



INTRODUCCIÓN

La contaminación de fármacos en aguas superficiales, subterráneas o de consumo empieza a reconocerse como un problema medioambiental. La industria farmacéutica diseña y produce principios activos cada vez más potentes, biodisponibles y persistentes. Además, en las concentraciones ambientales en las que se encuentran algunos productos farmacéuticos se asocian a efectos adversos en organismos acuáticos y podemos denominarlos "micropolutantes emergentes"[1].

Existe poca información sobre los efectos toxicológicos que los fármacos provocan en organismos acuáticos y terrestres, por lo que, se tienen lagunas en el conocimiento de datos de ecotoxicidad en diversas familias de éstos [2].

Este trabajo se engloba dentro de una línea de investigación cuyo objetivo es realizar una caracterización sistemática y exhaustiva de diferentes familias de fármacos.

Con este objetivo se ha determinado la toxicidad aguda de varios fármacos perteneciente a las familias de Beta-bloqueantes y Estatinas a través de dos bioensayos normalizados aplicados organismos acuáticos como terrestres: *Eisenia fetida* y *Vibrio fischeri*.

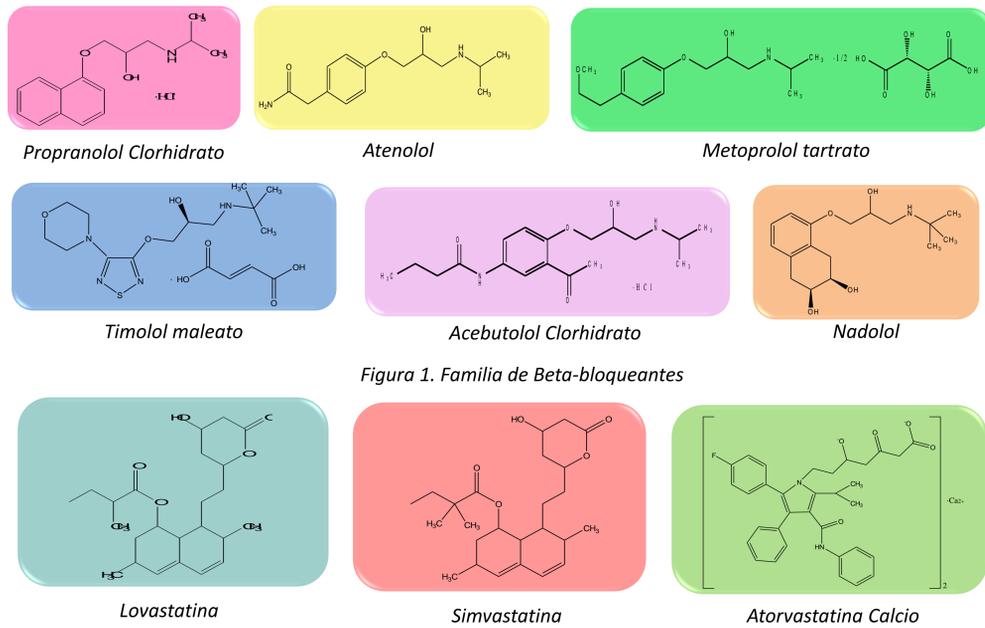


Figura 1. Familia de Beta-bloqueantes

Figura 2. Familia de estatinas

MATERIAL Y METODOLOGÍA

Se utilizaron principios activos de dos familias de fármacos que se obtuvieron de distintas casas comerciales, tal y como se indica en la tabla 1:

	Fármacos	Pureza	P.M. (g/mol)	Proveedor
BETA-BLOQUEANTES	Propranolol Clorhidrato	>99%	295,81	Acofarma
	Atenolol	>98%	266,30	Acofarma
	Metoprolol Tartrato	>98%	684,81	Sigma-Aldrich
	Nadolol	98,50%	309,40	Fagron
	Timolol Maleato	>98%	432,50	Acofarma
	Acebutolol Clorhidrato	99,50%	372,89	Sigma-Aldrich
ESTATINAS	Atorvastatina Calcio	99%	1155,38	Teva
	Simvastatina	99%	418,57	Teva
	Lovastatina	99%	404,55	Ercros S.A.

Tabla 1. Datos de los fármacos de estudio

Los organismos utilizados para la evaluación de la ecotoxicidad fueron *Eisenia fetida* y *Vibrio fischeri*. El luminómetro empleado en el ensayo de *Vibrio fischeri* es el BioFix Lumi-10 de Macherey-Nagel. La metodología utilizada fue la descrita en las normas estandarizadas Earthworms, acute toxicity test OECD Guideline [3] y EN ISO 11348-3:2007 [4], respectivamente.

Para el ensayo de toxicidad en organismos terrestres con *Eisenia fetida* se preparó el suelo artificial. Para cada ensayo, se realizó un control positivo de cloracetamida y uno negativo y, al menos, tres réplicas. Se adicionaron 10 lombrices adultas por cada sustancia y concentración estudiada. El test se llevó a cabo a $21 \pm 1^\circ\text{C}$.



Figura 3. Ensayo de Eisenia

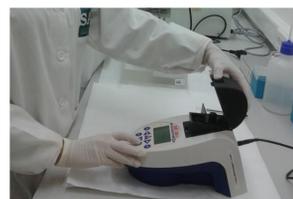


Figura 4. Ensayo de Vibrio

Para el test de toxicidad en organismos acuáticos con *Vibrio fischeri* se realizaron distintas disoluciones (mg/L) de los fármacos a testar en agua salina al 2% en NaCl. Todas las disoluciones que fueron necesarias se ajustaron con NaOH o HCl a pH entre 6 y 8,5. Cada ensayo se realizó a temperatura constante de $15 \pm 1^\circ\text{C}$.

Se calculó la LC50 de los fármacos estudiados utilizando el método Probit para los resultados obtenidos en el ensayo de *Eisenia fetida*. En el caso de los datos obtenidos en el ensayo de *Vibrio fischeri*, se realizó una representación lineal del LogC frente a Logγ siendo γ el valor derivado de la ecuación 1.

$$\gamma = \frac{\% \text{ inhibición}}{100 - \% \text{ inhibición}}$$

Ecuación 1. Cálculo de γ

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los principios activos con *Eisenia fetida*. Se puede comprobar que ninguno de éstos pertenecientes a la familia de Beta-bloqueantes es tóxico, ya que la norma indica que una sustancia es tóxica cuando su LC50 se encuentra por debajo de 1000mg/Kg. Totalmente distintos son los resultados observados en la familia de las estatinas, de las tres estatinas estudiadas, únicamente la lovastatina se observó con una LC50 superior a 3000mg/Kg y, por tanto, no tóxica.

	Fármaco	LC50	Tóxico
BETA-BLOQUEANTES	Propranolol Clorhidrato	>2000mg/Kg	No
	Atenolol	>2000mg/Kg	No
	Metoprolol Tartrato	>2000mg/Kg	No
	Nadolol	>2000mg/Kg	No
	Timolol Maleato	>2000mg/Kg	No
	Acebutolol Clorhidrato	>2000mg/Kg	No
ESTATINAS	Atorvastatina	<200mg/Kg	Sí
	Simvastatina	<1000mg/Kg	Sí
	Lovastatina	<4000mg/Kg	No

Tabla 2. Resultados para el ensayo de Eisenia fetida

RESULTADOS

	Fármaco	LC50	Tóxico
BETA-BLOQUEANTES	Propranolol Clorhidrato	<1000mg/L	Sí
	Atenolol	>4000mg/L	No
	Metoprolol Tartrato	>4000mg/L	No
	Nadolol	>1000mg/L	No
	Timolol Maleato	>4000mg/L	No

Tabla 3. Resultados para el ensayo de Vibrio fischeri

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para los ensayos de *Vibrio fischeri*. Este ensayo no se realizó con la familia de las Estatinas por ser insolubles en agua. Dentro de la familia de Beta-bloqueantes se encontró que el único fármaco tóxico es el propranolol ya que el resto supera el valor de LC50 de 1000mg/L establecido por la norma aplicada.

En la figura 5 se representan la curva dosis-respuesta para *Eisenia fetida* y la recta LogC frente a Logγ para *Vibrio fischeri* del Propranolol.

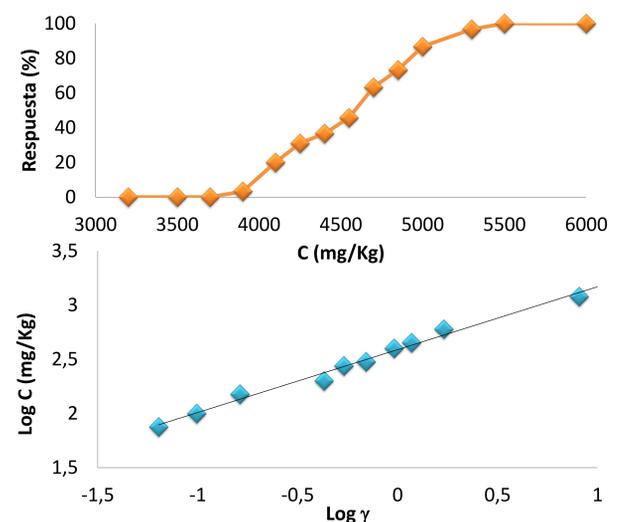


Figura 5. Curva dosis-respuesta y representación lineal para Propranolol

CONCLUSIONES

En este trabajo se presenta el estudio de la toxicidad aguda de nueve principios activos utilizando para ello dos bioensayos normalizados. Los valores de la LC50 muestran que el único fármaco tóxico según la normativa aplicada es el propranolol para el caso de *Vibrio fischeri*. Por otro lado, la familia de Estatinas muestran una tendencia mucho más tóxica para *Eisenia fetida* que la familia previamente mencionada. Las propiedades de insolubilidad en agua de las Estatinas impiden la realización del ensayo de *Vibrio fischeri*.

Este estudio será completado con otros bioensayos de ecotoxicidad con *Daphnia magna* y *Chlamydomonas reinhardtii*. Además, el estudio se ampliará a otras familias de fármacos, excipientes, y a mezclas de estos.

Para obtener una valoración real de la toxicidad de fármacos es necesario llevar a cabo ensayos de toxicidad crónica.

REFERENCIAS

- [1] K. Fent, AA. Weston, D. Caminada, Ecotoxicology of human pharmaceutical, Aquatic toxicology, 76 (2006) 122-159.
- [2] Lúcia H.M.L.M Santos, A.N. Araújo et al., Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. Journal of hazardous materials, 175 (2010) 45-96.
- [3] Earthworm, Acute Toxicity Tests. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Earthworm 207, acute toxicity tests (1984).
- [4] EN ISO 11348-3:2007. Determinación de efecto inhibitor de muestras de agua sobre luminiscencia de *Vibrio fischeri*.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a **Imerys Tiles Minerals España, S.A** por su donación de suelo artificial, así como a **Ercros S.A.** y **Teva** por su donación de estatinas.

Proyecto realizado en el grupo de investigación GIMACES (E02), grupo consolidado de investigación aplicada reconocido por Gobierno de Aragón. Cofinanciado por Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo. "Construyendo Europa desde Aragón".