

Ecotoxicidad aguda en semillas de *Lactuca sativa* L. de antibacterianos con riesgo ambiental

Hernández Martínez E.M.^{a*}, Carrazana García D. I.^b, Martínez Suárez B^b, Madrigal Gutiérrez W^b y Águila Jiménez E^a.

Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuani Km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuani Km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Resumen: En los últimos años existe una creciente preocupación por los efectos que los desechos de los medicamentos producen en el medio ambiente. El objetivo de esta investigación fue evaluar la ecotoxicidad aguda de antibacterianos en *Lactuca sativa* que se vierten a uno de los dos ríos que atraviesan las zonas más urbanizadas de la ciudad de Santa Clara (Cuba). Para esto se realizó un estudio de consumo de los antibacterianos consumidos en el hospital durante un año, se predijo sus concentraciones ambientales mediante un modelo matemático y se determinó su riesgo ecotoxicológico. En el período de estudio se utilizaron 22 antibacterianos, el de mayor consumo fue la ceftriaxona y el de menor la doxiciclina. Todos constituyen un riesgo para el ambiente exceptuando doxiciclina y miconazol. Se observó inhibición de la germinación de *Lactuca sativa* L. en todos los antibacterianos resaltando el cotrimoxazol con 38.78% (CI₅₀=0.52g/L) y vancomicina la de menor efecto en la inhibición de la germinación con un 8.56% (CI₅₀=44,14g/L). En la mezcla solamente hubo inhibición de la germinación a la mayor concentración evaluada, mientras que en el resto de las concentraciones no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. El tipo de interacción de la mezcla se clasifica como sinérgica. El vertimiento de residuos de antibacterianos puede ser causa de contaminación ambiental perjudicial.

Palabras clave: antibacterianos; ceftriaxona; ecotoxicidad aguda; *Lactuca sativa* L.

Abstract: *Acute toxicity in Lactuca sativa* L. seeds of antibiotics with environmental risk.

In recent years, there is a growing concern about the effects that drugs produce in the environment. The aim of this research was to evaluate the acute toxicity in *Lactuca sativa* of the antibacterials discharged into a river that runs through a very urbanized area of the city of Santa Clara (Cuba). For this, an study of antibacterial consumption in the hospital during a year was carried out, their environmental concentrations were predicted by a mathematical model and its ecotoxicological risk was determined. In the study period they were used 22 antibacterials, the highest consumed was ceftriaxone and the less consumed was doxycycline. All they constitute a risk to the environment except doxycycline and miconazole. Germination inhibition of *Lactuca sativa* L. was observed in all antibacterial highlighting the cotrimoxazol with 38.78% (IC₅₀ = 0.52g/L) and vancomycin with minor effect on the germination inhibition with 8.56% (IC₅₀ = 44, 14g/L). In the mixture there was only germination inhibition at the highest concentration tested, while in other concentrations no statistically significant differences were found, respect to control. The type of mixture interaction is classified as a synergistic. The dumping of antibacterials residues can be a cause for the environmental pollution.

Keywords: antibacterial; ceftriaxone; acute ecotoxicity; *Lactuca sativa* L.

Introducción

Los productos farmacéuticos son compuestos complejos ampliamente utilizados en todo el planeta. Aunque las más recientes investigaciones han demostrado que los fármacos están ampliamente

distribuidos en los ecosistemas acuáticos y que una de las principales fuentes de entrada es a partir de los centros asistenciales de salud, (Barceló y López de Alda, 2008; Baquero *et al.*, 2008; Carmona *et al.*, 2014; Esteban *et al.*, 2014; Gil *et al.*, 2012; Kümmerer, 2001; Kuster *et al.*, 2010; Pignato *et al.*, 2009; Teijón *et al.*, 2010) es difícil valorar el riesgo que representan para el medio ya que son compuestos químicos que están diseñados para tener modos específicos de acción y muchos de ellos persisten en el cuerpo humano (Jiménez, 2011; Silva *et al.*, 2012).

En el caso particular de los antibacterianos no se conoce adecuadamente las consecuencias ecológicas del ingreso de estos a los cuerpos de agua; aunque hay evidencia de la presencia de residuos de estos compuestos en el ambiente y su implicación en los mecanismos de defensa propios de los organismos (Jiménez, 2011). Los microorganismos han desarrollado resistencia y alteraciones enzimáticas ante la presencia de nuevos compuestos antibacterianos, lo cual tiene repercusiones difíciles de cuantificar (Jiménez, 2011; Passos *et al.*, 2011). Entre los antibacterianos con mayor concentración encontrados en los cuerpos de agua están las tetraciclinas (Dang *et al.*, 2007), los aminoglucósidos (Shakil *et al.*, 2008), los macrólidos, los betalactámicos y la vancomicina (Jiménez, 2011).

El consumo de fármacos en los países de la Unión Europea se cifra en toneladas por año, y muchos de los más usados, entre ellos los antibacterianos, se emplean en cantidades similares a las de los pesticidas (Barceló y López de Alda, 2008). La presencia de estos compuestos en el ambiente ha aumentado la toxicidad en los organismos acuáticos y la presencia de bacterias con resistencia antibiótica (Ramos y Pellón, 2006). El problema de la resistencia a los antibacterianos puede tener efectos ecológicos y nunca antes se había visto que los organismos infecciosos fueran resistentes a tan alto número de éstos (Márquez, 2008). Por ende, la evaluación del efecto de estos compuestos en bioensayos a través del análisis de riesgo ambiental permitirá tomar las medidas de mitigación necesarias para la protección de los ambientes acuáticos ante su contaminación por productos farmacéuticos (Iannacone y Alvariano, 2009).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la ecotoxicidad aguda en *Lactuca sativa* de diversos compuestos antibacterianos vertidos por el Hospital Provincial Universitario "Dr. Celestino Hernández Robau" en un área del río Bélico en Santa Clara, Cuba.

Material y métodos

Para realizar esta investigación se utilizó como caso de estudio el Hospital Provincial Universitario "Dr. Celestino Hernández Robau" (HCHR), dedicado a la atención hospitalaria, investigación y docencia médica. La caracterización del Hospital se hizo a partir de datos procedentes de la vicedirección docente del centro.

Determinación del consumo de antibacterianos

El estudio de consumo se llevó a cabo en el período comprendido entre noviembre de 2012 y octubre de 2013. Para la obtención del consumo de los antibacterianos se revisaron los expedientes de antibacterianos presentes en la farmacia intrahospitalaria del hospital objeto de estudio.

Para el cálculo del consumo de los antibacterianos a estudiar se utilizaron las siguientes fórmulas (Telechea *et al.*, 2009):

*e-mail: emaria@uclv.cu

$$\text{de DDD} = \frac{\text{Medicamento total consumido durante un año(mg)}}{\text{DDD del medicamento (mg)}}$$

DDD/100 camas – día

$$= \frac{\text{consumo de un determinado fármaco en mg durante un período "a"}}{\text{DDD en mg} \times \text{N}^{\circ} \text{ de días incluidos en el período a} \times \text{N}^{\circ} \text{ de camas} \times \% \text{ de ocupación}} \times 100$$

Donde:

DDD: Unidad técnica de medida de consumo de fármacos conocida como dosis diaria definida, y que expresa la dosis diaria de un fármaco para su principal indicación en adultos. Los valores de DDD se encuentran disponibles en el Centro de Colaboración de la OMS (WHOCC, 2014).

Porcentaje de Ocupación: es el número promedio de camas que estuvieron ocupadas diariamente durante un período, expresado en porcentaje.

En este hospital en el periodo en estudio trabajaron 871 personas, entre profesionales de la salud, técnicos y empleados. Las camas-día disponibles; período de 24 horas durante en el cual una cama de hospital se mantiene a disposición para el uso de pacientes internados, en la fecha citada fueron 214, las cuales se distribuyeron por sala. El índice ocupacional proporcionado por el Departamento de Estadística del Hospital fue de 85.4.

Predicción de la concentración ambiental (PEC)

Según los datos obtenidos en el estudio de consumo se realizó una predicción de la concentración ambiental de los antibacterianos en el río Bélico.

La Predicción de la Concentración Medioambiental (Predicted Environmental Concentrations, PEC) según Kümmerer (2008); se calculó según la siguiente ecuación modificada, al incluir la proporción de vertimiento al río:

$$\text{PECw} = \frac{\text{Consumo anual(mg)}}{365 \times V \times D \times v}$$

Dónde:

V: volumen de agua residual producida per cápita por día, D: factor de dilución en el medio ambiente (valor por defecto) y v: proporción de vertimiento de agua residual al río.

Se predijo un valor de concentración de fármacos en aguas superficiales (PECw) considerando el factor de dilución en los cuerpos receptores de 10 según se indica por la Comisión Europea (2003).

El volumen de agua residual producida per cápita por día se estimó considerando un índice de consumo de 80 L por trabajador-día y 1200 L por paciente-día que es un valor medio de los reportados para un paciente ingresado (Galindo, 2001) y corrobora las estimaciones realizadas sobre el consumo de agua en el hospital. El caudal de aguas residuales se estimó a partir de los resultados del proyecto JICA-GTE (2004) y según Palacios *et al.* (2005), donde el 90% corresponde a residuales líquidos hospitalarios, teniendo en cuenta que en este hospital existen calderas (transformación del agua en vapor).

Los antibacterianos con valores de PECw $\geq 0.01 \mu\text{g/L}$ se consideraron peligrosos para el ambiente (Kümmerer, 2008).

Evaluación ecotoxicológica del riesgo ambiental

Los bioensayos toxicológicos agudos de exposición a los

antibacterianos se realizaron en el Centro de Toxicología Experimental (CENTOX) ubicado en la Universidad de Ciencias Médicas “Serafin Ruiz de Zarate Ruiz”, bajo la asesoría de especialistas. Para el desarrollo de las técnicas y procedimientos

toxicológicos se utilizaron las guías aprobadas por la US-EPA (United States-Environmental Protection Agency) y la OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Se realizó el ensayo de toxicidad aguda en semillas de *L. sativa* (EPA, 1996).

Según la predicción y teniendo en cuenta el elevado número de antibacterianos que podían considerarse peligrosos para el ambiente se hizo una selección preliminar de aquellos de mayor consumo y/o carencia de datos toxicológicos para evaluar su toxicidad. Se consideró un ensayo del tipo estático donde no hay renovación de la solución durante el estudio. Los antibacterianos empleados en el ensayo fueron: cefazolina, ceftriaxona, cefuroxima, ceftazidima, cefepima, cefotaxima, amoxicilina más sulbactam, vancomicina y cotrimoxazol; comercializados por los Laboratorios de producción del Grupo Empresarial Químico Farmacéutico (QUIMEFA).

Ensayo de toxicidad aguda en semillas de L sativa

Para el ensayo de toxicidad aguda en semillas de *L sativa* se consideraron quince concentraciones de cada antibacteriano y un grupo control, con tres réplicas cada tratamiento. Se prepararon diluciones seriadas (50; 40; 30; 20; 10; 1; 0.1; 0.01; 0.001; 0.0001; 0.00001; 0.000001; 0.0000001; 0.00000001 g/L) que permitieran establecer el intervalo de concentración (incluyendo las PECs estimadas y mayores) conveniente para obtener valores de efecto entre 0 y 100 % necesarios para calcular la CI₅₀ (Concentración Inhibitoria Media). Se realizó simultáneamente la evaluación de la toxicidad de las muestras empleando un grupo control utilizando agua destilada.

Se utilizaron semillas de *L sativa* provenientes de la Empresa Provincial de Semillas Varias de Villa Clara, con certificado de calidad suministrado por el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Villa Clara. Se colocó en cada placa de Petri de 100 mm de diámetro un disco de papel de filtro de 90 mm, se saturó el papel de filtro con 4 mL de la dilución con el antibacteriano evitando que se formaran bolsas de aire. Se colocaron veinte semillas, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces. Se incubaron durante 120 horas a una temperatura de 22± 2 °C en completa oscuridad.

Ensayo de toxicidad aguda en semillas de L sativa con la mezcla de antibacterianos

Se realizó según se describe en acápite anterior seleccionando cinco concentraciones de la mezcla de antibacterianos y un grupo control con tres réplicas cada uno. Se prepararon 5 diluciones seriadas en escala logarítmicas 100; 10; 1; 0.01; 0.0001 %, que permitieran establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 0 y 100 % necesarios para calcular la CI₅₀ partiendo de una solución de la mezcla de antibacterianos (concentraciones que no alcanzaran la CI₅₀ previamente calculada para cada antibacteriano).

Expresión de los resultados

Se realizaron los siguientes cálculos: promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición en la germinación y la elongación de la radícula e hipocotilo de las plántulas de *L. sativa*. Estos se compararon con un análisis de ANOVA (One-way; $p < 0.001$) para verificar diferencias y para detectar la diferencia entre los grupos se utilizaron los intervalos LSD y una prueba de Dunnett para los resultados obtenidos, utilizando el programa: StatSoft, Inc. Ver. 8.0 (2007). Para verificar las diferencias con respecto al grupo control, los resultados con un $p < 0.05$ se consideraron como diferencias estadísticas. Se utilizó el programa StatSoft, Inc. Ver. 8.0 (2007) realizando ajustes de modelos de curvas sigmoides para estimar la Concentración efectiva media (CE₅₀) y la CI₅₀ utilizando la ecuación $y = E_0 + E_{\text{max}} * x^n / (x^n + DE_{50}^n)$.

Para el cálculo del efecto de la mezcla se analizaron los resultados a través de la aplicación del Modelo de Concentración – Adición (CA), el cual asume que cuando dos tóxicos actúan de modo similar y se

mezclan en cualquier proporción, se sumará su acción para dar la respuesta observada (Gaete & Chávez 2008). El valor de CI₅₀ estimada se obtiene sumando los valores de CI₅₀ de los antibacterianos obtenidos experimentalmente de forma individual asumiendo que todos contribuyen por igual a la mezcla. Luego estos valores de CI₅₀ estimados se dividen entre los valores obtenidos experimentalmente de la mezcla, para así determinar la clase de acción conjunta de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

Donde CA = 1 indica que el efecto es aditivo, CA > 1 que hay sinergia y CA < 1 que hay antagonismo.

Resultados

Determinación del consumo de antibacterianos

En el período de estudio se emplearon en el hospital 21 antibacterianos. Los antibacterianos consumidos en este período y los valores del No. de DDD y DDD/100 camas-días se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Consumo de antibacterianos en el período de noviembre 2012- octubre 2013 en el Hospital Dr. "Celestino Hernández Robau" de Villa Clara, Cuba.

Antibacteriano	Consumo (g)	No. de DDD	DDD/ 100 camas-días
Amikacina 500 mg (bbo)	931,5	621	0.0093
Gentamicina 80 mg (amp)	161,68	673.67	0.0101
Ceftriaxona 1000 mg (bbo)	6729	6729	0.1009
Cefazolina 1000 mg (bbo)	2884	1442	0.0216
Cefotaxima 1000 mg (bbo)	4632	2316	0.0347
Ceftazidima 1000 mg (bbo)	3677	1225.67	0.0184
Cefepima 1000 mg (bbo)	795	397.5	0.0056
Cefuroxima 750 mg (bbo)	1646,25	731.67	0.0110
Ciprofloxacina 200 mg (fco)	540,6	1351,5	0.0203
Metronidazol 05% (fco)	3470,5	2313.67	0.0347
Meropenem 1000 mg (bbo)	1107	738	0.0111
Vancomicina 500 mg (bbo)	485,5	242.75	0.0036
Cotrimoxazol 480 mg (amp)	946,56	986	0.0148
Azitromicina 500mg (tab)	213,5	427	0.0064
Amoxicilina más Sulbactam 500mg (tab)	649	432.67	0.0064
Fluconazol 200 mg (bb)	43,2	216	0.0032
Aciclovir 250 mg (bbo)	21	21	0.0003
Miconazol 10 mg (amp)	1,11	37	0.0006
Amoxicilina más Sulbactam 750 mg (bbo)	578,95	257.31	0.0039
Doxiciclina 100 mg (tab)	4,5	22.5	0.0003
Fluconazol 100 mg (tab)	14	140	0.0021

* bbo: bulbo, tab: tableta, amp: ampúla, fco: frasco, DDD: Dosis diaria definida.

Predicción de la concentración ambiental (PEC)

En el HCHR el volumen de agua por día, necesario para su funcionamiento fue de aproximadamente 327 m³/día considerando la cantidad de trabajadores, de camas/pacientes y de población fluctuante. El consumo de agua de los 871 trabajadores se estimó en 70 m³/día y el de los pacientes en 257 m³/día, mientras que el caudal de aguas residuales se estimó en 294 m³/día. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de la predicción de la concentración ambiental (PEC_w) vertida en el río. Los

antibacterianos con valores de PEC_w ≥ 0.01 µg/L se consideraron peligrosos para el ambiente (Kümmerer, 2008). De los 21 antibacterianos 19 (90.48 %) constituyeron un riesgo para el ambiente.

Tabla 2: Predicción de la Concentración Ambiental de los antibacterianos vertidos en las aguas residuales procedentes del Hospital Dr. "Celestino Hernández Robau" de Villa Clara, Cuba, en un fragmento del río Bético en el período de noviembre 2012- octubre 2013.

Antibacteriano	PEC _w (µg/L)
Ceftriaxona 1000 mg (bbo)	6.2706
Cefotaxima 1000 mg (bbo)	4.3165
Ceftazidima 1000 mg (bbo)	3.4265
Metronidazol 05% (fco)	3.2341
Cefazolina 1000 mg (bbo)	2.6875
Cefuroxima 750 mg (bbo)	1.5341
Meropenem 1000 mg (bbo)	1.0316
Cotrimoxazol 480 mg (amp)	0.8821
Amikacina 500 mg (bbo)	0.8680
Cefepima 1000 mg (bbo)	0.7408
Amoxicilina más Sulbactam 500mg (tab)	0.6048
Amoxicilina más Sulbactam 750 mg (bbo)	0.5395
Ciprofloxacina 200 mg (fco)	0.5038
Vancomicina 500 mg (bbo)	0.4524
Azitromicina 500mg (tab)	0.1990
Gentamicina 80 mg (amp)	0.1507
Fluconazol 200 mg (bbo)	0.0403
Aciclovir 250 mg (bbo)	0.0196
Fluconazol 100 mg (tab)	0.0130
Doxiciclina 100 mg (tab)	0.0042
Miconazol 10 mg (amp)	0.0010

* bbo: bulbo, tab: tableta, amp: ampúla, fco: frasco, PEC_w: Predicted Environmental Concentration in Water.

Doxiciclina 100 mg y Miconazol 10 mg no fueron peligrosos para el ambiente

Evaluación ecotoxicológica del riesgo ambiental

Ensayo de elongación de la radícula y el hipocotilo

En las Figuras 1 y 2 se muestra la elongación de la radícula y el hipocotilo para los antibacterianos evaluados.

De los seis antibacterianos pertenecientes al grupo de las cefalosporinas (Fig. 1), cefazolina y cefepima mostraron inhibición en el crecimiento de la radícula a todas las concentraciones en estudio con diferencias significativas con respecto al control y en el caso del hipocotilo para todas las concentraciones mayores que 1 g/L, se observó inhibición del crecimiento estadísticamente significativo con respecto al control. La cefuroxima solo mostró diferencias significativas con respecto al control en la concentración de 10 g/L y en las mayores de 20 g/L evidenciando una inhibición en el crecimiento del hipocotilo, en el crecimiento de la radícula mostró diferencias significativas con respecto al control en casi todas las concentraciones con excepción de 0,0001, 0,001, 1 y 10 g/L. Ceftazidima mostró inhibición en el crecimiento del hipocotilo a todas las concentraciones en estudio con diferencias significativas con respecto al control y para la radícula para casi todas las concentraciones mayores que 0.01 g/L se observó inhibición del crecimiento estadísticamente significativo con respecto al control. Sin embargo, la cefotaxima estimuló el crecimiento de la radícula en todas las concentraciones por debajo de 0,1 g/L e inhibió el crecimiento de la misma para las mayores de 10 g/L; inhibiendo el crecimiento del hipocotilo para la mayoría de las concentraciones. La ceftriaxona mostró inhibición en el crecimiento de la radícula a la mayoría de las concentraciones en estudio con diferencias significativas con respecto al control y para el hipocotilo no se evidenciaron diferencias

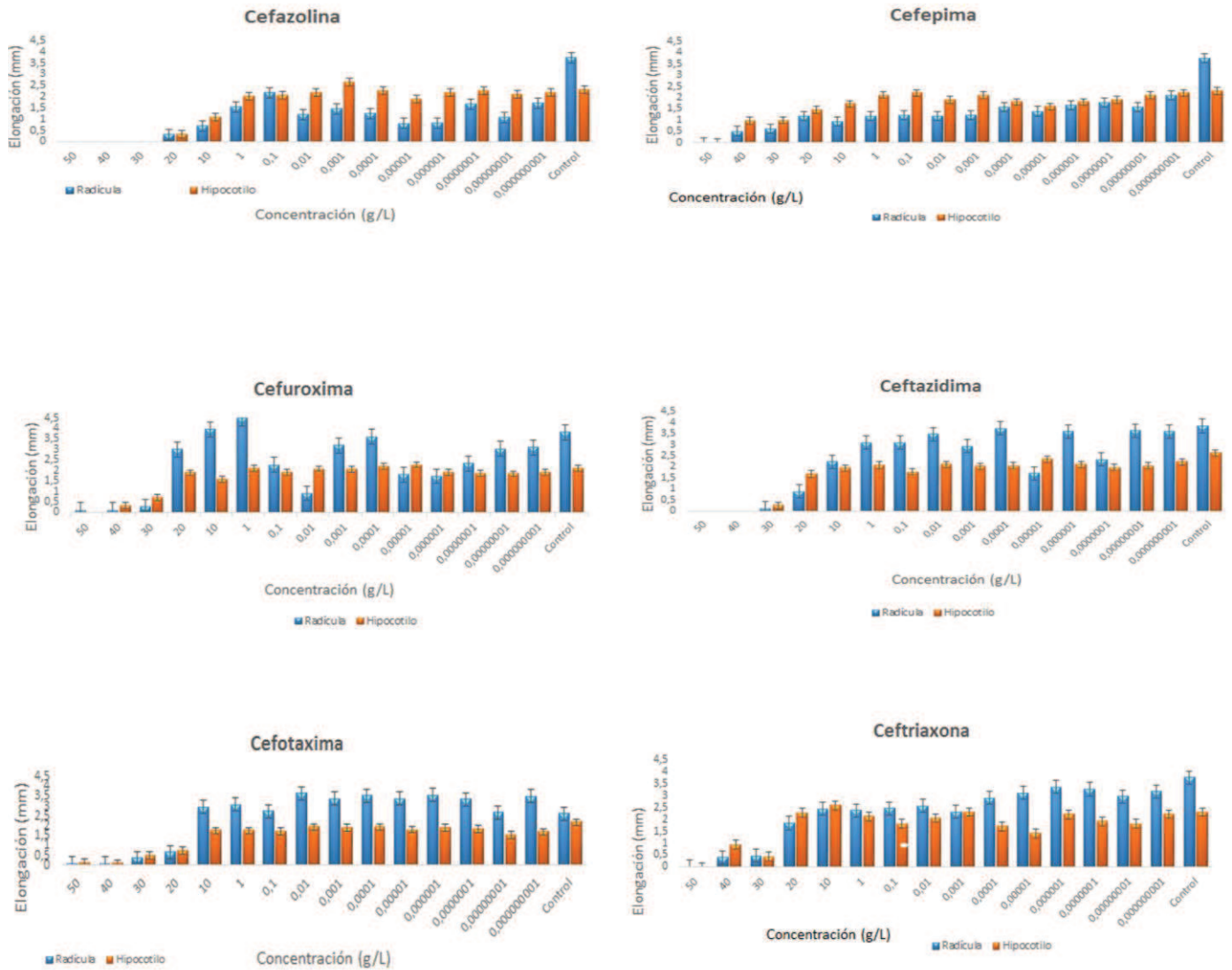


Figura 1: Evaluación de seis antibacterianos pertenecientes al grupo de las cefalosporinas en la elongación del crecimiento sobre semillas de *L. sativa L.*

respecto al control para la mayoría de las concentraciones evaluadas con excepción de las comprendidas entre 0.001 y 0.000001 g/L que se evidenció inhibición del crecimiento.

La vancomicina (glucopéptido) mostró inhibición en el crecimiento del hipocotilo a todas las concentraciones en estudio con diferencias significativas con respecto al control e inhibición del crecimiento de la radícula a las concentraciones mayores que 0,1 g/L, las restantes no mostraron diferencias con respecto al control (Fig. 2).

La amoxicilina más sulbactam que es una combinación de ingredientes activos pertenecientes al grupo de las aminopenicilinas e inhibidores de las β-lactamasas, mostró inhibición en la elongación de la radícula y el hipocotilo a la mayoría de las concentraciones probadas (Fig. 2).

En el cotrimoxazol perteneciente al grupo de las sulfonamidas, se observó una inhibición del crecimiento de la radícula a todas las concentraciones ensayadas y en el hipocotilo solo mostraron diferencias con respecto al control las concentraciones entre 0.001 y 1 g/L (Fig. 2).

En el ambiente es improbable que nos encontremos con concentraciones superiores a 1g/L pero es objetivo de nuestro trabajo poder calcular la CI₅₀ que nos permitirá realizar el ensayo a la mezcla de antibacterianos.

En todos los antibacterianos evaluados se observó inhibición en la germinación de las semillas, en la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos. El efecto de los antibacterianos estudiados sobre la germinación y la elongación de la radícula y el hipocotilo se muestra en la Tabla 4.

Tabla 3: Inhibición en la germinación de semillas de *L. sativa L.*

Antibacteriano	% Ig	% Ig corr
Vancomicina	8.56	8.56
Ceftazidima	30.44	28.04
Cefotaxima	18.78	14.51
Cotrimoxazol	38.67	38.67
Amoxicilina más Sulbactam	22.11	22.11
Cefuroxíma	21.89	21.89
Cefazolina	38	34.74
Cefepima	35.5	33.28
Ceftriaxona	52	49.47

* % Ig: Porcentaje de inhibición en la germinación

% Ig corr: Porcentaje de inhibición en la germinación corregido respecto al control negativo.

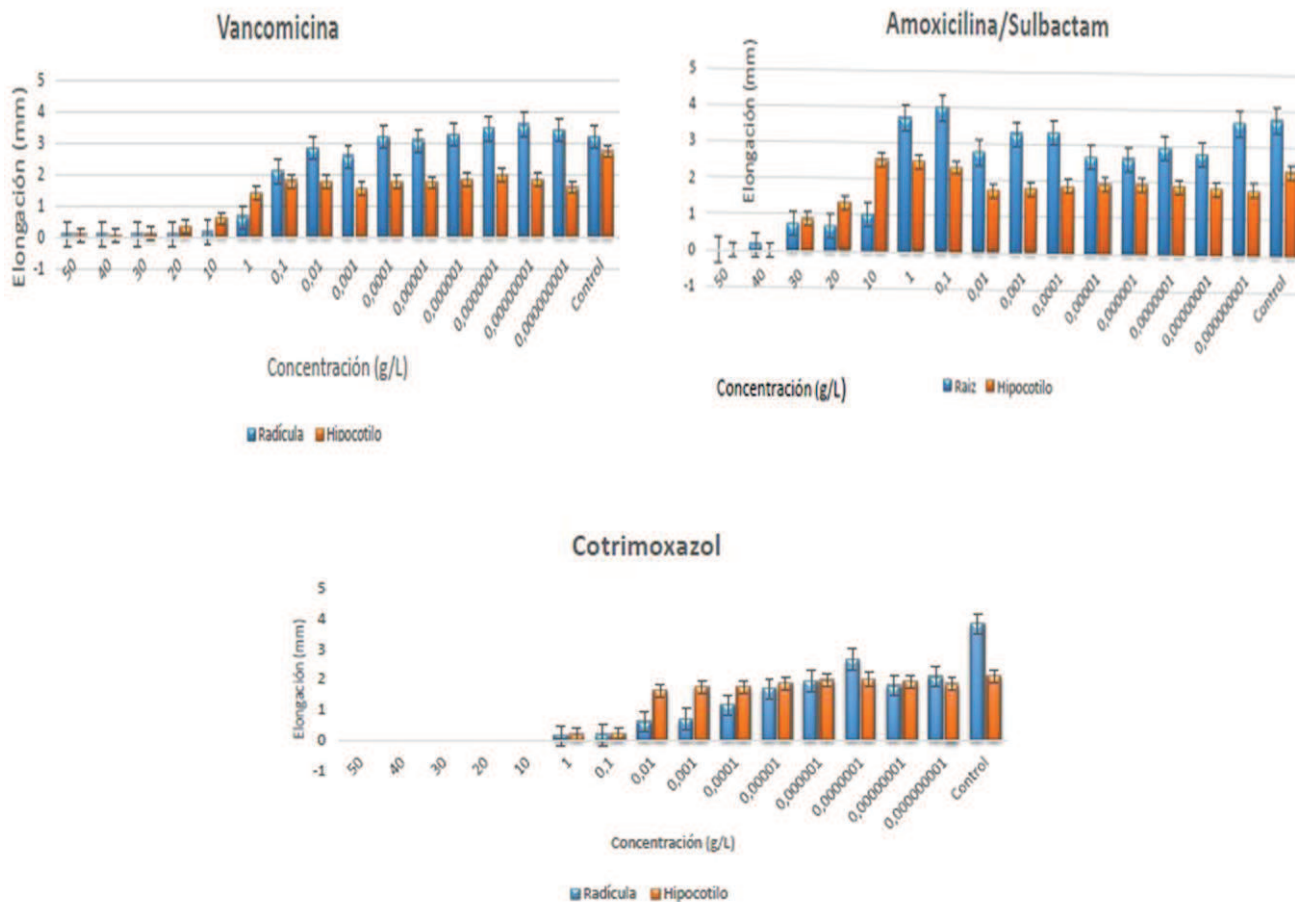


Figura 2: Evaluación de tres antibacterianos en la elongación del crecimiento sobre semillas de *L. sativa* L.

La totalidad de los antibacterianos evaluados mostraron inhibición de la germinación de las semillas de *L. sativa* (Tabla 3), siendo cotrimoxazol, ceftriaxona y cefazolina los que causaron mayor inhibición de la germinación con respecto al control, coincidiendo con los menores valores de CI_{50} sobre la germinación (entre 0 y 2 mg/L). Vancomicina al contrario presentó una menor inhibición de la germinación y su CI_{50} fue entre 25 y 45 mg/L (Tabla 4).

En la Figura 3 se muestra la inhibición del crecimiento de la radícula y el hipocotilo para la mezcla de antibacterianos.

Tabla 4: Efecto sobre la germinación y la elongación de radícula e hipocotilo sobre semillas de *L. sativa* L.

Antibacteriano	CE ₅₀	CE ₅₀	CI ₅₀ (g/L)
	Radícula (g/L)	Hipocotilo (g/L)	
Vancomicina	0.20	0.63	44.14
Ceftazidima	11.38	22.16	10.70
Cefotaxima	17.83	16.64	25.14
Cotrimoxazol	0.0000024	0.02	0.52
Amoxicilina más Sulbactam	6.09	24.41	8.57
Cefuroxima	22.91	27.27	20.20
Cefazolina	0.28	7.42	1.64
Cefepima	0.37	27.97	5.53
Ceftriaxona	15.37	26.99	1.33

* CE₅₀: Concentración efectiva media, CI₅₀: Concentración Inhibitoria Media

Ensayo de toxicidad aguda en semilla de L. sativa con la Mezcla de antibacterianos

En la mezcla de antibacterianos se observó inhibición de la germinación de las semillas de un 36.67 %. La CI_{50} sobre la germinación fue de un 6.89; la CE_{50} sobre la elongación de la radícula y el hipocotilo no se pudo calcular al ser los porcentajes de inhibición del crecimiento menores que 50 (Fig. 3).

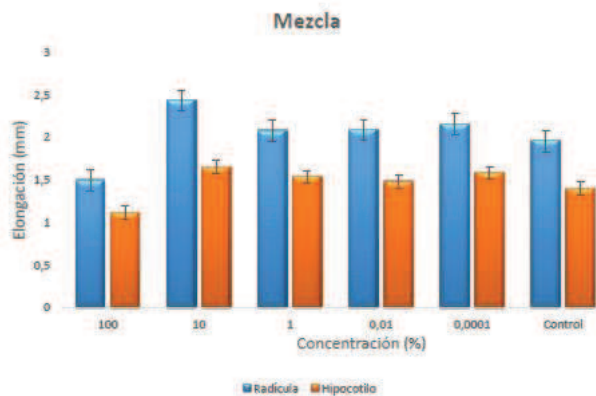


Figura 3: Evaluación de la mezcla en la inhibición del crecimiento sobre semillas de *L. sativa* L.

La mezcla de antibacterianos mostró estimulación del crecimiento de la radícula y el hipocotilo a la concentración de 10% e inhibición del crecimiento a la concentración de 100%, para el resto de las concentraciones no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Fig. 3). La inhibición de la germinación con valor de 34.29 % con respecto al control muestra que a las concentraciones ensayadas la mezcla de antibacteriano no tuvo un comportamiento muy tóxico lo que puede deberse a que estas concentraciones estaban por debajo de la CI_{50} estimada para cada antibacteriano. Sería recomendable en estudios posteriores la evaluación de la mezcla con concentraciones mayores de antibacterianos.

Concentración-Adición (CA)

La evaluación por bioensayos de los efectos de las sustancias químicas combinadas o en mezcla resulta extremadamente importante. Dos conceptos clásicos de toxicidad de mezcla, la “Adición de Concentración” y la “Acción Independiente”, se han aplicado de manera exitosa a una gama de mezclas farmacéuticas. Su poder para predecir la acción conjunta de los productos farmacéuticos es casi siempre de bueno a excelente. Son raros los casos de toxicidades sinérgica o antagonística de las mezclas (una toxicidad más elevada o más baja de la que se esperaba).

En la Figura 4 se muestra la toxicidad individual de cada antibacteriano, la toxicidad de la mezcla y el cociente concentración – adición (CA). La toxicidad individual de la mayoría de los antibacterianos estudiados es menor que la toxicidad de la mezcla de antibacterianos. No siendo así para el caso de cefazolina, cefepima, ceftriaxona y cotrimoxazol.

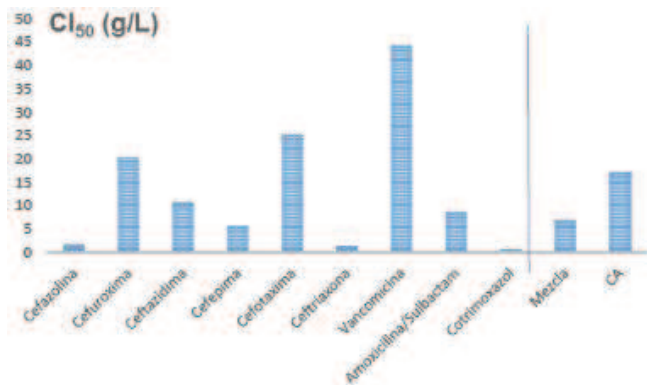


Figura 4: Toxicidad de los antibacterianos v la mezcla.

Discusión

Determinación del consumo de antibacterianos

En el periodo de estudio el antibacteriano de mayor consumo fue la ceftriaxona según su valor en DDD/100 camas-días (Tabla 1), lo que está en correspondencia con las características de los pacientes ingresados en la unidad. Los pacientes oncológicos sufren con frecuencia de complicaciones sépticas que deben ser tratadas con antibacterianos bactericidas ya que la inmunodepresión que padecen no les permite lograr el control de las mismas por otros medios. El amplio espectro antimicrobiano de esta cefalosporina garantiza que el tratamiento a las afecciones más frecuentes que causan el ingreso hospitalario (bronconeumonías, sepsis quirúrgicas y abscesos tumorales) resulte efectivo en la mayoría de los casos (Lacy *et al.*, 2012 - 2013).

Los resultados del presente estudio arrojaron que la cefepima posee un No. de DDD mayor que el reportado por Stockholm County Council (2014) (valor de 10), no siendo así para el resto de los antibacterianos. En un estudio de consumo realizado por Giachetto *et al.* (2003) en un hospital pediátrico, cefuroxima y ceftriaxona obtuvieron valores de DDD/100 camas-días de 5.36 y 5.53, mayores a los obtenidos en el estudio de consumo del HCHR. Por lo que sería recomendable realizar un estudio del empleo de cefepima que fundamente la propuesta de disminución de su uso.

En el hospital objeto de estudio se consumieron todos los antibacterianos disponibles teniendo en cuenta el uso racional de estos en cuanto a dosis, tratamiento, intervalo de dosificación e indicación-prescripción, esto se constata según los expedientes de antibacterianos de la Farmacia Intrahospitalaria del HCHR validándose con lo estipulado en el Drug Information Handbook (Lacy *et al.*, 2012 - 2013).

Predicción de la concentración ambiental (PEC_w)

Los valores de PEC_w obtenidos en la presente investigación representan las concentraciones máximas posibles que pueden ser encontradas en las aguas residuales del HCHR (Tabla 2), lo cual

estaría representando propiamente, las condiciones de extrema concentración. Es importante destacar que exceptuando el miconazol y la doxiciclina todos los antibacterianos consumidos presentaron valores por encima de 0.01 µg/L, por lo que representan un riesgo de contaminación ambiental. De ahí que, sería recomendable realizar estudios completos similares al presentado, en otros Centros de Salud y durante mayores periodos de tiempo, para obtener resultados más generales. Sin embargo, un factor que puede afectar la toxicidad individual de un contaminante es la presencia de otros contaminantes, debido a las interacciones que ocurren en la mezcla (sinérgica, antagónica, aditiva). Es por esto que en los últimos años ha habido un creciente interés por el estudio de las interacciones entre los agentes químicos, que permita predecir su impacto sobre los organismos que habitan los ecosistemas acuáticos (Gaete y Chávez, 2008).

Evaluación ecotoxicológica del riesgo ambiental

Ensayo de ecotoxicidad aguda en semilla de *L. sativa*

Las plantas superiores son ampliamente utilizadas por ser organismos eucarióticos, y por lo tanto más comparables a la mayoría de las especies de la flora y la fauna superiores, y constituyen una eficiente herramienta de trabajo para medir alarma de peligro ambiental por ser más sensibles que otros sistemas de ensayos disponibles, son de fácil manipulación, almacenaje y bajo costo, además de presentar buena correlación con otros sistemas de pruebas.

El bioensayo de toxicidad con semillas de *L. sativa* es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y el hipocotilo. Es importante destacar que durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general.

El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es de gran importancia para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula constituye un indicador representativo para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta. A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto.

Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas (Sobrero y Ronco, 2008). Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. Por otra parte, es de fácil y rápida germinación por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días. Este bioensayo de toxicidad ha sido

comendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros, además de la evaluación del efecto fitotóxico de plaguicidas sobre especies no blanco, necesarios para el registro de estos compuestos (OECD, 1984; US EPA, 1989; Wang, 1987). Aunque todos los antibacterianos evaluados evidenciaron inhibición del crecimiento en radícula e hipocotilo, (con porcentajes mayores para ceftriaxona y cotrimoxazol) en la investigación se evidenció estimulación en la elongación de la radícula en las concentraciones más bajas, que puede estar asociada a que uno de los requisitos para estos ensayos es que las semillas no estén tratadas con ningún producto (OECD, 1984) por lo que se infiere que los antibacterianos a bajas concentraciones inhiban el desarrollo de microorganismos que se encuentren como endófitos o epífitos.

Los resultados del presente estudio concuerdan con los obtenidos por Irahola y Gimenez (2000). Existen reportes del uso de antibacterianos en medios de cultivo para reducir la presencia de agentes contaminantes en el material vegetal y lograr una mayor eficacia en los medios de propagación *in vitro* de plantas, siempre y cuando sean utilizados en bajas concentraciones pues en elevadas dosis puede causar efectos fitotóxicos y provocar inhibición en el crecimiento de la radícula (Pierik, 1987; Vargas-Castillo y Abdelnour-Esquivel, 2010).

Por otra parte, un mayor desarrollo en la elongación de la radícula le permite a la plántula explorar más terreno, por lo que esta estimulación pudiera aumentar la supervivencia de la plántula en el ecosistema. Aunque es válido tener en cuenta que un estudio de más larga duración podría arrojar resultados más completos ya que estos miden otros parámetros como: largo de las raíces y tallo, número de hojas y peso (fresco y seco), los que indican el efecto tóxico de los productos sobre estos.

La cuantificación del riesgo medioambiental expresada por el cociente PEC/PNEC dio valores inferiores a 0,1 (insignificante) para todos los antibacterianos, indicando que no presentan riesgo de bioacumulación o toxicidad. Esto no coincide con lo reportado en la literatura científica ya que ceftriaxona, cefotaxima, cefuroxima y vancomicina no se logran clasificar por datos insuficientes, mientras que la amoxicilina un componente de amoxicilina más sulbactam se clasifica como de acción moderada para los ecosistemas, la cefazidima y el cotrimoxazol se clasifican de bajo riesgo y el resto de los antibacterianos investigados con riesgo insignificante (Stockholm County Council, 2014).

Ensayo de toxicidad aguda en semilla de L. sativa en la mezcla de antibacterianos

El creciente desarrollo industrial y urbano ha traído consigo la aparición de una cantidad apreciable de sustancias químicas y mezclas complejas tóxicas, las cuales afectan tanto la salud humana como la ambiental. Un instrumento alternativo para la determinación de la toxicidad es la utilización de bioensayos sencillos y económicos, que son muy empleados en evaluaciones iniciales.

Aunque en casos específicos se ha probado que incluso los productos farmacéuticos individuales provocan daño ambiental, las concentraciones de los productos farmacéuticos individuales que se encuentran en el ambiente son a menudo demasiado bajas como para provocar efectos ecotoxicológicos directos. Sin embargo, toda una gama de diferentes productos farmacéuticos está presente en un compartimento ambiental determinado en un momento dado. Por consiguiente, la típica situación de exposición es por lo general una mezcla de múltiples componentes de concentraciones de bajo efecto de los productos farmacéuticos individuales.

Concentración-Adición (CA)

El concepto de concentración adición es fácil de aplicar pero en algunos casos podría sobreestimar la toxicidad de mezclas. Sin

embargo, desde la perspectiva regulatoria esta sobreestimación podría ser beneficiosa para la protección de los organismos acuáticos. Este modelo puede ser aplicable como herramienta de carácter predictivo para la protección de los ecosistemas acuáticos.

En relación al tipo de interacción de la mezcla, según el modelo de proporción-sinergia, para la inhibición de la germinación el cociente fue superior a uno, clasificándose la interacción como sinérgica, el efecto de la combinación es mayor que el esperado de la suma de sus efectos individuales.

Conclusiones

De los 21 antibacterianos utilizados en el período de estudio cefepima supera la Dosis Diaria Definida según criterios internacionales. El vertimiento de residuos de estos antibacterianos según la predicción constituye un riesgo de contaminación ambiental para el ecosistema del río Bético. Con todos los antibacterianos evaluados se observó inhibición de la germinación y el crecimiento de la radícula y el hipocotilo de *L. sativa*, principalmente para ceftriaxona y cotrimoxazol. Se determinó que el cotrimoxazol se clasifica como muy tóxico, mientras que cefepima, cefazolina y vancomicina se clasifican como moderadamente tóxicos. La mezcla de antibacterianos resultó ser no tóxica y la interacción con los antibacterianos se clasifica como sinérgica.

Bibliografía

1. Baquero F, Martínez J, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*. 2008; 19(3), 260-265.
2. Barceló D, López De Alda M. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. 2008. (Panel Científico-Técnico de Seguimiento de la Política de Aguas). Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona.
3. Carmona E, Andreu V, Picó Y. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Science of the Total Environment*. 2014; 484, 53-63.
4. Dang H, Zhang X, Song L, Chang Y, Yang G. Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. *Journal of applied microbiology*. 2007; 103(6), 2580-2592.
5. EPA. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101). 712-C-96-154. April 1996.
6. Esteban S, Gorga M, Petrovic M, González-Alonso S, Barceló D, Valcárcel Y. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. *Science of the Total Environment*. 2014; 466-467, 939-951.
7. European Commission. Technical guidance document on risk assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. 2003. (<http://jrc.ecb.eu.it/>)
8. Gaete H, Chávez C. Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladocera, Crustacea). *Limnetica*. 2008; 27(1), 1-10.
9. Galindo M. Normas de consumo que se aplicaran en los cálculos del balance de agua. Empresa Aprovechamiento Hidráulico de Villa Clara (Cuba), Grupo de Operación y Vigilancia Técnica. 2001.
10. Giachetto G, Martínez A, Pérez M, Algorta G, Banchemo P, Camacho G. Vigilancia del uso de antibióticos en el Hospital Pediátrico del Centro Hospitalario Pereira Rossell: susceptibilidad antimicrobiana; gasto y consumo de antibióticos. *Revista Médica Uruguaya*. 2003; 19, 208-215.
11. Gil M, Soto A, Usma J, Gutierrez O. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*. 2012; 7(2), 52-73.
12. Iannaccone J, Alvarino L. Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*. *Ecología Aplicada*. 2009; 8(2).

- Irahola P, Gimenez A. Dos ensayos: Inhibición de Germinación de Semillas y Toxicidad en Artemia salina, como indicadores de actividad antitumoral. *Biofarbo*. 2000; 8.
13. JICA-GTE. Estudio del Desarrollo del Alcantarillado y el Drenaje Pluvial en la Bahía de La Habana (Informe Final del Proyecto). Resumen Ejecutivo. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA)-Grupo Estatal del Trabajo para el Saneamiento de la Bahía de La Habana, Cuba. 2004
 14. Jiménez C. Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos. *Revista Lasallista de Investigación*. 2011; 8(2), 143-153.
 15. Kümmerer K. Sources, Fate, Effects and Risks Pharmaceuticals in the Environment. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 2008
 16. Kümmerer K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources—a review. *Chemosphere*. 2001; 45, 957–969.
 17. Kuster M, De La Cal A, Eljarrat E, López De Alda M, Barceló D. Evaluation of two aquatic passive sampling configurations for their suitability in the analysis of estrogens in water. *Talanta*. 2010, 83(2), 493-499.
 18. Lacy C, Armstrong L, Goldman M, Lance L. Drug Information Handbook. American Pharmaceutical Association. 2012-2013. p. 21-1761.
 19. Márquez D. Residuos químicos en alimentos de origen animal: problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 2008; 9(1), 124-135.
 20. Organization for Economic Cooperation and Development. Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals N° 208, OECD Publications Service, Paris. 1984.
 21. Palacios, F., García, E., Borrego, A. Gestión Integral de residuos hospitalarios en el Hospital Miguel Enríquez, Cuba. XV Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales, México. 2005.
 22. Passos J, De Sousa F, Lula I, Barreto E, Lopes J, De Almeida W, et al. Multi-Equilibrium System Based on Sertraline and B-Cyclodextrin Supramolecular Complex in Aqueous Solution. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011; 421(1), 24-33.
 23. Pierik R. In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands. 1987.
 24. Pignato S, Coniglio MA, Faro G, Weill FX, Giammanco G. Plasmid-mediated multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* in crude and treated wastewater used in agriculture. *Journal of Water and Health*. 2009; 7(3), 251–258.
 25. Ramos C, Pellón A. Metodología empleada en el diseño de tecnologías de tratamiento de las aguas residuales de la producción de diversos medicamentos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2006; 37(2).
 26. Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan Au. Aminoglycosides versus bacteria—a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *Journal of biomedical science*. 2008; 15(1), 5-14.
 27. Silva L, Lino C, Meisel L, Pena A. Selective Serotonin Re-Uptake Inhibitors (SSRIs) in the Aquatic Environment: An Ecopharmacovigilance Approach. *Science of the Total Environment*. 2012; 437, 185-195.
 28. Sobrero MC, Ronco A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. En: Ramírez P, Mendoza A, Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en México. Instituto Nacional de Ecología. Editorial: Sermanat México. 2008. p. 55 – 67.
 29. Statsoft, Inc. Statistica (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com. 2007.
 30. Stockholm County Council.. Environmentally Classified Pharmaceuticals. 2014-2015 [consultado en Internet] [citado 21 de abril 2015]. Disponible en: http://www.janusinfo.se/Global/Miljo_och_lakemedel/Miljobroschyr_2014_engelsk_webb.pdf
 31. Teijón G, Candela L, Tamoh K, Molina-Díaz A, Fernández-Alba AR. Occurrence of emerging contaminant, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Science of the Total Environment*. 2010; 408, 3584-3595.
 32. Telechea H, Speranza N, Lucas L, Santurio A, Giachetto G, Algorta G, Nanni L, Pérez C. Evolución del consumo de antibióticos y de la susceptibilidad antimicrobiana en el Centro Hospitalario Pereira Rossell en la era de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Revista chilena de infectología*. 2009; 26(5), 413-419.
 33. US EPA, Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites, US Environmental Protection Agency, 600/3-88/029, Corvallis. 1989.
 34. Vargas-Castillo MP, Abdelnour-Esquivel A. Cultivo in vitro de *Geophila macropoda* (Ruiz & Pav. DC) a partir de embriones cigóticos. *Agronomía Mesoamericana*. 2010; 21(1), 73.
 35. Wang W. Root Elongation Method for Toxicity Testing of Organic and Inorganic Pollutants. *Environmental Toxicology & Chemistry*. 1987; 6, 409-414.
 36. WHOCC. 2014. World-Health-Organization Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. Disponible en: <http://www.whocc.no/atc-ddd-index>.