Effects of rotenone and other mitochondrial complex I inhibitors on the brine shrimp *Artemia*. *Acta Biol. Hung.* 2010; 61: 401-410.
76. Xu, S (2015) Environmental fate of Carbaryl. [Acceso 12 de julio del 2015] Disponible en: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/carbaryl>.