

Evaluación toxicológica de soluciones acuosas de ibuprofeno mediante bioensayos con *Artemia salina*, *Allium schoenoprasum* L y *Lactuca sativa*

Saetama V., Vera L., Vanegas M.E., Cruzat C., Brazales D.

Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Químicas.

Resumen: Los fármacos son considerados dentro de los llamados contaminantes emergentes, por lo que es importante investigar los efectos tóxicos que pueden producir en el medio ambiente. Este estudio tuvo como objetivos determinar el efecto tóxico de soluciones acuosas de ibuprofeno sobre un organismo acuático *Artemia salina* y las semillas de *Allium schoenoprasum* L y *Lactuca sativa*. Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo exponiendo a los organismos de prueba a concentraciones de soluciones acuosas de ibuprofeno de 20, 10, 5, 2, 1 y 0.5 mgL⁻¹. Se determinó el porcentaje de mortalidad para la *Artemia salina* y la elongación de la radícula e hipocótilo para las semillas. El porcentaje de mortalidad más elevado se presentó a la concentración de 20 mgL⁻¹, la CL50 calculada fue de 17.386 mgL⁻¹. Un efecto tóxico bajo se presentó en la germinación de las semillas de *Allium schoenoprasum* L. Se produjo la inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo en semillas de *Allium schoenoprasum* L y un efecto de estimulación en la elongación de la radícula e hipocótilo de las semillas de *Lactuca sativa*. El mayor efecto de inhibición se presentó a 1 y 20 mgL⁻¹ y la mayor estimulación a 20 mgL⁻¹.

Palabras claves: Ibuprofeno, toxicidad, bioensayo, contaminantes.

Abstract: *Toxicological evaluation of aqueous solutions of ibuprofen through bioassays with Artemia salina, Allium schoenoprasum L y Lactuca sativa*

Drugs are considered within the so-called emerging pollutants, so it is important to investigate the toxic effects they can produce in the environment. The aim of this study was to determine the toxic effect of aqueous solutions of ibuprofen on an aquatic organism *Artemia salina* and the seeds of *Allium schoenoprasum* L and *Lactuca sativa*. The toxicity tests were carried out by exposing the test organisms to concentrations of aqueous ibuprofen solutions of 20, 10, 5, 2, 1 and 0.5 mgL⁻¹. The percentage of mortality for *Artemia salina* and the elongation of the radicle and hypocotyl for the seeds were determined. The highest mortality percentage occurred at the concentration of 20 mgL⁻¹, the calculated LC50 was 17.386 mgL⁻¹. A low toxic effect was present in the germination of the seeds of *Allium schoenoprasum* L. There was inhibition in the elongation of the radicle and hypocotyl in seeds of *Allium schoenoprasum* L and a stimulation effect in the elongation of the radicle and hypocotyl of the seeds of *Lactuca sativa*. The highest inhibition effect was presented at 1 and 20mgL⁻¹ and the highest stimulation at 20 mgL⁻¹.

Keywords: Ibuprofen, toxicity, bioassay, contaminants.

Introducción

Actualmente se ha investigado la aparición de los llamados contaminantes emergentes en compartimentos acuáticos tanto en aguas superficiales, subterráneas e incluso agua potable. Esto debido a que las plantas de tratamiento de agua no han sido diseñadas para la remoción de estos contaminantes, dentro de los cuales se encuentran los fármacos, que luego de ser consumidos, son metabolizados y eliminados en los efluentes domésticos y aguas residuales de hospitales, las cuales van directamente al alcantarillado para posteriormente ser conducidos hacia las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Existen diversos estudios en los que se aborda la aparición de fármacos entre ellos el ibuprofeno, en aguas de río se han reportado concentraciones en rangos de 5 ngL⁻¹ a 2700 ng L⁻¹ (Ollers et al.,

2001; Corcoran et al., 2010); y a la salida de las plantas de tratamiento de aguas residuales sus concentraciones varían entre 5 ng L⁻¹ a 85000 ngL⁻¹.

El ibuprofeno, compuesto ácido 2- [3- (2-metilpropil) fenil] propanoico, es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) del grupo del ácido propiónico, su mecanismo de acción se basa en la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2, impidiendo la formación de prostaglandinas en el organismo, dando como resultado la disminución del dolor, la fiebre e inflamación (Rainsford, 2013).

Este fármaco se produce y consume en grandes cantidades y ha sido identificado como uno de los principales productos farmacéuticos presentes en los ecosistemas acuáticos. En muchos países se ha detectado presencia de ibuprofeno y sus metabolitos en aguas dulces, de mar y efluentes de plantas depuradoras (Buser et al., 1999; Weigel et al., 2004; Cruz et al., 2014), pudiendo llegar también al suelo mediante actividades de riego (Rede et al., 2016).

Existe poca información ecotoxicológica sobre el Ibuprofeno, varios estudios han determinado sus efectos en distintos compartimentos ambientales, se ha encontrado que el ibuprofeno afecta a los organismos acuáticos inhibiendo su crecimiento (Pomati et al., 2004; Geiger et al., 2016; Mondal et al., 2016) y reproducción (Ji et al., 2013); también se ha encontrado acumulación de este fármaco en tejidos (Mezzelani et al., 2016); y órganos (Brozinski et al., 2012).

El Ibuprofeno puede acumularse en el suelo y causar efectos tóxicos sobre las plantas, ocasionando el desarrollo (Schmidt, 2015) o la inhibición de la raíz (González y Boltos, 2014), dependiendo de tipo de especie.

Los efectos tóxicos que producen diversos contaminantes pueden ser evaluados mediante la aplicación de bioensayos en organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. (Castillo et al., 2004). En este estudio se utilizó un organismo acuático *Artemia salina* (crustáceo de agua salada) y dos especies de semillas *Allium schoenoprasum* L (*cebollín*) y *Lactuca sativa* (*lechuga*) con el objetivo de determinar el efecto tóxico que producen diferentes concentraciones de soluciones acuosas de ibuprofeno sobre dichos organismos, ya que este medicamento es uno de los más utilizados tanto en forma doméstica como en las casas de salud convirtiéndose en un grave problema por la toxicidad que puede producir sobre los organismos del ambiente.

Materiales y Métodos

Reactivos

Se utilizó Ibuprofeno de Sigma Aldrich (pureza > 98%, peso molecular 206.28 g/mol). Metanol de grado para cromatografía líquida (Merck Millipore, pureza 99.9%, contenido de agua < 0.02%, masa Molar: 32.04 g/mol). Todas las soluciones se prepararon con agua destilada tipo II. Se empleó sal marina sin aditivos de grado comercial para la preparación de agua de mar artificial de salinidad 35 ± 1 g L⁻¹.

Preparación de soluciones

Para la exposición de *Artemia salina* y las semillas de *Allium schoenoprasum* L. y *Lactuca sativa*, se prepararon concentraciones nominales de 20, 10, 5, 2, 1 y 0.5 mg L⁻¹, tomando como factor de dilución 0.5.

Las concentraciones de las soluciones de prueba fueron elegidas

*e-mail: mayrav81@yahoo.es

basados en los datos de la CL_{50-24h} disponibles en la literatura para una especie similar a la *Artemia salina* un crustáceo de agua dulce *Thamnocephalus platyurus* cuyo valor de CL_{50-24h} para el ibuprofeno fue de 19.59 mg L⁻¹ (Kim et al., 2009). Debido a que no existen datos de la CL_{50-24h} para semillas, se decidió utilizar las mismas concentraciones aplicadas en el bioensayo con *Artemia salina* para evaluar los efectos tóxicos sobre las semillas *Allium schoenoprasum* L y *Lactuca sativa* (Pino et al., 2015; Schmidt y Redshaw, 2015).

Para el bioensayo con *Artemia salina* se preparó 1 litro de una solución madre de 20 mg L⁻¹ de Ibuprofeno en agua de mar artificial con metanol al 0.5%.

Para el Bioensayo con *Allium schoenoprasum* L. y *Lactuca sativa*, se preparó 1 litro de una solución madre de 20 mg L⁻¹ de Ibuprofeno en agua destilada con metanol al 0.1%.

Las concentraciones de 10, 5, 2, 1, 0.5 mg L⁻¹ fueron obtenidas por diluciones sucesivas y verificadas en un espectrofotómetro UV Visible Genesys 10S de Thermo SCIENTIFIC.

Organismos de Prueba

Los quistes de *Artemia salina* utilizados en el bioensayo fueron adquiridos de INVE GSL originaria de Great Salt Lake, Utah – USA, eclosionados e incubados hasta alcanzar el estado II y III. Para la eclosión de los quistes de *Artemia salina* se prepararon 3 litros de una solución salina 35 g L⁻¹ salinidad, disolviendo 105 g de sal marina purificada en 3 litros de agua destilada. Esta solución salina fue sometida a aireación durante 24 horas, manteniendo un pH de 8.0 ± 0.5.

En la solución aireada se colocaron aproximadamente 1.5 g de quistes para ser incubados manteniendo una temperatura de 25 ± 1 °C y con iluminación de intensidad de al menos 500 lux. Los quistes fueron mantenidos en suspensión continua mediante aireación con la ayuda de una manguera plástica extendida hasta el fondo del recipiente. Después 24 horas se detuvo la aireación para que los nauplios en movimiento que se concentran en el fondo del recipiente, y mediante pipeteado sean trasladados a un nuevo envase que contenía 3 litros solución salina. Esta solución con los nauplios, fue nuevamente aireada y mantenida durante exactamente 24 horas a una temperatura de 25 ± 1 °C y una iluminación de 500 - 1000 lux, en donde se desarrollaron hasta el estado II y III, para luego ser utilizados en las pruebas de toxicidad. Las condiciones para la eclosión de los huevos de *Artemia salina* se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones para la eclosión de *Artemia salina*.

Factor	Condición
Temperatura (°C)	25 ± 1
Intensidad de luz (lux)	500 - 1000
Medio de eclosión	Agua de mar artificial
Salinidad (gL ⁻¹)	35 ± 1
pH de la solución	8.0 ± 0.5
Peso de quistes (g)	1.5
Volumen de ensayo (ml)	3000
Tiempo de incubación eclosión (h)	24
Tiempo de incubación desarrollo estado II y III (h)	24

Las semillas, *Lactuca sativa* (lechuga) Cisco, lote 34LA, registro de Agrocalidad: 010155974801 y de *Allium schoenoprasum* L (cebollín), variedad Kiyotaky White Long, lote 71LA, registro de Agrocalidad: 0101559746001, fueron obtenidas de Takki Seeds, a través de un distribuidor local.

Se verificó la viabilidad de cada lote de semillas en función del porcentaje de germinación (mayor o igual al 90%) y la variabilidad de la elongación de la radícula e hipocótilo (coeficiente de variación debe ser menor al 30%), (Sobrero y Ronco, 2004), mediante ensayos

de germinación utilizando agua destilada, se realizaron tres réplicas por cada tipo de semilla. En cada caja Petri de 90 mm de diámetro se colocaron dos discos de papel filtro Sartorius grado 292 equivalente a Whatman 1, los cuales fueron humedecidos con 5 ml de agua destilada evitando la formación de burbujas de aire, se colocaron 20 semillas en cada caja Petri, se cubrieron las cajas, y se colocaron en bolsas plásticas para evitar la luz y la pérdida de humedad, bajo esas condiciones fueron incubadas 120 horas (5 días) a una temperatura de 22 ± 2 °C.

Terminado el período de incubación, se realizó el conteo del número de semillas germinadas, se midió la longitud de la radícula e hipocótilo, considerando germinadas aquellas con una longitud de radícula mayor a 1 mm, se determinó el promedio de las longitudes, la desviación estándar, se calculó el porcentaje de germinación y el coeficiente de variación.

Pruebas de toxicidad con *Artemia salina*

La evaluación de la toxicidad de Ibuprofeno en *Artemia salina* se realizó tomando como referencia el método propuesto por Vanhaecke y Persoone (1981) y Rajabi, et al., (2015). La prueba se basa en la determinación de la concentración que mata el 50% de los nauplios de *Artemia* en 24 horas, esta concentración se conoce como LC_{50-24h} (Vanhaecke y Persoone, 1981).

Se prepararon soluciones de prueba con diferentes concentraciones de Ibuprofeno 20, 10, 5, 2, 1 y 0.5 mg L⁻¹ en agua de mar artificial (35 g L⁻¹) que contenía 0.5% v/v de metanol, inmediatamente antes de su uso. Para verificar que los efectos observados se atribuirían al Ibuprofeno, se utilizaron dos controles negativos: agua de mar artificial y solvente 0.5% v/v de metanol en agua de mar artificial. Antes de realizar el bioensayo las concentraciones de las soluciones de ibuprofeno fueron medidas en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 222 nm.

Los ensayos con cada concentración fueron realizados por triplicado. Las cajas Petri de 35 mm de diámetro, se llenaron con 10 ml de las concentraciones respectivas de Ibuprofeno y los dos controles negativos aclimatados a 25 °C, con una pipeta pasteur se transfirieron 10 nauplios en cada caja, tomando en consideración que el agua de mar en la pipeta excediera los 0.05 ml, las cajas se cerraron e incubaron en oscuridad a una temperatura de 25 ± 1 °C por 24 horas. Después de 24 horas se contó el número de larvas muertas en cada caja, los nauplios fueron observados utilizando un microscopio corvascopio Kimray. Los nauplios se consideraron muertos al no observar ningún movimiento luego de transcurridos 10 segundos. El efecto tóxico para cada solución se expresó como el porcentaje de mortalidad, los porcentajes de muertes se calcularon comparando el número de sobrevivientes en el control negativo y en las soluciones de prueba (Rajabi et al, 2015). La mortalidad se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Mortalidad} = \frac{\text{Individuos vivos pruebas} - \text{Individuos vivos control}}{\text{Individuos vivos control}} \times 100$$

Con los datos de mortalidad se evaluó la Concentración Letal Media (CL₅₀) del Ibuprofeno sobre la *Artemia salina* mediante el método probit utilizando el programa SPSS. Las condiciones del ensayo de toxicidad se muestran en la tabla 2.

Pruebas de toxicidad con semillas de *Allium schoenoprasum* L. y *Lactuca sativa*

La evaluación de la toxicidad de Ibuprofeno en las semillas de *Allium schoenoprasum* L. (Monocotiledónea) y *Lactuca sativa* (Dicotiledónea) se realizó en base a los métodos propuestos por Schmidt y Redshaw (2015) y Sobrero y Ronco (2004), basados en evaluar el efecto de inhibición en la germinación y crecimiento de la radícula e hipocótilo en semillas, luego de 120 horas de exposición a un compuesto tóxico.

Para cada semilla se realizó el siguiente procedimiento: se prepararon soluciones de prueba con diferentes concentraciones de Ibuprofeno

Tabla 2. Condiciones para el ensayo de toxicidad con *Artemia salina*.

Factor	Condición
Inicio de la fase larvaria	Estadio Nauplio II-III
Tipo de prueba	Estático
Temperatura (°C)	25 ± 1
Intensidad de luz (lux)	Oscuridad
Salinidad (g L ⁻¹)	35 ± 1
Agua de dilución	Agua de mar artificial
Volumen de ensayo (ml)	10
Número de concentraciones de exposición	6
Número de nauplios expuestos	10
Número de repeticiones por concentración	3
Número de controles	2
Tipo de control	Agua de mar artificial y Agua de mar artificial con metanol al 0.5% v/v
Punto final	Mortalidad
Duración de la prueba	24 horas
Criterios de aceptabilidad de la prueba	Mortalidad ≤ 10% en el control negativo

20, 10, 5, 2, 1 y 0.5 mg L⁻¹ en agua destilada que contenía 0.1% v/v de metanol, inmediatamente antes de su uso. Para verificar que los efectos observados se atribuían al Ibuprofeno, se utilizaron dos controles negativos agua destilada y solvente 0.1% v/v de metanol en agua destilada. Antes de realizar el bioensayo, las concentraciones de las soluciones de ibuprofeno fueron medidas en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 221 nm.

Los ensayos con cada concentración fueron realizados por triplicado. En cada caja Petri de 90 mm de diámetro se colocaron dos discos de papel filtro Sartorius grado 292 equivalente a Whatman 1, los cuales fueron humedecidos con 5 ml de cada concentración evitando la formación de burbujas de aire, se colocaron 20 semillas dejando espacio suficiente entre la mismas para permitir la elongación de las raíces, las cajas fueron cubiertas y colocadas en bolsas plásticas de color negro para evitar la luz y la pérdida de humedad, bajo esas condiciones fueron incubadas 120 horas (5 días) a una temperatura de 22 ± 2 °C.

Culminado el período de exposición se realizó el conteo del número de semillas germinadas y se midió la longitud de la radícula y el hipocótilo. Se determinó el promedio de la longitud de la radícula e hipocótilo, la desviación estándar y el coeficiente de variación, de los controles negativos y de cada concentración.

Los efectos fitotóxicos, se determinaron mediante el porcentaje de germinación y la inhibición o estimulación en la elongación de la radícula e hipocótilo.

Se calculó el porcentaje de germinación (%G) de las semillas para cada concentración con respecto al control negativo de acuerdo a Rodríguez et al, (2014) mediante la siguiente expresión:

$$(\%G) = \frac{\text{No. Semillas germinadas en cada concentración}}{\text{No. Semillas germinadas en el control}} \times 100$$

El porcentaje de inhibición o estimulación en la elongación (%IE) de la radícula e hipocótilo, fue calculado de acuerdo a Bagur et al., (2011) mediante la siguiente expresión:

$$(\%IE) = \frac{\text{Promedio elongación muestra} - \text{Promedio elongación control}}{\text{Promedio elongación control}} \times 100$$

Las condiciones del ensayo de toxicidad se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones del ensayo de toxicidad con semillas de *Allium schoenoprasum* L. y *Lactuca sativa*.

Factor	Condición
Temperatura (°C)	20 ± 1
Intensidad de luz (lux)	Oscuridad
Agua de dilución	Agua destilada
Volumen de la solución de prueba (ml)	5
Número de concentraciones de exposición	6
Número de semillas por réplica	20
Número de réplicas	3
Tipo de control negativo	Agua destilada y metanol 0.1% v/v
Tiempo de duración de la prueba (h)	24
Efecto medido	Porcentaje de germinación, elongación de radícula e hipocótilo
Criterio de aceptabilidad de la prueba	Germinación > 90%, coeficiente de variación >30% en control negativo

Resultados

Exposición de *Artemia salina* a diferentes concentraciones de ibuprofeno

Se realizaron ocho experimentos cada uno de ellos por triplicado. La mortalidad en los controles negativos con agua de mar artificial y solvente 0.5% v/v de metanol en agua de mar artificial fue del 0%, razón por la cual se tomó como control negativo al solvente 0.5% v/v de metanol en agua de mar artificial. El porcentaje de mortalidad en los controles negativos no excedió el 10%. El porcentaje de mortalidad más elevado corresponde a la concentración de 20 mg L⁻¹ de ibuprofeno con el 63.3% de mortalidad de nauplios de *Artemia* (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* expuesta a diferentes concentraciones de ibuprofeno.

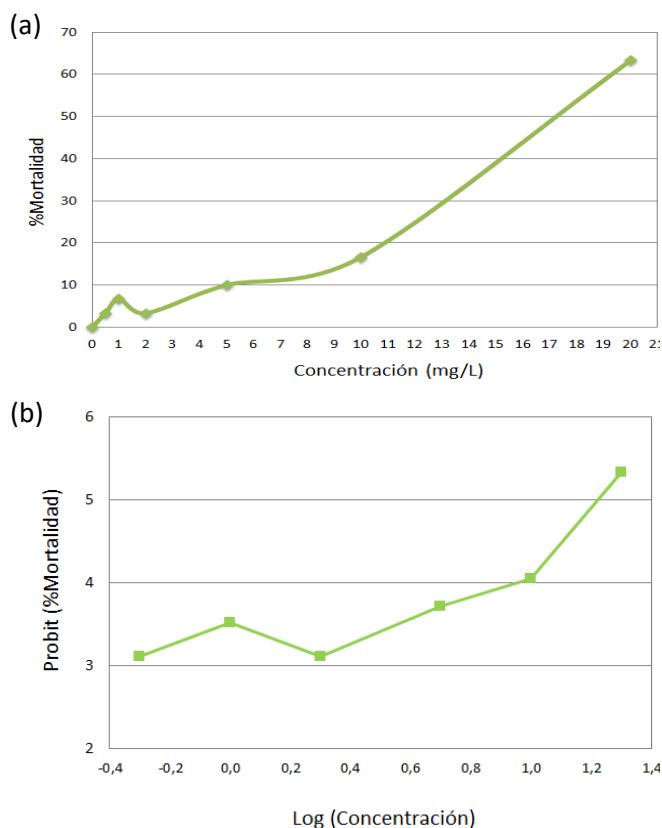
Concentraciones	Concentraciones reales de ensayo	No. Nauplios por réplica	No. Nauplios Vivos			% Mortalidad			Promedio del % Mortalidad
			R1	R2	R3	R1	R2	R3	
Control									
Solución salina		10	10	10	10	0	0	0	0
Control 0.5 %Metanol		10	10	10	10	0	0	0	0
0.5 mg L ⁻¹	0.489 mg L ⁻¹	10	10	9	10	0	10	0	3.3
1 mg L ⁻¹	1.126 mg L ⁻¹	10	8	10	10	20	0	0	6.7
2 mg L ⁻¹	2.104 mg L ⁻¹	10	10	9	10	0	10	0	3.33
5 mg L ⁻¹	5.910 mg L ⁻¹	10	9	9	9	10	10	10	10.0
10 mg L ⁻¹	10.560 mg L ⁻¹	10	8	8	9	20	20	10	16.7
20 mg L ⁻¹	20.050 mg L ⁻¹	10	4	4	3	60	60	70	63.3

La concentración de ibuprofeno que produce mortalidad sobre el 50% de los nauplios de *Artemia salina* en estado II-III en un periodo de exposición de 24 horas CL_{50-24h} fue 17.386 mg L⁻¹. El valor de la CL₅₀ y sus límites con un 95 % de confianza se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la CL_{50} mgL^{-1} y límites de confianza de la concentración de ibuprofeno para *Artemia salina*.

Probabilidad	Concentración (mgL^{-1}) 95% de confianza		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior
0.5	17,386	12,855	27,485

Las curvas Concentración - Mortalidad y la curva basada en el modelo Probit se muestran en la figura 1.

**Figura 1:** (a) Curva Concentración- Mortalidad y (b) Curva basada en el modelo Probit.

Exposición de *Allium schoenoprasum L* (cebollín) y *Lactuca sativa* (lechuga) a diferentes concentraciones de ibuprofeno.

Germinación de las semillas

El porcentaje de germinación en los controles con agua destilada y solvente 0.1% v/v de metanol, no presenta ninguna diferencia siendo de 96.7% para el cebollín y 100% para la lechuga. El porcentaje de germinación en los controles negativos fue mayor al 90%.

Para las semillas cebollín a concentraciones de 1, 2 y 5 $mg L^{-1}$ se obtuvo un porcentaje de germinación de 84%, 89 y 86%, con una inhibición del 15.5, 10.3 y 13.8 % respectivamente, para el resto de concentraciones el porcentaje de germinación fue mayor al 90% y una inhibición menor al 5% a 0.5, 10 y 20 $mg L^{-1}$.

Para las semillas de lechuga el porcentaje de germinación fue mayor al 90% de ibuprofeno y la inhibición fue menor al 5% a todas las concentraciones de ibuprofeno.

En las tablas 6 y 7 se observan los resultados obtenidos con respecto al número de semillas germinadas, el porcentaje de germinación y el porcentaje de inhibición de las semillas de *Allium schoenoprasum L* (cebollín) y *Lactuca sativa* (lechuga), para los controles negativos y las soluciones de 20, 10, 5, 2, 1 y 0.5 mgL^{-1} de ibuprofeno.

Tabla 6. Porcentajes de germinación de semillas de *Allium schoenoprasum L* a diferentes concentraciones de ibuprofeno.

Concentraciones	Concentración medida	No. Semillas por réplica	No. Semillas germinadas			Porcentaje Germinación %	Porcentaje Inhibición %
			R1	R2	R3		
Control (AD)		20	20	19	19	96.7	-
Control 0.1 % Metanol		20	20	19	19	96.7	-
0.5 $mg L^{-1}$	0.465 $mg L^{-1}$	20	19	20	17	96.6	-3.4
1 $mg L^{-1}$	1.15 $mg L^{-1}$	20	17	18	14	84.5	-15.5
2 $mg L^{-1}$	1.91 $mg L^{-1}$	20	17	18	17	89.7	-10.3
5 $mg L^{-1}$	4.66 $mg L^{-1}$ 10.24 $mg L^{-1}$	20	17	18	15	86.2	-13.8
10 $mg L^{-1}$		20	20	18	19	98.3	-1.7
20 $mg L^{-1}$	19.6 $mg L^{-1}$	20	19	18	19	96.6	-3.4

RI: Réplica 1, R2: Réplica 2, R3: Réplica 3. AD: Agua Destilada. MeOH: Metanol. El signo (-) indica inhibición.

Tabla 7. Porcentajes de germinación de semilla *Lactuca sativa* a diferentes concentraciones de ibuprofeno.

Concentraciones	Concentración medida	No. Semillas por réplica	No. Semillas germinadas			Porcentaje Germinación %	Porcentaje Inhibición %
			R1	R2	R3		
Control (AD)		20	20	20	20	100.0	-
Control 0.1 % Metanol		20	20	20	20	100.0	-
0.5 $mg L^{-1}$	0.465 $mg L^{-1}$	20	19	18	20	95.0	-5.0
1 $mg L^{-1}$	1.15 $mg L^{-1}$	20	20	20	20	100.0	-0.0
2 $mg L^{-1}$	1.91 $mg L^{-1}$	20	20	20	18	96.7	-3.3
5 $mg L^{-1}$	4.66 $mg L^{-1}$	20	20	20	19	98.3	-1.7
10 $mg L^{-1}$	10.24 $mg L^{-1}$	20	19	20	20	98.3	-1.7
20 $mg L^{-1}$	19.6 $mg L^{-1}$	20	20	20	20	100.0	-0.0

RI: Réplica 1, R2: Réplica 2, R3: Réplica 3. AD: Agua Destilada. MeOH: Metanol. El signo (-) indica inhibición.

Elongación de la radícula e hipocótilo

Los resultados de las medidas de la elongación de la radícula e hipocótilo de las semillas de *Allium schoenoprasum L* (cebollín) y *Lactuca sativa* (lechuga), fueron expresados como la media \pm SD (desviación estándar) de ocho experimentos, cada uno de ellos realizado por triplicado, adicionalmente se calcularon los porcentajes de inhibición / estimulación en la elongación de la radícula de las semillas tratadas con soluciones de 20, 10, 5, 2, 1 y 0.5 $mg L^{-1}$ de ibuprofeno. El signo negativo en los porcentajes indica inhibición y el signo positivo indica estimulación de la elongación en la radícula e hipocótilo Tablas 8 y 9.

En los controles negativos de agua destilada y metanol 0.1%, no existió diferencia significativa en la elongación de la radícula e hipocótilo de las semillas ($P>0.05$), esto fue comprobado estadísticamente aplicando el análisis test de Mann-Whitney.

En las semillas de cebollín se presentó una disminución en la elongación de la radícula e hipocótilo en comparación con el control negativo, siendo significativamente menor para las concentraciones de 1 y 20 mgL^{-1} ($p < 0.05$), de acuerdo al análisis estadístico Kruskal-Wallis. El porcentaje de inhibición más alto para la radícula e hipocótilo se presentó a las concentraciones de 1 y 20 mgL^{-1} y el porcentaje más bajo de inhibición se observó a las concentraciones de 0.5 mgL^{-1} y 5 mgL^{-1} . El efecto de inhibición fue menor al 50% en todas las concentraciones.

Tabla 8. Resultados de la elongación de la radícula de las semillas de *Allium schoenoprasum* L y *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ibuprofeno.

Tipo de semilla	<i>Allium schoenoprasum</i> L (Cebollín)	<i>Lactuca sativa</i> (Lechuga)	<i>Allium schoenoprasum</i> L (Cebollín)	<i>Lactuca sativa</i> (Lechuga)
Concentración (mg L ⁻¹)	Promedio de elongación (mm)		% Inhibición / Estimulación	
Control (AD)	16.0 ± 5.35	24.47 ± 6.63	0.0	0.0
Control 0.1 % Metanol	16.2 ± 5.32	24.18 ± 5.88	0.0	0.0
0.5 mg L ⁻¹	15.9 ± 6.38	25.95 ± 8.21	-1.8	7.3
1 mg L ⁻¹	13.6 ± 7.89	43.22 ± 9.58	-15.8	78.7
2 mg L ⁻¹	14.7 ± 7.44	41.93 ± 10.87	-9.0	73.4
5 mg L ⁻¹	15.7 ± 7.99	43.35 ± 13.29	-3.1	79.3
10 mg L ⁻¹	14.4 ± 5.77	43.70 ± 13.50	-11.0	80.7
20 mg L ⁻¹	13.8 ± 5.41	48.23 ± 8.04	-15.0	99.4

El signo (-) indica inhibición.

Tabla 9. Resultados de la elongación del hipocótilo de las semillas de *Allium schoenoprasum* L y *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ibuprofeno.

Tipo de semilla	<i>Allium schoenoprasum</i> L (Cebollín)	<i>Lactuca sativa</i> (Lechuga)	<i>Allium schoenoprasum</i> L (Cebollín)	<i>Lactuca sativa</i> (Lechuga)
Concentración (mg L ⁻¹)	Promedio de elongación (mm)		% Inhibición / Estimulación	
Control (AD)	25.6 ± 5.35	25.4 ± 6.63	0.0	0.0
Control 0.1 % Metanol	25.3 ± 5.32	25.8 ± 5.88	0.0	0.0
0.5 mg L ⁻¹	24.0 ± 6.38	27.4 ± 8.21	-5.32	6.12
1 mg L ⁻¹	21.8 ± 7.89	28.0 ± 9.58	-13.92	8.51
2 mg L ⁻¹	24.0 ± 7.44	27.7 ± 10.87	-5.45	7.09
5 mg L ⁻¹	25.1 ± 7.99	28.1 ± 13.29	-0.84	8.83
10 mg L ⁻¹	24.4 ± 5.77	29.0 ± 13.50	-3.61	12.21
20 mg L ⁻¹	22.3 ± 5.41	29.6 ± 8.04	-12.08	14.63

El signo (-) indica inhibición.

En las semillas de lechuga se presentó una estimulación en la elongación de la radícula e hipocótilo para todas las concentraciones de ibuprofeno con respecto al control negativo (figura 2), siendo significativamente mayor para las concentraciones de 1 a 20 mgL⁻¹ (P < 0.05) de acuerdo al análisis estadístico Kruskal-Wallis. El porcentaje más alto de estimulación en la elongación de la radícula e hipocótilo se presentó a la concentración 20 mgL⁻¹ el porcentaje más bajo de estimulación se observó a la concentración de 0.5 mgL⁻¹.

En las figuras 2 y 3 se muestran los porcentajes de inhibición y estímulo en la elongación de la radícula e hipocótilo para las semillas de cebollín y lechuga.

Discusión

Efecto tóxico sobre *Artemia salina*

En este estudio se determinó el efecto de mortalidad de la *Artemia salina* ocasionada por el ibuprofeno luego de una exposición aguda en soluciones acuosas del medicamento. El porcentaje de mortalidad en los controles negativos fue 0% por lo que el lote de *Artemia* utilizado fue aceptable para el ensayo.

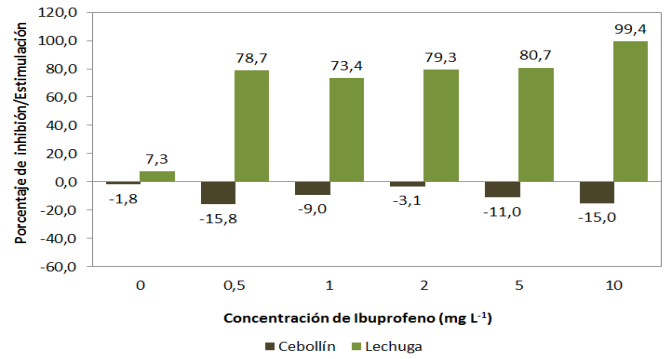


Figura 2: Porcentaje de inhibición y estímulo en la elongación de la radícula de las semillas de cebollín y lechuga tratadas con diferentes concentraciones de soluciones de ibuprofeno.

El efecto de estímulo se muestra barras por encima de la línea, mientras que el efecto de inhibición se presenta en barras debajo de la línea.

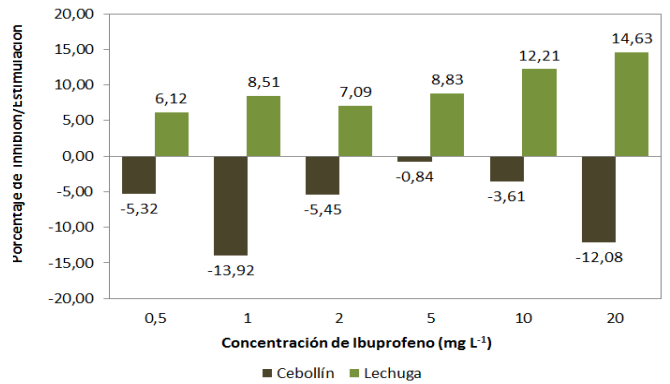


Figura 3: Porcentaje de inhibición y estímulo en la elongación del hipocótilo de las semillas de cebollín y lechuga tratadas con diferentes concentraciones de soluciones de ibuprofeno.

El porcentaje de mortalidad más elevado de nauplios de *Artemia* ocurrió a la concentración de 20 mgL⁻¹ de ibuprofeno, equivalente al 63.3% de mortalidad, lo que evidencia que si existen efectos de toxicidad aguda con ibuprofeno. Se calculó la concentración de ibuprofeno que produce mortalidad sobre el 50% de los nauplios de *Artemia salina* en estado II-III en un periodo de exposición de 24 horas CL_{50-24h} mediante el análisis probit obteniendo como resultado 17.386 mg L⁻¹. Un resultado similar se obtuvo en un estudio realizado por Kim et al., (2009) quien expuso a un crustáceo de agua dulce a ibuprofeno determinando como concentración letal CL_{50-24h} 19.59 mg L⁻¹.

Efecto tóxico sobre semillas de *Allium schoenoprasum* l. *Lactuca sativa*.

Geminación de semillas

Los resultados para la germinación de las semillas de *Allium schoenoprasum* l. (*cebollín*) y *Lactuca sativa* (*lechuga*) muestran que en ningún caso la reducción en la germinación llegó a ser del 50% con respecto al control negativo, por lo que no fue posible calcular la concentración que produce el 50% de inhibición en la germinación. Siguiendo los criterios descritos por Poi de Neiff y Ramos (2001) que indican que se pueden considerar sustancias no tóxicas a las muestras cuya germinación es mayor del 90%, tóxicas a las que presentan una germinación del 75% al 90% y muy tóxicas a las que tienen menos del 75% de germinación en relación con el control negativo, se puede concluir que hubo un efecto de toxicidad causado por el ibuprofeno en las semillas de cebollín a las concentraciones de 1, 2 y 5 mgL⁻¹, siendo el efecto tóxico más alto a 1 mgL⁻¹ con una germinación del 84% , por el contrario el ibuprofeno no causa ningún efecto tóxico sobre la germinación de las semillas de lechuga, demostrando que el cebollín, una especie monocotiledónea es más sensible al ibuprofeno que la lechuga una especie dicotiledónea, Alvear y Abad, (2015) también

determinaron una mayor sensibilidad en la germinación de las semillas de cebolla sometidas a soluciones acuosas de material articulado en comparación con las de lechuga.

Los porcentajes de inhibición y por lo tanto la toxicidad en la germinación de las dos semillas fueron bajos y estuvieron comprendidos entre el 0% y el 15.5% en todos los casos, un resultado de inhibición similar fue determinado por Pino et al, (2016) al tratar semillas de lechuga con varias concentraciones de antiinflamatorios entre ellos el ibuprofeno, sin embargo las concentraciones utilizadas en este caso fueron más altas que las de este estudio llegando a los 1000 mgL⁻¹, lo que indica que incluso a concentraciones altas de ibuprofeno la germinación no se ve afectada.

Elongación de la radícula e hipocótilo

El efecto sobre el crecimiento de la radícula de cebollín y lechuga fue diferente para cada tipo de semilla. En las semillas de cebollín se presentó una disminución del tamaño de la radícula e hipocótilo, mientras que para la lechuga se observó una estimulación del desarrollo de la radícula e hipocótilo, con respecto al control negativo. El mismo efecto sobre las semillas de lechuga y cebolla fue determinado por Alvear y Abad, (2015) quienes concluyen que la cebolla es una especie sensible a compuesto tóxicos.

El efecto fitotóxico sobre la radícula e hipocótilo de cebollín fue mayor a las concentraciones de 1 y 20 mgL⁻¹. La inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo fue menor al 50% con respecto al control negativo, por lo que no fue posible calcular la concentración que produce el 50% de inhibición en la radícula e hipocótilo, bajo esta consideración el ibuprofeno a las concentraciones estudiadas no se considera altamente tóxico (Bagur et al., 2011).

La estimulación de la radícula e hipocótilo de las semillas de lechuga indica un efecto de hormesis. Según Sobrero y Ronco, (2004) la estimulación radicular no debe ser interpretada como un efecto favorable o estimulante, aunque es posible que ciertos compuestos produzcan exaltación por ser micronutrientes vegetales. Un efecto similar fue determinado por Schmidt y Redshaw, (2015) donde las semillas tratadas con una solución de 1 mgL⁻¹ de Ibuprofeno mejoraron el desarrollo de la raíz primaria e hipocótilo de semillas de lechuga en comparación con control negativo, en otro estudio realizado por Pounds et al., (2008) a concentraciones más altas de ibuprofeno comprendidas entre 250 mgL⁻¹ y 500 mgL⁻¹ las raíces fueron más delgadas y largas y produjeron la inhibición del 50% de la elongación del hipocótilo con respecto al control negativo, además presentaron manchas de tejido necrótico en las puntas de las raíces, al contrario concentraciones mayores a 1000 mgL⁻¹ ocasionaron una inhibición del 50% de la elongación de la radícula, lo que indica que concentraciones altas de ibuprofeno causan un efecto tóxico sobre la radícula e hipocótilo.

Al comparar los efectos del ibuprofeno sobre la radícula e hipocótilo de los tipos de semillas, se observa que el efecto tóxico sobre las semillas de cebollín es mayor en la radícula que en el hipocótilo, lo mismo ocurre en el caso de la lechuga la estimulación fue mayor en la radícula, lo que sugiere que la raíz es más sensible a las soluciones acuosas de ibuprofeno, un resultado similar fue descrito por An et al., (2009) al analizar el desarrollo de las plántulas de trigo expuestas a paracetamol.

El ibuprofeno se encuentra en concentraciones muy bajas en diferentes compartimentos acuáticos y en aguas residuales, las concentraciones detectadas están comprendidas en el orden de los µgL⁻¹ y ngL⁻¹ (Stumpf et al., 1999; Boyd et al., 2003; Buxton y Kolpin, 2005), Sin embargo, las concentraciones utilizadas en los ensayos toxicológicos son altas encontrándose en el rango de 0.1 mgL⁻¹ a 1000 mgL⁻¹ (Pounds et al, 2008; Iannacone y Alvarino, 2009). Kim et al., 2009; Eissa et al., 2014; González et al., 2016), por lo que el efecto tóxico agudo sería muy bajo y podría desestimarse. Un análisis similar lo realizó Kim et al., (2009) quien

concluye que los efectos tóxicos agudos de los compuestos farmacéuticos pueden ser insignificantes en los entornos acuáticos naturales ya que las concentraciones que han ocasionado algún efecto sobre los organismos sometidos a ensayos ecotoxicológicos son muy elevadas y no se han encontrado concentraciones similares en los compartimentos acuáticos.

Por esta razón se requiere que los estudios de toxicidad de productos farmacéuticos sean realizados a largo plazo y a concentraciones lo más cerca posible de las condiciones reales para determinar los efectos de los fármacos sobre el crecimiento, reproducción y daños a nivel genético de los organismos acuáticos, en el caso de las semillas se analiza el crecimiento y desarrollo de las plántulas, además de la peroxidasa, superóxido dismutasa, clorofila y proteína soluble en las plántulas germinadas tal como lo hizo An et al, (2009) con las semillas de trigo.

Conclusiones

Los efectos del Ibuprofeno sobre diferentes tipos de organismos no son bien conocidos. Los efectos tóxicos observados en los bioensayos de toxicidad aguda realizados en este estudio fueron obtenidos utilizando concentraciones superiores a las máximas encontradas en los cuerpos de agua. Los resultados de esta investigación mostraron que las concentraciones de ibuprofeno analizadas produjeron un efecto tóxico alto sobre la *Artemia salina* causando la muerte del más del 50% de los organismos obtenido un valor de CL_{20-24h} de 17.386 mg L⁻¹, sin embargo para el caso de las semillas de *Allium schoenoprasum* L y *Lactuca sativa* estas concentraciones resultaron ser de baja toxicidad, siendo las semillas de *Allium schoenoprasum* L más sensibles a la exposición. Los futuros estudios deben considerar el estudio de toxicidad crónica de este fármaco, evaluando otros tipos de indicadores y analizando concentraciones similares a las encontradas en el medio ambiente y en matrices reales, con el fin de contribuir a una normativa ambiental que permita establecer los límites permisibles para los medicamentos.

Agradecimiento

Los autores agradecen el financiamiento proveniente de la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca (DIUC) a través del proyecto DUIC_XIV_2016_037.

Referencias

1. Ahmed, M. B., Zhou, J. L., Ngo, H. H., Guo, W., Thomaidis, N. S., & Xu, J. (2017). Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: a critical review. *Journal of hazardous materials*, 323, 274-298.
2. Alvear, N. G., & Terán, M. A. (2015). Análisis preliminar de la fitotoxicidad del material particulado sedimentable de la zona urbana de Cuenca. *Maskana*, 6(1), 39-52.
3. Akar, S. T., Yilmazer, D., Celik, S., Balk, Y. Y., & Akar, T. (2015). Effective biodecolorization potential of surface modified lignocellulosic industrial waste biomass. *Chemical Engineering Journal*, 259, 286-292.
4. Bagur-González, M. G., Estepa-Molina, C., Martín-Peinado, F., & Morales-Ruano, S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal (loid) s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of soils and sediments*, 11(2), 281-289.
5. Boyd, G. R., Reemtsma, H., Grimm, D. A., & Mitra, S. (2003). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Science of the total Environment*, 311(1-3), 135-149.
6. Brozinski, J. M., Lahti, M., Meierjohann, A., Oikari, A., & Kronberg, L. (2012). The anti-inflammatory drugs diclofenac, naproxen and ibuprofen are found in the bile of wild fish caught downstream of a wastewater treatment plant. *Environmental*

science & technology, 47(1), 342-348.

7. Buser, H. R., Poiger, T., & Müller, M. D. (1999). Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environmental science & technology*, 33(15), 2529-2535
8. Buxton, H. T., & Kolpin, D. W. (2005). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams. *Water Encyclopedia*, 5, 605-608.
9. Castillo Morales, G., Rojas Clemente, J. J., Mills, D., Kunoh, H., Keen, N. T., Mayama, S., ... & Waller, G. R. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicación (No. 615.907 E59). Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México, DF (México). IDRC, Ottawa (Canadá).
10. Corcoran, J., Winter, M. J., & Tyler, C. R. (2010). Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical reviews in toxicology*, 40(4), 287-304.
11. Cruz Esteban, S., Cruz López, L., A Malo, E., Valle Mora, J., Infante Matha, D. M., Santiesteban Hernández, A., ... & Bello Mendoza, R. (2014). Presencia De Anti Inflamatorios No Esteroides en Cuerpos de Agua Superficial de Tapachula, Chiapas, México. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica*, 7(2).
12. Eissa, B. L., Ossana, N. A., Ferrari, L., & Salibián, A. (2014). Effect of ibuprofen on the swimming pattern of *Cyprinus carpio*. *Fresenius Environ Bull*.
13. Geiger, E., Hornek-Gausterer, R., & Saçan, M. T. (2016). Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 129, 189-198.
14. González-Naranjo, V., & Boltes, K. (2014). Toxicity of ibuprofen and perfluorooctanoic acid for risk assessment of mixtures in aquatic and terrestrial environments. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(6), 1743-1750.
15. González-Pérez, B. K., Sarma, S. S. S., & Nandini, S. (2016). Effects of selected pharmaceuticals (ibuprofen and amoxicillin) on the demography of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* (Rotifera). *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(3), 341-347.
16. Iannacone, J., & Alvarriño, L. (2009). Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*. *Ecología aplicada*, 8(1-2), 71-80.
17. Ji, K., Liu, X., Lee, S., Kang, S., Kho, Y., Giesy, J. P., & Choi, K. (2013). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. *Journal of hazardous materials*, 254, 242-251.
18. Kim, J. W., Ishibashi, H., Yamauchi, R., Ichikawa, N., Takao, Y., Hirano, M., & Arizono, K. (2009). Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *The Journal of toxicological sciences*, 34(2), 227-232.
19. Mezzelani, M., Gorbi, S., Da Ros, Z., Fattorini, D., d'Errico, G., Milan, M., ... & Regoli, F. (2016). Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine environmental research*.
20. Mondal, S., Aikat, K., & Halder, G. (2016). Biosorptive uptake of ibuprofen by chemically modified *Parthenium hysterophorus* derived biochar: Equilibrium, kinetics, thermodynamics and modeling. *Ecological Engineering*, 92, 158-172
21. Ollers, S., Singer, H. P., Fässler, P., & Müller, S. R. (2001). Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *Journal of chromatography A*, 911(2), 225-234.
22. Pino, M. R., Muñiz, S., Val, J., & Navarro, E. (2016). Phytotoxicity of 15 common pharmaceuticals on the germination of *Lactuca sativa* and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(22), 22530-22541.
23. Poi de Neiff, A., & Ramos, A. O. (2001). Utilización de bioensayos para el estudio ecotoxicológico de los ríos Salado y Negro (Chaco, Argentina). Disponible en: [http](http://).
24. Pomati, F., Netting, A. G., Calamari, D., & Neilan, B. A. (2004). Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology*, 67(4), 387-396.
25. Pounds, N., Maclean, S., Webley, M., Pascoe, D., & Hutchinson, T. (2008). Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Ecotoxicology and environmental Safety*, 70(1), 47-52.
26. Rainsford, K. D. (2013). *Ibuprofen: pharmacology, therapeutics and side effects*. Springer Science & Business Media.
27. Rede, D., Santos, L. H., Ramos, S., Oliva-Teles, F., Antão, C., Sousa, S. R., & Delerue-Matos, C. (2016). Ecotoxicological impact of two soil remediation treatments in *Lactuca sativa* seeds. *Chemosphere*, 159, 193-198
28. Schmidt, W., Redshaw, C.H., 2015. Evaluation of biological endpoints in crop plants after exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): implications for phytotoxicological assessment of novel contaminants. *Ecotoxicol. Environ.Saf.* 112, 212e222.
29. Sobrero, M. C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. IDRC/IMTA. Canadá, Capítulo, 4, 71-79.
30. Stumpf, M., Ternes, T. A., Wilken, R. D., Rodrigues, S. V., & Baumann, W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of the total environment*, 225(1-2), 135-141.
31. Vanhaecke, P., Persoone, G., 1981. Report on an intercalibration exercise on a short-term standard toxicity test with *Artemia nauplii*, 370-376.

Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., & Hühnerfuss, H. (2004). Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56(6), 583-592.