



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Estudio de la acumulación de compuestos farmacéuticos de uso humano en especies de peces de la Cuenca del Plata

Tesista: Lic. Macarena Gisele Rojo

Director: Dr. Pedro Carriquiriborde

Año: 2021

Índice

Resumen	4
Agradecimientos	6
Difusión de los resultados obtenidos	8
Premios	10
Introducción general	12
Hipótesis y objetivo	35
Capítulo I	36
Sección I. Acumulación de fármacos humanos en peces del Río Uruguay	37
Introducción	37
Hipótesis específicas	40
Objetivos específicos	41
Materiales y métodos	41
Resultados	50
Discusión	61
Conclusiones parciales	66
Sección II. Acumulación de fármacos humanos en peces del bajo Río Uruguay y Río de la Plata	68
Introducción	68
Hipótesis específica	70
Objetivos específicos	70
Materiales y métodos	71
Resultados	78
Discusión	84
Conclusiones parciales	88
Capítulo II	90
Sección I. Bioensayos en condiciones controladas de laboratorio	91
Introducción	91
Hipótesis específica	95
Objetivos específicos	95
Materiales y métodos	96
Resultados	106
Discusión	114
Conclusiones parciales	119
Sección II. Bioensayos en condiciones de campo	120
Introducción	120
Hipótesis específica	122
Objetivos específicos	122
Materiales y métodos	122
Resultados	128
Capítulo III	129
Sección I. Evaluación de la actividad enzimática en peces de campo	130

Introducción	130
Hipótesis específica	134
Objetivos específicos	134
Materiales y métodos	134
Resultados	137
Discusión	139
Conclusiones parciales	141
Sección II. Evaluación de la actividad enzimática en peces bajo condiciones controladas de laboratorio	142
Introducción	142
Hipótesis específica	143
Objetivos específicos	144
Materiales y métodos	144
Resultados	146
Discusión	151
Conclusiones parciales	153
Capítulo IV	154
Introducción	155
Hipótesis específica	157
Objetivo específico	158
Materiales y métodos	158
Resultados	162
Discusión	169
Conclusiones parciales	173
Discusión general	175
Conclusión general	188
Material suplementario	195

Resumen

Luego de su consumo, una fracción de los fármacos humanos (FH) y sus metabolitos, ingresan a las plantas de tratamiento de aguas residuales (cuando existen) a través de las excretas y se descargan directamente en las aguas superficiales. En Argentina, estudios previos han demostrado la presencia de FH en los cuerpos de agua superficiales de nuestro país, por lo que los riesgos ambientales de estos compuestos, se esperarían principalmente en los ecosistemas acuáticos e incluso hay evidencia de que pueden ser absorbidos y bioacumulados diferencialmente por los peces.

En base a los antecedentes, el objetivo general de esta tesis fue estudiar la bioacumulación de FH en peces de la Cuenca del Plata, relacionarla con las propiedades fisicoquímicas de dichas sustancias y las características biológicas de las especies, evaluar si pueden biomagnificarse y estimar el potencial riesgo para el consumo humano.

Para ello, como punto inicial se implementó la metodología de PLE y se adaptó la metodología de Extractor Rotatorio para la extracción de los FH en músculo de peces, resultando satisfactorias para el análisis de los compuestos y permitiendo reportar por primera vez la presencia de 18 fármacos humanos, en el músculo de *M. obtusidens*, *P. lineatus*, *P. maculatus*, y *S. brasiliensis*, recolectados en la Cuenca del Plata. CBZ y ATE fueron los más frecuentes (> 50%) en concentraciones <1 µg kg⁻¹ en peces recolectados en el Río Uruguay. Mientras que ATE y SIL, fueron los más frecuentes (≥ 50%), y en concentraciones >10 µg kg⁻¹ en peces recolectados en el Bajo Río Uruguay y Río de La Plata Interior. Los niveles de concentración de ENA y SIL se reportaron por primera vez a nivel mundial. No hubo relación entre el nivel de bioacumulación y las propiedades fisicoquímicas de los FH, ni tampoco un patrón de biomagnificación en las especies estudiadas.

Como segunda parte de la tesis, se evaluaron los factores de bioconcentración a 96 h de ATE, ENA y SIL en *C. decemmaculatus*, resultando <1 para los 3 compuestos y respetando el orden $CBZ \sim SIL > ENA$. Para SIL, se estudió la cinética de bioconcentración en *C. decemmaculatus* y *P. mesopotamicus* y se observó que los BCF fueron mayores a los obtenidos a 96 h, indicando que se necesitan tiempos > 7 d para alcanzar el estado estacionario.

En la tercer parte de la tesis, se evaluó la actividad de las enzimas del sistema de biotransformación de fase I (EROD y BROD) y fase II (GST) en ejemplares de *P. lineatus* recolectados en el margen costero sur del Río de La Plata Interior (RLP) y Bajo Río Uruguay (URU). Las cuales mostraron mayor actividad ($>25\%$) en RLP y BROD mostró una correlación negativa significativa con ENA.

Complementariamente, la respuesta de dichas enzimas más la enzima del sistema antioxidante (CAT), fue evaluada en *P. mesopotamicus* expuestos a SIL, en condiciones controladas de laboratorio. Como resultado, todas las enzimas evaluadas mostraron un aumento en la actividad durante los días de exposición y luego una disminución en los días de depuración.

Como parte final, de acuerdo a los PNECs calculados y las concentraciones de FH detectadas en el tejido muscular de los ejemplares de campo, se estimaron los potenciales riesgos para el consumo de pescado en la región, concluyendo que el riesgo para la salud humana por consumo de peces contaminados con fármacos de uso humano es muy bajo.

Los resultados obtenidos en la presente tesis conforman un aporte esencial de información, a nivel nacional e internacional, con posibles vistas futuras a aplicarse en la legislación y en la gestión de los recursos naturales y pesqueros de la región.

Agradecimientos

Cuando pienso que finalmente llegué al final de esta etapa, surgen en mi cabeza una mezcla de emociones, entre melancolía porque finaliza una etapa muy importante en mi vida y felicidad porque sé que se abren caminos nuevos por explorar y seguir creciendo. Pienso en estos 5 años vividos y la cantidad de experiencias por las que he pasado, y por ello no puedo dejar de agradecer a todas aquellas personas que formaron parte de esta etapa y me acompañaron en este camino:

En primer lugar quisiera agradecer al Centro de Investigaciones del Medioambiente (CIM)-CONICET-UNLP, que me brindó las instalaciones para llevar a cabo este trabajo.

Luego quisiera agradecer al Instituto Catalán de Investigación del Agua (ICRA), Gerona, España, por recibirme en sus instalaciones y darme el acceso al equipamiento necesario para realizar parte del estudio de esta tesis doctoral.

A la Comisión Administradora del Río Uruguay (CARU) que ha contribuido activamente en la toma de muestras de peces para la presente tesis, desde su personal hasta la infraestructura necesaria para la recolección de los peces.

Luego quisiera agradecer al Lic. Diego Cristos, del Centro de Investigación en Agroindustria, dependiente del Instituto Nacional de Alimentos (CIA-INTA), Castelar, por darnos acceso al uso del HPLC-MS, con el que realicé la separación y detección de los compuestos estudiados en la presente tesis doctoral.

Al Dr Pedro Carriquiriborde con el que he compartido muchos años, desde mi trabajo de Licenciatura hasta mi trabajo de Tesis Doctoral. Valoro mucho todo lo me has enseñado, guiado y acompañado todos estos años.

A mi compañeres del CIM, que han conocido todas mis facetas y estados de ánimo estos años. Estoy muy agradecida de haber compartido estos años con ustedes.

A mis amigos del CIM, Sofi, Tom y Santi, con los que hemos compartido desde catarsis del mundo de becaries hasta vacas-congreso. Les quiero.

A las Ippis, Agus, Coty, Dani, Jeza, Pato y Vivi que siempre están ahí firme para que no me caiga y si me caigo me vuelven a levantar. Que suerte tengo de tener amigas como ustedes.

A las pejerreinas, Pato y Vivi, que me han incluido en el grupo desde el día cero, siempre dispuestas a darme una mano, son unas compañeras de 10 y unas amigas increíbles.

A mis amigas Aipi, Les, Ro y Vir, que me acompañan desde hace años, siempre presentes para que no pierda el camino.

A Lu, Carli, y Vir que fueron y son un gran soporte para mí, me han escuchado hablar mil veces de lo mismo, han reído y llorado conmigo, siempre apoyándome y acompañándome. Las quiero mucho.

A mi tío Germán y mi abuela Felisa, que son luz en mi vida y una parte de mi corazón.

A mi mamá Blanca y mi papá Luis, que nunca me va a alcanzar la vida para agradecerles todo lo que han hecho y hacen por mí. Los amo con el alma.

Gracias de corazón a todes.

Macarena

Difusión de los resultados obtenidos

Los resultados de esta tesis forman parte de los siguientes trabajos publicados:

- Rojó M., Álvarez-Muñoz D., Dománico A., Foti. R., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D., Carriquiriborde P., 2019; Human pharmaceuticals in three major fish species from the Uruguay River (South America) with different feeding habits; Environmental Pollution, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.099>.
- Rojó M., Cristos D., González P., López-Aca V., Dománico A., Carriquiriborde P., 2021. "Accumulation of human pharmaceuticals in muscle, and biotransformation enzyme activities in the liver of fish from the Inner Rio de la Plata Estuary and the Lower Uruguay River". Chemosphere, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129012>

A su vez, los resultados han sido presentados en los siguientes congresos nacionales e internacionales:

- Rojó M., Cristos D., Dománico A., Carriquiriborde P., 2016; Productos farmacéuticos de uso humano en especies de peces de consumo en el Río Uruguay. Libro de resúmenes en VI Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental.
- Rojó M., Álvarez-Muñoz D., Dománico A., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D., Carriquiriborde P., 2016; Human pharmaceuticals in fillet of fish species of interest for consumption in the Uruguay River. Libro de Resúmenes en SETAC 7th World Congress/ SETAC North America 37th Annual Meeting.

- Rojó M., Cristos D., González P., López-Aca V., Dománico A., Carriquiriborde P., 2017; Muscle concentrations of human pharmaceuticals and hepatic EROD and BROD activity in fish from the Inner La Plata River and Lower Uruguay River. Libro de resúmenes en SETAC 12th Latin America Biennial Meeting.
- Rojó M., Cristos D., Dománico A., Carriquiriborde P., 2018; Fármacos humanos en peces del sector sur del Río de La Plata y el bajo Río Uruguay. Libro de resúmenes VII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental.
- Rojó M., Álvarez-Muñoz D., Dománico A., Bazzalo M., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D., Carriquiriborde P., 2018, Fármacos de uso humano en músculo de especies de peces del Río Uruguay con diferentes estrategias tróficas. Libro de resúmenes de las Jornadas sobre biodiversidad en el corredor del Río Uruguay.
- Rojó M., Cristos D., González P., López-Aca V., Dománico A., Carriquiriborde P., 2019; Relationship between concentrations of human pharmaceuticals in muscle and EROD and BROD hepatic activity in fish from the inner Rio de la Plata estuary and Lower Uruguay River. Libro de Resúmenes del Young Environmental Scientists Meeting (YES) 2019.
- Rojó M., Cristos D., Carriquiriborde P., 2019; Bioconcentración y eliminación del sildenafil en peces en condiciones de laboratorio. Libro de resúmenes del XXI Congreso Argentino de Toxicología.
- Rojó M., Cristos D., Carriquiriborde P., 2020; Bioaccumulation of carbamazepine, enalapril and sildenafil in fish under laboratory conditions. Libro de resúmenes del Young Environmental Scientists Meeting (YES) 2020.

Premios

En el transcurso de la presente tesis, se obtuvieron los siguientes premios para participación en congresos internacionales:

- “Student award”, SETAC Latin America 12th Biennial Meeting. Santos, Brasil. Septiembre 2017.
- “Student Travel Award”- 8vo Young Environmental Scientist Meeting (YES)/SETAC. Gante, Bélgica. Febrero 2019

Becas obtenidas

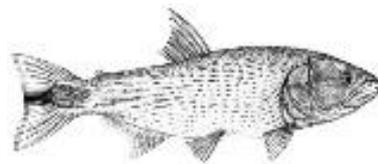
- Estadía de investigación doctoral. Instituto Catalán de Investigación del Agua (ICRA)/ Gerona, España. (Marzo 2016 - Mayo 2016)
- Beca doctoral. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Centro de Investigaciones del Medioambiente (CIM), CONICET/UNLP. (Abril 2016-Abril 2021).

Financiamiento recibido para el desarrollo de las investigaciones

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) PIP2012-2014-0090 y PIP 2014-0090
- Agencia Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (ANPCyT) PICT 2014-1690 y PICT (2018-2737)
- Las instalaciones científicas del Instituto Catalán de Investigación del Agua (ICRA) han sido cofinanciadas por el Ministerio de Economía y Competitividad de España (MINECO) y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional,

(FEDER) en el marco del Programa Operativo FEDER de Cataluña 2007 y 2013. Este trabajo ha contado con el apoyo parcial de la Generalitat de Catalunya (Grupo de Investigación Consolidado: Instituto Catalán de Investigaciones del Agua 2014 SGR 291). A su vez también se contó con el apoyo del programa Ramón y Cajal (RYC-2014-16707), S. Rodríguez-Mozaz, y el apoyo del proyecto XENOMETABOLOMIC (CTM2015-73179-JIN) (AEI/FEDER/UE), Diana Álvarez-Muñoz.

Introducción general



Contaminantes emergentes y dinámica ambiental

El incremento de la población humana, su estilo de vida y los fenómenos de globalización han contribuido a la contaminación del medio ambiente. A principios del siglo XIX surgieron las primeras evidencias de que el **paradigma de la dilución**, que consideraba que el ambiente tenía una capacidad infinita de diluir los contaminantes que el ser humano generaba, era erróneo. En particular, a partir de la década del '60 comenzaron consolidarse los primeros estudios científicos que demostraban que las sustancias que el hombre utilizaba y liberaba al ambiente retornaban en contra, causando daño no sólo a su salud sino también a el medio ambiente, dando paso así al **paradigma del boomerang** (Newman, 2015). En tal sentido, la icónica publicación de la autora norteamericana Raquel Carson, *Silent Spring*, puso de manifiesto por primera vez en la opinión pública, los efectos adversos del plaguicida organoclorado DDT y su principal metabolito de degradación el DDE, sobre especies de animales silvestres, generando conciencia sobre los problemas que el ser humano podía infligir a la naturaleza. Durante el período 1960-1980 comenzó a hacerse notoria la presencia de metales y compuestos organometálicos, trihalometanos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, por sus siglas en inglés) y plaguicidas (DDT y metabolitos) en el medio ambiente. Luego entre 1980-1990 la atención se centró en las dioxinas (como la 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, TCDD), los cuales son compuestos sintéticos, que también pueden generarse durante el proceso de síntesis de plaguicidas organoclorados, metabolitos de los detergentes, y una gama de agroquímicos.

Gracias a las nuevas tecnologías y los avances científicos, se ha podido determinar la presencia de ciertos contaminantes no considerados como tales hasta el momento. En tal sentido, se define a un **contaminante de preocupación emergente (CPEs)** como una sustancia química natural o sintética, o a un microorganismo, que no ha

sido históricamente considerado en la legislación y/o planes de monitoreo ambiental pero que es capaz de ingresar al ambiente y representar una amenaza potencial o real para la salud humana o el medio ambiente. En algunos casos, su presencia en el ambiente puede haber ocurrido durante un largo tiempo, pero puede no haber sido reconocida hasta que se desarrollaron nuevos métodos para su detección. En otros, puede tratarse de la síntesis de nuevas sustancias, cambios de uso o disposición final de sustancias preexistentes que generan nuevas fuentes de ingreso al ambiente y/o exposición para los seres humanos (USEPA, 2012). Así, entre 1990-2000 se comenzaron a detectar y considerar como CPEs a los fármacos, disruptores endocrinos, retardantes de llama y solventes, polibromo difenil éteres y derivados del ácido perfluorooctanóico (teflón). Más recientemente, entre el 2000 y 2010 se enfocó la atención a productos de la desinfección de aguas como los trihalometanos (THMs, se su sigla en inglés), nuevos fármacos y sus metabolitos, drogas de abuso, productos de higiene personal y cosméticos, luego entre 2010 y 2013 se sumaron los microplásticos, nanopartículas y nuevos medicamentos. Es así que desde el 2013 hasta la actualidad, las investigaciones científicas se centran en nuevos productos que puedan tener impactos negativos sobre el ambiente (Marín Galvín, 2017).

Por lo tanto, los CPEs incluyen una amplia gama de compuestos, que van desde los productos farmacéuticos hasta aditivos de gasolina (Figura i.1.). Esta lista de compuestos está en constante crecimiento, actualmente más de 100 millones de sustancias químicas están registradas en el Chemical Abstracts Service (CAS) y alrededor de 4.000 compuestos nuevos se registran cada día (Dulio et al., 2018).

Según Gil (2012) la característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan poseer una vida media prolongada para causar efectos, debido a que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción

continua en el ambiente. Debido tales características sustancias tales como los fármacos han sido consideradas como contaminantes **pseudo-persistentes** (Daughton and Ternes, 1999). De esta característica deriva su peligrosidad, ya que estando permanentemente en el medio pueden ocasionar efectos adversos en organismos no-blanco, sin necesidad de poseer media a alta persistencia ambiental.

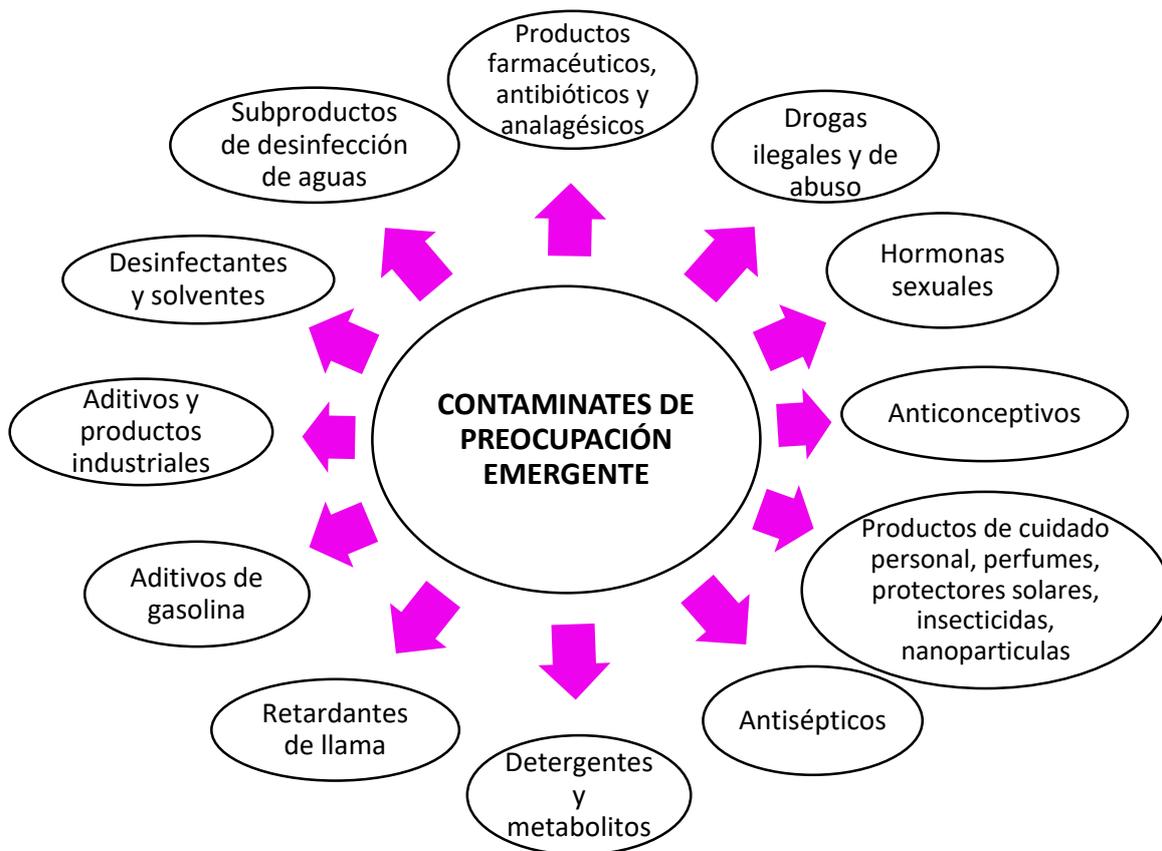


Figura i.1. Clases de CPEs

Una vez en el ambiente una sustancia puede desplegar su acción tóxica sobre los ecosistemas través tres fases (Figura i.2.), conocidas como las **tres P** de la toxicología: exPosición, Partición y Potencia (Rand, 1995). La fase de exposición

explica la distribución y destino de la sustancia en los diferentes compartimientos ambientales, así como su biodisponibilidad. La exposición depende no sólo de la lipofilicidad (K_{ow}), capacidad de ionización (pK_a) y volatilidad (constante de Henry), sino también de procesos de transporte, transferencia entre fases y transformación. La fase de partición dentro del organismo involucra mecanismos que establecen su incorporación, distribución interna, metabolización y eliminación, los cuales determinarán su nivel de acumulación en los tejidos (toxicocinética). Finalmente, una vez que los contaminantes alcanzan una determinada concentración interna, comienza la fase de potencia en la cual estos compuestos interactuarán con biomoléculas blanco desplegando sus modos de acción tóxica sobre los organismos (toxicodinamia). Cuando un contaminante ejerce efectos tóxicos, podrá causar de forma directa la muerte del organismo o desarrollar patologías que conduzcan a un menor desempeño a nivel reproductivo o de capacidad de supervivencia que repercuta sobre la capacidad adaptativa de la población, afectando a su vez su papel en el funcionamiento normal del ecosistema (Capó, 2007).

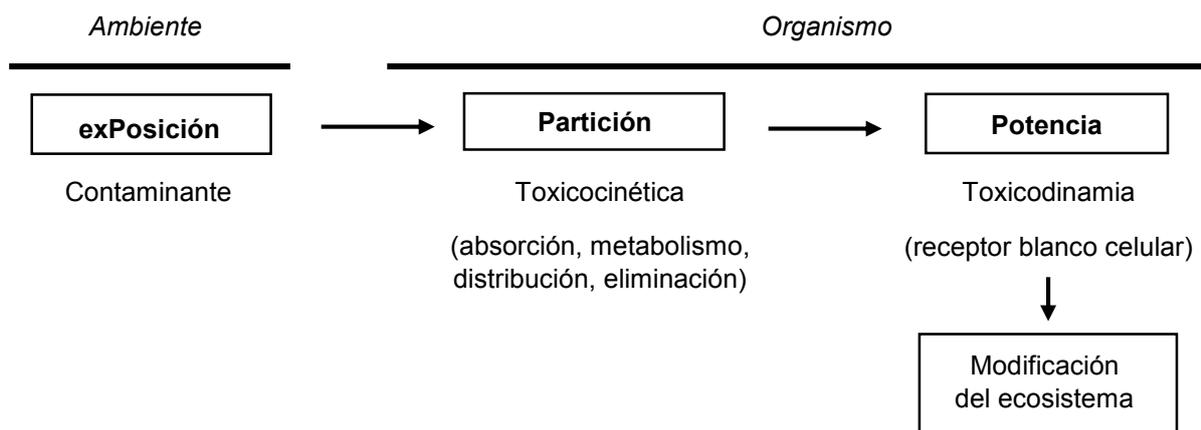


Figura i.2. Fases de acción tóxica de los contaminantes

En comparación con los contaminantes tradicionales, existe mucha menor información sobre el efecto que los CPEs pueden causar sobre la salud humana y en el ecosistema. Por ello, es de suma importancia el estudio de este tipo de compuestos vinculados al desarrollo de metodologías para su detección y monitoreo ambiental.

En un compartimiento biológico, como los peces, los contaminantes son capaces de alcanzar concentraciones que pueden ser varios órdenes de magnitud superior a las concentraciones de los mismos en el compartimiento abiótico que residen. Por lo tanto, la predicción del destino de los mismos en el medioambiente, es un punto de relevancia relacionado con la evaluación de la calidad del medio. Los estudios llevados a cabo relacionados con este tópico, utilizan una combinación de modelos predictivos, experimentos y luego validación en campo.

La bioacumulación es un proceso por el cual una sustancia química es incorporada por un organismo a través de todas las rutas de exposición, como ocurre en el medio ambiente, es decir, fuentes alimenticias, transporte a través de las superficies respiratorias y absorción dérmica (Figura i.3.). Es el resultado neto de procesos competitivos de incorporación de la sustancia por el organismo y su eliminación por distintas vías. En particular, el proceso de incorporación en peces puede darse ya sea mediante la superficie respiratoria, la dieta y en menor medida el tegumento. La eliminación se da a través de su expulsión del cuerpo mediante las heces y orina, o mediante la biotransformación metabólica del compuesto parental y la dilución del crecimiento¹.

¹ Se considera dilución del crecimiento a un proceso de pseudo-eliminación, ya que el exógeno no es realmente eliminado por el organismo sino que la concentración se puede diluir por un aumento en el volumen de tejido (Du et al., 2014)

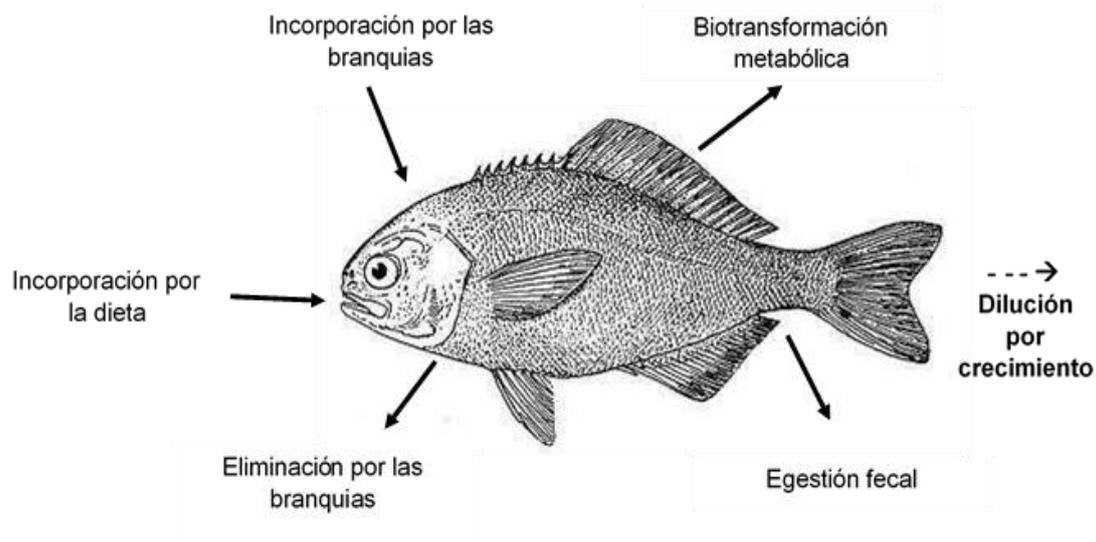


Figura i.3. Vías de ingreso y depuración de compuestos exógenos en peces

El grado en que se acumula una sustancia en el organismo respecto al medio está definido por el Factor de Bioacumulación (BAF, de sus siglas en inglés). Por otro lado, la bioconcentración es el proceso por el cual una sustancia es absorbida por un organismo desde el agua alcanzando el equilibrio, en el caso particular de los peces se considera la absorción a través de las branquias y posibles vías dérmicas, excluyendo la exposición a través de la dieta. Se expresa como el Factor de Bioconcentración (BCF, de sus siglas en inglés). En cuanto a la biomagnificación, se refiere a la propagación sucesiva de la bioacumulación de una sustancia a través de los diferentes eslabones que participan a lo largo de la cadena trófica. Se expresa mediante un Factor de Biomagnificación (BMF, de sus siglas en inglés) y es definido como la relación de la concentración de una sustancia en un organismo respecto a la de su dieta. Por último, el Factor de Acumulación de Biota Sedimentos (BSAF, de sus siglas en inglés) es la relación entre la concentración química en un organismo y la concentración química en el sedimento (Arnot and Gobas, 2006).

El potencial de bioconcentración y bioacumulación de los compuestos químicos orgánicos es comparado con el coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}) (Arnot and Gobas, 2006). En general se admite que las sustancias con un logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) superiores o igual a tres, tienen el potencial para acumularse en los tejidos biológicos. Sin embargo, al considerar la bioacumulación de productos farmacéuticos en los organismos acuáticos, hay que tener en cuenta otros factores en consideración, como el grado de ionización que depende del pH del medio, las diferentes tasas de metabolización en diversos organismos, el comportamiento de acumulación de los metabolitos, y la cinética de captación/depuración, entre otras cosas. En tal sentido, cabe resaltar que la ionización de la mayoría de los fármacos es pH dependiente y que ello tiene una estrecha relación con los transportadores de membranas celulares a través de los que son captados o eliminados del cuerpo. Nichols et al. (2015) demuestran claramente la importancia de este aspecto en un estudio donde determinan que la incorporación de difenilhidramina es mayor, cuanto mayor es el pH del medio, al cual la molécula se encuentra ionizada.

Los fármacos como contaminantes ambientales

Los compuestos farmacéuticos son sustancias bioactivas sintéticas o naturales que se encuentran en los medicamentos. Incluyen una gran variedad de familias terapéuticas como: antibióticos, drogas psiquiátricas, alérgenos/antiinflamatorios, tranquilizantes, β bloqueantes y diuréticos, entre otros. Están diseñados para actuar sobre blancos moleculares específicos y prevenir o tratar enfermedades en los humanos y los animales (Huerta et al., 2012). Las vías de ingreso de los fármacos humanos al ambiente incluyen la eliminación inapropiada de medicamentos, los

efluentes hospitalarios, los lixiviados de rellenos sanitarios, los procesos industriales (de síntesis de estos compuestos) y los provenientes de los efluentes cloacales domiciliarios (Boxall et al., 2012a; Masoner et al., 2015; Scott et al., 2018). Mientras que las vías de ingreso de los fármacos veterinarios abarcan la avicultura, los lixiviados agrícolas, incluyendo los provenientes de lotes de engorde a corral y mataderos, la piscicultura, la reutilización de estiércol líquido (con/sin tratamiento previo), reutilización de camas de pollos en horticultura, entre otros. (Boxall et al., 2012a; Cha and Carlson, 2018; Perez et al., 2020).

Luego del consumo, una fracción de los productos farmacéuticos es metabolizada y excretada en forma parental o como metabolitos, en la orina, las heces o la bilis, dependiendo de la tasa de eliminación del compuesto en el organismo estudiado, variando su tasa de excreción (Donoho, 1984). Las plantas de tratamiento de efluentes cloacales, cuando existen, suelen ser ineficientes en la remoción de gran parte de estos compuestos. Es por estas razones que, a través de los efluentes cloacales, los mismos pueden alcanzar los cuerpos de agua superficial (Figura i.4.).

Por lo tanto, los ecosistemas acuáticos receptores de descargas de efluentes cloacales representan el mayor escenario de exposición a fármacos para una amplia variedad de organismos que van desde peces hasta larvas de insectos, así como plantas acuáticas y microorganismos (Brooks et al., 2005).

Debido a que los fármacos están diseñados particularmente para actuar en rutas metabólicas y moleculares específicas en humanos y animales, una de las principales preocupaciones en relación con su presencia en el ambiente, se debe a que estos (en su forma parental o en forma de metabolitos) sean biológicamente activos en los organismos no blanco, pudiendo inducir efectos no deseados sobre la biota (Huerta et al., 2012).

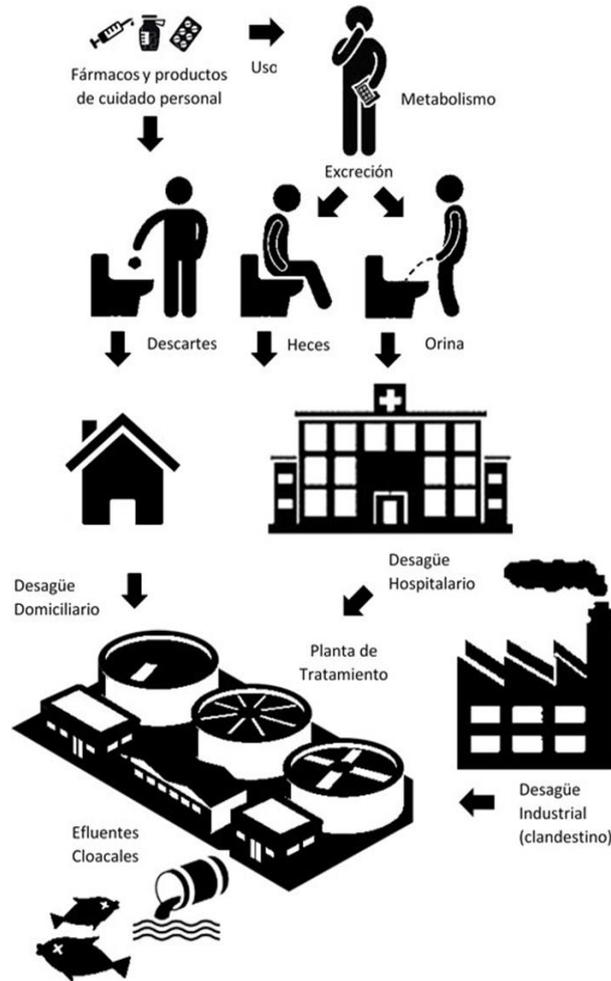


Figura i.4. Vías de ingreso de los fármacos humanos a los cuerpos de agua superficiales, (Carrquiriborde and Somoza, 2015)

El impacto de los fármacos en los organismos acuáticos puede ser evaluado tanto por su bioacumulación como por los efectos ecotoxicológicos (Huerta et al., 2012). En particular, los peces poseen un papel importante en los ecosistemas acuáticos, ya que conducen energía activamente a través de la cadena trófica, constituyen una forma de almacenamiento de energía dentro del ecosistema y son agentes de regulación energética. Debido a estas características y a su gran movilidad a través de los cuerpos de agua, son considerados uno de los organismos más susceptibles a la bioacumulación de fármacos en el medio acuático (Corcoran et al., 2010).

Existen estudios previos que han evidenciado la capacidad de los compuestos farmacéuticos de acumularse en los tejidos de peces. Uno de los primeros estudios que confirmaron la presencia de productos farmacéuticos en peces de agua dulce fue publicado por [Brooks et al. \(2005\)](#). El mismo informó sobre concentraciones máximas de hasta 30 ng g⁻¹ de fluoxetina, sertralina y sus metabolitos en tejido cerebral de tres especies de peces recolectadas en un arroyo receptor de efluentes cloacales situado en Texas (Estados Unidos). Luego, [Ramírez et al. \(2007\)](#) extendieron este estudio para una lista más amplia de productos farmacéuticos e informaron sobre la acumulación de difenhidramina, diltiazem y carbamazepina en los peces recogidos del mismo arroyo. Como resultado de ello, se llevó a cabo un estudio piloto a nivel nacional por la Oficina de Ciencia y Tecnología de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, su sigla en inglés) en conjunto con la empresa Tetra Tech y la Universidad de Baylor para el análisis de peces provenientes de cinco ríos en varias partes de Estados Unidos ([Ramírez et al., 2009](#)). Casi simultáneamente, un método de análisis desarrollado por [Chu and Metcalfe \(2007\)](#) se aplicó con éxito para el análisis de algunos medicamentos psiquiátricos en tejido de peces recogidos del puerto de Hamilton, una zona muy influenciada por la urbanización e industrialización del lago Ontario (Canadá). En el mismo, las concentraciones máximas de paroxetina, fluoxetina y norfluoxetina detectadas fueron alrededor de 1 ng g⁻¹ de peso húmedo. Otro estudio reciente confirmó la presencia de 17 α -etinilestradiol, un estrógeno sintético prescrito como anticonceptivo, a una concentración de 1-2 ng g⁻¹ en peces recolectados en campo cerca de una planta de tratamiento de aguas residuales en el río St. Clair, Canadá ([Al-Ansari et al., 2010](#)).

Los estudios realizados en Europa sobre la presencia de productos farmacéuticos en los organismos acuáticos han surgido principalmente de estudios de acuicultura y

control de alimentos estrechamente relacionados con el consumo y la regulación de la demanda humana. En un estudio realizado en Alemania, en el cual se analizaron 15 compuestos, se encontraron difenhidramina y n-desmetilsertralina (metabolito de la sertralina) en concentraciones en el rango de 0,07-3,28 ng g⁻¹, respectivamente (Subedi et al., 2011). Por otro lado, en un estudio realizado en España, dirigido específicamente al estudio de los niveles de fármacos en peces, Huerta et al. (2013) detectaron una gran variedad de compuestos farmacéuticos como: diclofenac, citalopram, carbamazepina, venlafaxina, clopidogrel, carazolol, propranolol, sotalol y salbutamol. Uno de los estudios realizado por Alvarez-Muñoz et al. (2015), demuestra que 10 de 20 compuestos farmacéuticos fueron detectados en muestras de peces provenientes de ríos de Portugal, España, Italia, Países Bajos y Noruega. Entre ellos se encontraron β -bloqueantes como: atenolol, carazolol, metoprolol, propranolol, sotalol; medicamentos psiquiátricos como: carbamazepina, citalopram y venlafaxina; el antiinflamatorio diclofenac y el diurético hidroclorotiazide.

Pese a la creciente evidencia a nivel internacional sobre la acumulación de los compuestos farmacéuticos en peces que viven en ambientes influenciados por descargas cloacales, existen escasos trabajos que informen sobre este aspecto para Latinoamérica o Argentina. Estudios pioneros realizados en Argentina, han detectado la presencia de fármacos como atenolol, cafeína, carbamazepina, diclofenac e ibuprofeno en diferentes ambientes acuáticos de la Cuenca del Plata en concentraciones que van desde los 0,55 a 13,32 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Elorriaga et al., 2013b). Luego, otro estudio realizado en la provincia de Córdoba (Argentina), demostró que el atenolol, la carbamazepina y el diclofenac son los compuestos con mayor frecuencia de detección encontrados en el Río Suquía, alcanzando niveles del orden de los $\mu\text{g l}^{-1}$ (Valdés et al., 2014). Adicionalmente, en un estudio posterior al inicio de esta tesis

se reportó la presencia de al menos 7 fármacos en especies de peces pequeños, *Gambusia affinis* y *Jenynsia multidentata*, provenientes del mismo río, en el rango de 1 a 67 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Valdés et al., 2016). Dentro de los trabajos más recientes se encuentra el de Ondarza et al. (2019), el cual ha demostrado la presencia de fármacos y drogas ilegales y sus metabolitos en músculo, hígado y branquias en múltiples especies de peces recolectados en el Río Paraná y Río Acaraguá.

La Cuenca del Plata y sus recursos pesqueros

La Cuenca del Río de la Plata (Figura i.5.) es una de las cuencas fluviales más grandes del mundo, cuenta con una superficie de 3.200.000 km². La misma está conformada por cuatro subcuencas principales, que son la de los ríos: Uruguay, Paraná, Paraguay y Río de la Plata. A su vez, abarca cinco países: Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay (Berbery and Barros, 2002).

Las pesquerías continentales de la Argentina tienen importancia significativa en términos económicos debido al volumen exportable de peces, y gran impacto social por su aporte a la seguridad alimentaria y a las economías familiares regionales. Más del 90% de la producción pesquera continental del país proviene de las pesquerías de esta cuenca. Por su dimensión, la Cuenca del Plata en Argentina reviste la mayor importancia en la pesca artesanal, ya que abarca sectores de 12 provincias y más de 4.000 km de cauces, considerando sólo los grandes ríos. Pueden distinguirse tres tipos de pesquerías: de subsistencia, comercial y deportiva. Las dos primeras son realizadas por “pescadores artesanales” para quienes la pesca no sólo proporciona su alimentación y fuente de trabajo, sino su forma de vida y cultura comunitaria; mientras que la última está asociada a la recreación y al turismo (MAyP, 2017).



Figura i.5. Cuenca del Plata. Recuperado de: Comité Intergubernamental Coordinador de los Países de la Cuenca del Plata (CIC) <https://comip.org.ar/la-cuenca-del-plata/>

El Río Uruguay es un curso de agua internacional y su cuenca hidrográfica se encuentra formando parte de los territorios de Argentina, Brasil y Uruguay abarcando un área total de aproximadamente 339.000 km². Tiene sus orígenes en la Sierra do Mar (Brasil), siendo su longitud de 1.800 km, hasta su desembocadura en el Río de La Plata. Su curso transcurre un 32% aproximadamente por territorio brasilero, un 38% forma parte del límite entre Argentina y Brasil y un 30% forma límite entre Argentina y Uruguay. Este último tramo, cuenta con una población mayor a 500.000 habitantes del lado argentino y mayor a 220.000 habitantes del lado uruguayo, y se

encuentra bajo administración de la Comisión Administradora del Río Uruguay (CARU) desde su fundación en 1975. Dicho río constituye un importante recurso hídrico cuyo potencial de desarrollo está aún en una etapa incipiente². En el mismo habitan más de 150 especies de peces, de las cuales las especies migratorias de gran importancia comercial y deportiva son: *Megaleporinus obtusidens* (boga), *Prochilodus lineatus* (sábalo), *Salminus brasiliensis* (dorado)³. De acuerdo con ello en el tramo inferior del río, la especie con mayor biomasa es *P. lineatus* (sábalo) cuya captura sustenta importantes pesquerías comerciales, ya sea para la exportación como para el consumo directo (Kroon et al., 2017). Según un informe del año 2017 del MAyP (Ministerio de Agroindustria y Pesca), el volumen anual exportado de esta especie osciló entre 10.000 y 18.000 T, desde el año 2007⁴.

El Río Uruguay es receptor de los efluentes cloacales sin tratamiento, de un gran número de ciudades de un tamaño poblacional considerable, que se encuentran sobre sus orillas tanto de la margen argentina como uruguaya. De esta manera, los compuestos farmacéuticos estarían ingresando al ambiente acuático y en consecuencia los peces podrían estar bioacumulando este tipo de contaminantes. Esta problemática podría tener influencia no sólo sobre la salud de los peces sino también sobre la actividad pesquera, ya que la calidad del producto se vería afectada debido a la presencia de residuos de tales contaminantes. La misma es de gran importancia para Argentina y los países limítrofes como Uruguay, con el que comparten una zona común de pesca en este sitio.

² Recuperado de: <https://www.caru.org.uy/web/institucional/subcomisiones/subcomision-tecnica-calidad-de-aguas-y-prevencion-de-la-contaminacion-ambiental/el-rio-uruguay/>

³ Peces del Río Uruguay, CARU/ Recuperado de: http://www.caru.org.uy/web/pdfs_publicaciones/Peces-del-Rio-Uruguay.pdf

⁴Recuperado de:

https://magyp.gob.ar/sitio/areas/promocion_consumo/informes_archivos/180221_Mercado%20Interno%20de%20la%20Pesca%20Continental.pdf

Biomarcadores y su relación con contaminantes ambientales

Los biomarcadores constituyen una herramienta de evaluación de efecto tóxico muy útil en los estudios de evaluación de riesgo toxicológico y ecotoxicológico. El término biomarcador se refiere a cambios fisiológicos, bioquímicos, histológicos y comportamentales, entre otros, que se pueden detectar como consecuencia del contacto con los xenobióticos, desde el organismo, población y ecosistema (efecto demoecológico) (Boudou and Ribeyre, 1997). Se distinguen tres tipos de biomarcadores: de exposición, de efecto y de susceptibilidad.

Un biomarcador de exposición se puede utilizar para confirmar y evaluar la exposición de individuos o poblaciones a un compuesto en particular, relacionando los niveles de exposición externa y los niveles internos (Van der Oost et al., 2003). Lo más habitual es que los biomarcadores de exposición a compuestos estables, como los metales, comprendan mediciones de las concentraciones del metal en muestras, como la sangre, el suero o la orina. En cambio, si el compuesto se metaboliza en el cuerpo, pueden elegirse uno o varios metabolitos como biomarcadores de la exposición; que suelen determinarse en muestras de orina (Medina, 2012). La bioacumulación de ciertos contaminantes ambientales persistentes en los tejidos animales también puede considerarse como un biomarcador de exposición a estas sustancias químicas (Van der Oost et al., 2003).

Además, las respuestas biológicas que se despliegan producto de la interacción específica con el contaminante (ej. mediadas por receptores moleculares específicos como el receptor arilo o el receptor de estrógenos), también se consideran biomarcadores de exposición (Medina, 2012).

Los biomarcadores de efecto abarcan las alteraciones bioquímicas, fisiológicas o de otro tipo, que se puedan detectar y medir dentro de los tejidos o fluidos corporales de un organismo, para vincularse de esta manera con una enfermedad o deterioro de la salud ([Van der Oost et al., 2003](#)). Dichos biomarcadores pueden ser específicos o no específicos. Los específicos son útiles porque indican un efecto biológico de una exposición concreta, por lo que aportan datos que pueden ser valiosos para identificar cual es el contaminante que los dispara. Los biomarcadores no específicos no indican una causa única del efecto, pero pueden reflejar el efecto total integrado debido a una exposición combinada ([Medina, 2012](#)).

En cambio, los biomarcadores de susceptibilidad, indican la capacidad inherente o adquirida de un organismo (factores genéticos y cambios en los receptores que alteran la susceptibilidad de un organismo a esa exposición), para responder frente a la exposición de una sustancia específica ([Van der Oost et al., 2003](#)).

Por otro lado, los biomarcadores de exposición son generalmente específicos o selectivos para los productos químicos a los que se está expuesto, mientras que los biomarcadores de efecto a menudo no son específicos. Por lo tanto, estos últimos tienen mayor potencial para reflejar las exposiciones a mezclas y las exposiciones secuenciales en el tiempo ([Van der Oost et al., 2003](#)).

Adicionalmente, los biomarcadores representan una herramienta importante en toxicología y ecotoxicología, ya que permiten la estimación del efecto sobre el tejido diana, consideran la variabilidad inter e intraindividual y constituyen indicadores sensibles de alteraciones, por lo que pueden ser útiles en estrategias diagnósticas y preventivas ([Magnarelli, 2015](#)).

En particular, el sistema de monooxigenasas múltiple es un complejo multienzimático cuya oxidasa final es una hemoproteína denominada citocromo P450 (CYP 450, de sus siglas en inglés). Este sistema se encuentra presente en diferentes tejidos como el riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos, placenta y otros, pero es particularmente activo en el hígado. Además de participar en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena como drogas, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, entre muchos otros, el CYP 450 participa en el metabolismo de sustratos endógenos de importancia biológica como el colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroidales y ácidos grasos. La gran gama de reacciones químicas catalizadas y la amplia especificidad de sustrato característico de estas enzimas, hacen del CYP 450 uno de los catalizadores más versátiles conocidos ([Orellana and Guajardo, 2004](#)).

Luego de que un xenobiótico ha ingresado en un organismo puede biotransformarse en compuestos polares, más solubles que se excreten rápidamente. Sin embargo, este proceso de biotransformación también puede cambiar la actividad biológica del xenobiotico y con ello el destino y actividad metabólica, potenciando su toxicidad y disminuyendo la excreción del compuesto ([Timbrell and Marrs, 2009](#)).

La biotransformación de compuestos exógenos se realiza en 2 fases: fase I y fase II, en las cuales se encuentran implicadas una gran variedad de reacciones ([Tabla i I](#)).

La fase I está catalizada por el grupo de enzimas CYP 450 y otras enzimas asociadas con el retículo endoplásmico liso (oxigenasas, enzimas que eliminan el oxígeno reducido, enzimas hidrolíticas y otros). Si los metabolitos de las reacciones de fase I son suficientemente solubles en agua, pueden excretarse fácilmente en este punto. En raras ocasiones, el metabolismo puede disminuir la solubilidad en agua y así reducir la excreción.

Tabla II. Principales reacciones de biotransformación de un xenobiótico

Fase I		Fase II
Oxidación	Aromática	Sulfatación
	Alifática	
	Heterocíclica	Glucuronidación
	Alicíclica	
	De nitrógeno	Conjugación con glutatión
	De sulfuros	
	N-hidroxilación	Acetilación
	Desalquilación	Conjugación de aminoácidos
Reducción	Azoica	Metilación
	Nitro	
Hidrólisis	Ester	
	Amida	
	Hidrazida	
	Carbamato	
Hidratación		
Deshalogenación		

Readaptado de: [Timbrell and Marrs \(2009\)](#).

En la mayoría de los casos, los metabolitos del sistema de fase I son sustrato de las enzimas del sistema de biotransformación de fase II. Dicha fase involucra la conjugación bioquímica, en la cual dichas enzimas unen pequeños restos químicos como el ácido glucurónico, el sulfato, la glicina y otros aminoácidos al xenobiótico. Las vías de la fase II, como la metilación y la acetilación, concluyen o atenúan la actividad biológica, mientras que la conjugación con glutatión (GSH) protege al cuerpo contra compuestos o metabolitos químicamente reactivos. Los productos de la fase II en ocasiones son solubles en agua, fácilmente excretables y habitualmente carecen de actividad farmacológica y toxicidad para el organismo ([Burkina et al., 2015](#)).

Las enzimas de biotransformación de fase I y II son usualmente empleadas como biomarcadores, aunque no son siempre específicas, ya que son sensibles a múltiples contaminantes y factores, como lo son la especie, el sexo, el tamaño, la edad, el tejido blanco y la estación de año ([Gagnon and Rawson, 2017](#)). Por lo tanto, la medición de un biomarcador de exposición único, no es suficiente y debe complementarse con una batería de biomarcadores ([Iturburu et al., 2018](#)).

Análisis de residuos de fármacos en tejidos de peces

Diferentes métodos de pretratamiento de muestras han sido utilizados para la extracción de fármacos en músculo de peces. Entre ellos pueden nombrarse: la Extracción por Ultrasonido (USO, de su sigla en inglés), la extracción por QuEChERS, (de su acrónimo en inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), la Extracción Líquida Presurizada (PLE, de su sigla en inglés) y el “Método del Extractor Rotatorio” desarrollado por ([Ramírez et al., 2007](#)).

La USO adaptada por [Schultz et al. \(2010\)](#) consiste en la utilización de una mezcla acuosa de ácido acético y metanol como solvente de extracción. Dicha extracción incluye ciclos de ultrasonicación. Luego de cada ciclo, el sobrenadante se recoge y se centrifuga. La segunda metodología nombrada es la de QuEChERS, que implica la extracción y purificación del extracto a microescala mediante extracción en fase sólida de dispersión (D-SPE).

La PLE utiliza disolventes orgánicos a altas presiones (500-3000 psi) y temperaturas por encima del punto de ebullición (50-200°C). El aumento de la temperatura acelera la extracción y la presión elevada mantiene al solvente debajo de su punto de ebullición, lo que permite una extracción rápida, segura y eficiente. Por otro lado, operando a presión elevada, el bombeo de disolvente a través de la matriz sólida es más fácil y eficiente ya que resulta en un contacto más cercano con los analitos ([Sarker, 2012](#)). La muestra sólida de 1 a 100 g se incorpora en un cartucho con un soporte sólido, el cual es atravesado por la mezcla de extracción, durante cortos períodos de tiempo. La extracción se completa en 15-25 min y consume entre 15-45 ml de disolvente. Se utiliza gas comprimido para purgar el extracto de muestra del cartucho en un recipiente de recolección ([Richter et al., 1996](#)). Esta metodología ha sido utilizada con éxito para la extracción de diversas clases de productos naturales, por ejemplo, alcaloides, compuestos fenólicos, esteroides, terpenoides y fármacos en organismos acuáticos, tales como: crustáceos, mejillones, algas y peces ([Chu and Metcalfe, 2007](#); [Huerta et al., 2013](#); [Subedi et al., 2011](#)).

Por otro lado, el **Método del Extractor Rotatorio** de [Ramírez et al. \(2007\)](#) consiste en la homogenización de la muestra empleando una mezcla de ácido acético/metanol (1:1), como solventes de extracción, su posterior agitación en un Extractor Rotatorio y finalmente su centrifugación a alta velocidad. El sobrenadante es analizado luego

por HPLC-MS. En su versión original, el método no incluye “clean-up”, lo que lo hace muy sencillo y ha demostrado recuperaciones mayores al 90% para la carbamazepina y el ibuprofeno.

Dado que las muestras de tejido suelen contener una gran cantidad de proteínas y una baja concentración de analitos de interés, el procedimiento de extracción requiere una alta eficiencia. Aun así, en ciertos casos es necesaria una nueva etapa de purificación (“clean-up”) posterior del extracto. Entre los métodos más utilizados se encuentran la extracción líquido-líquido con hexano para eliminar los lípidos y la extracción en fase sólida (SPE, de sus siglas en inglés) con cartuchos Oasis-HLB, alúmina o con Florisil® (Huerta et al., 2013).

La cromatografía líquida en tándem con detección espectrofotométrica, tales como la detección por arreglo de diodos, detección de absorbancia UV y fluorescencia, son metodologías de análisis que han sido tradicionalmente utilizadas para la detección de algunos fármacos en organismos acuáticos. Sin embargo, en los últimos años la mayoría de los métodos de análisis para la determinación de fármacos en biota se basan en cromatografía líquida (LC) o cromatografía gaseosa (GC) en combinación con espectrometría de masas (MS). La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas simple (LC-MS) o en tándem (LC-MS/MS) ha ganado gran popularidad en la última década debido a su compatibilidad con compuestos polares y no volátiles. En particular, la cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC) ha ido creciendo sobre la de alta eficiencia (HPLC) dado que la información proporcionada es mucho mayor que la HPLC, ya que tiene mayor velocidad, resolución y sensibilidad. También el tiempo de análisis y el disolvente utilizado en UPLC es menor que en todas las demás técnicas cromatográficas usadas (Ashok et al., 2012). Utiliza presiones de

40 MPa y mayores, y materiales de empaque de columnas con un tamaño de partícula de 2 μm ([Perez-Moral et al., 2018](#)).

Las interfaces más comunes que permiten acoplar la cromatografía líquida a la espectrometría de masas son la Ionización por Electropulverización (ESI, de sus siglas en ingles) y la Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI, de sus siglas en ingles). Sin embargo, la ESI ha sido utilizada preferentemente debido a que solamente unos pocos fármacos pueden ser ionizados eficientemente por APCI. La espectrometría de masas acoplada MS/MS proporciona una elevada selectividad, especificidad y sensibilidad requerida para este tipo de estudios. En los últimos años, la LC-MS/MS se ha vuelto el método de detección por excelencia debido a su confiabilidad en la identificación de los fármacos a niveles de hasta partes por trillón ([Huerta et al., 2012](#)).

Hipótesis y objetivo

En base a los antecedentes del tema expuesto anteriormente, se elaboraron las siguientes hipótesis:

Hipótesis General

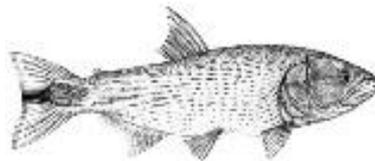
Los fármacos de uso humano que llegan a los ambientes acuáticos continentales a través de las descargas cloacales son acumulados por los peces de manera diferencial, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas y de las particularidades biológicas de cada especie, biomagnificándose a través de los niveles tróficos y representando un potencial riesgo para el consumo humano.

Objetivo general

Estudiar la bioacumulación de fármacos de uso humano, frecuentemente prescritos y de probada presencia en los ambientes acuáticos de la región, en peces de la Cuenca del Plata, relacionar tal fenómeno con las propiedades fisicoquímicas de las sustancias y con las características biológicas de las especies, evaluar si pueden biomagnificarse, y estimar el potencial riesgo para el consumo humano.

Capítulo I

Acumulación de fármacos humanos en músculo de peces



Sección I. Acumulación de fármacos humanos en peces del Río Uruguay

Introducción

Los fármacos humanos (FH) son sustancias bioactivas diseñadas para ser utilizadas en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades, y han contribuido significativamente al aumento de la calidad y esperanza de vida de los seres humanos. La industria farmacéutica proporciona una gran cantidad de estudios en animales y humanos durante el proceso de registro de estos compuestos, para minimizar posibles efectos adversos en la salud humana y el medio ambiente. Sin embargo, todavía existe preocupación por las posibles consecuencias que pueda tener la presencia de dichos productos en el medio ambiente.

El destino ambiental de los fármacos veterinarios y humanos después de las excreciones fecales y urinarias es distinto. Refiriéndonos a los medicamentos veterinarios, es más probable que contaminen directamente el suelo y las aguas subterráneas, para finalmente llegar a las aguas superficiales indirectamente a través de la escorrentía. En cuanto a los FH (y sus metabolitos), los mismos se descargan principalmente en las aguas residuales, ya que pasan a través de plantas de tratamiento de aguas residuales (cuando existen) y, si no se eliminan de manera eficiente, se descargan directamente en las aguas superficiales ([Khetan and Collins, 2007](#)). Otras vías de ingreso también son los efluentes de industrias de síntesis y los lixiviados de relleno sanitario ([Masoner et al., 2015](#); [Scott et al., 2018](#)). Es por ello que los riesgos ambientales de los FH se esperan principalmente en los ecosistemas acuáticos. Además, debido a su uso generalizado y al aporte continuo al medio

ambiente, se han clasificado como contaminantes "pseudopersistentes" ([Daughton and Ternes, 1999](#)).

Se han reportado concentraciones de diferentes fármacos que oscilan en el rango de ng/L a g/L en efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales ([Fent et al., 2006](#)). Además, se observan diferencias importantes en cuanto a la ocurrencia del tipo de fármaco y las concentraciones ambientales en diferentes regiones del mundo, debido a un patrón diferente de prescripción y uso, conectividad y tratamiento de aguas residuales y características ambientales del receptor ([Kookana et al., 2014](#)). Estudios previos realizados en Argentina han identificado que la carbamazepina, el atenolol, el diclofenac, el ibuprofeno y estrógenos se encuentran entre los FH más recetados y se han detectado de manera ubicua en aguas residuales y aguas superficiales ([Elorriaga et al., 2013a](#); [Elorriaga et al., 2013b](#); [Valdés et al., 2014](#)).

Desde el primer trabajo de [Brooks et al. \(2005\)](#), otros estudios han demostrado que los FH también pueden ser captados y acumulados por la biota acuática ([Huerta et al., 2012](#)) e incluso pueden ser absorbidos y bioacumulados diferencialmente por las plantas ([Keerthanan et al., 2020](#)). Por lo tanto, el estudio de los patrones de bioacumulación de los productos farmacéuticos se plantea como un tema de investigación prioritaria para comprender los efectos de los mismos en la salud del ecosistema ([Boxall et al., 2012a](#)). En particular, los peces son una de las comunidades más conspicuas en los ecosistemas acuáticos, ya que presentan diversas estrategias de vida y desempeñan funciones de regulación. Además, algunas especies tienen relevancia económica como la pesca deportiva o la pesca comercial ([Lynch et al., 2016](#)). La bioacumulación de productos farmacéuticos en los peces no sólo podría afectar a los organismos que están directamente expuestos a estas sustancias químicas, sino que también representa un riesgo para sus depredadores e incluso

para los humanos. Aunque la mayoría de los estudios anteriores parecen indicar que la biomagnificación de la mayoría de los productos farmacéuticos a través de la red trófica no es significativa, se ha observado una acumulación selectiva en especies de peces ([Arnnok et al., 2017](#); [Du et al., 2014](#)). Dentro de la región neotropical, solo unos pocos estudios han evaluado la acumulación de productos farmacéuticos en peces de ríos de Argentina. En la provincia de Córdoba, se identificó una gran cantidad de FH en muestreos estacionales de tres especies de peces pequeños a lo largo del Río Suquía, ([Valdés et al., 2016](#)). En particular, la evaluación a escala regional sobre la acumulación de FH en peces característicos de los principales ríos sudamericanos y su potencial biomagnificación a través de diferentes niveles tróficos de las comunidades de peces neotropicales, es un tema de estudio que está abordando de manera reciente. En comparación con América del Norte y Europa, los grandes ríos de América del Sur aún albergan una comunidad de peces muy diversa. Sin embargo, la falta de planificación y de ordenamiento territorial de los asentamientos urbanos, junto con deficiencias en los sistemas cloacales y el tratamiento de aguas residuales, amenazan su integridad biológica. El Río Uruguay es uno de los ríos más importantes (después del río Paraná-Paraguay) de la Cuenca del Río de La Plata, la segunda cuenca de drenaje más grande de América del Sur (después de la cuenca del Amazonas). Con una cuenca de drenaje de 365.000 km² y una longitud total de 1.838 km, el Río Uruguay comienza en el sur de Brasil, en la Serra do Mar, y desemboca en el Río de la Plata en Punta Gorda. La descarga promedio del mismo es de 5.500 m³/s y el sector inferior es parte de la frontera internacional entre Argentina y Brasil, y Argentina y Uruguay ([CARU, 1996](#)).

Ictio-geográficamente, el Río Uruguay pertenece a la Región Guayano-Brasileña, y más específicamente a la provincia Parano-Platense, y tiene una rica diversidad de

peces con más de 150 especies descritas (CARU, 1996). En particular, el sábalo (*Prochilodus lineatus*), la boga (*Megaleporinus obtusidens*) y el dorado (*Salminus brasiliensis*) son tres especies relevantes para el ecosistema del río, no sólo por su biomasa y su papel biológico, sino también por su relevancia para la pesca comercial, artesanal y deportiva. Además, dichas especies ocupan diferentes nichos tropicales; mientras que el sábalo es un pez detritívoro, la boga es omnívoro y el dorado piscívoro (Burress et al., 2013).

Por otro lado, varias ciudades de tamaño mediano (población superior a 10.000 personas) se están desarrollando rápidamente a lo largo del Río Uruguay y sus aguas residuales aún se descargan sin tratamiento o con tratamiento insuficiente, directamente al río. Es por ello que ha aumentado la preocupación respecto a los posibles impactos que los CPEs puedan tener sobre el ecosistema del río y los recursos vivos.

Hipótesis específicas

Los fármacos humanos se acumulan de forma diferencial en el tejido muscular de las especies sábalo, boga y dorado que habitan en el Río Uruguay.

Los FH se acumulan de forma diferencial dada las propiedades fisicoquímicas de los mismos, las características de las especies y los hábitos, las estaciones del año y las localidades.

Objetivos específicos

- Identificar cuáles de los 17 fármacos de uso humano seleccionados son capaces de bioacumularse a niveles detectables en las tres especies de peces del Río Uruguay estudiadas, determinando su frecuencia de detección y las concentraciones en el tejido muscular.
- Analizar los patrones de bioacumulación de cada fármaco en relación a sus pKa y K_{ow} y los diferentes hábitos alimenticios de las especies estudiadas, buscando posibles patrones de biomagnificación.
- Evaluar diferencias en la acumulación de FH en relación con las localidades de muestreo a lo largo de los 500 km del tramo compartido entre Argentina y Uruguay y con la estación del año.

Materiales y métodos

Sitios de muestreo y especies seleccionadas

El muestreo de los peces se realizó en el marco del Programa de Conservación de peces y pesca de la CARU (Comisión Administradora del Río Uruguay), durante otoño y primavera de 2016. Los muestreo incluyeron 8 localidades distribuidas a lo largo de aproximadamente 500 km a lo largo del Río Uruguay, bajo la jurisdicción de la CARU. De norte a sur, los lugares de muestreo fueron: 1) Bella Unión, 2) Mocoretá, 3) Arapey, 4) Puerto Yerúa, 5) Concepción del Uruguay, 6) Gualeguaychú, 7) San Salvador, y 8) Villa Paranacito ([Figura I.1.](#)).

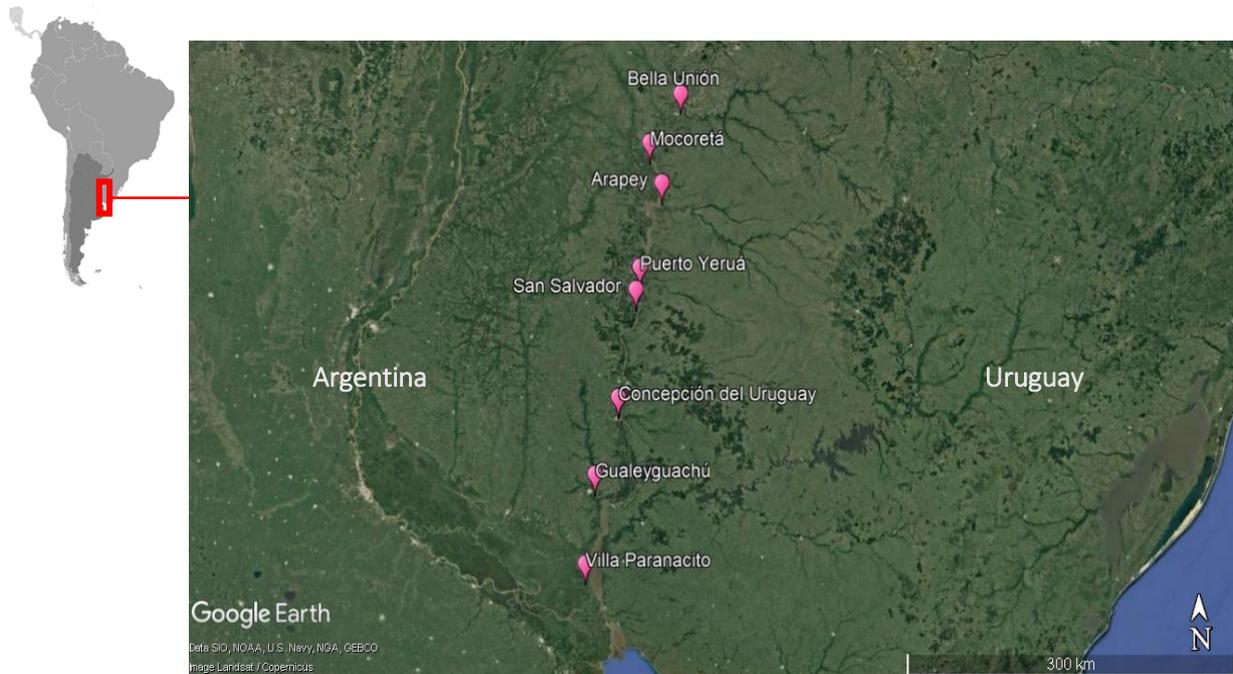


Figura I.1. Sitios de muestreo sobre el Río Uruguay

Las especies de peces estudiadas fueron seleccionadas en función de la factibilidad de su captura, relevancia pesquera e importancia para el consumo. Todas las especies seleccionadas pertenecen al grupo sistemático Characiformes, uno de los órdenes filogenéticas más representativas del río: i) sábalo (*Prochilodus lineatus*, Valenciennes, 1836). Talla Longitudinal (TL_{máx}): 40-60 cm, Peso máx (P_{máx}): 5-6 kg; ii) boga (*Megaleporinus obtusidens*, Valenciennes, 1847) TL_{máx}: 40-100 cm, P_{máx}: 9-10 kg, una de las especies más abundantes, muy apreciada para la pesca recreativa y deportiva, y iii) dorado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier, 1816) TL_{máx}: 130 cm, P_{máx}: 34 kg (Figura I.2.). Teniendo en cuenta el nivel trófico, se esperaría que *Salminus brasiliensis* al ser estrictamente piscívoro, se alimentara de las especies *Megaleporinus obtusidens*, que es omnívora y *Prochilodus lineatus*, que es detritívora. A su vez, la especie *Megaleporinus obtusidens* podría alimentarse de juveniles de la especie *Prochilodus lineatus*. Los peces fueron capturados utilizando diferentes artes de pesca: redes de enmalle, arrastre y espinel. Las redes de enmalle se colocaron

durante la noche y se recogieron en las primeras horas de la mañana siguiente. Luego los ejemplares capturados, se mantuvieron en hielo hasta llegar al sitio de campaña y se procesaron rápidamente. Los músculos dorsales de ambos flancos se disecaron (quitando la piel) con instrumentos de acero inoxidable, se envolvieron por separado en papel de aluminio y se etiquetaron respectivamente. Finalmente se colocaron en bolsas de polietileno de grado alimenticio y se almacenaron a -20°C, hasta su traslado al laboratorio, donde se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento. La totalidad del procedimiento realizado en campo se realizó bajo la Guía de campo ilustrada para la evaluación externa e interna de anomalías en peces, del Servicio Geológico de los Estados Unidos (USGS, por sus siglas en inglés) (USGS, 2002). El total de muestras recolectadas y procesadas en las dos campañas fue de 94: *M. obtusidens* = 34, *S. brasiliensis* = 32 y *P. lineatus* = 32 (Tabla suplementaria 1). Debido a limitaciones logísticas, las localidades de muestreo no fueron exactamente las mismas en las dos campañas, pero los sitios alternativos fueron representativos del mismo sector del río. Las localidades muestreadas en la campaña de otoño fueron: Bella Unión, Arapey, Puerto Yerúa, San Salvador y Villa Paranacito 1. Mientras que durante la campaña de primavera se recolectaron peces de Mocoetá, Gualaguaychú, Concepción del Uruguay y Villa Paranacito 2.



Figura I.2. Programa de “Conservación de Peces y Pesca” de la CARU

Estándares y reactivos

La selección de los FH que se analizaron en esta instancia estuvo limitada a compuestos de prescripción frecuente en Argentina y en España, que pudieran ser analizados mediante el método analítico puesto a punto y validado en el laboratorio del Instituto Catalán de Investigación del Agua (ICRA) (Girona, España) por [Huerta et al. \(2013\)](#). De acuerdo a ello, se analizaron 17 compuestos, seis β -bloqueantes: atenolol (ATE), carazolol (CAR), metoprolol (MET), nadolol (NAD), propranolol (PRO) y sotalol (SOT); cuatro psicofármacos: diazepam (DIA), lorazepam (LOR), venlafaxina (VEN) y carbamazepina (CBZ) incluido 2 de sus metabolitos: 10,11-epoxycarbamazepina (EPO-CBZ) y 2-hidroxicarbamazepina (OH-CBZ); un agente antiplaquetario: clopidogrel (CLO); una droga para tratar el asma salbutamol (SAL);

dos analgésicos/antiinflamatorios codeína (COD) y diclofenac (DIC); y un diurético: hidroclorotiazida (HCT). Todos los estándares de fármacos utilizados fueron de alto grado de pureza (> 95%) y se adquirieron de Sigma–Aldrich, excepto VEN, que fue comprada en Farmacopea Europea (EP) y MET obtenido de Farmacopea de los Estados Unidos (USP). Los metabolitos OH-CBZ y EPO-CBZ se adquirieron de “Toronto Research Chemicals” (TRC). Los isótopos marcados, utilizados como estándares internos, diazepam-d5, ronidazol-d3 y fluoxetina-d5 se adquirieron de Sigma-Aldrich. atenolol-d7, carbamazepina-d10, hidroclorotiazida-d2 y citalopram-d4 se adquirieron de la compañía “CDN Isotopes”. Venlafaxina-d6 se adquirió de TRC. Sulfadoxina-d3 y ketoprofeno-d3, que fueron utilizados como patrón sustituto, se adquirieron de la compañía “CDN Isotopes”. El metanol, diclorometano y acetonitrilo de calidad HPLC se compraron a Merck (Darmstadt, Alemania). Mientras que el agua de grado HPLC, se obtuvo del sistema de purificación Milli-Q® Advantage, adquirido de Millipore Ibérica S.A. (España).

Procesamiento de muestras y análisis químico

La extracción, purificación y análisis se realizó siguiendo la metodología analítica de [Huerta et al. \(2013\)](#). Las muestras de músculo de 3 a 5 peces de la misma especie, provenientes de los mismos sectores de muestreo y colectados en la misma estación, se agruparon y homogeneizaron a 12.000 rpm utilizando un triturador de acero inoxidable. Luego, 16 g de cada muestra compuesta se liofilizaron y se conservaron a -20°C. Posteriormente, a tres submuestras de 1 g de peso seco de las muestras compuestas (27 muestras) se les añadió un sobreagregado de una mezcla de isótopos marcados, conformada por atenolol-d7, carbamazepina-d10, hidroclorotiazida-d2, citalopram-d4 y venlafaxina-d6, a una concentración de 20 µg kg⁻¹

¹ y una mezcla de estándar sustituto de sulfadoxina-d3 y ketoprofeno-d3 a una concentración de 1 mg kg⁻¹.

La extracción de las muestras se realizó mediante Extracción Líquida Presurizada (PLE) utilizando un equipamiento ASE 350® (Thermo Scientific Dionex) (Figura 1.3.). Adicionalmente, se realizó una purificación de la muestra por Cromatografía de Permeación en Gel (GPC) utilizando un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) Agilent 1260 Infinity. Los extractos se analizaron en un equipo de Cromatografía Líquida Waters Acquity Ultra-Performance® (UPLC) acoplado a un espectrómetro de masas híbrido con trampa de iones y triple cuadrupolo-lineal SCIEX QTRAP® 5500 (Applied Biosystems). Para los analitos analizados por ionización por electropulverización positiva (PI, de sus siglas en inglés), la separación cromatográfica se realizó en una columna Acquity HSS T3 (50 mm x 2,1 mm d.i., tamaño de partícula de 1,8 µm) utilizando metanol y 10 Mm de ácido fórmico/formiato de amonio (pH 3,2) como fase móvil, a un caudal de 0,5 ml min⁻¹. Por otro lado, para los analitos en modo de ionización por electropulverización negativa (NI, de sus siglas en inglés), la separación cromatográfica se realizó en una columna Acquity BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., tamaño de partícula de 1,7 µm) utilizando acetonitrilo y acetato de amonio/amoniaco 5 Mm (pH=8) como fase móvil, a un caudal de 0,6 ml min⁻¹. En ambos casos, el volumen de inyección fue de 5 µl. Los parámetros utilizados para el espectrómetro de masas bajo PI fueron: gas de cortina (CUR, de sus siglas en inglés), 30 psi; gas de colisión (CAD, de sus siglas en inglés) nitrógeno; temperatura de la fuente (TEM, de sus siglas en inglés) 650 °C, voltaje de pulverización de iones 5500 V, gases de ionización GS1, 60 psi, y GS2, 50 psi. Para los compuestos analizados en NI los parámetros fueron: gas de cortina (CUR, de sus siglas en inglés) 30 psi; gas de colisión (CAD, de sus siglas en inglés) nitrógeno, temperatura de la fuente (TEM)

fue de 650 °C; el voltaje de pulverización de iones fue -3500 V; Los gases fuente de iones GS1 y GS2 se establecieron a 60 y 70 psi (Huerta et al., 2013).



Figura I.3. Equipamiento utilizado para PLE- ASE 350® (Thermo Scientific Dionex).

Se monitorearon dos transiciones de masas bajo el método de monitoreo de reacción simple (SRM, de sus siglas en inglés), la primera se utilizó para la cuantificación y la segunda para la confirmación de la identidad del compuesto. La abundancia relativa de las dos transiciones en la muestra también se comparó con la de los estándares internos marcados, encontrándose la misma dentro del 20% (Gros et al., 2012). Para asegurar la calidad del análisis al momento de realizar los cálculos de la eficiencia del método, la recuperación, el efecto matriz, el límite de detección y cuantificación del método, se utilizó la mezcla isótopos marcados como estándar interno. Además, a cada extracto se le adicionó estándares sustitutos de sulfadoxina-d3 y ketoprofeno-d3. Las curvas de calibración realizadas sobre los extractos de tejido, para suprimir el efecto matriz abarcaron los puntos de 0,1 a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Huerta et al., 2013).

El contenido de lípidos se determinó gravimétricamente después de ser removidos del extracto mediante GPC (Ondarza et al., 2011). El porcentaje de humedad se calculó a partir del peso de cada muestra compuesta antes y después de la liofilización. El mismo se utilizó para corregir los valores de concentración obtenidos en la cuantificación de los compuestos en las muestras liofilizadas de la siguiente manera: peso húmedo = (peso seco/% humedad) x 100. Las concentraciones se expresaron como $\mu\text{g kg}^{-1}$ (peso/húmedo).

Análisis de los resultados

Los FH analizados se agruparon en cuatro clases en función de su frecuencia de detección y concentración promedio. Clase I (concentraciones máximas $>1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (peso/húmedo) y frecuencias de detección $>50\%$), Clase II (concentraciones máximas $<1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (peso/húmedo) y Frecuencias de detección $> 50\%$), Clase III (concentraciones máximas $>1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (peso/húmedo) y Frecuencias de detección $< 50\%$) y Clase IV (concentraciones máximas $<1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (peso/húmedo) y frecuencias de detección $< 50\%$). Los datos se presentaron como la media \pm error estándar. En algunos casos, también se muestra la mediana. Para los valores por debajo del límite de detección del método (LDM) o dentro de este y el límite de cuantificación del método (LCM) se siguió el enfoque del "Método de sustitución simple" utilizando la aproximación $\text{LDM}/2$ y $(\text{LCM}+\text{LDM})/2$, respectivamente. La utilización de este método se centró en que al omitir los valores por debajo del límite de cuantificación y detección del método se estaría perdiendo información de las concentraciones que se encuentran por debajo de los mismos, generando un sesgo en la estimación de los valores y una pérdida de información valiosa de los mismos (Duval and Karlsson, 2002; Gilliom et al., 1984; Helsel and Hirsch, 1992)

La carga total de FH, expresada como FHT se utilizó como un estimador comparativo del grado de contaminación de cada muestra. Se calculó como la suma de las concentraciones medias detectadas, considerando solo aquellas que se encontraron por encima del LDM y los valores que se encontraron por debajo del LCM se sustituyeron por la aproximación $(LCM+LDM)/2$. Las contribuciones relativas de los FH detectados a la carga total de los productos farmacéuticos (FHT) (Figura 1.5) fueron calculadas como la relación entre la concentración media del fármaco sobre la sumatoria de concentraciones medias de todos los fármacos medidos (FHT), considerando los principales 3 fármacos que contribuyen con los FHT y agrupando al resto de los compuestos en la categoría de “Otros” (Tabla suplementaria 2).

Para probar las diferencias estadísticas entre especies, después de la transformación logarítmica de las concentraciones para la normalización, se utilizó el Análisis de Varianza de Una Vía (ANOVA). La normalidad y la homocedasticidad se probaron utilizando las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente, y las comparaciones “post hoc” se realizaron utilizando la prueba de la Diferencia Significativa Menor de Fisher (LSD). Mientras que para evaluar las diferencias estadísticas entre estaciones, se utilizó la prueba t de Student.

En el diagrama de dispersión de pKa frente a la acumulación, se graficó el valor de pKa de cada FH más cerca del pH promedio del río (7,2). Se utilizó el método de correlación de Pearson para evaluar la relación entre la acumulación de FH, $\log K_{ow}$ y pKa. En todos los casos, el valor crítico fue $\alpha \leq 0,05$. El promedio móvil, se utilizó para describir la variación de la concentración de FH en el músculo del pez con la latitud de la localidad de muestreo. El mismo se calculó como el promedio entre la concentración media de FH en el tejido del pez recolectado en la latitud “x” y la

concentración del FH en el tejido del pez recolectado en la latitud “x-1”, repitiendo el procedimiento para las subsiguientes latitudes ([Helsel and Hirsch, 2002](#)).

Resultados

Desempeño del método

El método demostró un desempeño adecuado para analizar los fármacos seleccionados en las especies estudiadas ([Tabla I.1](#)). Los porcentajes de recuperación estuvieron en el rango de 119%-26% para *P. lineatus*, 118%-16 % para *M. obtusidens* y 20%-92% para *S. brasiliensis*. Los LDM ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y LCM ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en *P. lineatus* se encontraron dentro del rango de 0,017-2,7 y 0,056-9,1 respectivamente, mientras que para *M. obtusidens* el rango fue de 0,030-2,1 y 0,10-6,9; finalmente en *S. brasiliensis* el rango fue de 0,019-2,5 y 0,063-8,5.

El contenido de lípidos medido fue $4,2 \pm 1,6\%$ para *M. obtusidens*, $2,6 \pm 0,6\%$ para *P. lineatus* y $1,0 \pm 0,3\%$ para *S. brasiliensis*. El mismo no se correlacionó con las recuperaciones obtenidas para cada especie, por lo tanto tampoco se establecieron relaciones entre los lípidos y los LDM y LCM y entre los lípidos y los niveles de concentración de los FH en el músculo.

Se consideran que otros factores además del contenido de lípidos explicarían las variaciones en el rendimiento del método.

Las recuperaciones para cada analito y los LDM y LCM se informaron por separado para cada especie, debido a las variaciones obtenidas entre las especies estudiadas ([Tabla I.1](#)).

Ocurrencia y concentraciones de FH estudiados

Se lograron estudiar 17 compuestos farmacéuticos, de los cuales fueron detectados 16 de ellos en el músculo de las especies de peces estudiadas: *M. obtusidens*, *S. brasiliensis*, y *P. lineatus*, siendo ATE y CBZ los más frecuentes (>50%), pero en concentraciones menores a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Por otro lado, otros compuestos detectados que van desde β -bloqueantes hasta psicofármacos se encontraron en concentraciones máximas en el rango de 1 a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, pero con una frecuencia de detección menor al 50% (Figura I.4 A).

La incidencia global (frecuencias y concentraciones) de los FH detectados en las especies de peces estudiadas provenientes del Río Uruguay, se encuentra resumida en la [Tabla suplementaria 2](#).

Las concentraciones medias y máximas de los FH oscilaron entre $0,083-1,82 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $0,15-10,2 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. En ambos casos, SOT y la OH-CBZ fueron los extremos inferior y superior. Las frecuencias para los FH detectados oscilaron entre el 4% para el CAR y el 92% para la CBZ. El DIC no fue detectado en ninguna muestra.

Tabla I.1. Resumen del rendimiento del método de Extracción Líquida Presurizada (PLE) para las diferentes especies estudiadas

	Ion precursor	Ion Producto	<i>Prochilodus lineatus</i>			<i>Megaleporinus obtusidens</i>			<i>Salminus brasiliensis</i>		
			Rec±DER	LDM	LCM	Rec±DER	LDM	LCM	Rec±DER	LDM	LCM
			%	($\mu\text{g kg}^{-1}$)		%	($\mu\text{g kg}^{-1}$)		%	($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
<i>β-bloqueantes</i>											
Atenolol	267 [M+H] ⁺	145	115 ± 10	0,034	0,11	73 ± 10	0,032	0,11	91 ± 12	0,031	0,10
Carazolol	299 [M+H] ⁺	116	26 ± 10	0,089	0,30	16 ± 4	0,13	0,42	25 ± 3	0,073	0,24
Metoprolol	268 [M+H] ⁺	133	104 ± 16	0,043	0,14	49 ± 10	0,18	0,60	46 ± 6	0,080	0,27
Nadolol	310 [M+H] ⁺	254	97 ± 7	0,048	0,16	50 ± 4	0,038	0,13	55 ± 5	0,026	0,087
Propranolol	260 [M+H] ⁺	116	26 ± 5	0,047	0,16	16 ± 4	0,097	0,32	34 ± 11	0,057	0,19
Sotalol	273 [M+H] ⁺	255	119 ± 10	0,017	0,056	63 ± 3	0,030	0,10	78 ± 8	0,024	0,08
<i>Agente antiplaquetario</i>											
Clopidogrel	322 [M+H] ⁺	212	27 ± 4	0,098	0,33	26 ± 6	0,11	0,37	41 ± 14	0,049	0,16
<i>Para tratar el asma</i>											
Salbutamol	240 [M+H] ⁺	148	114 ± 6	0,042	0,14	80 ± 7	0,086	0,29	92 ± 12	0,059	0,19
<i>Diurético</i>											
Hydrochlorothiazide	296 [M-H] ⁻	269	72 ± 7	0,063	0,21	64 ± 7	0,062	0,21	56 ± 7	0,072	0,239

Tabla I.1. (continuación). Resumen del rendimiento del método de Extracción Líquida Presurizada (PLE) para las diferentes especies estudiadas

	Ion precursor	Ion Producto	<i>Prochilodus lineatus</i>			<i>Megaleporinus obtusidens</i>			<i>Salminus brasiliensis</i>		
			Rec±DER	LDM	LCM	Rec±DER	LDM	LCM	Rec±DER	LDM	LCM
			%	(µg kg ⁻¹)		%	(µg kg ⁻¹)		%	(µg kg ⁻¹)	
<i>Analgésicos / antiinflamatorios</i>											
Codeína	300 [M+H] ⁺	152	40 ± 5	0,093	0,31	21 ± 3	0,13	0,43	36 ± 9	0,17	0,57
Diclofenac	294 [M-H] ⁻	250	50 ± 17	2,70	9,10	118 ± 15	2,1	6,9	76 ± 10	2,5	8,5
<i>Drogas psiquiátricas</i>											
Carbamazepina	237 [M+H] ⁺	194	110 ± 12	0,028	0,092	84 ± 8	0,053	0,18	77 ± 14	0,036	0,12
10,11-EpoxyCBZ	253 [M+H] ⁺	180	36 ± 7	0,073	0,24	20 ± 4	0,11	0,36	20 ± 6	0,050	0,17
2-HydroxyCBZ	253 [M+H] ⁺	210	52 ± 12	0,051	0,17	33 ± 4	0,074	0,25	31 ± 6	0,019	0,063
Diazepam	285 [M+H] ⁺	193	75 ± 7	0,024	0,08	61 ± 6	0,085	0,29	63 ± 11	0,035	0,12
Lorazepam	321 [M+H] ⁺	275	49 ± 8	0,10	0,35	43 ± 7	0,58	1,9	41 ± 6	0,33	1,1
Venlafaxina	278 [M+H] ⁺	58	88 ± 10	0,11	0,35	35 ± 2	0,38	1,25	41 ± 11	0,08	0,27

Las recuperaciones están expresadas como el porcentaje promedio y la desviación estándar relativa (DER) (n=3). LDM: Límite de Detección del Método, LCM: Límite de Cuantificación del Método.

De los FH estudiados, o sus metabolitos, ninguno estuvo dentro de la Clase I. Luego en la Clase II sólo CBZ y ATE estuvieron comprendidos en la misma, detectados frecuentemente pero siempre en concentraciones por debajo de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Mientras que solo una pequeña cantidad de los fármacos estudiados se encontraron en la Clase III (COD, VEN, PRO, MET, HCT y el metabolito de carbamazepina, OH-CBZ). Por otro lado, todos los demás compuestos farmacéuticos estudiados se encontraron dentro de la Clase IV, compuestos detectados con poca frecuencia y en concentraciones máximas por debajo de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura I.4 A).

Si bien los productos farmacéuticos estudiados poseen una amplia gama de coeficientes de partición octanol/agua ($\log K_{ow}$) y constantes de disociación ácida (pK_a), de $-0,58$ a $4,3$ y $2,9$ a $19,7$, respectivamente, no se encontraron relaciones significativas entre estas variables y el nivel de concentración medido (Figura I.4.B y C).

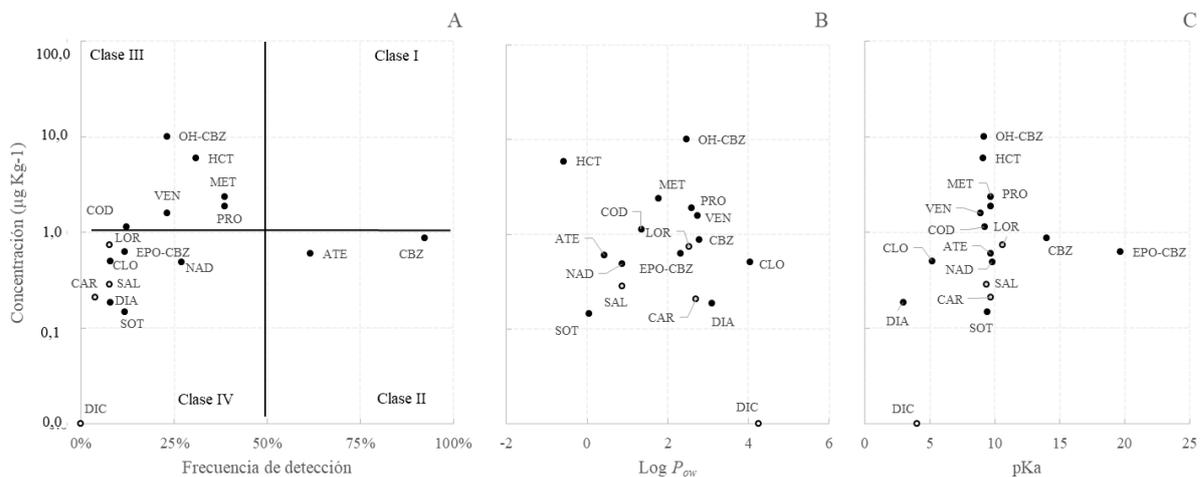


Figura I.4. Relaciones entre las concentraciones máximas ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso/húmedo) de los Fármacos Humanos (FH) medidos en el músculo de los peces del Río Uruguay y : A) la frecuencia de detección; B y C) sus propiedades fisicoquímicas

Relación entre el hábito trófico de las especies estudiadas y los patrones de acumulación de los fármacos analizados

Los patrones de acumulación de los FH analizados fueron diferentes en las especies de peces estudiadas del Río Uruguay. Esto se evidenció por el número, las frecuencias y las concentraciones medias y máximas de los FH estudiados en cada especie ([Tabla suplementaria 2](#)). El mayor número de FH detectados se encontró en *M. obtusidens* (13/17), seguido de *P. lineatus* (10/17) y *S. brasiliensis* (9/17). Algunos FH estuvieron presentes en todas las especies (ATE, CBZ, OH-CBZ, PRO, VEN y HCT), mientras que otros como EPO-CBZ y NAD sólo fueron comunes en dos de ellas, *M. obtusidens* y *P. lineatus*. De la misma manera MET y SOT sólo se detectaron en *M. obtusidens* y *S. brasiliensis*. Incluso algunos compuestos se encontraron exclusivamente en una sola especie. Por ejemplo, CLO, SOD y SAL sólo se detectaron en *M. obtusidens*, CAR y LOR en *P. lineatus*, y DIA en *S. brasiliensis*.

Además, las contribuciones relativas de los FH detectados a la carga total de fármacos (FHT) también fueron diferentes entre especies ([Figura I.5-Tabla Suplementaria 2](#)). Para las tres especies estudiadas, más de la mitad de los FHT sólo fue explicada por los tres FH más abundantes. Estos fueron OH-CBZ, CBZ y HCT en *P. lineatus*, MET, HCT y PRO en *M. obtusidens*, y MET, CBZ y VEN en *S. brasiliensis*. La contribución de los otros fármacos fue mucho menor debido a las bajas concentraciones detectadas.

En el caso particular de los metabolitos de la CBZ, autores como: [Álvarez-Muñoz et al. \(2015\)](#), [Moreno-González et al. \(2016\)](#) y [Valdés et al. \(2016\)](#), han informado que OH-CBZ y EPO-CBZ no se han encontrado simultáneamente en las muestras de tejido de las especies estudiadas de bivalvos y peces, coincidiendo con los resultados reportados en el presente estudio, en donde se puede observar que EPO-CBZ no se

ha detectado en *S. brasiliensis*. Sin embargo, a diferencia de los resultados reportados por los autores mencionados previamente, las concentraciones de estos metabolitos no siempre fueron más bajas que las del compuesto parental, como se puede observar en *P. lineatus*. Tampoco las concentraciones de OH-CBZ siempre fueron más altas que las concentraciones de CBZ-EP, como se observa en *M. obtusidens*, coincidiendo con el hecho de que la principal vía de metabolismo de la CBZ, es la conversión a CBZ-EP ([Thorn et al., 2011](#)). Estas diferencias encontradas entre las especies estudiadas y los resultados de los autores citados, se podrían explicar debido a las posibles diferencias entre las especies estudiadas y a la variabilidad presente entre los individuos de la de la misma especie, ya que para realizar las extracciones se tomaron muestras compuestas.

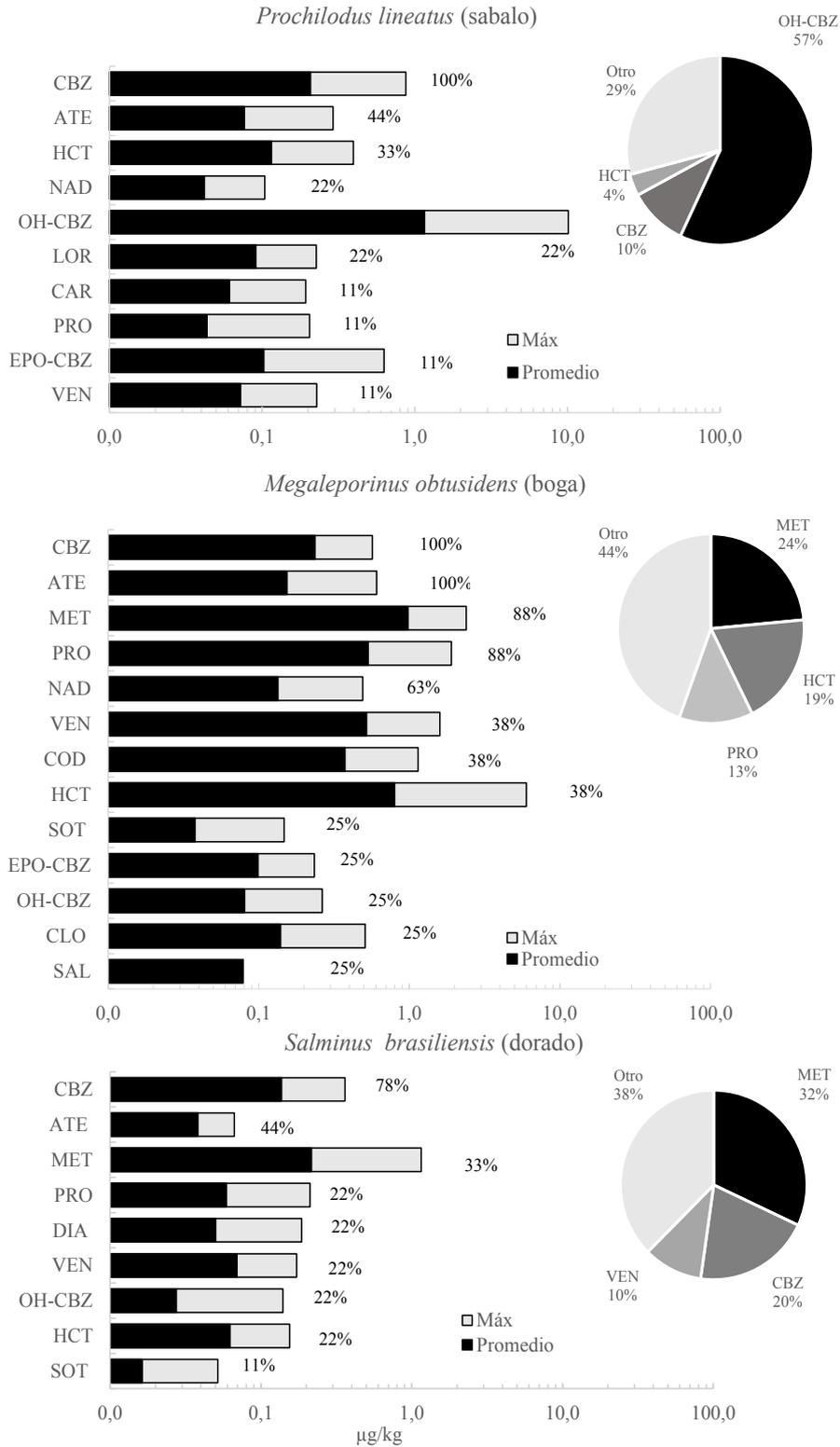


Figura I.5. Patrones característicos de acumulación de los Fármacos Humanos (FH) estudiados en el músculo de las especies de peces del Río Uruguay. Gráfico de barras: concentraciones máximas (en gris) y medias (en negro) como $\mu\text{g kg}^{-1}$ peso/húmedo (las muestras por debajo de los límites de detección o cuantificación se sustituyeron por $<LDM/2$ y $(LCM+LDM)/2$, respectivamente). $N=9$ para *P. lineatus* y *S. brasiliensis*, $N=8$ para *M. obtusidens*. Números al lado de cada barra: frecuencia de detección (%); Gráfico circular: contribución proporcional de cada FH a la carga total de FH (FHT) (%).

Debido a que CBZ y ATE son compuestos que se detectaron y cuantificaron en las 3 especies estudiadas, y que mostraron un patrón contundente de acumulación, se continuó su análisis comparativo. Cuando se comparó la concentración promedio de estos compuestos y de FHT entre las especies, se encontró que las concentraciones más altas se hallaban en *M. obtusidens*, seguido de *P. lineatus* y *S. brasiliensis* (Figura I.6). Los valores conjuntos sin tener en cuenta la estación (otoño, primavera), ni el sitio de muestreo, se muestran en la Tabla suplementaria 3. Los valores indican diferencias para FHT, CBZ y ATE, entre especies. Sin embargo, esas diferencias no fueron estadísticamente significativas debido a la gran dispersión de los valores entre las muestras.

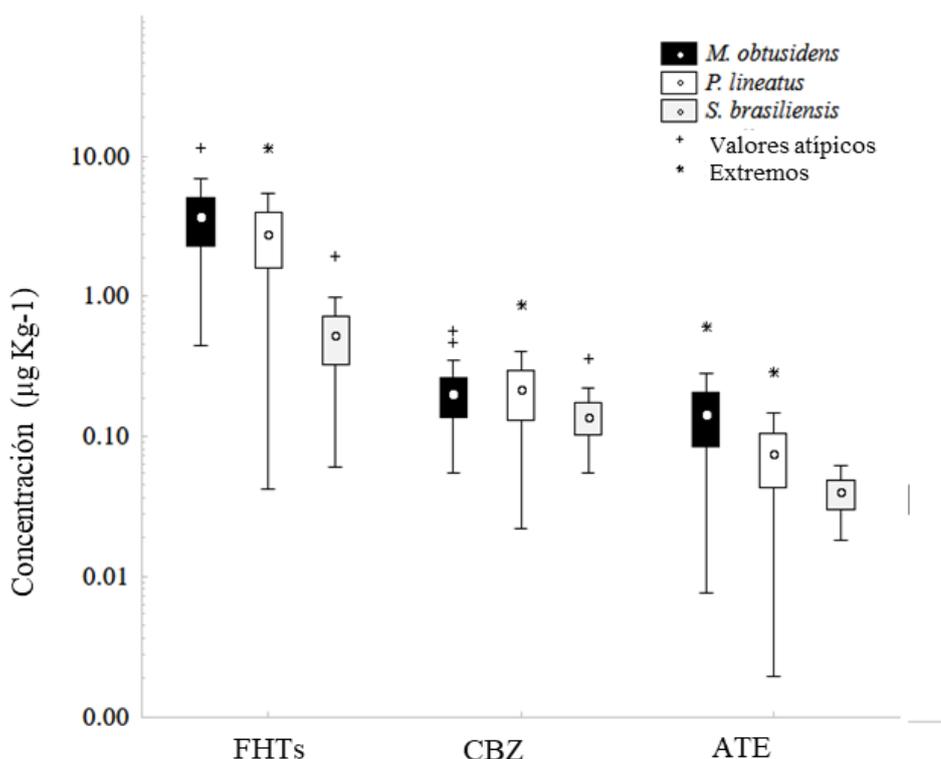


Figura I.6. Diferencias entre las concentraciones ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso/húmedo) de los FH y FHT más frecuentes en el músculo de las especies de peces estudiadas en el Río Uruguay. FH: Fármacos humanos, FHT: carga total de FH, CBZ: carbamazepina, ATE: atenolol.

Variaciones geográficas y estacionales de FH en especies de peces del Río Uruguay

Las concentraciones de los FH más frecuentes, CBZ y ATE, y la carga de FHT medida en el músculo de los peces recolectados en las diferentes localidades de muestreo a lo largo del Río Uruguay se muestran en la [Figura I.7](#). Se observaron diferencias claras para *M. obtusidens* a lo largo de los sitios de muestreo, mostrando concentraciones de CBZ, ATE, y FHT, más altas en el sector sur del río (río abajo), donde se encuentra la desembocadura en el estuario del Río de La Plata. El mismo patrón se observó en *P. lineatus* con respecto a las concentraciones de CBZ y ATE. En el caso de los FHT, también se encontraron valores más altos en el sector inferior, pero no en todos los sitios. Por otro lado, el patrón de acumulación en *S. brasiliensis* fue opuesto, presentando las concentraciones más altas de CBZ y FHT en el norte. Sin embargo, el gradiente geográfico no fue tan claro como el observado para *M. obtusidens* y *P. lineatus* en el sur ([Tabla suplementaria 4](#)).

Las variaciones estacionales en las concentraciones de FH estudiadas no fueron concluyentes y no hubo un factor general que afecte a todas las especies y sitios de la misma manera ([Tabla suplementaria 5](#)). Aunque se observaron valores más altos de FHT para *P. lineatus* y *S. brasiliensis* en primavera, las diferencias no fueron estadísticamente significativas y sería necesario un muestreo más detallado para comprender las variaciones estacionales.

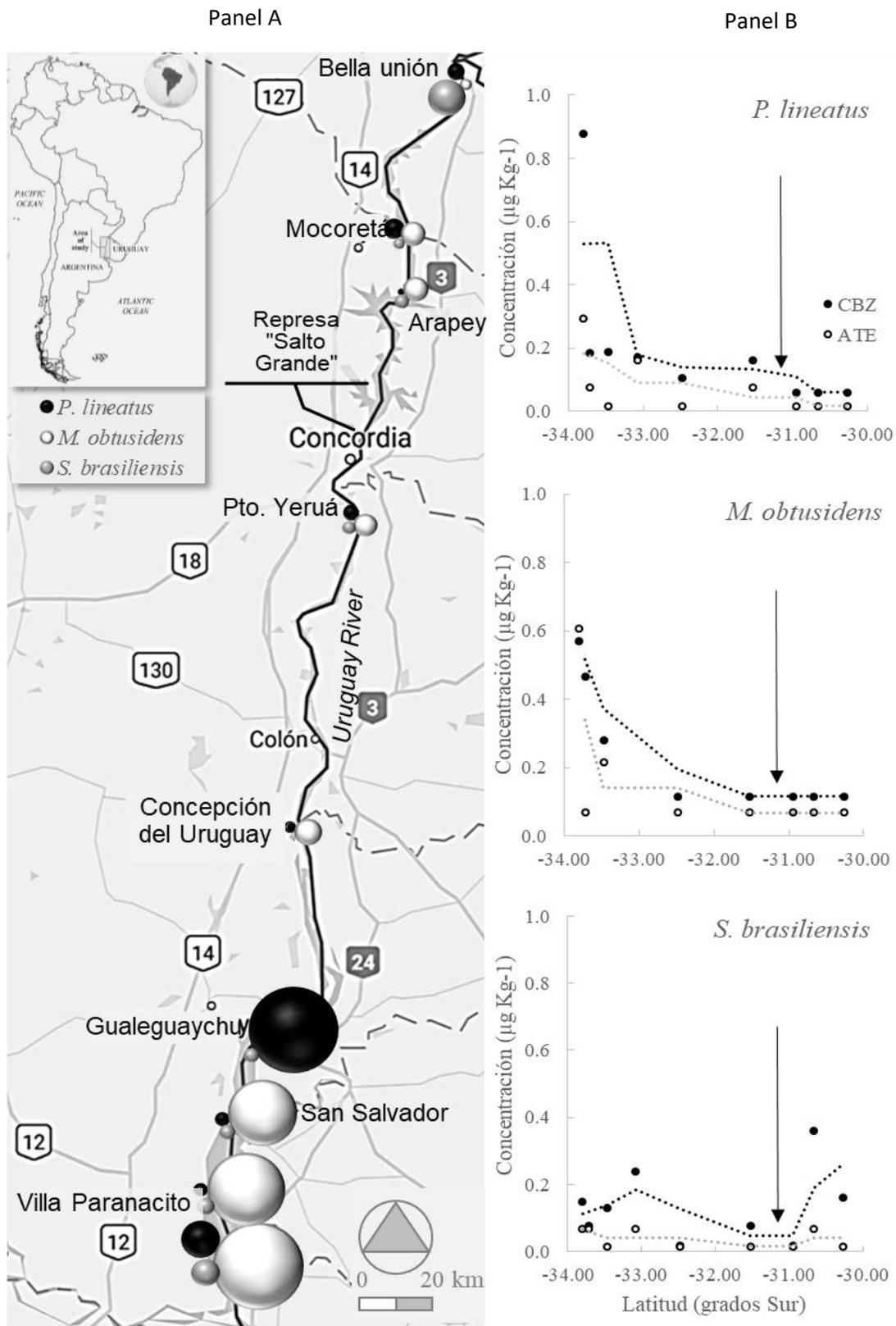


Figura 1.7. Variaciones geográficas de las concentraciones ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso húmedo) de carbamazepina, atenolol y FHTs en el músculo de las tres especies de peces estudiadas del Río Uruguay. Panel A: carga de fármacos humanos totales (FHT) medida en cada especie recolectada en cada sitio de muestreo, donde el color negro corresponde a *P. lineatus*, gris claro a *M. obtusidens*, y gris oscuro a *S. brasiliensis*, el tamaño de la burbuja es proporcional a la concentración de FHT. Panel B: variación de las concentraciones de carbamazepina (CBZ) y atenolol (ATE) con la latitud para las tres especies estudiadas, líneas de puntos: media móvil, flecha vertical: latitud correspondiente a la Represa de “Salto Grande”.

Discusión

Desempeño del método

El desempeño del método fue similar al reportado por [Huerta et al. \(2013\)](#), pero se obtuvieron algunas pequeñas diferencias en los límites de detección de algunos analitos en comparación con los obtenidos en el estudio anterior. A su vez, si bien se observaron ciertas diferencias en cuanto a los niveles de recuperación de cada compuesto, los rangos de valores obtenidos en este trabajo de tesis estuvieron dentro del mismo orden de magnitud que los reportados por [Huerta et al. \(2013\)](#) para las especies *Cyprinus carpio*, *Barbus graellsii* y *Silurus glanis*, los cuales estuvieron en el rango de 19,3–107,8%. En comparación con otras metodologías reportadas para la detección de FH en tejido, en el cual se reportan valores en el rango de 29-74 % (material suplementario de [Valdés et al. \(2016\)](#)) y en el rango de 33-110%, reportado en el material suplementario de [Arnnok et al. \(2017\)](#), los valores logrados con la metodología de PLE, se encontrarían cercanos a dichos valores.

Particularmente las recuperaciones promedio fueron significativamente más altas en *P. lineatus* que en *M. obtusidens* y *S. brasiliensis*, lo que indicaría diferencias en el rendimiento del método según las especies. Dicho resultado evidenciaría las limitaciones de las metodologías multiresiduos para compuestos orgánicos polares como los FH, en distintas matrices de tejido, ya que en comparación con las metodologías de extracción aplicadas a compuestos orgánicos no polares, las mismas mostrarían porcentajes de recuperación más elevados, demostrando que si bien en los últimos años ha habido avances en el desarrollo de metodologías analíticas para los FH en matrices ambientales, estas siguen siendo un desafío.

Ocurrencia y concentraciones de FH estudiados

La frecuencia y concentraciones de FH observada en el presente estudio ha sido diferente a la informada en estudios previos, en los cuales se utilizó la misma metodología analítica y se midieron los mismos compuestos. Ya sea comparando con pequeñas especies de peces recolectadas en la región central de Argentina (Valdés et al., 2016) o con especies de peces de ríos ibéricos en España o recolectados en ríos y arroyos de Estados Unidos (Huerta et al., 2013; Huerta et al., 2018). La comparación con otros estudios realizados en Alemania (Subedi et al., 2012) y Estados Unidos (Arnok et al., 2017; Ramirez et al., 2009) es más dificultosa, ya que los FH difieren de un estudio a otro. Sin embargo, es esperable que haya grandes variaciones entre las regiones del mismo país o entre diferentes países. Los factores que explican esta variabilidad son complejos y multicausales, pero los factores socioeconómicos (regulaciones, comercio, patrones de consumo, eliminación, tratamiento de aguas residuales, etc.) desempeñan un papel relevante (Kookana et al., 2014), además de los factores dependientes de cada especie, como los hábitos alimenticios y migratorios.

En particular, los compuestos que se encontraron dentro de la Clase III (COD, VEN, PRO, MET, HCT, deberían considerarse más propensos a acumularse en el músculo de los peces. Si bien este pequeño grupo de FH no se detectó con frecuencia elevada, son los únicos compuestos que se encontraron en concentraciones superiores a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, indicando que podrían estar presentes en el cuerpo de agua por ser los más consumidos por la población en los sectores estudiados. En particular para OH-CBZ, se ha reportado que la concentración del mismo en el tejido del pez *Liza aurata*, se detectó en el músculo, mientras que en el hígado no fue detectable, siendo el 95 % del compuesto parental (CBZ) metabolizado en el hígado (Thorn et al., 2011).

Indicando de esta manera que la incorporación de la CBZ por las branquias podría explicar los niveles de concentración del metabolito en el músculo. Esta incorporación estaría favorecida por el log K_{ow} , que al ser un valor medio, le permite tener suficiente solubilidad en agua y en lípidos, para incorporarse a las branquias y difundirse por las membranas celulares (Moreno-González et al., 2016).

Para la VEN, HCT y el metabolito de carbamazepina (OH-CBZ), se informaron concentraciones máximas por encima de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ también en peces de EE. UU (Huerta et al., 2018). Por otro lado, la CBZ y el ATE, fármacos que se han encontrado frecuentemente en aguas residuales y aguas superficiales de Argentina (Elorriaga et al., 2013a; Elorriaga et al., 2013b; Pérez et al., 2018; Valdés et al., 2014) han sido consistentemente clasificados dentro de la Clase II, ello es, fármacos que si bien se hallaron en concentraciones por debajo de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, fueron detectados en músculo con una frecuencia elevada.

Por otra parte, dada la falta de correlación entre la bioacumulación de cada fármaco y las propiedades fisicoquímicas consideradas, otros factores aparte del pKa y el K_{ow} , estarían impulsando la acumulación de los FH estudiados en las especies de peces del Río Uruguay.

Relación entre hábitos tróficos y patrones de acumulación

Estudios recientes, han mostrado que los patrones de acumulación de FH en peces son característicos para especies con diferentes estrategias de alimentación (Arnnok et al., 2017; Huerta et al., 2018). En el presente estudio, se esperaba que las concentraciones más altas y el mayor número de FH se encontraran en *P. lineatus*, ya que se ha demostrado que este pez detritívoro es atraído por la descargas de

aguas residuales para alimentarse y es capaz de acumular varios tipos de contaminantes, como hidrocarburos y PCB, que se encuentran con frecuencia en las descargas de aguas residuales del Área Metropolitana de Buenos Aires, Argentina (Colombo et al., 2007). Sin embargo, los resultados han demostrado que *M. obtusidens* ha sido la especie con mayor grado de contaminación en cuanto a la detección en músculo y a las concentraciones de FH. Este pez omnívoro tiene una alimentación muy variada, pero en las últimas décadas se ha incrementado cada vez más el consumo del mejillón exótico, *Limnoperna fortunei*. Este mejillón se ha convertido en un recurso de alimentación abundante en el Río Uruguay, ya que se introdujo accidentalmente en el Río de la Plata durante los años 90 (Penchaszadeh et al., 2000). Estudios recientes han demostrado que la transferencia trófica de FH por organismos bentónicos puede ser importante, dado que algunos de ellos suelen acumular este tipo de compuestos en mayor grado (Lagesson et al., 2016). En particular, se ha encontrado que los productos farmacéuticos son acumulados por los mejillones (Álvarez-Muñoz et al., 2015). Por lo tanto, la vía a través de *L. fortunei* podría ayudar a explicar los niveles más altos de FH que se encuentran en *M. obtusidens*. De acuerdo con el hábito de alimentación de esta especie, la captación de HCT a través de la vía bentónica mediante *L. fortunei* podría ser una vía de exposición importante. MET fue el compuesto más alto acumulado en *S. brasiliensis*, pero también fue importante en *M. obtusidens*. Dado que *S. brasiliensis* es estrictamente piscívoro y *M. obtusidens* omnívoro, la incorporación a través de peces pequeños e invertebrados podría explicar la vía de exposición para este fármaco. De manera diferente, la acumulación de CBZ y sus metabolitos fue más relevante en *P. lineatus*. Como se dijera, esta especie se alimenta con frecuencia en áreas ubicadas cerca de las descargas de aguas residuales, por lo tanto, la incorporación de esos

compuestos podría ocurrir directamente desde la fuente de exposición. En particular, CBZ y ATE han sido detectados en altas frecuencias de manera uniforme en las tres especies de peces. Teniendo en cuenta que estos FH se detectaron frecuentemente en aguas superficiales que reciben descargas de aguas residuales de diferentes regiones de Argentina ([Elorriaga et al., 2013b](#)), los resultados sugerirían que podrían ser incorporados directamente desde el agua.

Como se mencionó anteriormente, la transferencia trófica se ha propuesto como una vía importante que explicaría la exposición a los FH en el campo, y podría ayudar a comprender el patrón de acumulación encontrado para algunos FH estudiados en especies de peces del Río Uruguay. Sin embargo, no se observó un patrón de biomagnificación a través de la red trófica para ninguno de los FH estudiados, ya que las concentraciones en el depredador superior, *S. brasiliensis*, fueron siempre más bajas que en las especies omnívoras y detritívoras. Estos hallazgos coinciden con la ausencia de biomagnificación para fármacos reportada en cadenas tróficas de los lagos de China ([Xie et al., 2017](#)), o incluso más, la dilución trófica observada en ecosistemas dulceacuícolas de EE. UU ([Du et al., 2014](#); [Haddad et al., 2018](#)).

Variaciones geográficas y estacionales de FH en especies de peces del Río Uruguay

Las tres especies estudiadas son grandes peces migratorios de la Cuenca del Río de la Plata, y es de amplio conocimiento que se desplazan estacionalmente entre el Río Uruguay, el Río de la Plata y el Río Paraná. Aunque los datos sobre las concentraciones en agua de los FH estudiados no están disponibles aún para el Río Uruguay Inferior y a pesar de que el sector sur del Río Uruguay es un área

relativamente despoblada, las concentraciones más altas de FH encontradas en *P. lineatus* y *M. obtusidens* en el sector sur del Río Uruguay no fueron inesperados, dado que podrían explicarse por el comportamiento migratorio de los peces desde la región costera sur del Río de La Plata Interior. Esa zona es un área altamente impactada por acciones antrópicas y recibe las aguas residuales sin tratar de la mayor parte del Área Metropolitana de Buenos Aires. Ello es un hecho propicio para que *P. lineatus*, y probablemente otras especies, sean atraídas para alimentarse en las descargas cloacales. Previamente [Speranza et al. \(2012\)](#) describió un claro gradiente en la acumulación de hidrocarburos, alquilbencenos lineales, pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados en *P. lineatus*., cuyas concentraciones fueron disminuyendo desde la región costera sur del Río la Plata hasta el Río Paraná inferior (200 a 1000 km de Buenos Aires) y en los ríos Paraná y Paraguay superior (más de 1000 km de Buenos Aires).

El patrón observado en *S. brasiliensis*, pez depredador, indicaría un comportamiento alimentario o migratorio diferente.

Conclusiones parciales

En este capítulo se ha demostrado por primera vez para el Río Uruguay que:

- Los 17 fármacos de uso humano estudiados estarían alcanzando sus aguas y siendo bioacumulados a niveles detectables por los peces que en ellas habitan. Las frecuencias de detección y niveles de acumulación varían entre los fármacos hallándose algunos con frecuencias >50% pero concentraciones <1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, otros con concentraciones > 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pero frecuencias <50% y otros con frecuencias <50% y concentraciones <1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Sin embargo, ningún

fármaco presentó conjuntamente frecuencias >50% y concentraciones > 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Adicionalmente, ninguno de los FH evaluados superó los 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

- No se puede establecer una relación entre la concentración en el tejido y las propiedades fisicoquímicas de los FH seleccionados ($\log K_{ow}$ y pK_a), indicando que la diferencia en la bioacumulación observada para los diferentes fármacos se debería principalmente a otros factores.
- Los hábitos biológicos de los peces (ej. alimentación, comportamientos migratorios, etc.) serían factores importantes a la hora de explicar los patrones de acumulación de cada fármaco dado que el patrón de bioacumulación encontrado de los fármacos fue característico para cada especie. Por otra parte, no existiría biomagnificación a través de la red trófica del Río Uruguay para ninguno de los FH estudiados dado que el número de fármacos detectados y las concentraciones fueron siempre menores en la especie piscívora (*S. brasiliensis*) y mayores en la omnívora (*M. obtusidens*).
- Se observa una diferencia en la bioacumulación de FH en *M. obtusidens* y *P. lineatus* en relación a las localidades de muestreo, no para *S. brasiliensis*, siendo mayores las concentraciones en los peces colectados en el sector del río más cercano al estuario del Río de la Plata. Por otro lado, no existirían diferencias en la bioacumulación de los fármacos en relación a la estación del año.

Sección II. Acumulación de fármacos humanos en peces del bajo Río Uruguay y Río de la Plata

Introducción

Como ya se mencionó previamente, después de su administración, una fracción de los fármacos humanos se excreta en el estado original o como metabolitos a través de las excretas humanas. Las plantas de tratamiento de aguas residuales suelen ser ineficientes para la eliminación completa de la mayoría de estos compuestos. En consecuencia, las descargas de aguas residuales son una de las principales rutas de ingreso de estos compuestos a los cuerpos de agua superficiales ([Corcoran et al., 2010](#)). Además, debido a su introducción continua en los cuerpos de agua, son considerados contaminantes pseudopersistentes ([Daughton and Ternes, 1999](#)). Aunque la presencia de fármacos humanos en aguas superficiales se ha informado en todo el mundo, se han observado diferencias importantes entre los países, ya que presentan diferentes patrones de prescripción de los mismos, conectividad de alcantarillado y tratamiento de aguas residuales ([Kookana et al., 2014](#)). En Argentina, las plantas de tratamiento de aguas residuales suelen ser deficientes y las aguas residuales sin tratar se descargan con frecuencia en las aguas receptoras. Además, estudios previos han demostrado la presencia de fármacos humanos en los cuerpos de agua superficiales ([Elorriaga et al., 2013b](#); [Pérez et al., 2018](#); [Valdés et al., 2014](#)). Es de amplio conocimiento que la comunidad de peces juega un papel importante en los ecosistemas y algunas especies de peces son importantes recursos recreativos y alimentarios. Además, a medida que el ciclo de vida completo de los peces transcurre dentro del ambiente acuático, están permanentemente expuestos a contaminantes

presentes en el agua (Kime, 2001). Por lo tanto, son organismos útiles para evaluar la bioacumulación de contaminantes, el riesgo potencial para el ecosistema y la aptitud para el consumo humano. En particular, la capacidad de los peces para acumular compuestos farmacéuticos presentes en el ambiente se ha demostrado en todo el mundo (Brooks et al., 2005; Huerta et al., 2018; Tanoue et al., 2015). Sin embargo, se han informado diferencias importantes en las concentraciones de los mismos según los compuestos, las especies o las localidades de muestreo (Huerta et al., 2018).

Teniendo en cuenta el nivel trófico, *Prochilodus lineatus* es detritívoro, mientras que *Megaleporinus obtusidens* y *Pimelodus maculatus* son omnívoros, y *Salminus brasiliensis* es piscívoro. Además, *P. lineatus*, representa la mayor biomasa del ecosistema y *S. brasiliensis* es un depredador superior. *M. obtusidens* y *P. maculatus* son especies abundantes y presas de grandes depredadores como *S. brasiliensis*. Económicamente, la pesca comercial de *P. lineatus* es la más importante de la cuenca del Río de la Plata, mientras que *M. obtusidens* y *S. brasiliensis* son importantes para la pesca artesanal y recreativa, respectivamente.

En particular, en la Sección 1, se investigó la acumulación de 17 fármacos humanos (FH) en el músculo de tres especies de peces características de la "Cuenca del Plata" con diferentes hábitos alimenticios y de relevancia para consumo humano. Atenolol (ATE) y carbamazepina (CBZ) fueron los FH detectados con mayor frecuencia (> 50%), pero en concentraciones siempre inferiores a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso húmedo. Sin embargo, el nivel de bioacumulación de dos productos farmacéuticos altamente recetados en Argentina y previamente detectados en aguas superficiales (Pérez et al., 2018), enalapril (ENA) utilizado para tratar la presión arterial, y sildenafil (SIL) vasodilatador, aún se desconoce para la región. A pesar de que el SIL se usa

ampliamente en todo el mundo, hay poca información disponible internacionalmente sobre su bioacumulación en peces. El estudio anterior mostró un aumento significativo de las concentraciones de ATE, CBZ y FHT en peces capturados en localidades más cercanas a la desembocadura del Río Uruguay, un área relativamente despoblada.

El margen sur del estuario interior del Río de la Plata es un sector frente al Área Metropolitana de Buenos Aires que está altamente contaminado, ya que recibe las aguas residuales de la Ciudad de Buenos Aires y las descargas de varias corrientes costeras muy afectadas por las actividades urbanas e industriales (Colombo et al., 2005; Colombo et al., 2006; Colombo et al., 2018; Tatone et al., 2009). En base a los antecedentes previamente descritos, se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos específicos:

Hipótesis específica

Existe una mayor acumulación de FH (ATE, CBZ, ENA y SIL) en peces que habitan en el Río de La Plata Interior, en comparación con los que habitan en el Bajo Río Uruguay.

Estos FH, presentan una concentración diferencial entre especies pudiendo existir un patrón de biomagnificación.

Objetivos específicos

- Validar estrategias de pretratamiento de muestras en respuesta a la necesidad de buscar métodos alternativos a la PLE para laboratorios sin tanta complejidad y condiciones instrumentales para el análisis por HPLC-MS de diferentes familias de fármacos en músculo de peces.

- Estudiar la acumulación de ATE, CBZ, ENA y SIL en el músculo de 4 especies de peces pertenecientes a distintos niveles trófico y de interés comercial *M. obtusidens*, *P. lineatus*, *P. maculatus* y *S. brasiliensis*.
- Estudiar las variaciones geográficas en la acumulación de fármacos humanos en peces, comparando la región del Bajo Río Uruguay y el Río de la Plata.

Materiales y métodos

Sitios de muestreo y especies seleccionadas

En el otoño del 2016 se tomaron muestras de peces de dos áreas con diferente influencia urbana ([Figura I.8.](#)). Un área se encontró ubicada en el margen sur del Río de La Plata Interior frente al Área Metropolitana de Buenos Aires, región fuertemente influenciada por las principales descargas de aguas residuales de Buenos Aires y otros afluentes fuente de contaminación urbana. El otro área se encontró ubicada en el Bajo Río Uruguay, un área relativamente despoblada. El número de especímenes de cada especie recolectada en cada área, varió de 5 a 42, dependiendo de la factibilidad de captura.

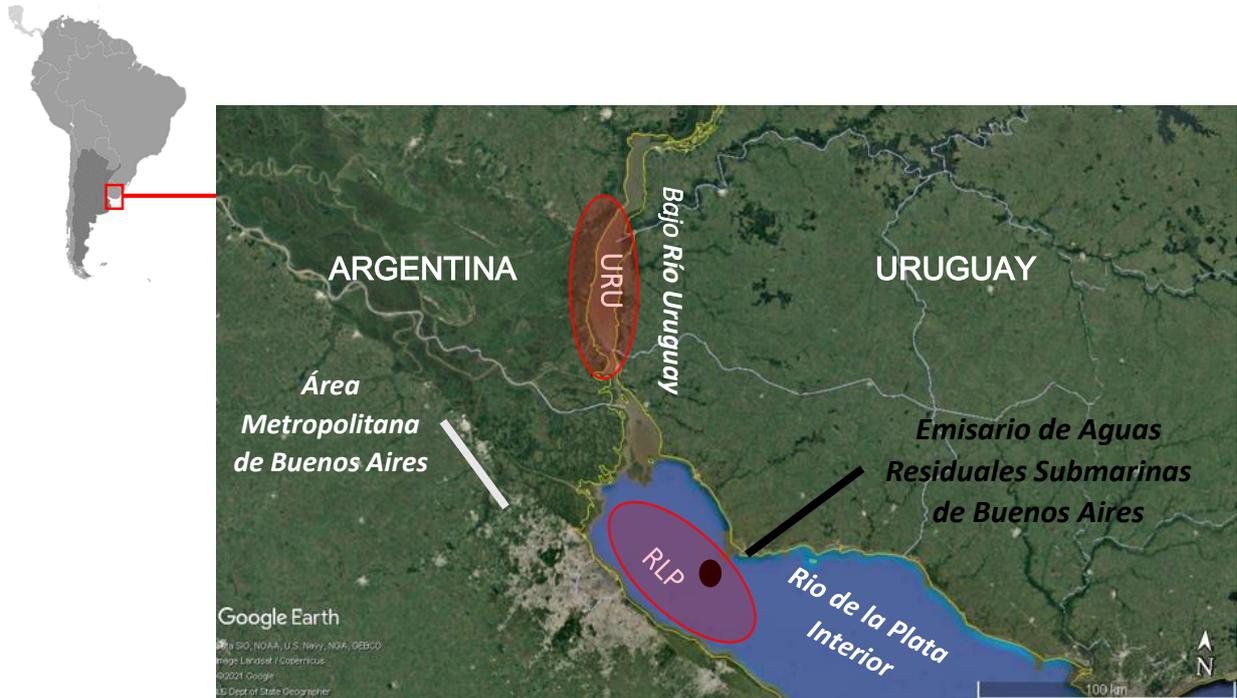


Figura I.8. Áreas de muestreo en el Bajo Río Uruguay y Río de la Plata Interior

Los peces fueron capturados con redes de enmalle, redes de arrastre y palangres. Fueron mantenidos y transportados en agua con hielo a la orilla e inmediatamente procesados. Se diseccionó el músculo dorsal, usando instrumentos de acero inoxidable. Los músculos de cada flanco se envolvieron por separado en papel aluminio, se colocaron en bolsas de polietileno de calidad alimentaria y se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento.

Los FH se seleccionaron en función de la prescripción, la presencia en efluentes de aguas residuales y cuerpos de agua de Argentina, y las capacidades analíticas. Los mismos fueron: atenolol (bloqueador β), carbamazepina (anticonvulsivo), enalapril (antihipertensivo) y sildenafil (vasodilatador). Las especies de peces fueron seleccionadas dependiendo de la relevancia ecológica, el rol en el ecosistema, el valor para el consumo y la factibilidad de captura. Las mismas fueron: *Pimelodus*

maculatus, *Megaleporinus obtusidens*, *Salminus brasiliensis* y *Prochilodus lineatus* (Figura I.9.).

Estándares y reactivos

Los estándares de los productos farmacéuticos, Parafarm® de alta pureza (90%), se obtuvieron de Saporiti, Argentina. Los patrones internos atenolol-d7 y 13C-15N carbamazepina se compraron de Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Las soluciones madre individuales se prepararon en metanol a una concentración de 1000 mg/L y se almacenaron a -20°C. La acetona, de grado analítico, se obtuvo de Cicarelli Co y el acetato de etilo de JT Baker®. El acetonitrilo y el metanol de grado HPLC utilizados para la fase móvil cromatográfica, fueron adquiridos de Carlo Erba. El formiato de amonio al 99% de pureza fue de Sigma-Aldrich y el ácido fórmico al 88% de pureza fue de Cicarelli Co.

Pimelodus maculatus (bagre amarillo), Lacepède (1803)



10 cm

Fotografía: Wilson S. Serra

Prochilodus lineatus (sábalo), Valenciennes (1837)



10 cm

Fotografía: Wilson S. Serra

Megaleporinus obtusidens (boga), Valenciennes (1837)



10 cm

Fotografía: Wilson S. Serra

Salminus brasiliensis (dorado), Cuvier (1816)



10 cm

Fotografía: Marcelo Loureiro

Figura I.9. Especies estudiadas

Procesamiento de muestras y análisis químico

Los FH se extrajeron utilizando el método desarrollado por [Ramírez et al. \(2007\)](#) con modificaciones menores. En cuanto a la validación del método, la misma se desarrolló utilizando como punto inicial los resultados obtenidos de [Rojo \(2016\)](#), realizado en el marco de trabajo final de la Licenciatura en Química y Tecnología Ambiental. En el mismo se comparó la eficiencia de extracción de las mezclas: i) acetato de etilo-metanol, ii) acetato de etilo-acetona, iii) acetona-metanol, iv) acetonitrilo-metanol, v) ácido acético-metanol. De las cuales, según los porcentajes de recuperación y reproducibilidad de los resultados, se optó por la mezcla **ii**; correspondiente a acetato de etilo-acetona. A partir de ello, se realizaron las consiguientes adaptaciones.

A las muestras de músculo dorsal (1 g) se le añadieron 100 µl de una solución mezcla de patrones internos de 100 µg/L y se dejaron reposar durante 1h. Luego se colocaron en tubos de vidrio de fondo redondo de 15 ml con 8 ml de acetato de etilo-acetona (50:50) y se homogeneizaron a 30.000 rpm con un homogeneizador Bio-Gen PRO200 (Pro-Scientific®). A continuación, los homogenatos se centrifugaron a 1.000 g durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga refrigerada Sigma® 3-16K y los sobrenadantes se transfirieron a tubos de vidrio cónicos de 15 ml ([Figura I.10.](#)). Los extractos se llevaron a sequedad bajo N₂ y se resuspendieron en 500 µl de metanol-acetonitrilo (50:50), se transfirieron a un vial cromatográfico y se almacenaron a -20°C hasta el análisis. Justo antes del análisis, se añadieron 500 µl de agua ultrapura a cada vial, los extractos se filtraron a través de un filtro de nylon de 0,22 µm en viales limpios para luego ser analizados por HPLC-MS.

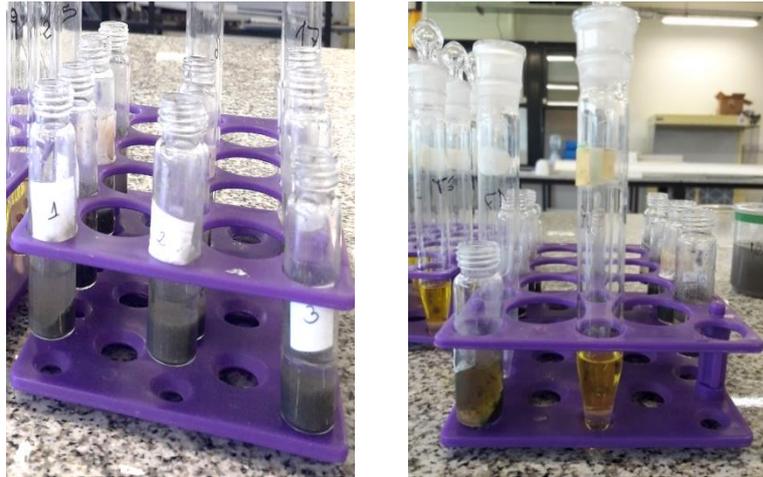


Figura I.10. Músculo homogeneizado con la mezcla de extracción

Las muestras fueron analizadas por HPLC-ESI-MS (ACQUITY®, Waters®). La separación cromatográfica se logró usando una columna Xselect CSH®/C18 (4,6 mm x 75 mm, tamaño de partícula de 3,5 μm), ejecutando un programa de elución en gradiente de 11 minutos a partir de 80:20 a 0:100 (acuoso:orgánico) a un flujo velocidad de 0,3 ml/min y 50°C. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 μl . La fase móvil fue ACN/MeOH (50:50) y agua ultrapura, con ácido fórmico (0,1%) y formiato de amonio (5 mM) como modificador en ambas fases. La ionización por electroaspersión se realizó en modo positivo y los parámetros de la fuente fueron: flujo de gas de cono 1,1 ml/s, flujo de gas de desolvatación de 193 ml/s, voltaje capilar de 3240 V, voltaje de cono de 35 V, temperatura de fuente de 148°C y temperatura de desolvatación de 350°C. Para la cuantificación de analitos y la confirmación de los iones seleccionados, se usó el monitoreo de ion seleccionado (SIM+, se sus siglas en inglés). Los límites de detección (LDM) y cuantificación (LCM) se expresaron como 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco reactivo. Para evitar los efectos de la matriz, la cuantificación se realizó mediante el Método de Adición Estándar (APHA-AWWA-WEF, 2017). Al igual que en la sección previa, los valores por debajo del límite

de detección del método (LDM) o dentro de este y el límite de cuantificación del método (LCM) se reemplazaron utilizando la aproximación $LDM/2$ y $(LCM+LDM)/2$, respectivamente, según el "Método de sustitución simple" (Duval and Karlsson, 2002; Gilliom et al., 1984; Helsel and Hirsch, 1992). Las curvas de calibración se realizaron para cada una de las especies estudiadas sobre los extractos de tejido, abarcando los puntos de 1, 10 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Como control de calidad de la eficiencia en la extracción, se utilizaron los estándares internos marcados.

Análisis de los resultados

Las concentraciones medias individuales de los FH estudiados en las especies *P. maculatus*, *M. obtusidens*, *S. brasiliensis* y *P. lineatus*, se agruparon como el promedio de las concentraciones de cada fármaco agrupando los sectores de muestreo, los resultados a los que se ha hecho referencia se muestran como el promedio \pm error estándar. Las frecuencias de detección de los FH estudiados se expresaron como porcentajes y para las comparaciones de las concentraciones de FH estudiadas, los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron evaluados por las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. Las comparaciones simples se evaluaron mediante la prueba t de Student, mientras que las múltiples se evaluaron mediante ANOVA de una vía. Las comparaciones post-hoc se realizaron mediante el uso de la prueba Tukey HSD (diferencia honestamente significativa). En aquellos casos en que los supuestos de ANOVA no se cumplieron, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En todos los casos, el nivel de significancia utilizado fue $\alpha = 0,05$.

Resultados

Desempeño del método

El método utilizado en esta sección demostró ser adecuado para extraer los FH estudiados en el músculo de los peces. Los LDM, LCM y las recuperaciones de los compuestos farmacéuticos estudiados se muestran en la [Tabla I.2](#), mientras que los efectos matriz se muestran en la [Tabla suplementaria 7](#). En cuanto a los LDM y LCM, los mismos estuvieron en el rango de 0,53-2,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 1,8-7,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Mientras que los porcentajes de recuperación para ATE, CBZ, ENA y SIL estuvieron en el rango de 28-56%. Los porcentajes de efecto matriz en valores negativos expresan supresión iónica y los valores positivos indican exaltación iónica. Obteniendo de esta manera, siempre valores de supresión para ATE, y de exaltación para CBZ, ENA y SIL. Particularmente los valores de ATE estuvieron en el rango de 32-98% de supresión, los de CBZ en el rango de 79-237%, los de ENA en el rango de 218-330% y los de SIL en el rango de 118-243%, todos ellos indicando exaltación.

Acumulación de fármacos humanos en peces

Las frecuencias y concentraciones de FH evaluados en el músculo de las cuatro especies estudiadas se muestran en la [Tabla I.3](#).

En el presente estudio, todos los productos farmacéuticos evaluados, excepto CBZ en *P. maculatus*, se detectaron al menos una vez en las especies estudiadas. Las frecuencias promedio generales (todas las especies) fueron 60%, 56%, 28% y 19% para ATE, SIL, ENA y CBZ, respectivamente. En particular, ATE se detectó de forma ubicua en *S. brasiliensis*.

Las concentraciones promedio generales (todos los peces) fueron 24,4; 17,1; 7,0 y 5,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (peso/húmedo) para ATE, SIL, ENA y CBZ, respectivamente. Las concentraciones obtenidas para todos los FH siempre fueron superiores a 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Particularmente, la concentración promedio de ATE y SIL fue superior a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, un valor umbral raramente superado en el Río Uruguay. A su vez, se observó una buena relación entre frecuencias y concentraciones, ya que aquellos compuestos que presentaron mayor ocurrencia también mostraron una mayor acumulación. Para aquellos compuestos con una frecuencia general superior al 50%, la concentración media general fue superior a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Por otro lado, aquellos compuestos que mostraron frecuencias generales inferiores al 50%, la concentración media general fue inferior a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. En consecuencia, los niveles de ocurrencias y acumulación pueden presentarse juntos, siguiendo el orden: ATE> SIL>ENA> CBZ. Además, no se observó relación entre los niveles de acumulación obtenidos y los valores de $\log K_{ow}$ o pKa de cada producto farmacéutico ([Tabla suplementaria 8](#)).

Tabla I.2. Valores de pKa y log K_{ow}, iones de cuantificación y de confirmación, tiempo de retención (tr) y rendimiento del método analítico.

	pKa	log K _{ow}	Ion Cuant (m/z)	EC (eV)	Ion Conf (m/z)	EC (eV)	tr (min)	Rec±DER (%)	n	LDM (µg kg ⁻¹)	LCM (µg kg ⁻¹)
<i>β-bloqueante</i>											
Atenolol	9,67 ^a	0,16 ^d	267,3 [M+H] ⁺	30	237,7	29	2,27	56 ± 1,1	4	1,8	6,1
<i>Droga psiquiátrica</i>											
Carbamazepina	13,9 ^a	2,77 ^a	237,2 [M+H] ⁺	30	259,2	19	7,17	45 ± 4,4	4	0,53	1,8
<i>Antihipertensivo</i>											
Enalapril	5,5 ^b	0,07 ^d	377,3 [M+H] ⁺	30	355,2	42	5,51	32 ± 3,2	4	2,3	7,6
<i>Vasodilatador</i>											
Sildenafil	6,78 ^c	3,18 ^c	475,4 [M+H] ⁺	30	194,2	23	5,29	28 ± 2,2	4	1,6	5,3

Las recuperaciones se expresan como el porcentaje promedio y la desviación estándar relativa (DER), n: número de muestras, LDM: Límite de detección del método, LCM: Límite de cuantificación del método, EC (energía de coalición), tr (tiempo de retención).

a Huerta et al. (2013).

b Loftsson et al. (2010).

c Gobry et al. (2000).

d Hansch et al. (1995).

Tabla I.3. Frecuencias y concentraciones generales de los compuestos farmacéuticos estudiados en el músculo de los peces recolectados en URU y RLP

	N	Atenolol			Carbamazepina				Enalapril			Sildenafil			
		Media± EE	Max	Frec.	Media± EE	Max	Frec.	Media± EE	Max	Frec.	Media± EE	Max	Frec.		
<i>P. maculatus</i>	5	22,5 ± 8,93	42,3	60%	ND	---	---	---	6,62 ± 5,48	28,6	20%	26,8 ± 12,9	71,6	80%	
<i>M. obtusidens</i>	6	7,44 ± 6,52	40,1	17%	7,85 ± 7,59	45,8	17%		10,4 ± 9,29	56,9	17%	25,5 ± 12,9	71,7	50%	
<i>S. brasiliensis</i>	5	53,6 ± 12,0	36,1	100%	7,07 ± 6,80	34,3	20%		7,14 ± 6,00	31,1	20%	9,82 ± 5,81	29,0	40%	
<i>P. lineatus</i>	42	14,1 ± 2,73	69,4	62%	1,7 ± 0,51	15,4	21%		3,98 ± 0,88	22,2	55%	6,18 ± 1,31	42,2	55%	

Las concentraciones se muestran en $\mu\text{g kg}^{-1}$ (peso/húmedo), Media: media de todas las muestras analizadas (las muestras por debajo de los límites de detección o cuantificación se sustituyeron por $<\text{LDM}/2$ o $(\text{LDC}+\text{LDM})/2$); EE: error estándar; Máx: concentración máxima detectada; Frec.: frecuencia de detección.

La carga de fármacos total en el músculo (FHT) se usó como un indicador del nivel de contaminación de cada especie. La comparación de FHT entre especies mostró diferencias estadísticas (ANOVA, $p < 0,0044$) en *S. brasiliensis*, presentando los niveles más altos, seguido de *P. maculatus* y *M. obtusidens*, y finalmente *P. lineatus*, con una diferencia de 3 veces entre extremos (Figura I.11.).

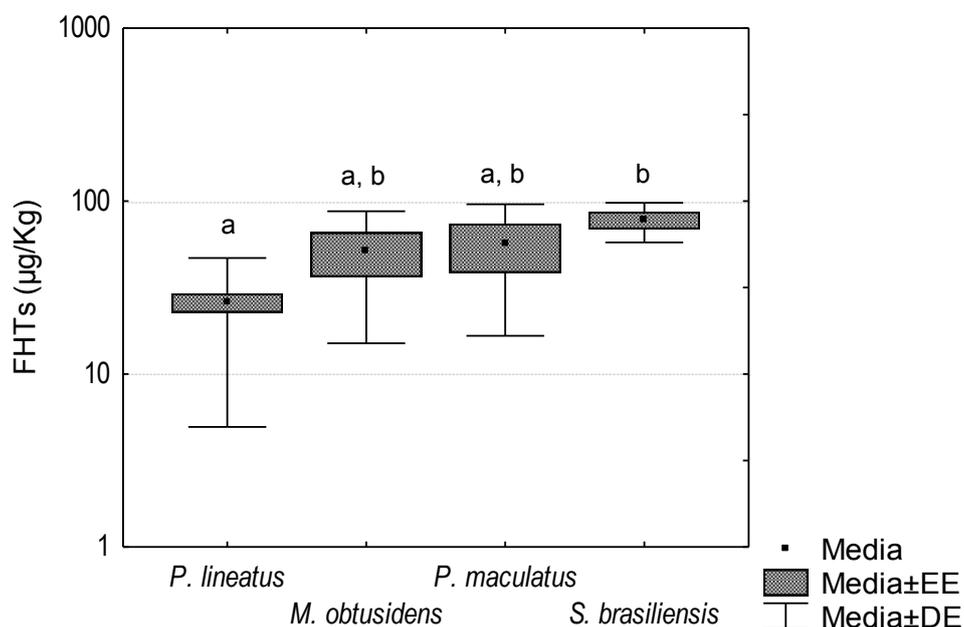


Figura I.11. Registro de la carga total de fármacos humanos (FHTs) detectados en las especies de peces estudiadas. Media: media de la concentración de todos los fármacos humanos detectados; EE: errores estándar; DE: desviación estándar. Diferentes letras significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$

En *S. brasiliensis*, las concentraciones de ATE fueron claramente más altas que las de CBZ, ENA y SIL, las cuales mostraron niveles de concentración similares. De manera diferente en *P. maculatus*, las concentraciones de ATE y SIL fueron similares, y más altas que las de ENA, sin mostrar niveles detectables de CBZ. En *M. obtusidens*, las concentraciones fueron más altas para SIL, seguido de ENA y luego de CBZ y ATE, con niveles similares. Finalmente, en *P. lineatus*, las concentraciones

de todos los productos farmacéuticos evaluados fueron más bajas que para las otras especies. El ATE fue el que se detectó en concentraciones más altas, seguido de SIL, luego ENA y por último CBZ. Según estos resultados, no parece existir una relación clara entre el nivel trófico y la acumulación de fármacos, lo que indica que no hay biomagnificación para ninguno de los productos farmacéuticos estudiados.

Comparación geográfica de la acumulación de fármacos humanos en peces del Bajo Río Uruguay y Río de la Plata

Con respecto a la acumulación de fármacos humanos en los peces muestreados en el Bajo Río Uruguay (URU) y Río de la Plata (RLP), solo ENA mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,018$), las concentraciones promedio de los cuatro productos farmacéuticos evaluados siempre fueron más altas en URU que en RLP (Figure I.12.).

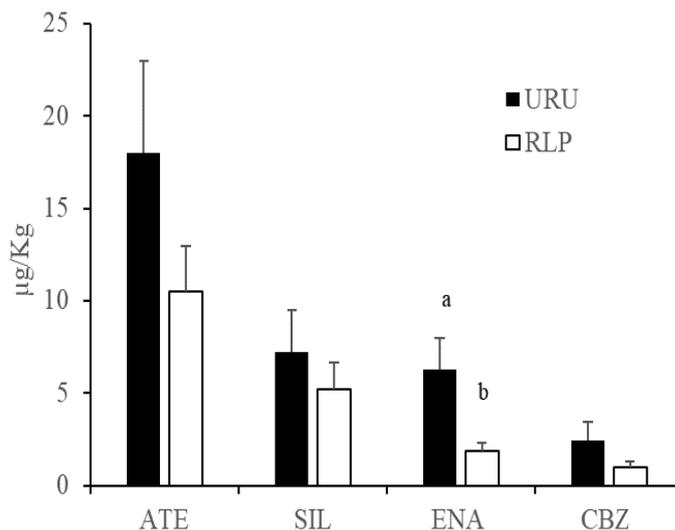


Figura I.12. Diferencias en las concentraciones de fármacos humanos detectados en peces recolectados en el bajo Río Uruguay y el Río de la Plata. ATE: atenolol; SIL: sildenafil; ENA: enalapril; CBZ: carbamazepina; URU: Bajo Río Uruguay; RLP: Río de la Plata

Las diferencias también fueron estadísticamente significativas ($p= 0,038$) cuando se compararon los FHTs acumulados para *P. lineatus*, única especie con tamaño de muestra en cada sitio lo suficientemente grande como para permitir tal comparación, siendo un 45% mayor en los peces muestreados en URU (Figura I.13).

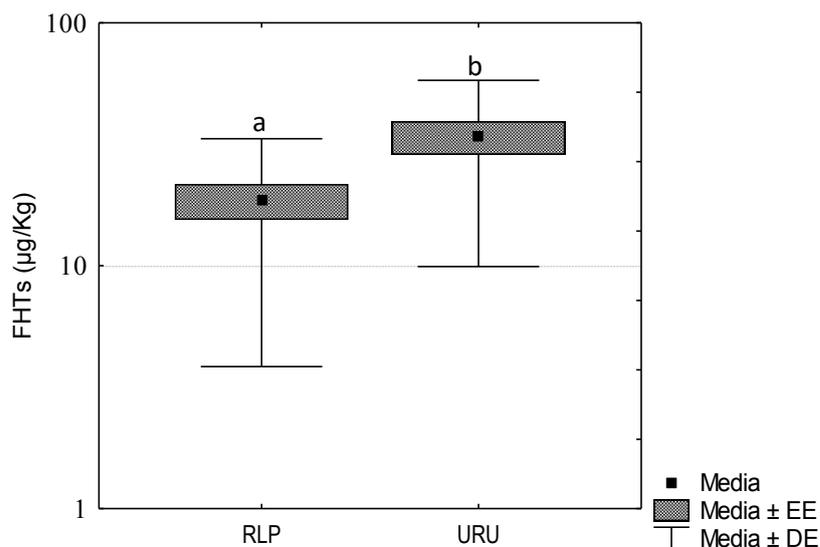


Figura I.13. Comparación de la carga total de fármacos humanos (FHTs) en *P. lineatus* recolectados en el Río de la Plata y el Bajo Río Uruguay. Media: media de la concentración de todos los compuestos farmacéuticos detectados; EE: error estándar; DE: Desviación estándar; RLP: Río de La Plata; URU: Bajo Río Uruguay; letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas.

Discusión

Desempeño del método

Los resultados obtenidos con la metodología de [Ramírez et al. \(2007\)](#), demostraron ser eficientes para la extracción de los FH estudiados en el tejido muscular de los peces. Los porcentajes de recuperación informados en el presente estudio en comparación con las reportadas en el trabajo original fueron mayores para la CBZ, para la cual en el trabajo citado (información suplementaria de [Ramírez et al. \(2007\)](#))

se reportaron valores mínimos de 35 %, y para ATE para el cual se reportaron valores mínimos de 25%. Por otro lado, los LDM estuvieron en el rango de 0,01-3,15 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y LCM 0,03-10,4 ($\mu\text{g kg}^{-1}$), siendo los valores mínimos un orden de magnitud menores que los reportados en este estudio y los valores máximos aproximadamente 1,4 veces mayores que los reportados en el presente estudio. En cuanto a los resultados de efecto matriz, los mismos demuestran que la cuantificación precisa de los analitos en extractos de tejido no sería factible utilizando patrones de calibración preparados en solvente, por lo cual fue esencial utilizar el Método de Adición Estándar ([APHA-AWWA-WEF, 2017](#)), para eliminar los efectos de la matriz en la cuantificación.

En comparación con el método de extracción de [Huerta et al. \(2013\)](#) correspondiente a la Sección I, el método de [Ramírez et al. \(2007\)](#), demostró porcentajes de recuperación similares e incluso algunos de ellos fueron mayores en las metodologías originales. Encontrando valores mínimos de 19% en el caso de la primer metodología y valores del 25% en el caso de la segunda metodología. En comparación con los porcentajes de recuperación obtenidos con las especies estudiadas de la Cuenca del Plata, se pudo observar que en la metodología de [Huerta et al. \(2013\)](#), si bien los porcentajes de recuperación para ATE y CBZ fueron mayores en comparación con los obtenidos por la metodología de [Ramírez et al. \(2007\)](#), para el resto de los compuestos estudiados los valores de recuperación se encontraron superando el 25%, superando incluso el valor mínimo de 16% encontrado con la metodología de [Huerta et al. \(2013\)](#). Por otro lado, los LDM y LCM obtenidos con la primer metodología nombrada estuvieron en el rango de 0,017-2,7 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y 0,056-9,1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$), respectivamente. Mientras que los correspondientes a la segunda metodología fueron de 0,53-2,3 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y 1,8-7,6 ($\mu\text{g kg}^{-1}$), respectivamente. Como se puede observar en los LDM, si bien los límites mínimos se encuentran hasta un orden de

magnitud menores en la primer metodología, los valores máximos se encuentran cercanos. Mientras que los LCM se encuentran 2 órdenes de magnitud por debajo y los límites máximos se encuentran nuevamente cercanos. Por lo cual, la adaptación a la metodología de [Ramírez et al. \(2007\)](#), si bien fue óptima para la determinación de los fármacos humanos estudiados, dos de ellos de los cuales no se ha reportado información previa sobre su presencia en el tejido de los peces (ENA y SIL), a vistas futuras podrían incluirse pasos de optimización para ampliar el campo de fármacos a medir y mejorar los límites de detección.

Acumulación de FH en el músculo de los peces

En Argentina, particularmente en el Río Colastiné, próximo de la descarga de aguas residuales de la ciudad de Santa Fe, se han detectado concentraciones de ATE, SIL, CBZ y ENA de hasta 0,007; 0,56; 13,8 y 26,7 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente, ([Pérez et al., 2018](#)). Sin embargo, en base a nuestro conocimiento, este es el primer estudio que informa la presencia de ENA y SIL en peces de todo el mundo. La concentración de SIL se evaluó en un estudio previo en plasma de tiburón toro recolectado en el estuario de Charlotte Harbor (Florida, EE. UU.) durante 2006 y 2007, pero no se detectó en ninguna muestra ([Gelsleichter and Szabo, 2013](#)).

En relación a ATE, se han reportado con alta frecuencia tanto en las especies de peces de consumo descritas en la sección anterior como en especies de peces pequeños de Córdoba ([Valdés et al., 2016](#)) con una frecuencia media general (>50%), encontrándose en el mismo rango que el clasificado en el presente estudio. Contrariamente, la frecuencia media general de CBZ en el presente estudio fue menor

que la encontrada en los ejemplares colectados en el Río Uruguay, descrita en la sección previa, situándose en una clase diferente (<50%).

Las concentraciones de ATE y CBZ fueron más altas que las encontradas en el estudio mencionado anteriormente. En cuanto a las concentraciones de ATE también fueron superiores a las reportadas para peces pequeños recolectados en ríos de Córdoba, Argentina (Valdés et al., 2016). De manera diferente, las concentraciones de CBZ fueron del mismo orden de magnitud que las encontradas en Córdoba y en el hígado de trucha capturada en ríos mediterráneos de España (Huerta et al., 2013). A su vez, resultaron levemente más altos que los valores reportados en peces de EE. UU (Huerta et al., 2018).

Los niveles tróficos descritos por González-Bergonzoni et al. (2019) para las especies estudiadas fueron: *S. brasiliensis* como piscívoro, *P. maculatus* y *M. obtusidens* como omnívoro, y *P. lineatus* como pez detritívoro. Aunque a primera vista parecería que existiese una relación entre los FHTs y el nivel trófico de los peces, tal patrón no fue respaldado por la acumulación de ninguno de los productos farmacéuticos evaluados por separado. Debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre especies para un solo compuesto. Además, los patrones de acumulación de tales compuestos resultaron característicos de cada especie.

Según los resultados descritos previamente no se observa un patrón de biomagnificación. Estos hallazgos estuvieron en concordancia con los resultados encontrados en la sección precedente de esta tesis en peces recolectados en el Río Uruguay y a nivel mundial en la mayoría de los estudios encontrados en la literatura (Arnnok et al., 2017; Du et al., 2016).

Comparación geográfica de la acumulación de fármacos humanos en peces del bajo Río Uruguay y Río de la Plata

Los resultados obtenidos fueron inesperados, debido a que el sitio de RLP fue considerado *a priori* como un área más contaminada, ya que recibe las aguas residuales sin tratar de la Ciudad de Buenos Aires y descargas de varios afluentes altamente contaminados del Área Metropolitana de Buenos Aires. Dado que en los muestreos realizados en relación a los objetivos de la sección previa del presente capítulo, se habían encontrado concentraciones más altas de FHTs en peces recolectados en el Bajo Río Uruguay y que el estudio de [Speranza et al. \(2012\)](#) muestra que los sábalos migran aguas arriba por el Río Paraná desde la margen costera sur del Río de la Plata llevando consigo la “huella” de contaminantes de ese lugar, se hipotetizó que los peces contaminados llegarían al Río Uruguay también migrando aguas arriba desde el Área Metropolitana de Buenos Aires. Los resultados de este estudio sólo respaldarían dicha hipótesis, si los peces capturados en RLP fueran los que bajaran (es decir, del Río Uruguay o del Río Paraná) para alimentarse allí y estuvieran menos contaminados que los que regresan al área URU después de la alimentación. Igualmente, se necesitarían más estudios para poder explicar los hallazgos obtenidos.

Conclusiones parciales

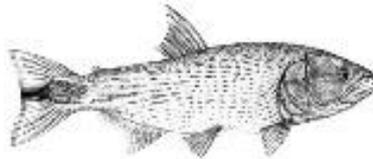
- Los niveles de bioacumulación de cuatro productos farmacéuticos comúnmente recetados en Argentina fueron reportados para cuatro especies de peces de relevancia en la Cuenca del Plata, siendo el primer informe en todo el mundo sobre la acumulación de ENA y SIL en peces. Las

concentraciones y frecuencias fueron variadas dependiendo de la especie y los productos farmacéuticos, no siendo posible establecer un solo patrón para todos ellos.

- Las concentraciones obtenidas para todos los fármacos humanos siempre fueron superiores a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, en particular la concentración promedio de ATE y SIL fue superior a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Por otro lado, las concentraciones de ATE y CBZ fueron más altas que las encontradas en el estudio descrito de la Sección I.
- No hubo relación entre la acumulación y los niveles tróficos, ya que ninguno de los productos farmacéuticos estudiados mostró una tendencia de biomagnificación. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre especies para un solo compuesto.
- Con respecto a la acumulación de fármacos humanos en *P. lineatus* recolectados en URU y RLP, solo ENA mostró diferencias estadísticamente significativas. Indicando que los peces contaminados llegarían al Río Uruguay desde el Área Metropolitana de Buenos Aires.

Capítulo II

**Estudio de la cinética de acumulación y eliminación
de fármacos humanos en peces**



Sección I. Bioensayos en condiciones controladas de laboratorio

Introducción

Conocer en qué grado los fármacos pueden acumularse en la biota y que factores influyen sobre dicho proceso ha sido considerado un tema prioritario de investigación (Boxall et al., 2012a). En ambientes contaminados, los organismos acuáticos están expuestos a compuestos farmacéuticos bioactivos, tanto a través de la absorción desde el agua (bioconcentración), como de la alimentación. A nivel internacional, diversos autores han aportado evidencias sobre la bioconcentración y bioacumulación de fármacos humanos en peces (Du et al., 2016; Muir et al., 2017; Nichols et al., 2015; Tanoue et al., 2015; Zenker et al., 2014; Zhang et al., 2010). Para identificar patrones generales de absorción y transferencia se han utilizado también estudios a largo plazo en sistemas acuáticos controlados (Lagesson et al., 2016).

La bioconcentración se define como el proceso por el cual un organismo incorpora una sustancia química presente en el medioambiente, a través de sus superficies respiratorias y dérmicas, sin incluir el ingreso del compuesto por el alimento. En otras palabras, es el resultado neto de las tasas de absorción competitivas de las sustancias químicas presentes en el medioambiente y los procesos de eliminación, que incluyen intercambio respiratorio, egestión fecal, biotransformación metabólica del compuesto original y dilución por crecimiento. La dilución del crecimiento se considera un proceso de "pseudo-eliminación", ya que el organismo no elimina la sustancia química, sino que la concentración puede diluirse mediante un aumento en el volumen de tejido. En comparación, la bioacumulación describe el proceso en el

que una sustancia química es absorbida en un organismo por todas las vías de exposición, como ocurre en el entorno natural ([Arnot and Gobas, 2006](#)).

La bioacumulación implica, por un lado, el movimiento de un tóxico desde el medioambiente hacia un organismo y puede ocurrir directamente desde el agua, la tierra, el sedimento y/o el alimento. La incorporación del contaminante puede ocurrir a través de la piel, las branquias, las superficies pulmonares o el intestino, y puede variar dependiendo de las especies y las condiciones ambientales. Incluso, puede variar para los individuos de la misma especie en condiciones constantes de laboratorio. Por otro lado, el contaminante acumulado es eliminado por medio de una variedad de mecanismos. Para su eliminación, los contaminantes orgánicos suelen ser biotransformados mediante reacciones de oxidación o hidrólisis (fase I) vinculadas a reacciones de conjugación (fase II) que permiten transformar a una sustancia orgánica no polar a una forma soluble en agua y apta para la excreción por vía de la bilis o la orina. Otros procesos de eliminación actúan mediante el transporte a través de las superficies respiratorias (ej. branquias), muda, excreción o deposición de huevos, etc. ([Newman, 2013](#)).

Los modelos matemáticos empleados para describir la cinética del proceso de bioconcentración de diferentes sustancias químicas en organismos son muy utilizados en estudios ecotoxicológicos ya que permiten representar el comportamiento de una sustancia química en un sistema real y de esta manera describir cuantitativamente los procesos de absorción, distribución, biotransformación y eliminación del mismo, en función del tiempo. En cierto modo, el proceso de bioconcentración puede visualizarse como un equilibrio entre dos procesos cinéticos: acumulación y eliminación, según lo cuantificado por las constantes de velocidad de primer orden k_1 y k_2 , respectivamente, siendo la ecuación diferencial resultante:

$$\frac{dC_b}{dt} = k_1 \times C_m - k_2 \times C_b \quad (1)$$

Siendo C_b la concentración en la biota, C_m es la concentración en el medio y t el tiempo. Partiendo de una condición inicial de C_b y t igual a cero, el resultado de la integración es:

$$C_b = C_m \times \left(\frac{k_1}{k_2}\right) \times (1 - e^{(-k_2 \times t)}) \quad (2)$$

En tiempos largos, C_b tiende hacia $C_m \times (k_1/k_2)$, o $C_m \times k_b$, siendo k_b igual al BCF (Mackay, 1982).

Trabajos realizados en condiciones de laboratorio sobre el estudio de la cinética de bioconcentración de fármacos humanos en peces revelan que estos compuestos suelen alcanzar el estado de equilibrio (“plateau”) entre las 48 h y 96 h del inicio de la exposición, dependiendo de la naturaleza química del mismo (Brox et al., 2016; Garcia et al., 2012; Nallani et al., 2011; Paterson and Metcalfe, 2008; Wang and Gardinali, 2013a).

Un parámetro muy útil que permite representar de manera simple la capacidad que una sustancia tiene de bioconcentrarse es el Factor de Bioconcentración (BCF). Este factor se obtiene como la relación adimensional entre la concentración de la sustancia en la biota respecto del agua. El grado en que las sustancias químicas se bioconcentran no sólo depende de los procesos biológicos mencionados previamente, sino también de las propiedades fisicoquímicas de la molécula. Un parámetro fisicoquímico muy útil para predecir la capacidad de acumulación de una sustancia orgánica es su constante de reparto octanol/agua (K_{ow}). En dicha constante de equilibrio, la fase octanol por su lipofilidad, representa a los lípidos que

componene las membranas plasmáticas y por tanto al compartimiento biótico. Se ha observado que para los compuestos orgánicos neutros existe una correlación lineal entre el logaritmo del K_{ow} ($\log K_{ow}$) y el BCF, especialmente cuando el $\log K_{ow}$ toma valores de entre 3 y 6 (Mackay, 1982). Sin embargo, la mayoría de los fármacos poseen grupos que pueden encontrarse ionizados, o no, dependiendo del pH. Por consiguiente, la constante de disociación ácida (pK_a) del compuesto es otro parámetro muy importante para predecir la capacidad de bioconcentración de un fármaco. En general se asume que la especie neutra es la que posee mayor capacidad de difundir de forma pasiva a través de las membranas biológicas, pero dependerá también de la existencia de transportadores activos de membrana que puedan incorporar o eliminar a los fármacos de las células. Este aspecto particular de los fármacos representa uno de los mayores desafíos para la ecotoxicología en cuanto al desarrollo de modelos de bioconcentración más precisos que los originalmente desarrollados para sustancias neutras (Boxall et al., 2012b).

En Argentina, el estudio de los procesos de acumulación y eliminación de fármacos humanos en peces, comenzó a desarrollarse en los últimos años. Uno de los primeros trabajos en reportar la bioconcentración de atenolol y carbamazepina en la especie de pez *Gambusia affinis* fue realizado por Valdés et al. (2014). Posteriormente, Valdés et al. (2016) estudiaron la bioconcentración del psicofármaco carbamazepina y monitorearon la concentración de los metabolitos, carbamazepina 10,11-epóxido (CBZ-EP) y 2-hidroxicarbamazepina (2-OH-CBZ), en diferentes tejidos (branquias, intestino; hígado, cerebro, músculo) de la especie de pez silvestre *J. multidentata*. Sin embargo, aún es muy poco lo que se conoce respecto a la acumulación de los fármacos en especies nativas de Argentina.

Las especies nativas seleccionadas para los estudios de bioconcentración de los fármacos humanos de relevancia para la Argentina fueron *C. decemmaculatus* y *P. mesopotámicus*. La “madrecita” (*Cnesterodon decemmaculatus*, Jenyns, 1842) es una especie endémica de América Neotropical que habita en ambientes dulceacuícolas de Argentina. Es un pez pequeño, ovovivípara vivíparo y dimórfica con marcada diferenciación sexual, abundante en ríos y arroyos de la región pampeana. Además, es una especie con gran tolerancia en ambientes contaminados, es por este motivo que es una de las especies de peces más utilizadas como modelo ecotoxicológico (Hued and Bistoni, 2005). Por otra parte, el “pacú” (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) es un pez nativo característico de la Cuenca del río Paraguay-Paraná, de habito omnívoro y muy apreciada para el consumo. Es la especie de mayor producción en la acuicultura de agua dulce de Argentina (Panné, 2018).

Hipótesis específica

El factor de bioconcentración de diversos fármacos de uso humano difiere dependiendo de sus características fisicoquímicas y la cinética de bioconcentración es distinta según la especie.

Objetivos específicos

- Estudiar, bajo condiciones controladas de laboratorio, el factor de bioconcentración de carbamazepina (CBZ), enalapril (ENA) y sildenafil (SIL) fármacos humanos detectados con mayor frecuencia y a concentraciones más

altas en peces de la Cuenca del Plata) en el pez “madrecita” (*Cnesterodon decemmaculatus*).

- Comparar la cinética de bioconcentración del sildenafil en dos especies de peces distintas, *Cnesterodon decemmaculatus* y *Piaractus mesopotámicus*

Materiales y métodos

Especies seleccionadas

Los bioensayos no se realizaron con las especies de campo y comerciales estudiadas en el capítulo previo, debido a que al ser especies de gran tamaño y de difícil mantenimiento, se dificultaba la logística del ensayo. Además la especie *C. decemmaculatus*, como se ha nombrado previamente es ampliamente utilizada en ensayos ecotoxicológicos y la especie *P. mesopotámicus*, es ampliamente utilizada en acuicultura, lo cual garantiza el mantenimiento de los mismos en condiciones distintas a las del campo, garantizando la supervivencia de los organismos.

Para el ensayo con la especie *C. decemmaculatus*, se utilizó el protocolo N° 005-26-17 “Toxicity bioassays with the fish *Cnesterodon decemmaculatus*”. Los ejemplares de *C. decemmaculatus* (Figura II.1.) fueron obtenidos de un sector del cuerpo de agua artificial: Lago del Bosque, ubicado en la Ciudad de La Plata-Buenos Aires, Argentina, en el cual no se evidencia la presencia de descargas de efluentes cloacales domiciliarios, hospitalarios o clandestinos, tampoco lixiviados de rellenos sanitarios, ni ninguna de las posibles vía de ingreso de los FH descripta en la introducción general del presente trabajo. Los mismos fueron mantenidos bajo condiciones controladas de laboratorio durante dos semanas previas al ensayo, en condiciones de temperatura $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16 h luz:8 h oscuridad y alimentados

diariamente a base de alimento balanceado de peces omnívoros (Kilomax Peces Omnívoros 3mm, Mixes del Sur) molido.



Figura II.1. Ejemplar de *C. decemmaculatus*

Los ejemplares de *P. mesopotamicus* (Figura II.2.) fueron obtenidos del Centro de Investigación de Agroindustria, Instituto Nacional de Tecnología de Alimentos (CIA-INTA), ubicado en Castelar-Provincia de Buenos Aires, adquiridos previamente de la Empresa Teko, ubicada en la Provincia de Chaco.

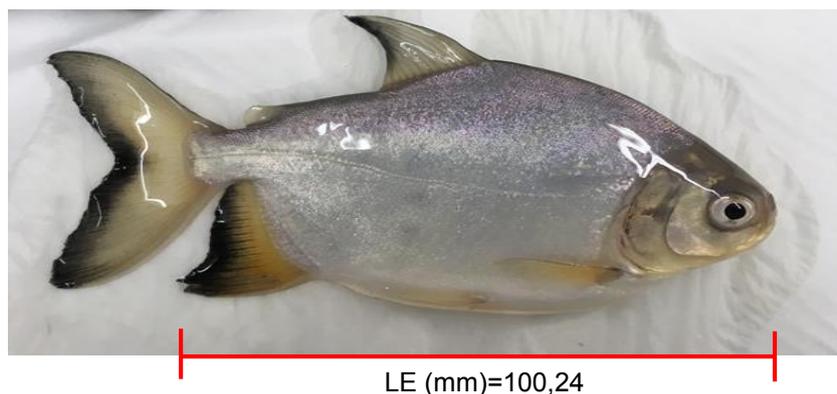


Figura II.2. Ejemplar *P. mesopotamicus* en el momento de la disección y medida de sus longitudes

Estándares y reactivos

Se utilizaron estándares de carbamazepina (CBZ), enalapril (ENA) y sildenafil (SIL) con alto grado de pureza (90%) marca Parafarm® adquiridos en droguería Saporiti, Argentina. Las soluciones madre individuales se prepararon en metanol a una concentración de 1000 mg/L y se almacenaron a -20°C. La acetona, de grado analítico, se obtuvo de Cicarelli Co y el acetato de etilo de JT Baker®. El acetonitrilo y el metanol de grado HPLC utilizados para la fase móvil cromatográfica, fueron adquiridos de Carlo Erba. El formiato de amonio al 99% de pureza fue de Sigma-Aldrich y el ácido fórmico al 88% de pureza era de Cicarelli Co.

Procesamiento de muestras y análisis químico

La metodología utilizada para la extracción de los fármacos en el tejido de ambas especies fue la del método del **Extractor Rotatorio** ([Ramírez et al., 2007](#)), previamente descrita en el Capítulo I-Sección II. Para evitar los efectos de la matriz, la cuantificación se realizó mediante el Método de Adición Estándar ([APHA-AWWA-WEF, 2017](#)). La curva de calibración realizada sobre los extractos de tejido tomaron los puntos de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Con *C. decemmaculatus*, para alcanzar la cantidad de masa de tejido necesario requerido por la metodología, se conformó una muestra compuesta utilizando el pez entero. Para *P. mesopotamicus*, se utilizó el músculo dorsal de ambos flancos como muestra para la extracción y posterior análisis.

Los extractos de músculo se midieron por HPLC-MS del mismo modo que se describieron en la Sección II del Capítulo I. Las muestras de agua al inicio (C_0) y final

(C_f) de cada recambio se midieron por el mismo método, pero por inyección directa previo filtrado por filtro de nylon de 0,22 µm.

Bioensayos para determinar la bioconcentración de CBZ, ENA y SIL en *C. decemmaculatus* expuestos durante 96h.

Para el ensayo se expusieron hembras adultas, debido a que en la especie estudiada las hembras son las de mayor tamaño (Longitud estándar = $2,3 \pm 0,5$ cm y Peso total = $0,298 \pm 0,173$ g), lo cual permitió llegar al peso mínimo necesario para el desarrollo del método. Los ejemplares se expusieron durante de 96 h a 200, 600, y 100 µg/l de CBZ, ENA, y SIL, respectivamente, más un grupo control con agua de clorinada y 0,01% de metanol, en el cual los peces no fueron expuestos al fármaco. Se realizaron renovaciones parciales de la solución de ensayo, retirando 80% del volumen a las 48 h. Las concentraciones seleccionadas fueron superiores a las encontradas en los cuerpos de agua, debido a que para determinar los valores de BCF_{emp} como primer aproximación del estudio se tomó el peor escenario posible y de esta manera también podríamos asegurarnos detectar la presencia de los mismos en el tejido, lo cual ocurriría notoriamente con concentraciones elevadas. Por otro lado, según los autores consultados relacionados a la temática han reportado niveles de exposición de peces a fármacos humanos en condiciones de laboratorio, dentro del mismo orden de magnitud o incluso mayores que las estudiadas en el presente estudio (Nallani et al., 2011; Silva et al., 2016; Valdés et al., 2016; Wang and Gardinali, 2013b). En cada caso se colocaron un número total de 36 peces en tanques de 20 L de acero inoxidable con 12 L de agua corriente de clorinada (pH 7,5) y aireada durante 48 h antes de ser utilizada en el acuario (Figura II. 3). Durante el ensayo se mantuvieron las condiciones de fotoperiodo controlado de 16 h luz/8 h oscuridad y los ejemplares

fueron a alimentados a las 48 h. Al utilizarse una gran cantidad de peces, los ensayos no pudieron ser realizados en el material de vidrio disponible, sin embargo según los manuales de la USEPA (de sus siglas en inglés): Métodos para ensayos de toxicidad aguda con peces, macroinvertebrados y anfibios (USEPA, 1975) y Métodos para medir la toxicidad aguda de efluentes y aguas receptoras para organismos marinos y de agua dulce (USEPA, 2002), tanto lo materiales de vidrio como los de acero inoxidable son aptos para la realización de los ensayos. Finalizado el tiempo de ensayo, los ejemplares fueron anestesiados con hielo y almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

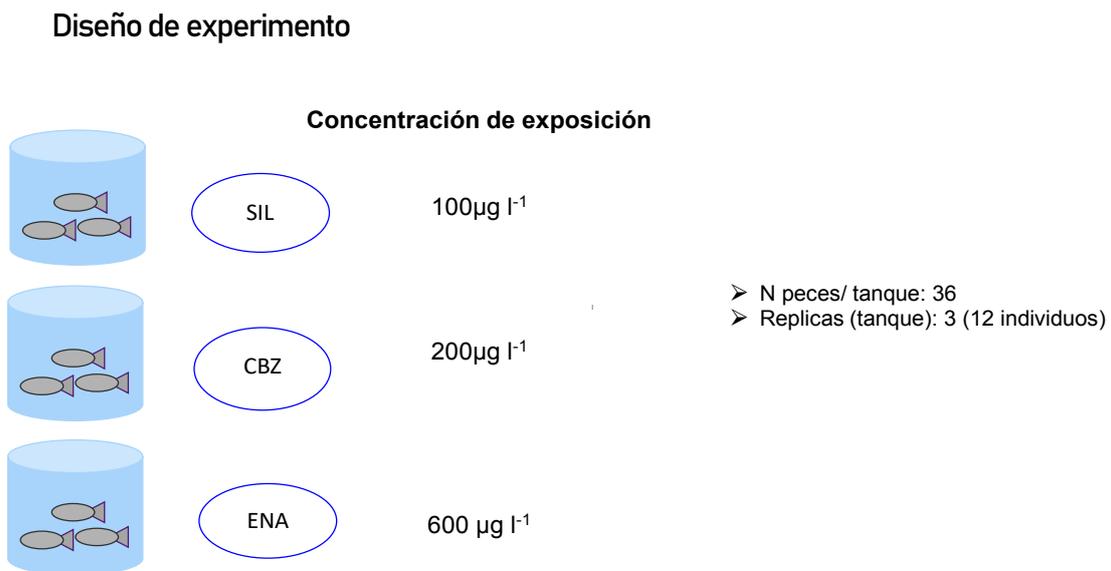


Figura II.3. Diseño de experimento de biconcentración a 96 h de CBZ, ENA y SIL en *C. decemmaculatus*. Cada imagen de pez representa un N de 12 individuos

Bioensayos para determinar la cinética de bioconcentración del SIL utilizando *C. decemmaculatus*.

Se realizó un ensayo de 11 días duración, con una fase de exposición de 7 días a $100 \mu\text{g l}^{-1}$ de SIL, más un grupo control con agua de clorinada y 0,01% de metanol, y luego una fase de depuración de 4 días, en la cual se reemplazó la solución de ensayo por agua de clorinada. Cada tratamiento se realizó por triplicado, disponiendo 4 hembras adultas (Longitud estándar = $2,4 \pm 0,46$ cm y Peso total = $0,281 \pm 133$ g) en un frasco de vidrio de 3 L, con un volumen de 2,5 L de solución de ensayo (Figura II.4.). A los días 0 (CTL), 1, 3, 5, 7, 9 y 11, se muestrearon por triplicado los 4 peces para la determinación de SIL en los tejidos. Los peces se alimentaron sólo al final de la exposición (7^{mo} día). Se realizó un recambio total de las soluciones de ensayo cada 48 h y se mantuvieron en las condiciones de fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad. Los ejemplares muestreados a cada tiempo fueron anestesiados con hielo y almacenados a -80°C previo a su procesamiento.

Diseño de experimento

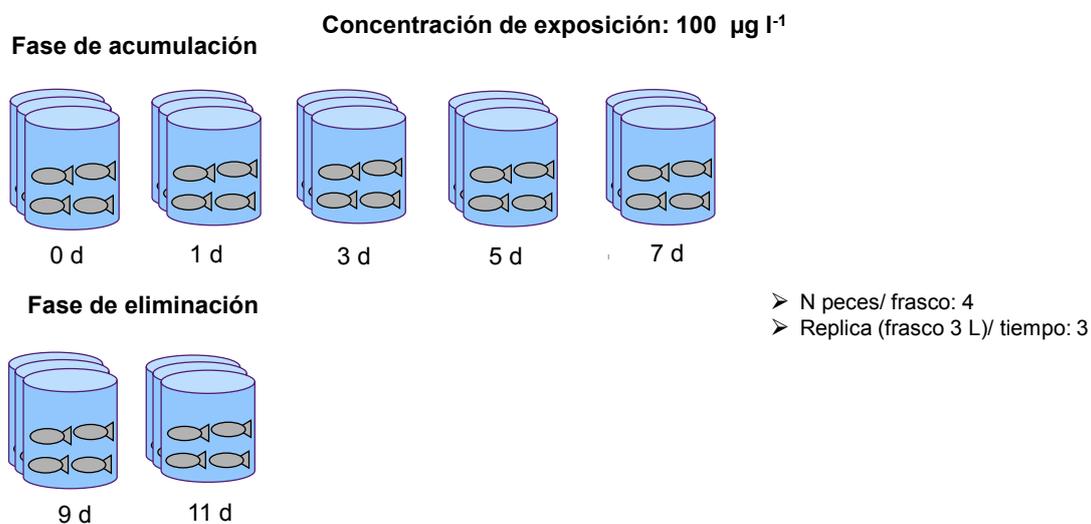


Figura II.4. Diseño de experimento del bioensayo de la cinética de bioconcentración de SIL en *C. decemmaculatus*

Bioensayos para determinar la cinética de bioconcentración del SIL utilizando *P. mesopotámicus*.

El ensayo tuvo una duración total de 10 días, con una fase de exposición de 6 días a $100 \mu\text{g l}^{-1}$ de SIL, más un grupo control, y luego una fase de depuración de 4 días, en los cuales se reemplazó la solución de ensayo por agua de clorinada y 0,01 % de metanol. Cada tratamiento se realizó por triplicado, disponiendo 3 peces juveniles (Longitud estándar = $10,01 \pm 0,57$ cm y Peso total = $35,72 \pm 7,33$ g) por cada tanque de acero inoxidable 20 L con un volumen de 10 L de solución de ensayo (Figura II.5.). Al seleccionar peces juveniles no se diferenciaron entre sexos, ya que aún no se encontraban claramente desarrolladas las gónadas.

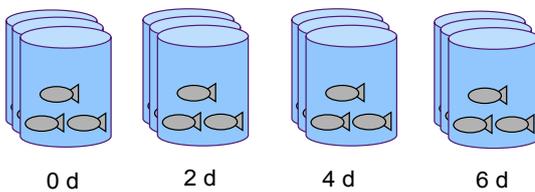
Durante el periodo de exposición, los ejemplares se alimentaron cada 48 h, previo al recambio parcial de la solución de ensayo (80% del volumen) y fueron mantenidos en condiciones de fotoperiodo controlado de 16 h luz/8 h oscuridad. A los días 0 (CTL), 2, 4, 6, 8 y 10 se muestrearon por triplicado los 3 peces para la determinación de SIL en los tejidos.

Los ejemplares fueron anestesiados en agua con hielo previa disección con instrumental de acero inoxidable, luego las muestras de músculo se envolvieron en papel aluminio y se colocaron en bolsas de calidad alimentaria, para posteriormente ser almacenadas a -80°C .

Diseño de experimento

Concentración de exposición: $100 \mu\text{g l}^{-1}$

Fase de acumulación



- N peces/ tanque: 3
- Replica (tanque 20 L)/ tiempo: 3

Fase de eliminación

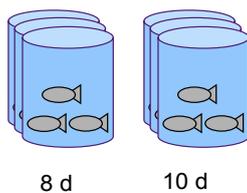


Figura II.5. Diseño de experimento del bioensayo de la cinética de biconcentración de SIL en *P. mesopotamicus*

Análisis de los resultados

La ecuación para modelar la cinética de acumulación en los experimentos realizados fue la propuesta por Newman (2013):

$$C_t = C_a \times \left(\frac{k_1}{k_2}\right) \times (1 - e^{-k_2 \times (t - t_{lat})}) \quad (3)$$

C_t ($\mu\text{g kg}^{-1}$): concentración del compuesto en el tejido al tiempo t

C_a ($\mu\text{g l}^{-1}$): concentración del compuesto en el agua (dato experimental)

k_1 ($\text{l kg}^{-1} \text{h}^{-1}$): constante de acumulación (arrojada por el modelo cinético)

k_2 (h^{-1}): constante de eliminación (arrojada por el modelo cinético)

t (días): tiempo de exposición (dato experimental)

t_{lat} (días): tiempo de latencia, es decir tiempo que demora la sustancia en ser incorporada y detectada en el tejido, desde que comienza la exposición (dato experimental)

El modelo describe la acumulación del compuesto en el tejido a través del tiempo, la cual se acerca al equilibrio en relación a la concentración en el agua. La constante de eliminación (k_2), se determinó a partir de la pendiente de la exponencial expresada por la ecuación 4:

$$C_t = C_a \times (e^{-k_2 \times (t - t_{lat})}) \quad (4)$$

Por otro lado, la constante de acumulación (k_1) se estimó sustituyendo la constante de eliminación (k_2) en el modelo de acumulación descrito en la ecuación 3.

El Factor de Bioconcentración estimado a partir del modelo cinético (BCF_{Mod}) se calculó a partir de la relación entre las constantes de velocidad de acumulación (k_1) y eliminación (k_2) determinadas a partir de los gráficos exponenciales de concentración del compuesto en el tejido en función del tiempo de exposición (acumulación) (ecuación 3) y eliminación (ecuación 4), respectivamente:

$$BCF_{Mod} = \left(\frac{k_1}{k_2} \right)$$

Los Factores de Bioconcentración empíricos, BCF_{emp} , fueron estimados como la relación entre la concentración media de los respectivos fármacos medida en el tejido de los peces expuestos, en el último día de exposición, y la concentración media detectada en la solución de ensayo entre recambios:

$$C_m = \frac{(C_0 + C_f)}{2}$$

A su vez, los valores del Factor de Bioconcentración obtenidos, se compararon con los predichos a partir del K_{ow} de cada fármaco, según la ecuación de [Mackay \(1982\)](#):

$$BCF = 0,048 \times K_{ow}$$

Donde:

K_{ow} : coeficiente de partición octanol-agua

0,048: constante

Resultados

Rendimiento del método

Los porcentajes de recuperación de CBZ, ENA y SIL con un sobreagregado de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, fueron de 48%, 106% y 72%, respectivamente. Mientras que los límites de detección y cuantificación (LDM y LCM) estuvieron entre 0,14-0,23 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 0,46-0,76 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Por otro lado, los límites de detección y cuantificación instrumentales (LDI y LCI), se encontraron dentro del rango de 0,0067-0,24 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 0,22-0,81 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente ([Tabla II.1.](#)).

Tabla II.1. Resumen del desempeño del método para determinación de CBZ, ENA, SIL en el organismo entero en el ensayo de laboratorio.

Compuesto	Rec% \pm ES	LDM	LCM	LDI	LCI
<i>Droga psiquiátrica</i>					
Carbamazepina	48% \pm 0,10	0,14	0,46	0,067	0,22
<i>Antihipertensivo</i>					
Enalapril	106% \pm 2,7	0,23	0,76	0,24	0,81
<i>Disfunción eréctil</i>					
Sildenafil	72% \pm 4,4	0,21	0,70	0,15	0,50

Los porcentajes de recuperación están expresados como el promedio y el error estándar (ES) (n=2); LDM: Límite de Detección del Método ($\mu\text{g kg}^{-1}$), LCM: Límite de Cuantificación del Método ($\mu\text{g kg}^{-1}$); LDI: Límite de detección instrumental ($\mu\text{g kg}^{-1}$); LCI: Límite de cuantificación instrumental ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

Bioconcentración de CBZ, ENA y SIL en *C. decemmaculatus* a 96 h

Durante los ensayos no se observó mortalidad en ninguno de los tratamientos. Las concentraciones medias medidas en los peces, las concentraciones inicial y final en el agua y los factores de bioconcentración empíricos calculados para CBZ, ENA y SIL luego de las 96h de exposición se muestran en la [Tabla II.2](#).

Tabla II.2. Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de CBZ, ENA y SIL en tejido de *C. decemmaculatus*, concentración en agua en de los mismos al iniciar el ensayo y al finalizarlo y BCF_{emp} calculados.

Compuesto	$C_{p96h} \pm \text{ES}$	$C_{ai} (\mu\text{g l}^{-1})$	$C_{af} (\mu\text{g l}^{-1})$	$C_{am} (\mu\text{g l}^{-1})$	BCF_{emp}
<i>Droga psiquiátrica</i>					
Carbamazepina	203 \pm 28,9	226	44,4	135	1,5
<i>Antihipertensivo</i>					
Enalapril	2,16 \pm 1,86	573	45,3	309	0,007
<i>Disfunción eréctil</i>					
Sildenafil	102 \pm 7,31	128	12,7	70.4	1,4

C_{p96h} : concentración promedio de los fármacos estudiados en el pez entero luego de 96h de exposición; ES: error estándar (n=3); C_{ai} : concentración de fármacos en agua a tiempo 0h; C_{af} : concentración de fármacos en agua a las 96h; C_{am} : concentración promedio de fármacos en agua durante el ensayo; BCF_{emp} : Factor de Bioconcentración empírico.

Las concentraciones de los fármacos en el medio utilizado para el ensayo decayeron entre un 80 y 92% durante el mismo. Las mayores y menores concentraciones en el organismo se observaron en los peces expuestos a CBZ y ENA respectivamente. El mismo orden se observó para los BCF, siendo CBZ el fármaco que presentó los mayores valores. De acuerdo a los valores de BCF obtenidos, las concentraciones en el organismo para CBZ y SIL luego de 96h fueron semejantes a las concentraciones

promedio en el medio. De manera diferente, para ENA fueron más de dos órdenes de magnitud inferiores.

Cinética de bioconcentración del sildenafil en *C. decemmaculatus*

La concentración de exposición promedio en el agua del ensayo, medida durante la fase de exposición arrojó un valor de $82 \pm 3,3$ (n=3) $\mu\text{g l}^{-1}$. En la [Tabla II.3.](#), se muestran las concentraciones empíricas de bioacumulación del SIL en *C. decemmaculatus*. En el mismo se puede observar que la concentración medida en el tejido se incrementó hasta el día 7 (último día de la fase de exposición), alcanzando un valor de $1738 \pm 106,3$ $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=3), lo que significa un factor de bioconcentración de 21,2 veces en el pez respecto a la concentración en el agua. En cuanto al último día de ensayo (fase de depuración) se puede observar que la concentración se redujo hasta 7 veces la concentración más alta alcanzada, descrita previamente, alcanzando un valor de 221 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Los resultados descritos previamente, permiten observar claramente los procesos de incorporación y eliminación del SIL en la especie utilizada.

Tabla II.3. Valores empíricos de bioconcentración de SIL en *C. decemmaculatus*

Fase	t (d)	Ct ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	ES	n	C _{ai} ($\mu\text{g l}^{-1}$)	C _{af} ($\mu\text{g l}^{-1}$)
	0 (CTL)	<LDM		2	81,6	1,28
Exposición	1	482	$\pm 54,3$	2		
	3	593	$\pm 25,4$	3		
	5	806	$\pm 83,4$	3		
	7	1769	$\pm 106,3$	3		
Depuración	9	724	± 226	3		
	11	221	$\pm 3,04$	2		

t: tiempo en el que se recolectaron las muestras de peces (días), C_t : concentración en tejido correspondiente a cada tiempo de ensayo, ES: error estándar, n: número de muestras, C_{ai} : concentración media de SIL en agua al inicio del ensayo, C_{af} : concentración media de SIL en agua al final del ensayo

Los parámetros estimados para la fase de acumulación depuración a partir del modelo cinético se muestran en la [Tabla II.4](#).

Tabla II.4. Parámetros del modelo cinético de bioconcentración ajustado a los datos de acumulación de SIL en *C. decemmaculatus*

Fase acumulación.				Fase eliminación.	
k_1 (l kg ⁻¹ h ⁻¹)	C_{tinf} (µg kg ⁻¹)	BCF_{Mod} (l kg ⁻¹)	t_{lag} (d)	k_2 (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (d)
5,52	800	10,6	0	0,52	1,3

k_1 : constante de acumulación, k_2 : constante de eliminación, C_{tinf} : concentración a tiempo infinito estimada por el modelo, BCF_{Mod} : Factor de Bioconcentración estimado por el modelo cinético, t_{lag} : tiempo de latencia, $t_{1/2}$: tiempo medio de eliminación

El resultado del modelado de la cinética de bioconcentración del SIL, correspondiente a la fase de acumulación, se muestra en la [Figura II.5](#). El ajuste del modelo dado por el coeficiente de correlación de Pearson fue de 0,92, mostrando un buen ajuste a los datos experimentales. Entre los parámetros estimados, se puede observar que la concentración media, a tiempo infinito estimada por el modelo fue de 800 µg kg⁻¹, siendo aproximadamente la mitad de la concentración máxima realmente medida en el tejido. La constante de acumulación (k_1) y el BCF estimados por el modelo fueron de 5,52 l kg⁻¹ h⁻¹ y 10,6 l kg⁻¹ respectivamente. Por tanto el BCF estimado por el modelo fue aproximadamente la mitad del valor empírico obtenido con la concentración medida en el tejido al 7^{mo} día de exposición. Por otro lado, el valor de BCF estimado según el K_{ow} del SIL, utilizando un valor de log K_{ow} igual a 3,18 ([Gobry](#)

et al., 2000), resultó en un valor de 72,6. Por tanto, las diferencias entre la estimación del BCF a partir del K_{ow} respecto a los valores empíricos y estimados por el modelo cinético fueron de aproximadamente 4 veces y 7 veces mayores.

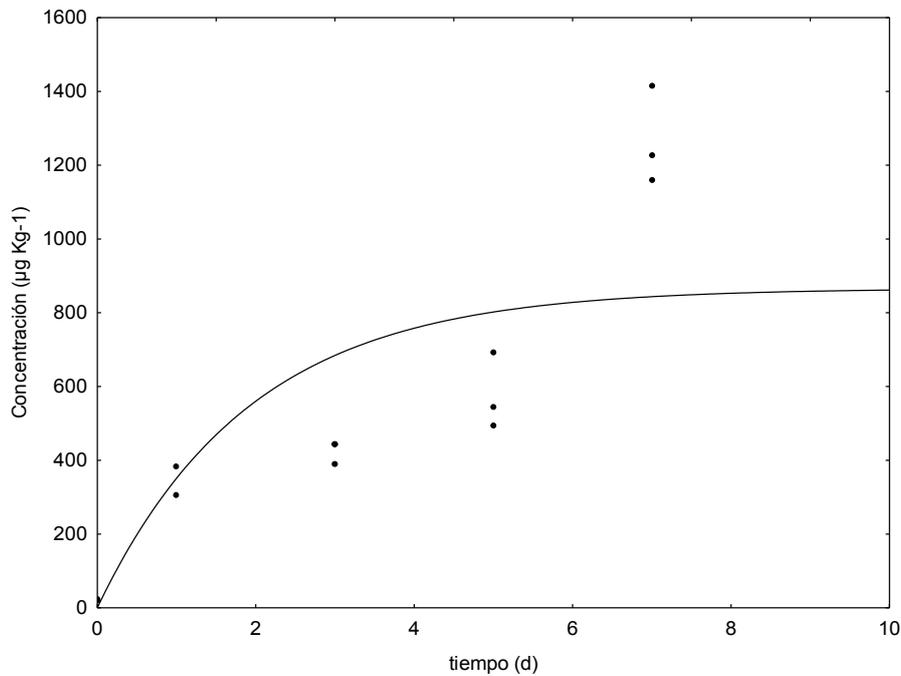


Figura II.5. Fase de acumulación del SIL en *C. decemmaculatus*

En la [Figura II.6.](#) se muestra el ajuste del modelo cinético durante la fase de depuración. La constante de eliminación estimada por el modelo (k_2) fue de $0,52 \text{ h}^{-1}$. El ajuste de la curva de eliminación mostró un coeficiente de correlación de Pearson de 0,92, indicando un buen ajuste. Mientras que el tiempo medio de eliminación ($t_{1/2}$) fue de 1,3 d. Los parámetros del modelo descritos previamente, se muestran en la [Tabla II.4.](#)

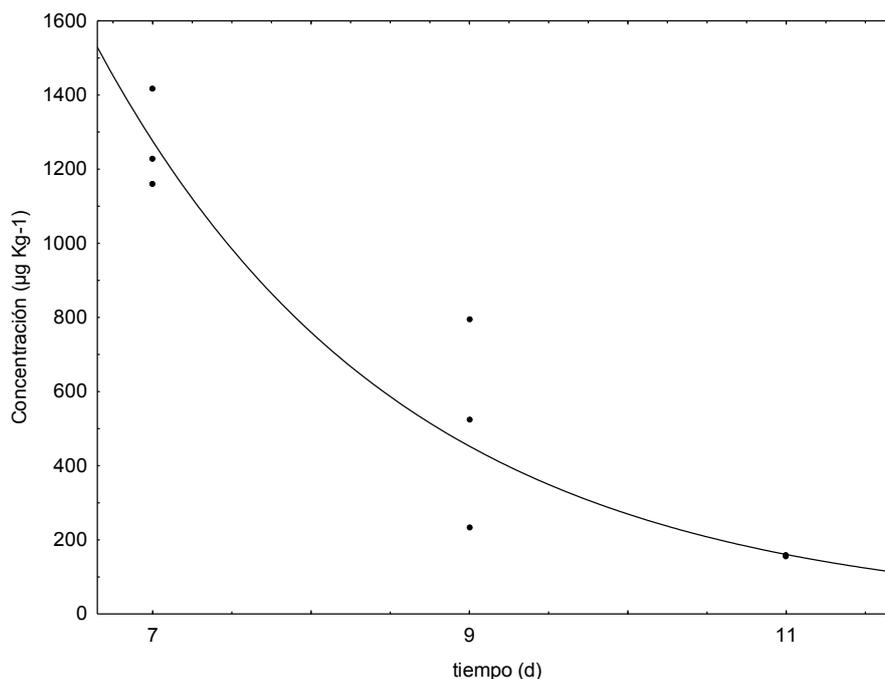


Figura II.6. Fase de eliminación del SIL en *C. decemmaculatus*

Cinética de bioconcentración del sildenafil en *P. mesopotamicus*

La concentración promedio de sildenafil en el agua del ensayo medida durante la fase de exposición fue de $32,3 \pm 1,08 \mu\text{g l}^{-1}$ ($n=3$). En la [Tabla II.5](#), se muestran los valores empíricos de bioconcentración del SIL en *P. mesopotamicus* obtenidos durante la fase de exposición y depuración del ensayo. Se puede ver que la concentración detectada en el tejido en el último día de exposición (día 6) fue de $241 \pm 43,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=8$), indicando, en relación a la concentración medida en el agua de ensayo, un BCF empírico al final de la fase de exposición de aproximadamente 7,5. Por otra parte, la concentración detectada en el último día de ensayo (fase de depuración) fue de $92 \pm 5,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=8$), siendo aproximadamente la mitad de la concentración detectada en tejido al último día de exposición (día 6). Los valores obtenidos de acumulación de SIL en el músculo, mostraron claramente los procesos de acumulación y eliminación del compuesto en *P. mesopotamicus*.

Tabla II.5. Valores empíricos de bioconcentración de SIL en *P. mesopotamicus*

Fase	t (d)	Ct ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	ES	n	C _{ai} ($\mu\text{g l}^{-1}$)	C _{af} ($\mu\text{g l}^{-1}$)
Exposición	0 (CTL)	<LDM		6	32,3	0,15
	2	0,4	$\pm 0,1$	8		
	4	25	$\pm 7,2$	7		
	6	241	$\pm 43,4$	8		
Depuración	8	102	$\pm 13,8$	9		
	10	92	$\pm 5,6$	8		

t: tiempo en el que se recolectaron las muestras de peces (días), Ct: concentración en tejido correspondiente a cada tiempo de ensayo, ES: error estándar, n: número de muestras, C_{ai}: concentración media de SIL en agua al inicio del ensayo, C_{af}: concentración media de SIL en agua al final del ensayo

Los parámetros del modelo cinético de bioconcentración del SIL obtenidos a partir del experimento con *P. mesopotámicus* se muestran en la [Tabla II.6](#).

Tabla II.6. Parámetros del modelo cinético de bioconcentración del SIL en *P. mesopotamicus*

k_1 ($\text{l kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Fase acumulación			Fase eliminación	
	C _{tinf} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	BCF _{Mod} (l kg^{-1})	t _{lag} (d)	k ₂ (h^{-1})	t _{1/2} (d)
5,30	616	19,1	3,8	0,28	6,4

k₁: constante de acumulación, k₂: constante de eliminación, C_{tinf}: concentración a tiempo infinito estimada por el modelo, BCF_{Mod}: Factor de Bioconcentración estimado por el modelo cinético, t_{lag}: tiempo de latencia, t_{1/2}: tiempo medio de eliminación

La fase de bioconcentración del SIL estimada por el modelo cinético para *P. mesopotamicus* se muestra en la [Figura II.7](#). El coeficiente de correlación de Pearson fue de 0,52, indicando una estimación del modelo con mayor grado de incertidumbre debido a que el tiempo de experimentación fue menor al requerido para alcanzar el

“plateau”. Además, el modelo muestra que el proceso de acumulación en esta especie posee un tiempo de latencia de 3,8 d. La concentración a tiempo infinito y la constante de acumulación (k_1) estimadas por el modelo fueron de $616 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $5,3 \text{ l kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. De acuerdo con estos valores, el BCF estimado a partir del modelo cinético fue de $19,1 \text{ l kg}^{-1}$. Por otra parte, el BCF estimado con el K_{ow} del compuesto, empleando el $\log K_{ow}$ reportado por [Gobry et al. \(2000\)](#), fue de 72,6. Por lo tanto, el valor de BCF empírico fue 2,5 y 10 veces menor al estimado por el modelo cinético y el K_{ow} , respectivamente.

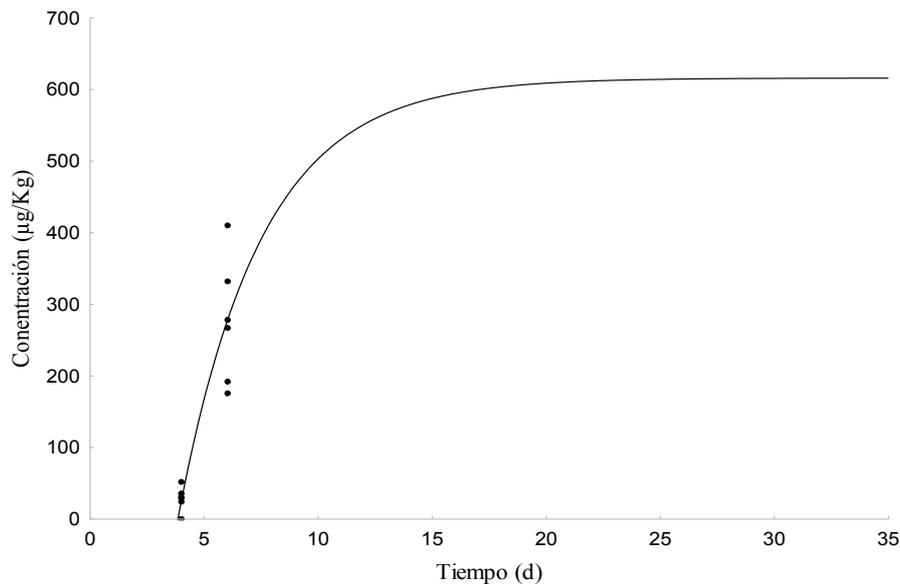


Figura II.7. Fase de acumulación del SIL en *P. mesopotamicus*

El ajuste del modelo cinético a la fase de depuración se muestra en la [Figura II.8](#). El coeficiente de correlación de Pearson fue de 0,95, indicando un buen ajuste del modelo a los datos experimentales. La constante de eliminación (k_2) y el tiempo medio de acumulación ($t_{1/2}$) estimados por el modelo en la fase de eliminación fueron de $0,28 \text{ h}^{-1}$ de 6,4 d, respectivamente.

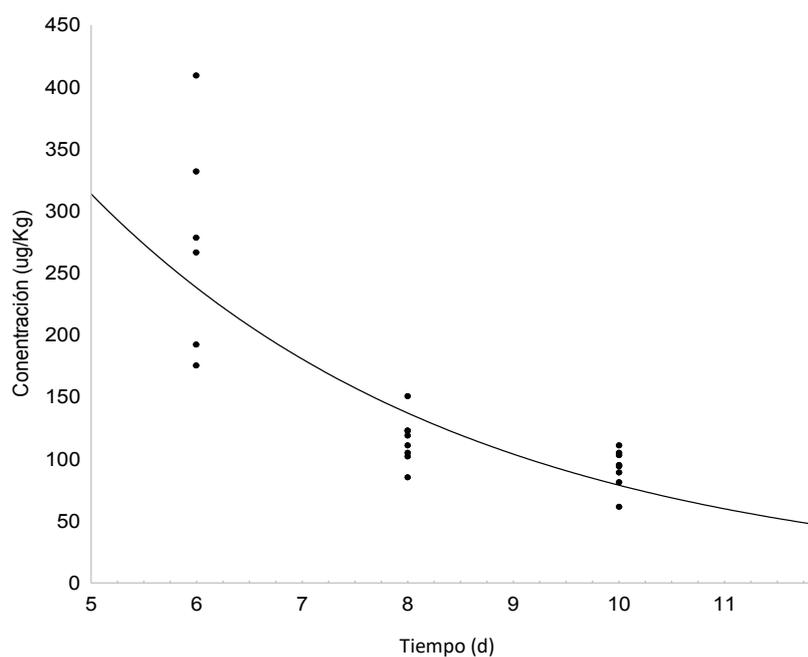


Figura II.8. Fase de eliminación del SIL en *P. mesopotamicus*

Discusión

Rendimiento del método

En comparación con los porcentajes de recuperación para CBZ, ENA y SIL obtenidos en las muestras de músculo de peces recolectados en la Cuenca del Plata, presentados en la Sección 2 del Capítulo I, los valores obtenidos en las especies ensayadas en condiciones de laboratorio fueron similares para CBZ pero mayores para ENA y SIL. Por lo tanto, los LDM y LCM ($\mu\text{g kg}^{-1}$) fueron un orden de magnitud menores. Las diferencias encontradas para ENA y SIL podrían deberse a características diferentes (ej. porcentaje lipídico, hábitos tróficos, mecanismos de incorporación depuración) en los tejidos de las distintas especies de peces. Para la

especie estudiada no se calculó el porcentaje lipídico, por lo cual podría ser una posible punto de partida para futuros estudios en la especie *C. decemmaculatus*.

Bioconcentración de CBZ, ENA y SIL

Durante los ensayos estáticos de bioconcentración de CBZ, ENA y SIL, las concentraciones de los fármacos en agua decayeron notablemente durante las 96h de exposición. Ello podría deberse a la incorporación de tales compuestos por los peces o su degradación, por lo cual sistemas de flujo continuo o con renovaciones más frecuentes del medio, serían más apropiados para una mejor estimación de la bioconcentración. Además de implementar un control de solución, sin peces, sobreagregada con la misma concentración de SIL y bajo las mismas condiciones de laboratorio que el ensayo.

Las concentraciones promedio en los peces y el BCF de los fármacos estudiados en *C. decemmaculatus* luego de 96h de exposición mostraron el siguiente orden CBZ~SIL>ENA. Si consideramos que los log K_{ow} publicados para cada una de estas sustancias son 2,77, 3,18 y 0,07, respectivamente (Gobry et al., 2000; Hansch et al., 1995; Huerta et al., 2013) y que los pKa son de 1 y 13,9 para CBZ (Bizi, 2019), 6,78 y 9,12 para SIL (Gobry et al., 2000) y de 3 y 5,5 para ENA (Loftsson et al., 2010b).

De ello puede inferirse que no habría una correspondencia directa entre el log K_{ow} y el BCF de CBZ y SIL, mientras que para ENA su bajo log K_{ow} concuerda con su baja bioconcentración. La diferencia entre los niveles de acumulación entre CBZ y SIL, respecto de sus log K_{ow} , podría ser explicado quizá por sus pKa, ya que al pH de ensayo (7,2) la CBZ se encuentra totalmente como una especie neutral y puede

incorporarse de forma pasiva, mientras que a ese pH es muy probable que una fracción del SIL se encuentre aún con carga positiva.

La concentración en el organismo y el BCF obtenido para CBZ fueron similares a los reportados para otra especie de pez pequeño, *Gambusia affinis*, expuesto a una concentración de exposición de 100 µg l⁻¹ durante 96 h (Valdés et al., 2014). Por otro lado, no se encontraron trabajos previos que hayan estudiado la bioconcentración de ENA y SIL en condiciones de laboratorio.

Finalmente, en comparación con diferentes criterios internacionales establecidos por la agencia ambiental de Canadá y Estados Unidos, la Unión Europea o las Naciones Unidas, en la que se consideren “bioacumulables” o “muy bioacumulables” aquellas sustancias con valores de BCF entre 1000 y 5000, los valores de BCF obtenidos para los tres fármacos estudiados indicarían que estos compuestos poseerían un bajo potencial de bioconcentración en los peces y no serían catalogados como “bioacumulables” (Arnot and Gobas, 2006).

Cinéticas de acumulación y eliminación del sildenafil en *C. decemmaculatus* y *P. mesopotamicus*

Pese a que los modelos cinéticos han sido desarrollados a partir de compuestos orgánicos neutros, y que una fracción del SIL podría estar ionizada al pH ensayado, el modelo utilizado se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales. Ello fue particularmente cierto para el experimento con *C. decemmaculatus* donde, al no haber un período de latencia se obtuvieron varios puntos en el tiempo para ajustar el modelo. En cambio, en el caso de *P. mesopotamicus*, el tiempo de latencia condujo a que menos puntos pudieran ser incorporados al modelo y por tanto el ajuste fue menor y,

en consecuencia, la estimación de los parámetros menos precisa. Pese a ello, varios parámetros estimados a partir del modelo (Ej. k_1 , C_{tinf} y el BCF_{Mod}) fueron semejantes para ambas especies, brindando mayor grado de confianza sobre los parámetros estimados. Por otro lado, otros parámetros (k_2 y $t_{1/2}$) fueron característicos para cada una de las dos especies estudiadas.

Pese a las diferencias de tamaños entre las dos especies y de los tejidos analizados, las concentraciones máximas a tiempo infinito estimadas por el modelo fueron semejantes en *C. decemmaculatus* y *P. mesopotamicus*, considerando las diferencias en las concentraciones reales de SIL medidas durante cada ensayo. En consecuencia, los BCF estimados para ambas especies estuvieron también dentro del mismo orden de magnitud.

Esta similitud de BCF entre especies contrastó con las diferencias en los valores de BCF obtenidos para *C. decemmaculatus* en el experimento a 96h y el experimento de cinética de bioconcentración. En este último el valor fue un orden de magnitud mayor que el medido en los ensayos estáticos a 96h. Ello podría explicarse por un lado por un aspecto metodológico, dado el recambio del medio realizado en los experimentos de cinética, y por otro, dado por la cinética de acumulación, que muestra que para el SIL el “plateau” se alcanzaría a tiempos mayores (>10d) que las 96h ensayadas en el primer experimento.

Por otra parte, una característica diferencial en la cinética de bioconcentración del SIL entre ambas especies fue el tiempo de latencia. Para *P. mesopotamicus* se observó un lapso de varios días antes que el fármaco se acumule a niveles detectables, mientras que en *C. decemmaculatus* la acumulación fue más rápida, detectándose el fármaco en los tejidos ya al primer día de exposición. Un factor que podría explicar esta diferencia, son las diferencias en la velocidad y/o mecanismos de incorporación

de compuestos, que pueden diferir según la especie ([McCallum et al., 2019](#)). Sin embargo, la constante de incorporación (k_1) fue semejante en ambas especies mientras que la de eliminación (k_2) fue incluso aproximadamente el doble en *C. decemmaculatus* que en *P. mesopotamicus*. Por consiguiente, se hubiese esperado una mayor velocidad de acumulación en esta última especie. Entonces, otros factores deberían explicar la diferencia encontrada en el tiempo de latencia. Una posibilidad podría ser la diferencia de peso entre los individuos ensayados de las dos especies. Dado que el peso promedio de cada individuo de *P. mesopotámicus* fue más de 100 veces el de *C. decemmaculatus*, ello podría causar un fenómeno de “dilución” del fármaco incorporado y retrasar así el tiempo de acumulación hasta que la concentración en el tejido fuera detectable.

Otro aspecto distinto entre ambas especies fue el tiempo de vida media de depuración. En *P. mesopotamicus* fue 6 veces mayor que en *C. decemmaculatus*, siendo similar a los 6,4 d reportados por [Paterson and Metcalfe \(2008\)](#) para fluoxetina en el pez *Oryzias latipes*. El mayor tiempo medio del SIL en *P. mesopotámicus* se explica por el menor valor de k_2 estimado para esta especie y reflejaría una menor capacidad de biotransformación y eliminación del fármaco. En consecuencia, ello indicaría una mayor capacidad de acumulación. Sin embargo, los valores de BCF estimados estuvieron dentro del mismo orden de magnitud para ambas especies, indicando que la diferencia en la capacidad de eliminación, dado por el valor de k_2 , entre especies no sería de gran relevancia al momento de alcanzar el equilibrio.

Conclusiones parciales

- El método analítico adaptado para las especies estudiadas resultó satisfactorio, con recuperaciones aún mayores que las obtenidas para especies estudiadas a campo.
- Los valores de BCF empíricos indican una capacidad de bioconcentración para los fármacos estudiados en el siguiente orden: CBZ~ SIL>ENA en *C. decemmaculatus*.
- Los valores de BCF para SIL en *C. decemmaculatus* fueron un orden de magnitud mayor para la estimación del BCF por medio del modelo cinético a tiempo infinito, respecto al BCF empírico obtenido a las 96 h, indicando que se requiere un tiempo mayor a una semana para que se alcance el equilibrio.
- La cinética de bioconcentración del SIL, fue diferente en la fase de acumulación para *C. decemmaculatus* y *P. mesopotámicus*, presentando la segunda especie un periodo de latencia que no posee la primera especie. Además, la fase de depuración también fue diferente en cuanto a que el tiempo medio de depuración fue mayor para *P. mesopotámicus* que para *C. decemmaculatus*. Sin embargo, las concentraciones a tiempo infinito y el BCF fueron similares para ambas especies. Todo ello indica que si bien varía la velocidad con la que el fármaco se bioconcentra en cada especie, ambas alcanzan valores de bioconcentración comparables en el equilibrio.
- De acuerdo a nuestro saber, este sería el primer aporte disponible en la actualidad a nivel internacional que provee de valores empíricos de BCF para el SIL y ENA, y que describe la cinética de bioconcentración del SIL en peces.

Sección II. Bioensayos en condiciones de campo

Introducción

Los ensayos de campo son una herramienta importante para comprender la relación entre la exposición de los organismos a sustancias químicas y los posibles efectos en la salud de los mismos. Muchas especies pueden utilizarse como bioindicadores para evaluar dichos efectos. Particularmente los peces, son relativamente sensibles y se utilizan ampliamente como indicadores del impacto de los xenobióticos a varios niveles de respuesta ([Van der Oost et al., 2003](#)).

La capacidad de los estudios ecotoxicológicos para predecir peligros y prevenir accidentes ecológicos, sigue siendo limitada. Esto se debe, en parte, a las dificultades logísticas en cuanto al estudio de especies silvestres y al desafío de extrapolar los datos generados en condiciones controladas de laboratorio a la diversidad del campo. Las principales dificultades se encuentran en la predicción de los efectos de un contaminante a nivel población; debido a que hay múltiples factores de estrés y otros contaminantes en el ambiente que afectan a las poblaciones, en la detección de los compuestos exógenos, debido a la amplia gama de este tipo de compuestos presentes en el ambiente y la extrapolación de los efectos de los mismos a otras especies ([Rattner, 2009](#)).

Los movimientos migratorios de muchas especies de peces, ya sea por razones de alimentación y/o de reproducción, crean incertidumbre acerca de la representatividad sobre la calidad del agua o del estado ambiental del sitio donde se realizó la captura. Sin embargo, las especies migradoras pueden mostrar un gradiente de contaminantes en un sector del río y brindar información útil a escalas regionales ([Speranza et al., 2012](#)). Un individuo podría haber ingresado recientemente al área de captura, desde

otras áreas más o menos contaminadas, y así reflejar la carga de contaminantes acumulados de un sitio anterior. Es por ello, que los estudios *in situ*, permiten el conocimiento preciso de la calidad ambiental del lugar y el tiempo preciso de la exposición. Es importante destacar que, en comparación con los peces autóctonos capturados en la misma área contaminada, los peces expuestos *in situ*, pueden estar expuestos de manera diferente a los contaminantes. Además estos individuos, sólo pueden obtener cantidades limitadas de alimentos propios de su ambiente natural, por lo tanto, la absorción de sustancias químicas a través de los alimentos probablemente difiera de la de los peces salvajes (Oikari, 2006).

La principal fuente de exposición a los compuestos farmacéuticos en los cuerpos de agua superficial se debe a las descargas de agua residuales sin previo tratamiento o con tratamientos deficientes. La tasa semanal de descarga de productos farmacéuticos a las aguas receptoras, luego de atravesar las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) municipales, puede alcanzar niveles de hasta 200 g l⁻¹, como se reporta para el antibiótico trimetoprima en Umeå, Suecia (Lindberg et al., 2005).

Si bien la absorción de compuestos ionizables, como los fármacos humanos, en los peces es rápida, alcanzando condiciones de estado estable en unos pocos días, hay un interrogante en relación al comportamiento de estas sustancias en condiciones de campo (Sims et al., 2020). Es por ello que diversos autores han utilizado los ensayos *in-situ* de exposición, para evaluar el impacto toxicológico en peces, producido por los efluentes de aguas residuales (Muir et al., 2017; Pérez et al., 2018; Simmons et al., 2017).

Hipótesis específica

Los factores de bioconcentración de los fármacos en peces expuestos en condiciones de campo difieren de los estimados en el laboratorio dado que contempla un espectro más amplio de rutas de exposición y factores que modifican la biodisponibilidad de tales compuestos.

Objetivos específicos

- Estudiar la cinética de acumulación y eliminación de fármacos humanos en la especie *C. decemmaculatus*, utilizando ensayos de campo *in-situ*, en cuerpos de aguas receptores de efluentes cloacales y compararlo con las concentraciones de dichos fármacos en el agua de forma tal de poder calcular los factores de bioacumulación a campo.

Materiales y métodos

Área de Estudio y características regionales

El área de estudio para realizar los ensayos de exposición *in situ* utilizando jaulas, fue la zona de la desembocadura del Arroyo del Gato, un arroyo que forma parte de la cuenca del Río Santiago (tributario del Río de la Plata), siendo su principal afluente por extensión y caudal. El Arroyo atraviesa los Partidos de La Plata y Ensenada, donde desemboca en un corto arroyo denominado El Zanjón, para finalmente desaguar en el Río Santiago. El mismo tiene una longitud de aproximadamente 21 km y se encuentra impactado por un denso desarrollo urbano-industrial en torno a su cauce. Este arroyo vehiculiza tanto descargas industriales y cloacales, muchas de

ellas clandestinas, de los partidos de La Plata y Ensenada. Tanto el arroyo como el resto de los cursos de agua que integran la Cuenca del Río Santiago, están sujetos a diversos usos, incluido actividades recreativas con o sin contacto directo (clubes náuticos, pesca recreativa). El conjunto de estas actividades desarrolladas en la cuenca ha llevado a una explotación intensa del recurso hídrico, generando modificaciones en las características hidrodinámicas y ecológicas del mismo (SPA, 2009).

Se seleccionaron tres sectores del Río Santiago a diferentes distancias de la desembocadura del Arroyo del Gato (Figura II.9. y Figura II.10.). El Sector 1 (S1), más próximo a la desembocadura, el Sector 2 (S2) comprende la zona del “espejo”, situado en el área del Club de Regatas de La Plata a unos 600 m de la desembocadura y el Sector 3 (S3) sobre el canal Santiago, a 2000 m de la desembocadura.

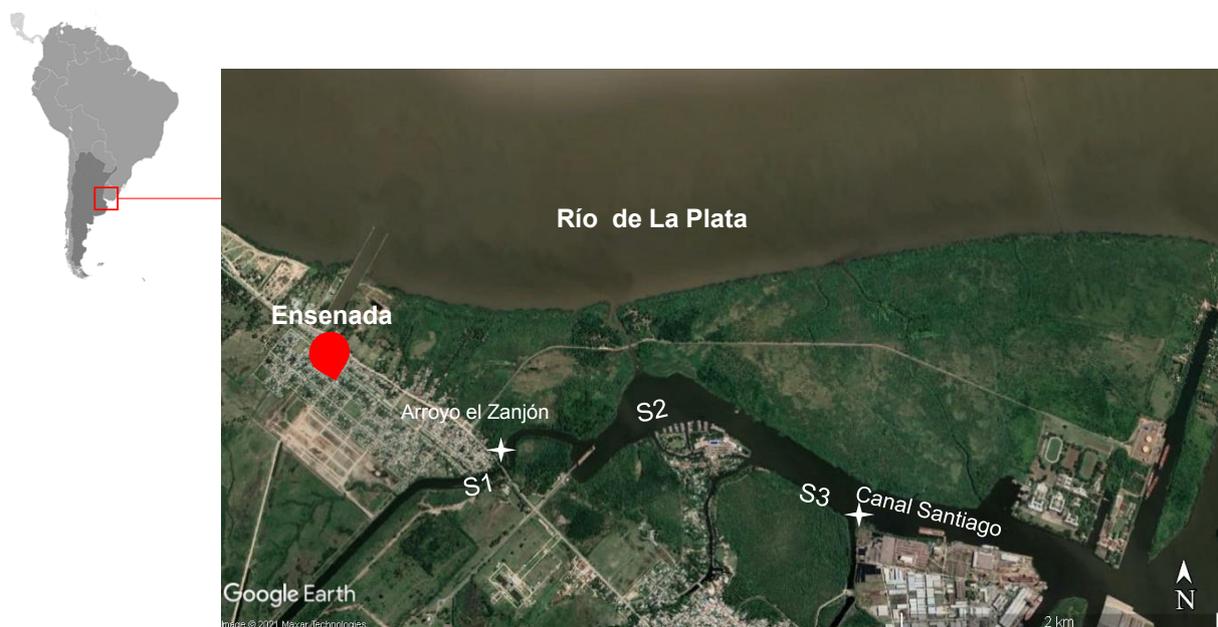


Figura II.9 Sectores de estudio en la localidad de Ensenada



Figura II.10. De Izq. a Der. Sector de estudio 1, 2 y 3

Especie seleccionada y material utilizado

Se seleccionó la especie de *C. decemmaculatus* por la factibilidad de su captura y la simplicidad de mantenimiento en condiciones de laboratorio. Para la realización del ensayo en campo, se construyó una jaula utilizando un recipiente de polietileno, con 4 orificios rectangulares a lo largo de su circunferencia cubiertos por una malla, permitiendo el paso del agua al interior del mismo (Figura II.11.). Al momento de colocar los peces en el recipiente, se colocó una bolsa hermética de polietileno con piedras como contrapeso, permitiendo que se hunda en el cuerpo de agua (Figura II.12.). Los peces fueron transportados desde el laboratorio a los sitios de exposición (en bote durante <1 h) en frascos de vidrio (3 L) con agua de cloro. Se colocaron tres jaulas con 10 peces cada una en cada uno de los sitios. Las jaulas de polietileno (0,38 m × 0,26 m × 0,28 m, 20-dm³) se sumergieron por completo para permitir la circulación del agua y el contacto de sedimentos para la alimentación de los peces. A los días 7 y 14 de colocadas, se tomaron las muestras de 5 peces de cada jaula. Se adormecieron en agua con hielo, se almacenaron en bolsas herméticas de calidad alimentaria debidamente rotuladas y se trasladaron refrigerados hasta el laboratorio, donde se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

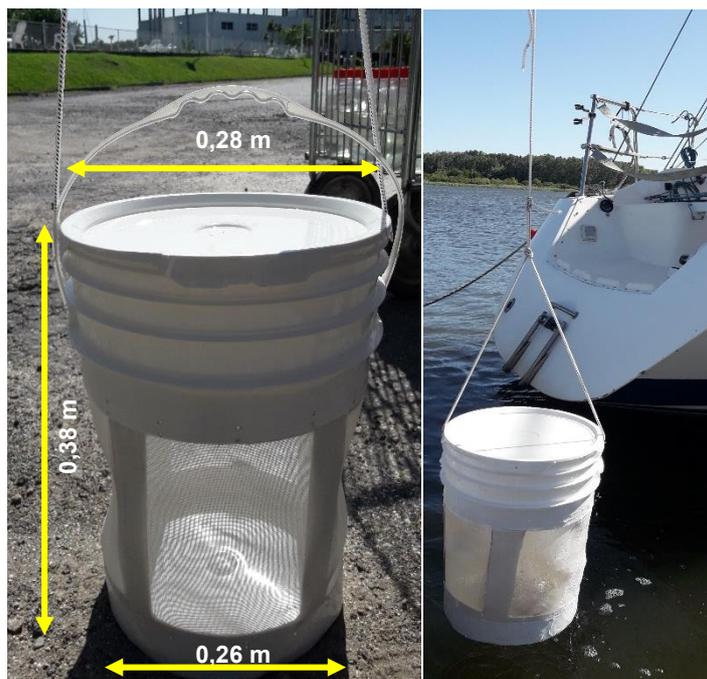


Figura II.11. Jaulas utilizadas para el ensayo de campo

Complementariamente, cada 48 h durante todo el ensayo, se analizaron los valores de pH, amonio y oxígeno en cada sitio y se tomaron muestras de agua con el fin de medir la concentración promedio de los fármacos en el agua. Las muestras fueron filtradas en el lugar y sobreagregadas con una mezcla de estándares isotópicamente marcados (atenolol-d7 y carbamazepina-13C 15N). Un total de 80 ml de muestra se filtró a través de filtros de membrana de celulosa de 47 mm, tamaño de poro de 0,45 μm y se colocaron en frascos color caramelo de 150 ml que fueron sobreagregados con la mezcla de estándares marcados ($100 \mu\text{g l}^{-1}$). Luego colocadas en hielo y llevadas a laboratorio donde fueron extraídas dentro de las 24 h. Debido a los costos de la extracción y los análisis, las muestras fueron luego integradas en 3 muestras correspondientes a tiempo inicial, intermedio y final.



Figura II.12 Interior de las jaulas previo al ensayo

Estándares y reactivos

Los estándares farmacéuticos de Parafarm® de alta pureza (90%) se obtuvieron de Saporiti, Argentina. Los patrones internos atenolol-d7 y carbamazepina-13C 15N se compraron de Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Las soluciones madre individuales se prepararon en metanol a una concentración de 1000 mg l⁻¹ y se almacenaron a -20°C. La acetona de grado analítico se obtuvo de Cicarelli Co y el acetato de etilo fue JT Baker®. El acetonitrilo y el metanol de grado HPLC utilizados para la fase móvil cromatográfica fueron Carlo Erba. El formiato de amonio al 99% de pureza, fue adquirido de Sigma-Aldrich y el ácido fórmico al 88% de pureza, en Cicarelli Co.

Procesamiento de muestras y análisis químico

La metodología utilizada para la extracción de los fármacos en el tejido de ambas especies fue la de “Método del Extractor Rotatorio” ([Ramírez et al., 2007](#)) previamente

descrita en el Capítulo I-Sección 2. Para conformar la muestra compuesta en *C. decemmaculatus*, se utilizó el cuerpo entero de cada pez.

Referido a las determinaciones de los fármacos en agua, se utilizó la técnica extracción en fase sólida (SPE, de sus siglas en inglés) desarrollada por [Elorriaga et al. \(2013a\)](#). La SPE se realizó con cartuchos Oasis HLB® (60 mg/3 ml de Waters Corp.) pre-acondicionados con metanol y agua nanopura y eluidos con metanol. Los extractos se llevaron a sequedad bajo un flujo suave de nitrógeno y se resuspendieron en metanol/agua nanopura (1:1). Las muestras se analizaron utilizando HPLC-MS.

Análisis de los resultados

El diseño experimental empleado en el estudio consistió en un arreglo bifactorial (distancia y tiempo de exposición) de 9 tratamientos realizados por triplicado (3 sitios, 3 tiempos de muestreo y 3 réplicas con 5 peces por réplica) ([Figura II.13](#)). Los datos de concentración de los fármacos en el agua y en los peces se expresaron como la media aritmética y el error estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo con un Análisis de la Varianza (ANOVA) de dos vías. El nivel de significancia fue $\alpha \leq 0,05$.

Para cada fármaco y cada tratamiento, se calcularon los factores de bioacumulación (BAF, de sus siglas en inglés) como el cociente entre la concentración promedio en el agua y en los peces. Las concentraciones de cada fármaco en los peces y sus BAF se correlacionaron con variables fisicoquímicas de las sustancias (K_{ow} , pKa, etc) y del ambiente (pH, amonio, etc.)

Diseño experimental

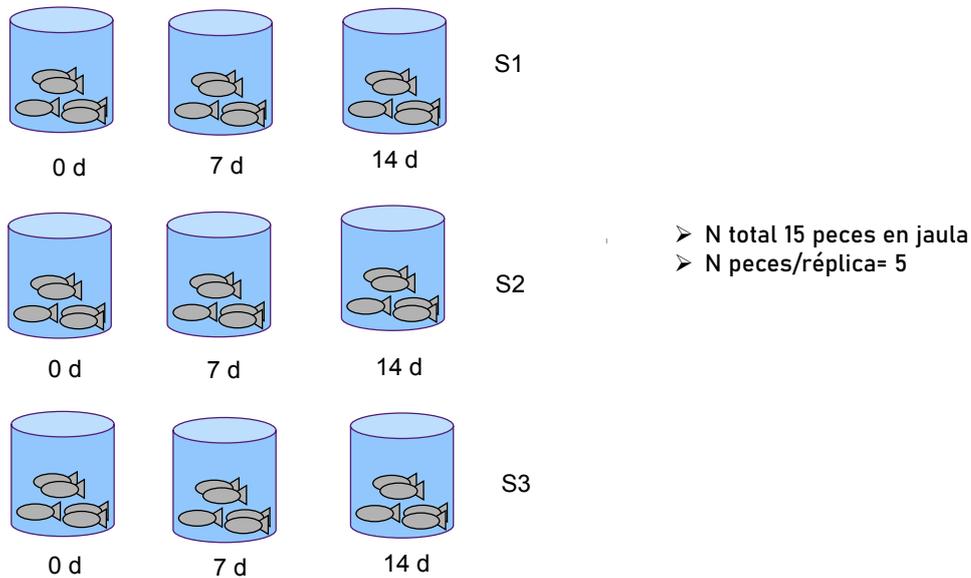


Figura II.13 Diseño de muestreo

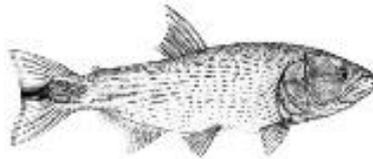
Resultados

Bioensayos en condiciones de campo

Dado que los análisis de las muestras han sido interrumpidos producto de las medidas de aislamiento social preventivo obligatorio (ASPO, de sus siglas en español) impuestas desde el Gobierno Nacional a partir del 20 de marzo de 2020, los resultados de esta sección se completarán en cuanto el contexto actual sanitario lo permita. Las extracciones tanto en tejido como en agua se encuentran realizadas y almacenadas. Se han incluido las actividades realizadas porque consideramos completaban una parte importante de esta tesis y representan un testimonio de las consecuencias de la pandemia COVID-19.

Capítulo III

Estudio de la toxicodinámica de los fármacos humanos en peces



Sección I. Evaluación de la actividad enzimática en peces de campo

Introducción

Evaluar el impacto de los contaminantes en la salud de los organismos y ecosistemas acuáticos es un desafío debido a la complejidad del mismo y a la presencia de múltiples factores estresantes. El hígado es el principal órgano que participa en la detoxificación de contaminantes, interfiere en la homeostasis metabólica y en los procesos de síntesis, metabolismo, almacenamiento y redistribución de carbohidratos, proteínas y lípidos (Bechmann et al., 2012). En este sentido es que los biomarcadores se han utilizado ampliamente para proporcionar la conexión entre niveles externos de exposición a contaminantes, niveles internos de contaminación de tejidos y efectos adversos tempranos en organismos. Son considerados como señales de 'alerta temprana' que tienen el potencial de detectar efectos en la biota antes que se observen en la población, comunidad o a nivel del ecosistema. Por lo tanto, el uso de biomarcadores puede ser utilizado como evidencia crítica para comprender las relaciones entre los factores estresantes y los efectos sobre la biota, y de esta manera prevenir impactos perjudiciales en la estructura y función del ecosistema. En particular, para los fármacos se ha señalado que los efectos farmacodinámicos que han sido clasificados como secundarios y considerados irrelevantes para el humano, podrían ser potencialmente importantes en los organismos no mamíferos (Laville et al., 2004). En consecuencia, los productos farmacéuticos pueden ser motivo de preocupación en especies acuáticas. Dado que los peces poseen sistemas enzimáticos y receptores similares a los mamíferos, los

mecanismos bioquímicos y fisiológicos de activación/desactivación que producen los fármacos en los humanos, podrían generar efectos adversos en este grupo de vertebrados (Huggett et al., 2003).

Uno de los biomarcadores bioquímicos mejor estudiado hasta el momento es la inducción de monooxigenasas dependientes del CYP 450. Payne and Penrose (1975 y Payne (1976) fueron los primeros en hacer uso de este sistema enzimático como biomarcador, informando una elevada actividad de CYP 450 en peces de sitios contaminados con petróleo en el medio ambiente acuático. Posteriormente, se produjo un salto en la aplicación de CYP 450 en estudios de campo, concentrándose principalmente en la medición de las actividades enzimáticas del CYP 4501A y los niveles totales de CYP 450 (Bucheli and Fent, 1995).

El complejo del CYP 450, o sistema de monooxigenasas de función múltiple, está comprendido por más de 100 genes que codifican para diferentes isoformas de enzimas caracterizadas por contener un grupo hemo en su estructura y es considerado como parte fundamental del sistema de biotransformación de fase I, en el cual los sustratos naturales o exógenos (contaminantes) son oxidados según la reacción general $RH + O_2 + NADPH+H \rightarrow ROH + H_2O + NADP^+$ para hacer más solubles y reactivos a los metabolitos resultantes, favoreciendo así su excreción directa o conjugación por las enzimas del sistema de biotransformación de fase II, tales como la glutatión-S-transferasa (GST) (Di Giulio et al., 1995).

Una de las isoformas más utilizadas como biomarcador en estudios ecotoxicológicos es la codificada por el gen CYP 1A y medida fluorométricamente a través de la actividad de 7-etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD) (Quabius et al., 2001). Una gran cantidad de experimentos de laboratorio, estudios de campo simulados y estudios de campo reales, han examinado la inducción de EROD en más de 150 especies de

peces. La medida de la actividad de esta enzima se utiliza como biomarcador de exposición en especies de peces (Whyte et al., 2000). Esta enzima representa la respuesta biológica temprana de los organismos ante una perturbación ambiental porque juega un papel clave en el proceso de detoxificación y excreción de contaminantes dado que es específicamente inducida a través del receptor arilo por los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Gagnon y Rawson, 2017). Otra isoforma del CYP 450 es la evaluada mediante la actividad de la benziloxiresorufina-O-depentilasa (BROD) que generalmente se asocia en mamíferos a la expresión del gen CYP 3A1 y que suele ser inducida mediante el receptor de dexametasona (DEX) y receptor X de pregnano (PXR) (Honkakoski and Negishi, 2000). En humanos esta isoforma cataliza el 50% de los fármacos (Stresser et al., 2000). Es importante considerar que en peces pueden existir diferencias respecto a la especificidad de las isoformas y sus inductores respecto a mamíferos y otros vertebrados (Stegeman, 1989). En particular, se ha demostrado que los fármacos no sólo son metabolizados por diferentes isoformas el CYP 450, sino que son capaces de modular la expresión génica y la actividad enzimática, induciendo o inhibiendo la acción de dicho sistema (Pelkonen et al., 2008).

El CYP 450, puede a su vez promover el denominado “Ciclo Redox” a través de la intervención del NADPH, en la que la reducción del O_2 a agua genera especies reactivas de oxígeno como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que son dañinas para la célula dado que pueden causar estrés oxidativo (Di Giulio et al., 1995). Tales especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés) se generan durante el metabolismo de numerosos contaminantes presentes en el ambiente acuático conducen al estrés oxidativo en los organismos. Tanto los peces, como los mamíferos, poseen un sistema de defensa antioxidante bien desarrollado para

neutralizar efectos tóxicos de ROS. Este sistema incluye las enzimas superóxido dismutasa (SOD, de sus siglas en inglés) y la catalasa (CAT, de sus siglas en inglés). Referido a CAT, la misma cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno resultante de la oxidación de los ácidos grasos. Muchos efectos bioquímicos y fisiológicos (es decir, peroxidación lipídica, LPO, de sus siglas en inglés) se han asociado con un incremento en ROS y pueden servir como buenos indicadores del estrés oxidativo. Los organismos pueden adaptarse a los aumentos en la producción de ROS al regular las defensas antioxidantes, mediante las enzimas antioxidantes. Uno de los sistemas antioxidantes más importantes, es el sistema glutatión (GSH, de sus siglas en inglés), este sistema actúa de forma no enzimática o como cofactor de glutatión peroxidasas. Los peces que habitan en ambientes acuáticos contaminados están expuestos a contaminantes que son potenciales sustratos para el GSH, cuyas conjugaciones están catalizadas por la enzima GST, formando parte del sistema de biotransformación de fase II, al conjugar al glutatión con una molécula orgánica previamente oxidada por el sistema de biotransformación de fase I. La enzima GST, también funciona como una enzima antioxidante al conjugar productos de descomposición de peróxidos lipídicos con GSH ([Di Giulio et al., 1995](#); [Lenartova et al., 1997](#); [Scarcia et al., 2012b](#)).

Algunos autores han probado la respuesta de biomarcadores en peces nativos de la Cuenca del Plata ([Pérez et al., 2018](#); [Scarcia et al., 2012a](#); [Scarcia et al., 2012b](#)). Sin embargo, estos biomarcadores no son específicos, ya que son sensibles a múltiples contaminantes y factores, como especie, sexo, tamaño, edad, tejido utilizado y estacionalidad. Por lo tanto, el análisis de un biomarcador único debe ser respaldado por otro biomarcador ([Gagnon and Rawson, 2017](#)).

Hipótesis específica

La actividad de las enzimas del sistema de biotransformación de fase I (EROD y BROD) y fase II (GST), correlacionan con la concentración los fármacos en los tejidos de los peces colectados a campo y por tanto son buenos biomarcadores de exposición.

Objetivos específicos

- Evaluar la actividad de las enzimas etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD), benziloxiresorufina-O-deetilasa (BROD) y glutatión-S-transferasa (GST) en el hígado de peces muestreados a campo en dos zonas con diferente grado de influencia antrópica y correlacionarla con las concentraciones de fármacos humanos detectados en el músculo.

Materiales y métodos

Especie seleccionada

Se utilizaron muestras de hígado de *P. lineatus* (sábalo) N = 19 peces por sitio, los cuales fueron capturados en la zona del Bajo Río Uruguay (URU), próximo a su desembocadura en el Río de la Plata, y el margen costero sur del Río de La Plata Interior (RLP). Los ejemplares capturados se correspondieron con los del Capítulo I- Sección 2 que se utilizaron para el análisis de acumulación de FH en el músculo. Se seleccionó esta especie debido a la factibilidad en el número de muestras para realizar el análisis. El hígado se diseccionó usando instrumentos de acero inoxidable, luego se colocaron rápidamente en un recipiente conteniendo hielo seco y se

mantuvieron allí hasta llegar al laboratorio, donde se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Estándares y reactivos

Los ingredientes de las soluciones buffer fueron base Trizma® (Sigma-Aldrich), EDTA (Anedra), KCl (Anedra), $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (Merck) y sacarosa (Cicarelli). Los sustratos EROD (etoxiresorufin-O-deetilasa), BROD (benziloxiresorufina-O-depentilasa) y la sal de NADPH sal tetrasódica donora de protones, se compraron en Sigma-Aldrich. Los reactivos de GST (glutación-S-transferasa), GSH (glutación reducido) y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (97%), también se compraron en Sigma-Aldrich.

Procesamiento de muestras y análisis químico

Un gramo de hígado se homogenizó en cuatro volúmenes de buffer TRIS-HCL (TRIS® base 20 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 0,25 mM, KCl 150 mM) pH 7,6 a 30.000 rpm utilizando un homogeneizador Bio-Gen PRO200 (Pro-Scientific®). El homogenato fue luego centrifugado en alícuotas de 1,5 ml a 10.000 g durante 20 min a 4°C ([Figura III.1](#)). La actividad EROD se midió fluorométricamente de acuerdo con [Quabius et al. \(2001\)](#). Se añadieron 10 μl del homogenato a 290 μl de buffer de reacción (Tris 50 mM, MgCl_2 25 mM, pH 7,5, NADPH 47 mM y 7-etoxiresorufina 0,5 mM). La producción de resorufina se midió cada 1 min durante 20 min a λ_{ex} 530 nm y λ_{em} 590 nm utilizando microplacas negras (Microfluor®) y se cuantificó frente a una curva de calibración externa de cinco puntos del estándar de resorufina incluido en la misma microplaca. Se usó el mismo procedimiento para medir BROD pero añadiendo 7-benciloxiresorufina 0,5 mM al buffer de reacción. La actividad de GST se midió

espectrofotométricamente según [Stephensen et al. \(2002\)](#) con modificaciones menores. Rápidamente, 10 μ l de homogenato y 290 μ l de buffer de reacción (buffer de fosfato de potasio 0,1 mM (pH 7,0), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 2 mM, GSH 1 mM), se añadieron a cada pocillo siguiendo el producto coloreado de la reacción de conjugación entre CNDB y GSH, a λ 340 nm cada 1 min durante 20 min. En todos los casos, la actividad enzimática se evaluó a 25°C. La proteína total en los homogenatos se midió según el método de [Lowry et al. \(1951\)](#) con la adaptación a microondas ([Akins and Tuan, 1995](#)). Se añadieron 25 μ l de homogenato a 250 μ l de solución ABC (10 ml de Na₂CO₃ al 20% en NaOH, 0,1 ml de tartrato de potasio al 2% y 0,1 ml de CuSO₄ 1 %), se colocó en el microondas (potencia máxima) 10 s, se añadieron 25 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y se leyó a λ 660 nm. Las mediciones se realizaron utilizando un espectrofotómetro multimodo Synergy HT (BioTek®) equipado con un módulo inyector de reactivo dual. La adquisición y el procesamiento de datos se realizaron utilizando el software Gen5 (BioTek®).

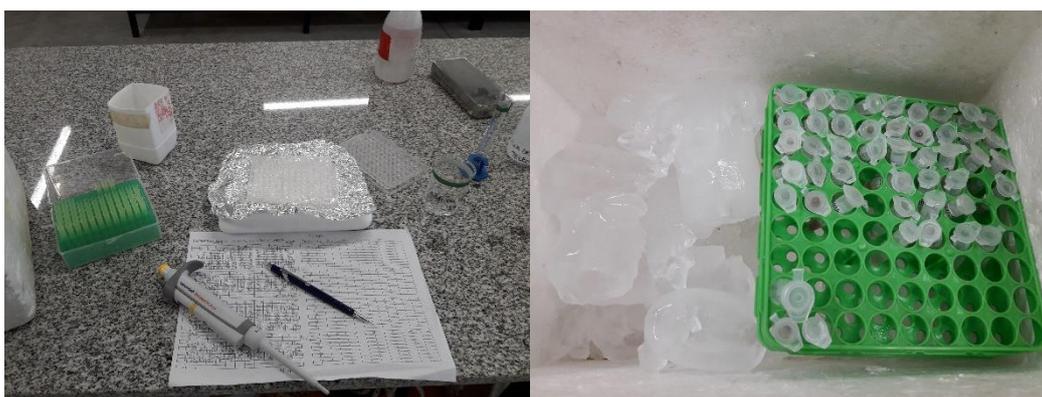


Figura III.1. Extractos de hígado de *P. lineatus* utilizados para la medición de las enzimas de biotransformación.

Análisis de los resultados

Los resultados se muestran como el promedio \pm error estándar. Las diferencias de las actividades enzimáticas entre localidades se presentaron como la diferencia porcentual de las medias obtenidas para cada localidad. Las comparaciones simples o múltiples entre actividades enzimáticas se evaluaron mediante la Prueba t de Student o ANOVA de una vía, respectivamente. Los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron evaluados por las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. Las comparaciones post-hoc se realizaron mediante el uso de la prueba Tukey HSD (diferencia honestamente significativa). En aquellos casos en que los supuestos de ANOVA no se cumplieron, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En todos los casos, el nivel de significancia utilizado fue $\alpha \leq 0,05$.

Resultados

Para ninguna de las enzimas evaluadas de fase I (EROD y BROD) y fase II (GST) las actividades entre los sexos fueron significativamente diferentes ([Tabla Suplementaria 9](#)). Por lo tanto, las comparaciones de las actividades enzimáticas se realizaron evaluando ambos sexos juntos.

Las actividades de EROD, BROD y GST medidas en el hígado de *P. lineatus* capturados en URU y RLP se muestran en la [Tabla III.1](#). Si bien todas las enzimas analizadas presentaron una mayor actividad en RLP respecto a URU, las diferencias fueron significativas sólo para BROD y GST.

Tabla III.1. Enzimas de biotransformación en *P. lineatus* de URU y RLP

	URU		RLP		Δ AE	p-valor
	Media \pm ES	n	Media \pm ES	n		
EROD (pmol/min mg prot)	205 \pm 47,5	12	243 \pm 33,5	19	17%	0,473
BROD (pmol/min mg prot)	190 \pm 41,7 ^a	16	296 \pm 33,6 ^b	19	44%	0,036
GST (pmol/min mg prot)	316 \pm 36,4 ^a	14	471 \pm 3,8 ^b	15	39%	0,004

URU: Río Uruguay, RLP: Estuario del Río de la Plata; EROD: etoxiresorufina-O-deetilasa; BROD: benzilresorufina-O-deetilasa; GST: glutation-S-transferasa; actividad enzimática expresada como pmol/min mg prot; ES: error estándar; Δ AE: diferencia porcentual entre la actividad media enzimática de ambas localidades. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas para la misma enzima en sitios diferentes.

Por otra parte, el análisis de la correlación entre la actividad de las enzimas evaluadas en el hígado (BROD, EROD, GST) y las concentraciones de los fármacos estudiados, ya sea, evaluados de forma independiente o como fármacos totales (FHT), sólo mostró una correlación significativamente negativa entre ENA y BROD ([Tabla III.2](#)).

Tabla III.2. Actividad de enzimas de biotransformación en hígado y relación con las concentraciones de FH en musculo dorsal, en la especie *P. lineatus*.

	EROD		BROD		GST	
	r	p-valor	r	p-valor	r	p-valor
Atenolol	0,224	0,228	0,141	0,437	0,141	0,452
Carbamazepine	0,024	0,896	0,057	0,747	0,141	0,422
Enalapril	0,173	0,351	0,346	0,041	0,100	0,564
Sildenafil	0,141	0,420	0,141	0,388	0,046	0,808
FHT	0,283	0,132	0,017	0,923	0,283	0,132

EROD: etoxiresorufina-O-deetilasa; BROD: benzilresorufina-O-deetilasa; GST: glutation-S-transferasa.; r: coeficiente de correlación de Pearson.

Al evaluar la correlación entre las enzimas estudiadas, se observó un resultado estadísticamente significativo solo para BROD y GST (Tabla III.3).

Tabla III.3. Correlación de las actividades de enzimas de biotransformación de fase I y fase II

	EROD		BROD		GST	
	r	p-valor	r	p-valor	r	p-valor
EROD	-	-	0,99	0,635	0,22	0,228
BROD	-	-	-	-	0,35	0,046

EROD BROD y GST se expresan en pmol/min g proteína, r: coeficiente de correlación de Pearson

Discusión

En la presente sección de esta tesis, se evaluó la actividad de enzimas del sistema de biotransformación de fase I y fase II en el hígado de *P. lineatus*, la especie más importante de la Cuenca del Plata en términos de biomasa e importancia como recurso pesquero. De acuerdo a la bibliografía disponible, esta sería la primera vez que se evalúa la actividad de la enzima BROD para la especie.

En particular, justamente la actividad de BROD y de GST mostraron diferencias mayores al 25% en los especímenes recolectados en RLP y URU, y a su vez mostraron una correlación entre las mismas, indicando la relación del sistema de biotransformación de fase I y de fase II. Las diferencias mayores al 20% corresponden al porcentaje que generalmente se considera como tamaño del efecto crítico (CES) en los programas de Monitoreo de Efecto Ambiental de Environmental Canada para el índice biológico como LSI (índice somático del hígado) y GSI (índice somático de

las gónadas) o puntos finales de toxicidad subletal (EC, 2010; Kilgour et al., 2007). La diferencia en la actividad de GST observada en el hígado de *P. lineatus* capturados entre ambas zonas de muestreo, fue mayor en el área de descarga de aguas residuales de Buenos Aires, diferente de la respuesta obtenida en un estudio realizado por Pérez et al. (2018), que colocó especímenes enjaulados de la misma especie a diferentes distancias del desagüe de aguas residuales de la ciudad Santa Fe, en el Río Colastiné, y donde no se observaron diferencias en la actividad enzimática. En cambio, la mayor actividad de GST en RLP (40%) obtenida en este trabajo, fue similar al observado en *Cyprinus carpio* enjaulado en el Río de la Plata (cerca al área de muestreo de este estudio) respecto a un sitio de referencia (Scarcia et al., 2012b). La respuesta observada en este estudio es consistente con los altos niveles de contaminación reportados históricamente en RLP, relacionados con contaminantes persistentes tales como hidrocarburos y PCB (Colombo et al., 2018).

Los productos farmacéuticos se han descrito habitualmente como moduladores de las enzimas de biotransformación (Pelkonen et al., 2008; Sasaki et al., 1989). Sin embargo en el presente estudio, no se encontró una correlación significativa entre las concentraciones musculares de la mayoría de los fármacos estudiados o la carga total de fármacos y las enzimas hepáticas estudiadas. Sólo se observó una correlación negativa entre las concentraciones de ENA en el músculo y la actividad de BROD hepática. La falta de correlación observada en EROD y BROD, o incluso el efecto inhibitor de ENA, fue consistente con la menor actividad enzimática en peces de URU a pesar de la mayor carga de fármacos totales (FHT) detectados en ese sector. Por lo tanto, la inducción relativa del sistema de biotransformación observada en los peces a partir del RLP se explicaría por otros contaminantes y no por los fármacos investigados.

Conclusiones parciales

- La presente sección permitió evidenciar que las actividades de las enzimas del sistema de biotransformación de fase I (BROD) y fase II (GST) medidas en el hígado de *P. lineatus* fueron diferentes entre las zonas estudiadas, siendo mayores en la zona considerada con mayor grado de contaminación, pero dichas diferencias no respondieron a los niveles de acumulación de los fármacos estudiados en el músculo.
- Sólo ENA correlacionó negativamente con BROD, indicando una acción inhibitoria sobre dicha enzima en consonancia con la menor actividad observada en URU, la zona donde los peces presentaron mayor concentración del fármaco.
- La falta general de correlación entre las enzimas hepáticas y los fármacos seleccionados indicaría que éstas serían poco apropiadas como biomarcadores para detectar exposición, a excepción quizá de BROD en relación a ENA. Además, podría explicarse por las interferencias causadas por la mezcla de diferentes contaminantes presentes en las aguas superficiales.

Sección II. Evaluación de la actividad enzimática en peces bajo condiciones controladas de laboratorio

Introducción

En el Capítulo I se pudo demostrar que los fármacos humanos que llegan a los ambientes acuáticos de la Cuenca del Plata son acumulados por los peces que en ellos habitan. En particular, en la Sección II del nombrado capítulo, se reportó por primera vez a nivel mundial la bioacumulación del sildenafil, un fármaco ampliamente utilizado para combatir la disfunción eréctil, pero que su acumulación y efectos en la biota han sido muy poco estudiados. A su vez, en la Sección I de este Capítulo, se observó que la actividad de las enzimas de fase I (EROD y BROD) y de fase II (GST) en el hígado de *P. lineatus* recolectado en dos áreas diferentes, mostraron modulaciones diferentes. Las actividades enzimáticas fueron menores en la zona donde los peces mostraron mayor carga de fármacos humanos. Específicamente BROD se correlacionó negativamente con la concentración de enalapril (ENA) y las enzimas del sistema de biotransformación de fase I (BROD) y fase II (GST) se correlacionaron positivamente entre sí.

Como se ha hecho referencia en la sección previa, tanto las enzimas del sistema de biotransformación de fase I y como las de fase II, se encuentran implicadas en la metabolización de los fármacos humanos en peces y se ha observado que los muchos fármacos no sólo son sustratos del CYP 450, sino que pueden modular su expresión ([Pelkonen et al., 2008](#)). En particular, estudios de laboratorio con ratas y conejos han

demostrado que el SIL es capaz de modular la actividad de varias enzimas (Sheweita et al., 2020). El hecho de que ninguna de las enzimas evaluadas en el capítulo anterior haya correlacionado con SIL, es probable se deba a que dichas modulaciones estén enmascaradas por la acción de múltiples interacciones causadas por las mezclas de contaminantes a las que están expuestos los peces en el campo. Por consiguiente, estudios en condiciones controladas de laboratorio podrían ayudar a entender si dichas interacciones entre el SIL y las enzimas evaluadas en el capítulo precedente realmente ocurren en los peces.

En particular *Piaractus mesopotamicus* es una especie nativa del sector septentrional de la Cuenca del Plata, incluyendo los ríos Paraguay y Paraná que actualmente representan el mayor volumen de producción en la acuicultura argentina (Panné, 2018). Su mantenimiento en el laboratorio es relativamente sencillo y por su rápido crecimiento, alcanza tamaños adecuados para extraer sangre y tomar muestras de tejidos en un corto tiempo.

Hipótesis específica

El SIL es capaz de modular la actividad de las enzimas del sistema de biotransformación de fase I (EROD y BROD), de fase II (GST) y del sistema antioxidante (CAT) en la especie Piaractus mesopotamicus, bajo condiciones controladas de laboratorio.

Objetivos específicos

- Evaluar en condiciones controladas de laboratorio la actividad de las enzimas EROD, BROD, GST y CAT en el hígado del pez *Piaractus mesopotamicus*, expuesto a concentraciones subletales de sildenafil (SIL).

Materiales y métodos

Diseño Experimental

El diseño experimental utilizado para el análisis de la actividad de los biomarcadores EROD, BROD, GST y CAT fue explicado en el Capítulo II-Sección I. En el bioensayo se expusieron individuos de *P. mesopotamicus*, a concentraciones de 100 µg l⁻¹ de SIL durante 6 d y luego en agua sin el fármaco por 4 d. Los individuos que se tomaron para el análisis de biomarcadores se correspondieron con los individuos seleccionados para el análisis de fármacos en músculo.

Estándares y reactivos

Los ingredientes de las soluciones buffer fueron base Trizma® (Sigma-Aldrich), EDTA (Anedra), KCl (Anedra), KH₂PO₄ / K₂HPO₄ (Merck) y sacarosa (Cicarelli). Los sustratos EROD (etoxiresorufin-O-deetilasa), BROD (benziloxiresorufina-O-deetilasa) y la sal de NADPH sal tetrasódica donora de protones, se adquirieron en Sigma-Aldrich. Los reactivos GST (glutación-S-transferasa), GSH (glutación reducido) y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (97%) y los reactivos de CAT (catalasa), H₂O₂, también se adquirieron en Sigma-Aldrich.

Procesamiento de muestras y análisis químico

Los ejemplares de *P. mesopotamicus* se anestesiaron en agua con hielo y luego se disectaron con instrumental de acero inoxidable. Los hígados se homogeneizaron en un buffer TRIS-HCL (TRIS-base 20mM, EDTA 1mM, sacarosa 0,25mM, KCl 150mM) pH 7,6 a 30.000 rpm usando un homogenizador Bio-Gen PRO200 (Pro-Scientific®), luego se centrifugaron a 10.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. Como se describió en el capítulo anterior, la actividad EROD y BROD se midió fluorométricamente según [Quabius et al. \(2001\)](#), mientras que el GST se midió espectrofotométricamente según [Stephensen et al. \(2002\)](#) y CAT se midió según el protocolo propuesto por [Aebi \(1984\)](#). En todos los casos, la actividad enzimática se evaluó a 25°C. La cantidad de proteínas en el tejido se analizó mediante el método de [Lowry et al. \(1951\)](#) con la adaptación para microondas de [Akins and Tuan \(1995\)](#).

Análisis de los resultados

Los resultados se normalizaron con el peso de hígado utilizado para el homogenato, debido a la variabilidad obtenida en la medida del contenido de proteínas. Las actividades se muestran como el promedio \pm error estándar. Las diferencias de las actividades enzimáticas entre el control y el último día de exposición (t=6 d) y entre el último día de exposición (t=6 d) y el último día de depuración (t=10 d), se presentaron como el valor absoluto de la diferencia porcentual de las medias obtenidas para cada tiempo, dividido el promedio de las medias. Las comparaciones múltiples entre las actividades enzimáticas correspondientes a diferentes días del ensayo se evaluaron utilizando ANOVA de una vía y las comparaciones post-hoc se realizaron mediante el uso de la prueba Tukey HSD (diferencia honestamente significativa). Los supuestos

de normalidad y homocedasticidad fueron evaluados por las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. En todos los casos, el nivel de significancia utilizado fue $\alpha \leq 0,05$.

Resultados

Los resultados de las actividades de las enzimas de fase I (EROD y BROD) y fase II (GST) y del sistema antioxidante (CAT) medidas en el hígado de *P. mesopotamicus* expuesto o no a SIL se muestran en la [Tabla III.4](#), [Fig. III.2](#) y [Fig. III. 3](#). Las diferencias en las actividades enzimáticas correspondientes al final de la fase de exposición (t=6 d) y final de la fase de depuración (t=10 d), fueron significativamente mayores sólo para EROD. A su vez, para la nombrada enzima, la actividad media observada en el control no mostró diferencias significativas cuando se realizó la comparación con las actividades medias medidas en los peces para todos los tiempos ensayados.

Sin embargo, todas las enzimas mostraron el mismo comportamiento con incrementos en sus actividades mayores al 50% en los peces expuestos (t=6 d) respecto a los peces del grupo control. Mientras que las enzimas en relación a la fase de depuración (t=10 d) mostraron una disminución en las actividades menor al 50 %, a excepción de EROD que arrojó disminuciones del 120%.

Tabla III.4. Respuesta de las actividades enzimáticas medidas en *P. mesopotamicus* expuesto a SIL al inicio del ensayo (t= 0), en el último día de exposición (t=6 d) y en el último día de depuración (t=10 d)

	t=0 (d)			t=6 (d)			t=10 (d)			ΔEA_{0-6}	ΔEA_{6-10}	p-valor
	Media	ES	n	Media	ES	n	Media	ES	n			
EROD (pmol/min g tejido)	1272 ^{ab} ±	334	6	2182 ^a ±	172	8	544 ^b ±	99	6	53%	120%	0,049
BROD (pmol/min g tejido)	328 ±	64,2	6	557 ±	122	9	391 ±	78	8	52%	35%	0,547
GST (nM/min g tejido)	266 ±	31,03	8	459 ±	123	8	325 ±	53	8	53%	34%	0,594
CAT (nM/min g tejido)	115 ±	20,04 ^a	7	220 ±	32,5 ^b	7	136 ±	16	8	63%	47%	0,149

EROD: etoxiresorufina-O-deetilasa; BROD: bencilresorufina-O-deetilasa; GST: glutation-S-transferasa; CAT: catalasa; las actividades enzimáticas se muestran como pmol/min y nM/min por g tejido; ES: error estándar; ΔEA : diferencia porcentual entre la actividad media enzimática de ambos tiempos. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas; r: coeficiente de correlación de Pearson

En cuanto a la cinética de la respuesta, la actividad de todas las enzimas siguió el mismo comportamiento, aumentando durante la fase de exposición en los peces expuestos al fármaco y disminuyendo luego en la fase de depuración. Es interesante notar que para *P. mesopotamicus*, la actividad hepática de EROD fue siempre aproximadamente 4 veces superior a la de BROD (Figura III.2.).

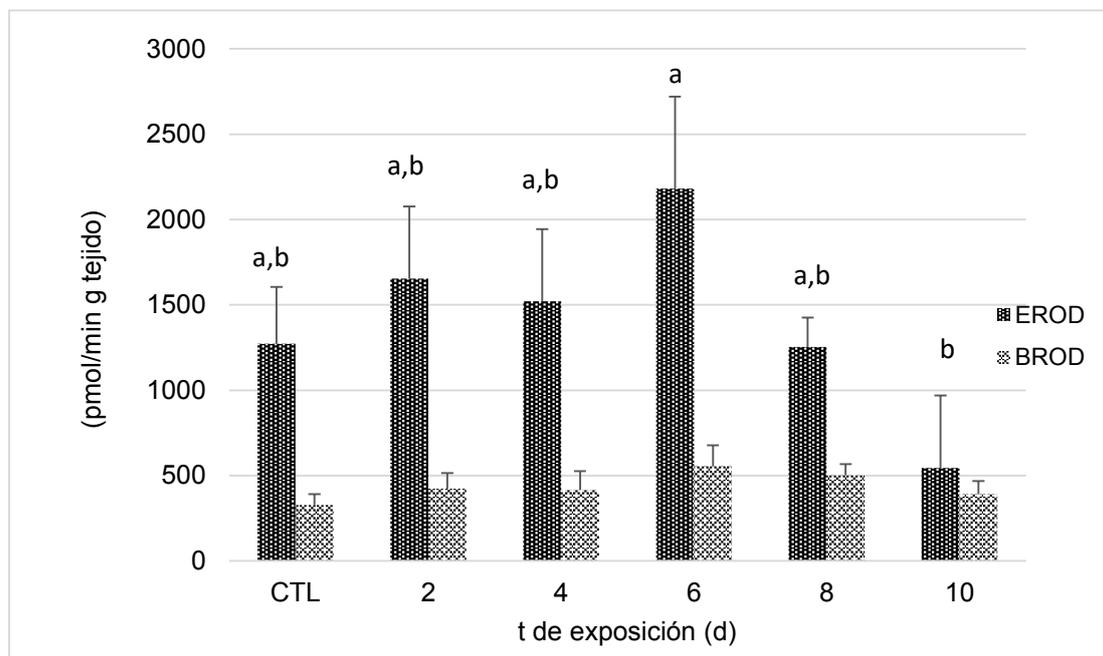


Figura III.2. Actividad enzimática (pmol/min g tejido) de EROD y BROD según el tiempo de exposición expresado en días.

Del mismo modo, tanto GST como CAT, mostraron un aumento de la actividad en los días de exposición y una disminución de la misma en los días de depuración (Figura III.3.).

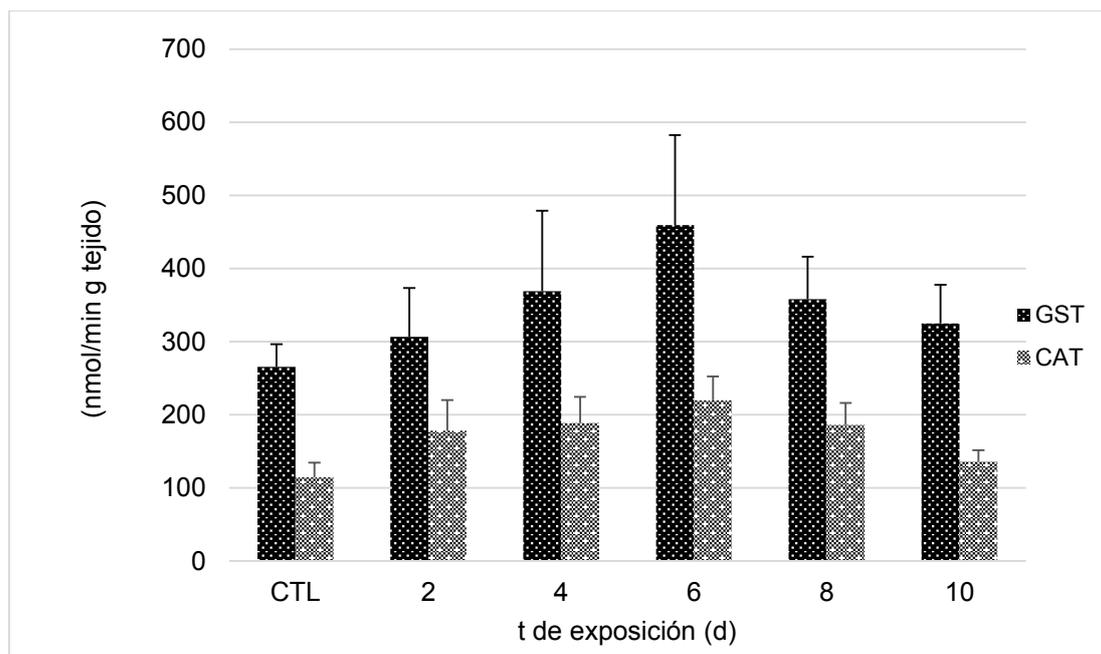


Figura III.3. Actividad enzimática (nmol/min g tejido) de GST y CAT según el tiempo de exposición expresado en días.

Al evaluar la correlación entre los biomarcadores medidos en el hígado de *P. mesopotamicus* y la concentración de sildenafil en el músculo del mismo, se observó una correlación positiva para BROD y GST ($p= 0,026$ y $p= 0,028$). Mientras que para EROD y CAT el grado de correlación no llegó a ser significativo.

Del mismo modo, se realizó el análisis de correlación entre las enzimas medidas. Los coeficientes de correlación de Pearson y los p -valores de los análisis estadísticos realizados para todas las enzimas, se muestran en la [Tabla III.5](#).

Tabla III.5. Actividad de las enzimas en *P. mesopotamicus* y relación con las concentraciones de sildenafil

	r	p-valor
EROD (pmol/min g tejido)	0,100	0,553
BROD (pmol/min g tejido)	0,360	0,026
GST (nmol/min g tejido)	0,365	0,028
CAT (nmol/min g tejido)	0,245	0,163

EROD: etoxiresorufina-O-deetilasa; BROD: benciloxiresorufina-O-dealquilasa; GST: glutatión-S-transferasa; CAT: catalasa; r: coeficiente de correlación de Pearson

Al realizar la correlación entre enzimas de biotransformación de fase I y fase II, las mismas fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para los pares BROD y GST, BROD y CAT y para GST y CAT, demostrando una relación entre todas ellas [Tabla III.6.](#)

Tabla III.6. Correlación de las actividades de enzimas de biotransformación de fase I y fase II

	EROD		BROD		GST	
	(pmol/min g tejido)		(pmol/min g tejido)		(nmol/min g tejido)	
	r	p-valor	r	p-valor	r	p-valor
EROD	-	-	-	-	-	-
BROD	0,37	0,062	-	-	-	-
GST	0,32	0,11	0,83	<0,0001	-	-
CAT	0,33	0,10	0,48	0,003	0,64	0,0004

EROD y BROD se expresan en pmol/min g tejido, GST y CAT se expresan en nmol/min g tejido; r: coeficiente de correlación de Pearson

Discusión

En base a la bibliografía disponible, el presente estudio es el primero a nivel mundial en evaluar la respuesta de enzimas del sistema de biotransformación de fase I y fase II, así como del sistema antioxidante en peces expuestos a SIL. La exposición de *P. mesopotámicus* al fármaco no sólo mostró una acumulación del fármaco en el músculo a lo largo del tiempo, sino que también ello se correspondió con un aumento en la actividad de las enzimas de biotransformación tanto de fase I (EROD y BROD) como de fase II (GST) y la enzima del sistema antioxidante CAT. La disminución en la actividad de EROD fue significativa en el periodo que abarcó los tiempos 6 a 10 días, correspondiéndose con la falta de inducción de la enzima por ausencia del SIL en el medio acuoso, debido a la fase de eliminación del ensayo de bioconcentración.

Un hecho interesante es que cuando se evaluaron las correlaciones entre EROD y CAT, se encontró una clara correlación que fue estadísticamente significativa. La correlación entre enzimas de fase I y fase II, también fue representada por [Duarte et al. \(2019\)](#), en el cual los autores observaron una correlación positiva entre EROD y GST, medidos en homogenatos de hígado del pez *Pareiodon microps*, expuesto a fluoxetina ($\mu\text{g l}^{-1}$) por 96 h. La correlación entre las enzimas de fase I (BROD) y fase II (GST y CAT) es consistente con la conocida relación que estas dos vías metabólicas poseen ([Di Giulio et al., 1995](#)).

Estudios realizados en conejos han encontrado que el fármaco es capaz de inducir CAT, pero suele inhibir GST y posee una acción inductora o inhibidora sobre el CYP 450, dependiendo de la isoforma que se trate ([Sheweita et al., 2020](#)). En ratas, por lo general inhibe la expresión génica de diferentes isoformas del CYP 450, reduciendo consecuentemente la actividad de dichas enzimas, particularmente la actividad de

EROD ([Sheweita et al., 2016](#)). También en ratas se ha encontrado que el SIL incrementa la actividad de CAT, pero reduce la de GST ([Sheweita et al., 2015](#)). Por consiguiente, pareciera que en peces el efecto de esta droga es algo diferente al que causa en mamíferos.

La inducción del CYP 450 o EROD ha sido observada en peces o hepatocitos de peces expuestos a diclofenac ([Burkina et al., 2015](#)), propranolol ([Laville et al., 2004](#)), o cafeína y sulfametoxazol ([Li et al., 2012](#)). En este último trabajo, los autores también encontraron una inducción de GST por los fármacos estudiados. Un aumento en las enzimas que intervienen en el estrés oxidativo, dentro de ellas incluida CAT, fue observado también en la trucha arcoíris ([Li et al., 2011](#)). Esto indicaría que el SIL podría generar efectos similares a los de estos fármacos sobre los sistemas enzimáticos estudiados.

Es interesante observar que la enzima EROD, cuya actividad fue significativamente menor durante la fase de depuración, no correlacionó significativamente con la concentración de SIL en tejido. Esto indicaría que la respuesta de la enzima EROD mostraría variaciones altas entre individuos que desdibujarían el efecto del SIL. Por el contrario, las enzimas BROD y GST, cuyas diferencias no fueron significativas al final de la fase de exposición, mostraron una relación más clara con SIL, con una correlación positiva. Esto podría explicar, en parte, que no haya habido una correlación entre la concentración de SIL y las enzimas analizadas en la sección previa, en la cual se evaluó la relación de FH con la actividad de enzimas en peces muestreados a campo. A ello debe sumarse además, que factores como las diferencias entre especies, el sexo, el tipo de alimento y la edad afectan la actividad catalítica de las reacciones mediadas por CYP 450 y pueden causar variaciones en los resultados de diferentes estudios ([Burkina et al., 2015](#)). A su vez, en el campo, la

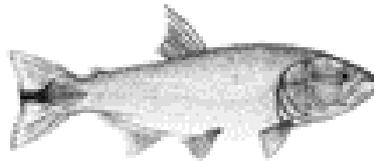
variedad de sustancias químicas presentes en el medio ambiente, podría afectar la respuesta de los biomarcadores debido al efecto sobre la señalización de los receptores nucleares. Lo cual conllevaría a una interpretación errónea en la respuesta de las enzimas (Celandier, 2011).

Conclusiones parciales

- Los estudios de laboratorio dirigidos a evaluar los efectos del SIL sobre las enzimas del sistema de biotransformación de fase I (EROD y BROD) y fase II (GST) junto a la enzima del sistema antioxidante (CAT) en el hígado de *P. mesopotamicus*, demostraron que el fármaco es capaz de causar una inducción generalizada de todos los sistemas. La cual fue consistente con el tiempo de exposición/depuración y con la concentración del fármaco medida en el musculo.

Capítulo IV

Potencial riesgo para el consumo humano



Introducción

La creciente evidencia sobre la presencia de contaminantes químicos en organismos acuáticos de interés para el consumo humano recogida a partir de mediados del Siglo XX causó preocupación en la opinión pública y en las instituciones sobre los peligros potenciales asociados al consumo de alimentos contaminados. Durante la década del '80, ello generó presión sobre las agencias reguladoras estatales de Estados Unidos para responder a estas preocupaciones, creando la necesidad de desarrollar una metodología para caracterizar y juzgar dichos riesgos. Para ser útil como herramienta de evaluación de riesgos, tal metodología tendría las siguientes características: 1) poseer capacidad de analizar una gran cantidad de sustancias químicas con recursos limitados, basada en una base de datos confiable, completa y de fácil acceso; 2) ser sensible a las propiedades peligrosas de cada sustancia química, 3) poseer la capacidad de separar contaminantes químicos en categorías según el grado de peligro; y 4) proporcionar una base consistente para establecer prioridades y permitir la toma de decisiones sobre el manejo del peligro (Brown et al., 1988).

En los Estados Unidos, el "Marco conceptual" en el que se basó la evaluación de riesgos para la salud humana estuvo elaborado a partir del asesoramiento de un cuerpo considerable de expertos que permitieron generar los comúnmente conocidos como el "Libro Rojo", "Evaluación de riesgos en el gobierno federal: Gestión del proceso" (NRC, 1983), el "Libro Azul", "Ciencia y juicio en la evaluación de riesgos" (NRC, 1994) y el "Libro Plateado" "Ciencia y decisiones: avance en la evaluación de riesgos" (NRC, 2009). En 1984, la Agencia Ambiental de los Estados Unidos publicó el documento "Evaluación y gestión de riesgos: marco para la toma de decisiones" (USEPA, 1984), que articuló por primera vez el marco de evaluación de riesgos de dicho organismo. Luego, la USEPA elaboró una serie de documentos que

establecieron pautas para definir varios aspectos de la evaluación de riesgos (ej., cáncer, mezclas químicas, toxicidad para el desarrollo, evaluación de la exposición, mutagenicidad, neurotoxicidad y toxicidad reproductiva). Paralelamente, otros organismos, tales como la Organización Mundial de la Salud, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Unión Europea, también han realizado esfuerzos para avanzar en la práctica de evaluación de riesgos ([Louro et al., 2019](#); [WHO, 1999](#)).

Dado que los peces representan una fuente de alimento importante para los seres humanos (ej. proporcionan proteínas de alta calidad y ácidos grasos poliinsaturados n-3) y que son capaces de acumular contaminantes ambientales en concentraciones lo suficientemente altas como para representar riesgos para la salud de los seres humanos, la USEPA ha elaborado un documento que trata específicamente sobre la evaluación de riesgos para la salud humana asociados al consumo de pescado en relación a contaminantes cancerígenos y no cancerígenos introducidos a través de la ingesta de pescado ([USEPA, 2000](#)). En relación a la seguridad de alimentos de consumo humano, la Unión Europea (UE, de sus siglas en inglés), mediante la Regulación 37/2010 y otras entidades regulatorias mundiales como la Comisión del Codex Alimentarius (CODEX, de sus siglas en inglés), Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, de sus siglas en inglés), Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos (CFIA, de sus siglas en inglés), Autoridad Australiana de Plaguicidas y Medicamentos Veterinarios (APVMA, de sus siglas en inglés) y el Departamento de Salud de Chile, han establecido límites máximos de residuos (LMR, de sus siglas en inglés), como concentraciones de tolerancia para fármacos veterinarios en alimentos humanos de origen animal como los animales de granja, sin incluir a los peces de acuicultura. Dichos LMR, difieren sustancialmente

entre las entidades (Cañada-Cañada et al., 2009). A su vez en Argentina, el Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, de sus siglas en español), a partir de la Resolución 559/2011 establece un número acotado de LMRs para los principios activos de fármacos veterinarios en distintos alimentos, en los cuales en su mayoría no se establecen valores para los peces y muchos de ellos tampoco se incluyen como fármacos humanos.

Las evaluaciones de riesgo para la salud humana en relación al consumo de peces contaminados han sido muy utilizadas en el caso de metales como el mercurio u otros contaminantes persistentes (Batt et al., 2017; Jiang et al., 2005; Martínez-Salcido et al., 2018). Para el caso particular de los fármacos, si bien se han realizado evaluaciones de riesgo vinculadas al consumo de agua (Cao et al., 2020; Schwab et al., 2005) o vegetales (Christou et al., 2017; Prosser and Sibley, 2015) contaminados por este tipo de sustancias. Son menos los estudios vinculados al consumo de peces u otros organismos acuáticos contaminados con fármacos (Álvarez-Muñoz et al., 2018; Martínez-Morcillo et al., 2020).

Dado que estudios previos demuestran la presencia de fármacos humanos en aguas de la Cuenca del Plata (Elorriaga et al., 2013b; Pérez et al., 2018) y que como se ha demostrado en los capítulos anteriores, los peces que en ellas habitan son capaces de acumularlos, en el presente capítulo se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

Hipótesis específica

Los fármacos de uso humano que alcanzan los ecosistemas acuáticos de la Cuenca del Plata y que son acumulados por los peces de importancia para el consumo, representan un riesgo para la salud humana.

Objetivo específico

- Evaluar el riesgo para la salud humana asociado al consumo de peces con las concentraciones de los fármacos detectados en el músculo de *M. obtusidens*, *P. lineatus*, *P. maculatus*, y *S. brasiliensis* recolectados en la Cuenca del Plata.

Materiales y métodos

Para evaluar el riesgo para la salud humana en relación a la exposición a los Ingredientes Activos de los Fármacos (API, de su sigla en inglés) mediante el consumo de peces, se utilizó la concentración predicha que no causa efecto adverso (PNEC, de su sigla en inglés), la cual se obtuvo a partir de valores de Ingesta Diaria Admisible (ADI, de su sigla en inglés) obtenidos de la bibliografía. Las ADI se combinaron con estándares referidos al potencial consumo de pescado, según el “Manual de evaluación de riesgos para la salud humana (Parte A-Volumen 1)” de la [USEPA \(1989\)](#). La ecuación utilizada se muestra a continuación:

$$PNEC = \frac{ADI \times BW \times AT}{IR \times EF \times ED} \quad (1)$$

Dónde:

ADI: ingesta diaria admisible ($\mu\text{g}/\text{kg}\text{-día}$)

BW: peso corporal (niño 14 kg, adulto 70 kg)

AT: tiempo promedio de la exposición calculado como $EF \times ED$ (2190 días niño, 10950 días adulto)

IR: tasa de consumo de pescado en niños y adultos (0,008 kg/persona-día)

EF: frecuencia de exposición (365 días/año)

ED: duración de la exposición (6 años niño, 30 años adulto)

Dado que los términos BW, EF e IR se mantienen constantes, la ecuación final para calcular PNEC_n y PNEC_a, en niños y adultos, respectivamente, quedaron expresadas como:

$$PNEC_n = ADI \times 1750 \quad (2)$$

$$PNEC_a = ADI \times 8750 \quad (3)$$

Las ecuaciones se aplicaron utilizando parámetros de exposición humana recomendados por la guía de la EPA de los Estados Unidos de América ([USEPA, 2000](#)). El valor de la tasa de consumo de pescado en Argentina (IR), se obtuvo de [Zapata et al. \(2016\)](#) a partir de la Encuesta Nacional de Gastos de los Hogares (ENGHO) del INDEC periodo 2012-2013.

El cálculo de PNEC, se realizó sólo para aquellos fármacos humanos de los cuales se pudo obtener el valor de ADI de datos bibliográficos ([Tabla IV.1.](#)). En el caso particular del enalapril, para el cálculo del PNEC se utilizó el ADI del metabolito enalaprilat, ya que fue el dato disponible en la bibliografía consultada.

Tabla IV.1. Concentración predicha sin efecto para niños (PNECn) y adultos (PNECa) en función de la tasa de consumo de pescado

Compuesto	ADI ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$)	PNECn ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	PNECa ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Atenolol (ATE)	0,4 ^a	700	3,50E+03
Carbamazepina (CBZ)	2,9 ^a	5,07E+03	2,53E+04
Clopidrogel (CLO)	1,1 ^b	1,92E+03	9,62E+03
Enalaprilat (metabolito enalapril, ENA)	70 ^c	1,22E+05	6,12E+05
Metoprolol (MET)	0,3 ^a	525	2,62E+03
Nadolol (NAD)	0,6 ^b	1,05E+03	5,25E+03
Propanolol (PRO)	1,1 ^b	1,92E+03	9,62E+03
Salbutamol (SAL)	0,2 ^b	350	1,75E+03
Sildenafil (SIL)	0,3 ^a	525	2,62E+03
Venlafaxina (VEN)	0,5 ^b	875	4,37E+03

ADI: Ingesta diaria admisible, ^aProsser and Sibley (2015), ^bBoxall (2018), ^cSchwab et al. (2005)

Para el análisis del riesgo el área estudiada de la Cuenca del Plata, se subdividió en tres sectores según se muestra en la [Figura IV.1](#). Sector 1 (S1), se ubicó en el Río Uruguay, en el tramo comprendiendo desde la localidad de Gualeguaychú (Argentina) hasta la localidad de Bella Unión (Uruguay). El Sector 2 (S2), abarcó el área de la desembocadura del Río Uruguay, comprendido entre las localidades de Villa Paranacito (Argentina) y San Salvador (Uruguay). Por último, el Sector 3 (S3), se ubicó en el margen sur del Río de La Plata Interior, estudiado en la Sección II-Capítulo I.

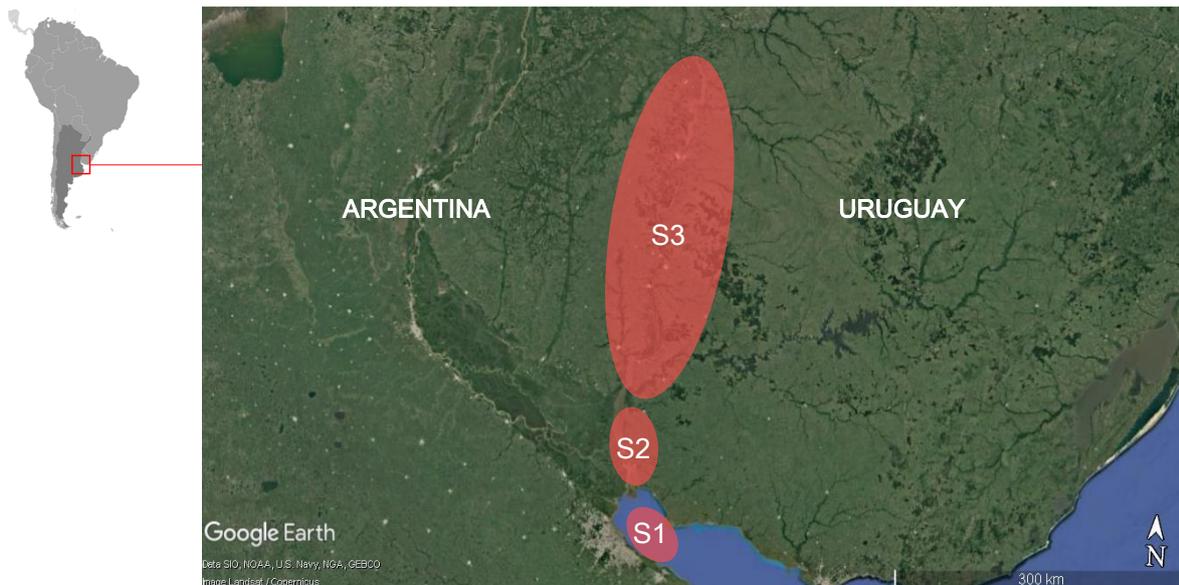


Figura IV.1. Sectores donde se analizaron las concentraciones de fármacos humanos en peces para el cálculo del PNEC

Para el cálculo del cociente de riesgo (RQ) se utilizó la relación MEC/PNEC, siendo MEC, de su sigla en inglés, la concentración ambiental medida. En este caso, el MEC, hace referencia a la concentración medida en el tejido de los peces estudiados. El valor de RQ tomado como límite fue de 1, existiendo un riesgo para el consumo humano si el valor tomaba valores mayores a 1.

El RQ, se caracterizó como riesgo medio y máximo tanto para niños como para adultos por separado, dado los diferentes valores de PNEC que se calcularon en cada caso. Para ello se dividieron las concentraciones medias y máximas detectadas en el músculo de las especies de peces estudiadas por los valores de PNEC_n y PNEC_a calculados para cada fármaco.

Con motivo de simplificar la visualización de los resultados, los valores de RQ fueron diferenciados según especie de pez, sector en el que se realizó el muestreo y fármaco estudiado. Particularmente en el Sector 1, la especie *P. maculatus* no fue estudiada,

es por ello que sólo se muestran los resultados de RQ calculados para los Sectores 2 y 3.

Es importante destacar que el Sector 2, que abarca la localidad de Villa Paranacito (Argentina) y San Salvador (Uruguay), fue estudiado en la Sección I y Sección II, correspondiente al Capítulo I de la presente tesis. Respecto al grupo de fármacos analizados en la Sección I estuvo comprendido por ATE, CBZ, CLO, MET, NAD, PRO, SAL y VEN mientras que el grupo de fármacos analizados en la Sección II fueron ATE, CBZ, ENA y SIL. Como se observa los fármacos ATE y CBZ fueron detectados con ambas metodologías de extracción, es por ello que para el cálculo de las concentraciones medias y máximas de ambos compuestos, se utilizaron las concentraciones detectadas en conjunto. Los valores de concentraciones que se encontraron por debajo del LDM y LCM correspondiente a cada metodología de extracción, se reemplazaron por $\frac{1}{2}$ de LDM y $(LCM+LCM)/2$ (Helsel and Hirsch, 1992), respectivamente. Los valores de concentración media y máxima de todos los fármacos considerados para la evaluación de riesgo, se encuentran diferenciados según especie y sitio de muestreo, en la [Tabla suplementaria 11](#).

Resultados

La caracterización del riesgo para el consumo humano se dividió en riesgo medio (RQ med) y riesgo máximo (RQ máx), respectivamente. El RQ medio para niños (RQn med) y adultos (RQa med) calculado para cada especie y fármaco en particular, se muestra en la [Tabla IV.2](#). Donde se puede observar que los cocientes de riesgo tanto para niños como para adultos, estuvieron en el orden de 10^{-2} y 10^{-6} , encontrándose

muy por debajo de la unidad. Particularmente, los dos compuestos que mostraron un valor de RQ med más cercano a la unidad, fueron ATE y SIL.

En el caso particular del ATE, solo los valores calculados para niños estuvieron más cercanos a la unidad, encontrándose en el rango de 0,01 y 0,04 (valores en color rojo), para las especies *P. lineatus*, *P. maculatus* y *S. brasiliensis*, recolectadas en los Sitos 2 y 3. Mientras que para *M. obtusidens*, sólo el Sitio 3 mostro valores de RQn en el rango de valores nombrado. Por otro lado, los RQ medios calculados para SIL en niños, estuvieron en el rango de 0,1 y 0,07 (valores en color rojo) para todas las especies estudiadas y recolectadas en los Sectores 2 y 3, excepto para *P. lineatus* en el Sector 3. Mientras que para adultos solo se detectó un valor de 0,02 (valor en color rojo), correspondiente a la especie *P. maculatus*, recolectada en el Sector 2.

Por otro lado, en la [Tabla IV.3.](#), se pueden observar los valores de RQ máx calculados para niños (RQn máx) y adultos (RQa máx), respectivamente. El rango de valores encontrados para RQn máx y RQa máx 10^{-1} y 10^{-6} , registrándose siempre por debajo de la unidad. Nuevamente, los compuestos que mostraron valores de RQ máx más cercanos a la unidad, fueron ATE y SIL.

Particularmente para ATE, los valores de RQ máx más cercanos a la unidad, estuvieron en el rango de 0,01 y 0,07 (valores en color rojo). Si bien los valores de RQ máximos fueron mayores que los de RQ med la diferencia entre un escenario y otro no fue muy grande.

Tabla IV.2. Cocientes de riesgo (RQ) medios, calculados para niños y adultos

	ATE		CBZ		CLO		ENA		MET	
	RQn	RQa	RQn	RQa	RQn	RQa	RQn	RQa	RQn	RQa
<i>M. obtusidens</i>										
S1	9,9E-05	2,0E-05	2,3E-05	4,6E-06	2,9E-05	5,7E-06	-	-	6,2E-04	1,2E-04
S2	8,5E-04	1,7E-04	6,9E-05	1,4E-05	1,5E-04	2,9E-05	9,4E-06	1,9E-06	3,9E-03	7,9E-04
S3	2,9E-02	5,8E-03	5,2E-05	1,0E-05	-	-	9,4E-06	1,9E-06	-	-
<i>P. lineatus</i>										
S1	7,2E-05	1,4E-05	2,0E-05	4,1E-06	2,5E-05	5,1E-06	-	-	4,0E-05	8,0E-06
S2	1,3E-02	3,7E-06	2,6E-04	5,1E-05	2,5E-05	5,1 E-06	4,6E-05	9,2E-06	4,1E-05	8,1E-06
S3	1,3E-02	2,7E-03	2,1E-04	4,2E-05	-	-	1,3E-05	2,6E-06	-	-
<i>P. maculatus</i>										
S2	3,0E-02	5,9E-03	5,0E-05	1,0E-05	-	-	1,2E-04	2,3E-05	-	-
S3	3,2E-02	6,3E-03	5,0E-05	1,0E-05	-	-	9,0E-06	1,8E-06	-	-
<i>S. brasiliensis</i>										
S1	4,6E-05	9,2E-06	2,9E-05	5,8E-06	1,2E-05	2,5E-06	-	-	4,3E-04	8,6E-05
S2	4,3E-02	8,6E-03	9,0E-04	1,7 E-04	1,3E-05	2,5E-06	6,4E-05	1,3E-05	3,8E-04	7,5 E-05
S3	4,1E-02	8,1E-03	5,2E-05	1,0E-05	-	-	9,4E-06	1,9E-06	-	-

RQ n med: cociente de riesgo medio en niños, RQ a med: cociente de riesgo medio en adultos, S1: sector 1, S2: sector 2, S3: sector 3, ATE: atenolol, CBZ: carbamazepina, CLO: clopidrogel, ENA: enalapril, MET: metoprolol

Tabla IV.2. (continuación) Cocientes de riesgo (RQ) medios, calculados para niños y adultos

	NAD		PRO		SAL		SIL		VEN	
	RQn	RQa	RQn	RQa	RQn	RQa	RQn	RQa	RQn	RQa
<i>M. obtusidens</i>										
S1	5,5E-05	1,1E-05	9,3E-05	1,9E-05	1,2E-04	2,5E-05	-	-	2,1E-04	4,3E-05
S2	2,5E-04	5,0E-05	5,9E-04	1,2E-04	4,0E-04	7,9E-05	5,0E-02	1,0E-02	1,2E-03	2,5E-04
S3	-	-	-	-	-	-	5,0E-02	1,0E-02	-	-
<i>P. lineatus</i>										
S1	3,6E-05	7,1E-06	1,2E-05	2,4E-06	6,0E-05	1,2E-05	-	-	6,1E-05	1,2E-05
S2	4,8E-05	9,7E-06	4,4E-05	8,7E-06	6,0E-05	1,2E-05	1,5E-02	3,1E-03	1,3E-04	2,5E-05
S3	-	-	-	-	-	-	7,9E-03	1,6E-03	-	-
<i>P. maculatus</i>										
S2	-	-	-	-	-	-	1,0E-01	2,0E-02	-	-
S3	-	-	-	-	-	-	1,5E-02	3,0E-03	-	-
<i>S. brasiliensis</i>										
S1	1,2E-05	2,5E-06	1,4E-05	2,8E-06	7,9E-05	1,6E-05	-	-	4,4E-05	8,8E-06
S2	1,2E-05	2,5E-06	6,0E-05	1,3E-05	8,4E-05	1,7 E-05	1,5E-02	3,0E-03	1,5E-04	2,9E-05
S3	-	-	-	-	-	-	3,4E-02	6,7 E-03	-	-

RQ n med: cociente de riesgo medio en niños, RQ a med: cociente de riesgo medio en adultos, S1: Río Uruguay 1, S2: Bajo Uruguay, S3: Río de la Plata Interior, NAD: nadolol, PRO: propanolol, SAL: salbutamol, SIL: sildenafil, VEN: venlafaxina

En cuanto a las especies estudiadas, se puede observar que los RQ calculados con concentraciones medias, respetaron la misma tendencia en todas las especies y sitios estudiados, siendo los Sitios 2 y 3 los más representados, y los valores menos conservadores representados en niños. Por el contrario, cuando se evaluaron los RQ calculados con las concentraciones máximas, los valores más cercanos a la unidad estuvieron representados en los mismos sitios, pero incluyendo los cocientes de adultos también, como en el caso del SIL en los RQ med.

Los ejemplares de *M. obtusidens*, *P. lineatus*, *P. maculatus* y *S. brasiliensis* recolectados en el Sitio 2, mostraron los valores de RQ máx más cercanos a 1 para SIL, en niños y adultos. Particularmente la especie *M. obtusidens*, mostró la misma tendencia en relación al Sitio 3. Mientras que ATE mostró los mismos resultados para en el Sitio 2 en *P. maculatus* y *S. brasiliensis*. De manera similar, los RQ máx calculados para *M. obtusidens* y *P. maculatus* recolectados en el Sitio 3 se encontraron en el mismo orden de magnitud, considerando a niños y adultos.

El caso particular del SIL, los valores de RQ máx estuvieron en el orden de 0,1 y 0,08 (valores en color rojo, [Tabla IV.3.](#)), incluyendo un mayor número de RQa máx en comparación con el RQa med calculado previamente, el cual sólo mostraba un valor en el orden de 10^{-2} ([Tabla IV.2.](#)).

Tabla IV.3. Cocientes de riesgo (RQ) máximos, calculados para niños y adultos

	ATE		CBZ		CLO		ENA		MET	
	RQn	RQa	RQn	RQa	RQn	RQa	RQn	RQa	RQn	RQa
<i>M. obtusidens</i>										
S1	8,7E-04	1,7E-04	1,1E-04	2,2E-05	2,6E-04	5,3 E-05	-	-	4,6E-03	9,1E-04
S2	1,1E-03	2,2E-04	4,6E-03	9,1E-04	2,6E-04	5,3E-05	4,6E-04	9,3E-05	4,6E-03	9,1E-04
S3	5,7E-02	1,1E-02	5,2E-05	1,0E-05	-	-	9,4E-06	1,9E-06	-	-
<i>P. lineatus</i>										
S1	4,2E-04	8,4E-05	1,7E-04	3,5E-05	2,5E-05	5,1E-06	-	-	4,1E-05	8,1E-06
S2	5,0E-02	1,4E-06	1,6E-03	3,2 E-04	2,5E-05	5,1E-06	1,8E-04	3,6 E-05	4,1E-05	8,1E-06
S3	5,1 E-02	1,2E-03	9,9E-04	2,0E-04	-	-	7,7E-05	1,5E-05	-	-
<i>P. maculatus</i>										
S2	6,6E-02	1,2E-02	5,2E-05	1,0E-05	-	-	2,3E-04	4,7E-05	-	-
S3	5,0E-02	1,0E-02	5,7E-04	1,1E-04	-	-	9,4E-06	1,9E-06	-	-
<i>S. brasiliensis</i>										
S1	9,1E-05	1,8E-05	2,8E-05	5,6E-06	1,2E-05	2,4E-06	-	-	6,9E-04	1,4E-04
S2	6,1E-02	1,2E-02	3,2E-03	6,5E-04	1,2E-05	2,4E-06	2,4E-04	4,9E-05	6,9E-04	1,4E-04
S3	4,1E-02	8,1E-03	5,2E-05	1,0E-05	-	-	9,4 E-06	1,9E-06	-	-

RQn máx: cociente de riesgo máximo en niños, RQa máx: cociente de riesgo máximo en adultos, S1: sector 1, S2: sector 2, S3: sector 3, ATE: atenolol, CBZ: carbamazepina, CLO: clopidrogel, ENA: enalapril, MET: metoprolol

Tabla IV.3. continuación Cocientes de riesgo (RQ) máximos, calculados para niños y adultos

	NAD		PRO		SAL		SIL		VEN	
	RQn	RQa	RQn	RQa	RQn	RQa	RQn	RQa	RQn	RQa
<i>M. obtusidens</i>										
S1	4,7E-04	9,4E-05	9,9E-04	2,0E-04	5,3E-04	1,1E-04	-	-	1,8E-03	3,7E-04
S2	4,7E-04	9,4E-05	9,9E-04	2,0E-04	5,3E-04	1,1E-04	1,0E-01	2,2E-02	1,8E-03	3,7E-04
S3	-	-	-	-	-	-	1,4E-01	2,7E-02	-	-
<i>P. lineatus</i>										
S1	9,9E-05	2,0E-05	1,1E-04	2,1E-05	6,0E-05	1,2E-05	-	-	2,6E-04	5,2E-05
S2	9,9E-05	2,0E-05	1,1E-04	2,1E-05	6,0 E-05	1,2E-05	8,0E-02	1,6E-02	2,6E-04	5,2 E-05
S3	-	-	-	-	-	-	1,9E-02	3,8E-03	-	-
<i>P. maculatus</i>										
S2	-	-	-	-	-	-	1,4 E-01	2,7E-02	-	-
S3	-	-	-	-	-	-	3,2E-02	6,3E-03	-	-
<i>S. brasiliensis</i>										
S1	1,2E-05	2,5E-06	1,0E-04	2,1E-05	8,0E-05	1,6E-05	-	-	1,9E-04	3,8E-05
S2	1,2E-05	2,5E-06	1,0E-04	2,1E-05	8,0E-05	1,6E-05	5,3E-02	1,1E-02	1,9E-04	3,8E-05
S3	-	-	-	-	-	-	3,4E-02	6,7E-03	-	-

RQ n máx: cociente de riesgo máximo en niños, RQ a máx: cociente de riesgo máximo en adultos, S1: sector 1, S2: sector 2, S3: sector 3, NAD: nadolol, PRO: propranolol, SAL: salbutamol, SIL: sildenafil, VEN: venlafaxina

Las especies *P. lineatus*, *P. maculatus* y *S. brasiliensis* recolectadas en el Sector 3, sólo mostraron un valor individual RQ máx cercano a uno para niños.

Discusión

Riesgo para el consumo humano

Las especies de peces *M. obtusidens*, *P. lineatus*, *P. maculatus* y *S. brasiliensis*, son consumidas comúnmente por la población local, tanto de Argentina como de Uruguay. Particularmente, la pesca comercial de *P. lineatus* es muy importante en la región ya que esta especie de pez es exportada principalmente al mercado internacional. Es por ello que es de gran importancia generar conocimiento en referencia a los niveles de acumulación de contaminantes como los fármacos humanos en estos peces y el riesgo que ello podría conllevar para el consumo humano.

Los Límites Máximos de Residuos (LMR) para los fármacos humanos estudiados en el presente trabajo, no están establecidos por la legislación internacional, tampoco por las regulaciones de Argentina ni de Uruguay. En particular, un escaso grupo de antibióticos y fármacos han sido incluidos como medicamentos veterinarios por la FAO-OMS (CODEX), USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos), la Unión Europea y el SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), considerando sólo animales de granja, sin incluir peces. Por ejemplo, el LMR para el diclofenac en el músculo bovino y porcino, establecido por el Reglamento Unión Europea No. 37/2010 es de 5 µg kg⁻¹. Coincidiendo con el valor de LMR establecido por el SENASA en la Resolución 559/2011 para el nombrado fármaco en el tejido muscular bovino y porcino. De manera similar, el LMR para el carazolol en el músculo

porcino indicado en el CODEX también es de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Ambos fármacos de uso humano y veterinario.

Los valores detectados de fármacos humanos que se utilizaron para el cálculo del RQ med y máx ([Tabla suplementaria 11](#)), se encontraron en general por debajo del LMR establecido por la Unión Europea, excepto por los compuestos de ATE, ENA y SIL, que estuvieron por encima de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ en todas las especies estudiadas, dependiendo del sector donde fueron recolectados. Particularmente, los ejemplares de *M. obtusidens* mostraron concentraciones de ATE en el Sector 3 y SIL en el Sector 2 y 3, en el rango de 20,5 a $36,6 \mu\text{g kg}^{-1}$. Mientras que para la especie *P. lineatus*, las concentraciones de ENA y SIL, ambos del Sector 2, estuvieron entre 5,7 y $8,1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Por otro lado, los ejemplares de *P. maculatus*, recolectados en el Sector 2, mostraron que ATE, ENA y SIL, estuvieron en el rango de 21,6 a $55,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, mientras que en el Sector 3, ATE y SIL, estuvieron entre 8,1 a $23,1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Por último, en *S. brasiliensis* recolectado en el Sector 2, las concentraciones de ATE, ENA y SIL estuvieron en el rango de 7,9 a $30 \mu\text{g kg}^{-1}$. Mientras que en el Sector 3, para la misma especie, las concentraciones de ATE y SIL, estuvieron en el rango de 17,7 a $28,4 \mu\text{g kg}^{-1}$. Como se puede observar, las concentraciones de ATE, ENA y SIL medidas en los peces del Río Uruguay y Río de la Plata, se encontraron superando hasta más del doble la concentración límite permitida por la Unión Europea y el CODEX establecido para otras drogas.

Teniendo en cuenta los valores de PNEC calculados para niños, los valores para ATE, MET, SAL, SIL y VEN, resultaron entre 1 y 2 órdenes de magnitud superior a las concentraciones ambientales medidas (MEC, de sus siglas en inglés) de los nombrados compuestos. En cambio, los valores de PNEC para adultos, correspondiente a todos los compuestos estudiados, superaron las concentraciones

ambientales medidas (MEC) hasta en 4 órdenes de magnitud. En base a esta comparación, se pudo observar que la evaluación del riesgo para el consumo humano realizada para los 10 fármacos humanos estudiados, demostró que las concentraciones medias y máximas detectadas en el músculo de los peces estudiados no representarían un riesgo para la salud humana, obteniendo en todos los casos un cociente de riesgo (RQ) <1.

En referencia a las concentraciones ambientales detectadas en el músculo que se encuentran más distantes respecto a los valores de PNEC se observa que corresponden con la de los ejemplares recolectados en el sector del Río Uruguay, el cual abarca desde Gualaguaychú (Argentina) hasta la localidad de Bella Unión (Uruguay) (Sector 1). Mientras que los ejemplares recolectados en las regiones de la desembocadura del Río Uruguay, abarcando las localidades de Villa Paranacito (Argentina) y San Salvador (Uruguay) (Sector 2) y margen sur del Río de La Plata Interior (Sector 3), mostraron las concentraciones en el músculo más próximas a los valores de PNEC.

Los resultados encontrados en el presente estudio concuerdan con otro trabajo realizado en Argentina en el cual se evaluó el riesgo para la salud humana asociado al consumo de peces obtenidos de la góndola de supermercados y de la acuicultura en los cuales se midieron concentraciones de antibióticos utilizados por humanos y para profilaxis en animales ([Griboff et al., 2020](#)). En el estudio al que se ha hecho referencia, los peces seleccionados para la evaluación fueron sábalo, pacú, trucha y salmón, siendo todas ellas especies de interés comercial, al igual que las especies seleccionadas para este estudio. Los resultados reportados demostraron que las concentraciones de antibióticos encontradas en peces, no representaban un riesgo para el consumo humano. En Europa se realizó un trabajo para evaluar el riesgo para

el consumo humano de organismos marinos de relevancia comercial en los cuales se ha detectado la presencia de fármacos humanos y disruptores endócrinos ([Álvarez-Muñoz et al., 2018](#)). Los resultados encontrados por los autores mencionados, también fueron coincidentes con la presente tesis, encontrando que el riesgo para la salud humana asociado al consumo de organismos marinos contaminados con fármacos es despreciable. En otro estudio similar realizado en China, también se determinó que las concentraciones de fármacos humanos y productos de cuidado personal acumulados en organismos marinos de relevancia para el consumo, como peces, mejillones y moluscos, no representan un riesgo para la salud humana ([Xie et al., 2019](#)). Un resultado semejante se encontró también para fármacos como el diclofenac, amoxicilina, 17 alfa-etinilestradiol (EE2, de sus siglas en inglés) y dexametasona, en otro estudio realizado en el sudeste asiático ([Omar et al., 2019](#)).

Si bien los resultados obtenidos indican un bajo riesgo para la salud humana asociado al consumo de peces contaminados con fármacos, en el análisis existen factores de incertidumbre que hacen que los mismos deban ser tratados con prudencia. Una de las limitaciones a tener en consideración, por ejemplo, es que la evaluación de riesgo se realizó en base a datos de concentraciones de fármacos humanos medidas en muestras no cocidas. Las especies estudiadas son consumidas generalmente luego de un proceso de cocción. Esto podría generar, por ejemplo, una subestimación del riesgo, ya que se ha comprobado en moluscos que el proceso de cocción produce un aumento general de la concentración de los residuos farmacéuticos en el alimento ([McEneff et al., 2013](#)). Otra de las limitaciones esta relacionada con factores respectivos con el consumo de alimentos, como por ejemplo la estimación de las tasas de consumo de peces en niños y adultos a nivel local y las cantidades consumidas según el tamaño de la porción ([Jacobs et al., 2017](#)).

Otro aspecto importante a considerar es el hecho de que el análisis realizado contempla sólo el riesgo para los compuestos individuales y no un análisis de riesgo acumulado, considerando un análisis de la exposición agregada, ni el efecto de las mezclas (USEPA, 2003). Si bien este aspecto ha sido enfocado principalmente a contaminantes con el mismo modo de acción, y en el presente trabajo se evalúan β -bloqueantes, antiplaquetarios, antihipertensivos, vasodilatadores y psicofármacos, entre otros, es sabido que sustancias con diferente modo de acción pueden desplegar su acción tóxica de forma sinérgica (Belden et al., 2007).

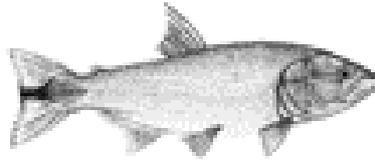
Conclusiones parciales

En el presente capítulo se caracterizó el riesgo para la salud humana de 10 productos farmacéuticos asociado al consumo de carne de pescado para cuatro especies de relevancia en la Cuenca del Plata, *M. obtusidens*, *P. lineatus*, *P. maculatus*, y *S. brasiliensis*. Las principales conclusiones alcanzadas son:

- El cociente de riesgo (RQ) fue menor a 1 en todas las muestras evaluadas tanto para niños como adultos, indicando que, para el sector de la cuenca y las especies estudiadas, existiría *a priori* un muy bajo riesgo para la salud humana vinculado al consumo de peces contaminados por los fármacos de uso humano evaluados.
- De los fármacos analizados, ATE y SIL fueron los que presentaron valores de RQ mayores, sin superar el $RQ > 1$ que implique un riesgo potencial por ingesta de peces, tanto en adultos como niños.
- Por otra parte, la especie que presentó valores de RQ más elevados fue *M. obtusidens* seguida de *P. maculatus*.

- En cuanto a los sectores de la cuenca evaluados, la zona de la desembocadura del Río Uruguay (Sector 2) y el margen costero sur del Río de La Plata Interior (Sector 3) fueron los sitios con mayores niveles de RQ.
- Dado los factores de incertidumbre señalados, sería importante incluirlos para obtener una evaluación más precisa respecto a particularidades de la población local y considerando el riesgo acumulado.

Discusión general



El estudio de los CPEs, es un campo que se encuentra en continuo crecimiento. Si bien existen numerosos trabajos científicos publicados que han contribuido al conocimiento sobre la dinámica, comportamiento y caracterización de los contaminantes emergentes, la mayoría de las producciones científicas provienen de América del Norte y Europa, incrementándose en Asia y China, y generando una brecha de conocimiento en América del Sur y África ([Reichert et al., 2019](#)).

La información disponible sobre la bioacumulación, bioconcentración, sensibilidad y efecto tóxico de los fármacos humanos para las especies de peces de la Cuenca del Plata es escasa y advierte la necesidad de generar información que permita un mejor conocimiento de los riesgos potenciales de estos compuestos, tanto para los peces y demás organismos silvestres que habitan el río, como para la salud de la población humana que se alimenta de ellos. En ese sentido, la presente tesis logró realizar un gran aporte a la temática mediante las publicaciones en revistas internacionales reconocidas ([Rojo et al., 2019](#); [Rojo et al., 2020](#)).

En la presente tesis se utilizaron dos metodologías de extracción diferentes para analizar la concentración de fármacos humanos en el tejido de peces por HPLC-MS o MS/MS: la Extracción Líquida Presurizada (PLE, de sus siglas en inglés), adaptada por [Huerta et al. \(2013\)](#) y la de “Extractor Rotatorio” de [Ramírez et al. \(2007\)](#). Los valores de recuperación reportados para la metodología de “Extractor Rotatorio” se encontraron superando el 25%, reportado en la metodología original, e incluso se encontraron por encima del valor mínimo de 19% encontrado con la metodología de [Huerta et al. \(2013\)](#). Por otro lado los porcentajes de recuperación para ATE y CBZ fueron mayores en la metodología de PLE, sin embargo, para el resto de los compuestos estudiados los porcentajes se encontraron dentro del mismo rango que los reportados previamente por [Huerta et al. \(2013\)](#). En cuanto a los límites de

detección fueron entre 1 y 2 órdenes de magnitud inferiores para la PLE, debido a una menor interferencia de la matriz. De todos modos, con los controles adecuados el método del “Extractor Rotatorio” y posibles aspectos futuros a mejorar para la extracción y detección de una multiplicidad de FH, representa una buena alternativa adecuada para laboratorios con un equipamiento no tan sofisticado.

El empleo de las metodologías mencionadas, han permitido que la presente tesis sea una de las primeras contribuciones a nivel nacional en relación al estudio de la acumulación de los fármacos en los peces. Este es un grupo de organismos acuáticos muy conspicuo, no sólo por su relevancia ecológica y su utilidad como organismos centinela, sino también como fuente de alimento para los seres humanos. En tal sentido, las concentraciones de fármacos humanos halladas en el músculo de los peces en este estudio han permitido demostrar que las especies de peces estudiadas están expuestas a diferentes niveles de concentración de los mismos, dependiendo del compuesto. Si bien, el músculo no es el tejido blanco primario de los compuestos estudiados, los residuos tisulares son un buen estimador de los niveles plasmáticos que, a su vez, son la mejor medida para estimar los efectos adversos de estos compuestos químicos (Meador et al., 2017). En referencia a ello, diversos autores han encontrado una correlación significativa entre las concentraciones musculares y plasmáticas, por ejemplo en el pez *Pimephales promelas*, expuesto a través del agua tanto a oxazepam (Huerta et al., 2016) como tramadol (Tanoue et al., 2017).

Uno de los aportes importantes de esta tesis ha sido que por primera vez se informa sobre la ocurrencia de fármacos humanos en especies de peces de la Cuenca del Plata con relevancia para el consumo humano. En particular, de acuerdo a la información disponible, este sería el primer estudio en el que se encontraron niveles

detectables de sildenafil y enalapril acumulados en el músculo de los peces a nivel mundial.

De los fármacos analizados, CBZ y ATE han sido los compuestos más frecuentemente detectados en el Río Uruguay, mientras que ATE y SIL lo fueron en el Bajo Río Uruguay y la margen costera sur del Río de La Plata Interior. En ambos casos, las frecuencias fueron superiores al 50%. Si bien no se encontró la misma ocurrencia para CBZ y ATE en ambos sectores estudiados, estos compuestos mostraron una correlación positiva, indicando la existencia de una asociación entre las fuentes desde donde provienen estos fármacos. Este hecho fue similar al patrón de detección encontrado en estudios previos donde se han estudiado las concentraciones de estos compuestos en los efluentes o en las aguas receptoras de la región ([Elorriaga et al., 2013a](#); [Elorriaga et al., 2013b](#)).

Pese a que la CBZ y ATE se encontraron con una elevada frecuencia en el Río Uruguay, sus concentraciones estuvieron siempre por debajo de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Por el contrario, otro grupo de fármacos humanos comprendido por la COD, VEN, PRO, MET, HCT y el metabolito de CBZ, (OH-CBZ), no fueron tan frecuentes, pero cuando lo hicieron lo hicieron a concentraciones superiores a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Por consiguiente, este podría considerarse como un grupo de fármacos menos comunes, pero más propensos a acumularse en el músculo de los peces, a excepción del metabolito de la carbamazepina que se estaría detectando en el músculo como parte del proceso de biotransformación del compuesto parental. Por otra parte, las concentraciones detectadas en el músculo de los peces en la desembocadura del Río Uruguay y la margen costera sur del Río de La Plata Interior, fueron más altas que las observadas en el sector medio del Río Uruguay para todos los fármacos estudiados (ATE, CBZ, ENA y SIL), siendo siempre superiores a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Particularmente, las

concentraciones promedio medidas para ATE y SIL fueron superiores a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Las mayores concentraciones en este sector de la cuenca podrían estar asociado al mayor grado de urbanización y consecuentemente mayor población en la desembocadura del Río Uruguay y Río de La Plata Interior.

Las diferencias encontradas en la ocurrencia de los fármacos humanos detectados en peces de la Cuenca del Plata podrían deberse a diferentes factores. En particular, para ninguno de los fármacos estudiados, las concentraciones mostraron una relación con los valores de $\log K_{ow}$ o pK_a de los mismos. Ello indicaría que los patrones de acumulación en las distintas especies están dados por otros factores que no se relacionan con las propiedades fisicoquímicas de los compuestos estudiados. Tales factores podrían deberse a los hábitos tróficos de cada especie o incluso a factores socioeconómicos, tales como comercialización, patrones de consumo, vías de descarte de los mismos al medioambiente y el tratamiento de aguas residuales, como ha sido sugerido por otros autores ([Kookana et al., 2014](#)).

Cuando se consideró la concentración total de fármacos humanos (FHT) acumulados por los peces, los dos estudios realizados en esta tesis arrojaron el mismo resultado, mostrando que la mayor carga de FHT la presentaron los peces recolectados en los sitios ubicados en el Bajo Uruguay, próximo a su desembocadura. Estos resultados fueron contrapuestos a la hipótesis planteada *a priori* sobre que los peces más contaminados estarían en el Río de la Plata en el sector influenciado por área metropolitana de Buenos Aires ya que en esta zona no sólo se encuentra el difusor del emisario que vierte los líquidos cloacales crudos de gran parte de la ciudad de Buenos Aires, sino que también recibe los efluentes cloacales crudos de la ciudad de La Plata y los aportes de muchos otros arroyos urbano-industriales de la región. Es sabido que especies como el sábalo se ven atraídas a estas fuentes ricas en materia

orgánica, pero también en contaminantes como los aquí estudiados. De hecho, los patrones de acumulación de contaminantes persistentes como los PCBs en dicha especie han permitido identificar sábalos con huellas de contaminación correspondientes a la región costeras sur del Río de la Plata, pero colectados varios cientos o miles de kilómetros río arriba en el Paraná (Speranza et al., 2012). Por consiguiente, una explicación posible a lo observado podría ser que los peces del Bajo Río Uruguay fuesen peces que migran río arriba luego de alimentarse en la zona costera del Área Metropolitana de Buenos Aires y la menor concentración en los peces colectados en ese lugar podría explicarse por individuos que llegan a alimentarse a la zona desde sectores menos contaminados río arriba. Sin embargo, nuevos estudios serán necesarios para poder probar estas hipótesis.

La carga de FHT, ha sido utilizada como un indicador del grado de contaminación por fármacos que presenta cada especie. En el primer estudio realizado, a lo largo del tramo compartido del Río Uruguay, se observó que las concentraciones fueron siempre menores en la especie piscívora, *S. brasiliensis*, y mayores en las especies omnívora, *M. obtusidens*, y detritívora, *P. lineatus*, respetando el mismo patrón para carbamazepina y atenolol. De un modo diferente, el estudio realizado en el Bajo Río Uruguay y región costera sur del Río de La Plata Interior, la especie en la que mostró niveles más altos de FHT fue *S. brasiliensis*, seguida por *P. maculatus* y *M. obtusidens*, y finalmente *P. lineatus*. Dicha tendencia fue explicada principalmente por las concentraciones de ATE, que mostró diferencias estadísticamente significativas entre especies con mayores concentraciones en las especies ubicadas en niveles tróficos más altos, pero sólo para los peces colectados en el Bajo Uruguay y el Río de la Plata. Si bien, ello insinuó una relación entre la carga de fármacos humanos y el nivel trófico de los peces, el análisis integral de los diferentes muestreos mostró

que no habría un real fenómeno de biomagnificación, si no que los patrones de acumulación de los fármacos evaluados responderían más a los diferentes hábitos y estrategias de alimentación de las especies de peces estudiadas. Resultados similares han sido encontrados en estudios realizados en otras regiones del mundo ([Arnnok et al., 2017](#); [Du et al., 2016](#); [Du et al., 2014](#); [Huerta et al., 2018](#)).

El análisis de las variaciones estacionales en las concentraciones de fármacos humanos detectadas en peces del Río Uruguay, no mostró resultados concluyentes respecto a que pudieran esperarse cambios importantes en diferentes momentos del año. Por otro lado, respecto a la distribución espacial, como se discutió previamente, los estudios mostraron mayores valores de concentración en los peces capturados en la zona del Bajo Río Uruguay. Aunque se hipotetizó que podría tratarse de peces que ingresan desde zonas más contaminadas de la región costera del Río de La Plata Interior, es evidente que otros estudios serán necesarios para comprender mejor porque los peces del Bajo Uruguay presentan mayores concentraciones de fármacos cuando es un área comparativamente más despoblada. La falta de estacionalidad en la concentración de fármacos humanos ha sido también observada en aguas del río Detroit, Estados Unidos en contraposición a las concentraciones de atrazina, un herbicida con un marcado patrón estacional ([Hua et al., 2006](#)).

Los bioensayos a tiempo final (96h), realizados para evaluar la capacidad de acumularse de algunos de los fármacos humanos detectados en los peces muestreados a campo, pero bajo condiciones controladas de laboratorio utilizando la especie a *C. decemmaculatus*, mostraron que si bien CBZ, ENA y SIL, son capaces de ingresar a los peces, su capacidad de acumularse es limitada, presentando valores de BCF levemente superiores a 1, para CBZ y ATE y por debajo de 1 para ENA. Según los valores de BCF, la capacidad relativa de bioconcentrarse de estos tres

fármacos fue CBZ~SIL>ENA, coincidiendo con los valores de log K_{ow} reportados en la bibliografía (Gobry et al., 2000; Hansch et al., 1995; Huerta et al., 2013).

Por otro lado, se comparó la cinética de bioconcentración del sildenafil en condiciones controladas de laboratorio para dos especies diferentes, *P. mesopotamicus* y *C. decemmaculatus*. En dichos ensayos se observaron ciertas diferencias entre especies. Por ejemplo, el tiempo de latencia de aproximadamente 4 días, detectado en *P. mesopotamicus*, no fue observado en *C. decemmaculatus*. Este comportamiento fue consistente con las constantes de acumulación (k_1) y eliminación (k_2), y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), los mismos reflejaron un proceso de acumulación más lento y una menor capacidad de eliminación por parte de *P. mesopotamicus*, así como también, un tiempo medio de eliminación del compuesto más lento de aproximadamente 6 días y medio. Las diferencias en la velocidad de acumulación observadas en las especies, podrían deberse a mecanismos de incorporación, eliminación y biotransformación que dependan de factores alométricos, regulado por el tamaño de las especies utilizadas en el ensayo.

Los bioensayos realizados para evaluar comparativamente la cinética de acumulación del sildenafil en las dos especies mencionadas, realizados a más largo plazo (6 y 7 días para *P. mesopotamicus* y *C. decemmaculatus*), mostraron que la concentración interna de este fármaco requiere de tiempos mayores que los ensayados para alcanzar el estado estacionario o “plateau”. Ello indica que los ensayos de bioconcentración con este fármaco debieran contemplar tiempos de exposición más prolongados para alcanzar el equilibrio entre la velocidad de incorporación y eliminación. Los valores de BCF estimados a partir del modelo cinético, se encontraron dentro del mismo orden de magnitud para ambas especies. Dichos valores (10,6 y 19,1 para *C. decemmaculatus* y *P. mesopotamicus*, respectivamente)

muestran un bajo potencial de bioconcentración para este fármaco de acuerdo a criterios normalmente consensuados internacionalmente (Arnot and Gobas, 2006).

Al comparar las concentraciones de los fármacos acumulados en los tejidos de los peces en los ensayos de laboratorio respecto a las observadas en los peces muestreados a campo puede verse que para el caso de CBZ y SIL los niveles de acumulación en el laboratorio fueron 27,2 y 4,9 veces mayores que en el campo mientras que para el ENA fueron 0,27. Esto indicaría que para CBZ y SIL, las concentraciones ensayadas en el laboratorio debieron ser mayores que las concentraciones promedio a las que pudieron estar expuestos los peces a campo. De un modo diferente, para ENA esta relación podría por un lado suponer concentraciones ambientales más altas que para los otros dos fármacos, pero por otro lado, podría indicar que para este fármaco la vía trófica es una ruta importante de acumulación. Dado que existe escasa información sobre la acumulación de estos fármacos en peces, especialmente ENA y SIL, los resultados obtenidos servirían de base para la formulación de nuevas hipótesis de trabajo a ser evaluadas en futuros estudios.

El análisis de las respuestas biológicas indicadoras (biomarcadores) sobre el estado del sistema de biotransformación de fase I y II en peces colectados a campo y su correspondencia con los fármacos analizados, mostraron una relación inversa con la concentración total de fármacos en el tejido, con valores significativamente más bajos de la actividad enzimática de BROD y GST en los sábalos capturados en el Bajo Río Uruguay (URU), sector en el que los peces mostraron los niveles de acumulación de los fármacos más altos. La diferencia de actividad entre los peces colectados en URU respecto a los colectados en la margen costera sur del Río de la Plata Interior (RLP) fue mayor al 25%, un porcentaje considerado como efecto de tamaño crítico (CES)

en el marco del “Environmental Effect Monitoring” (Relevamiento de Efectos Ambientales) realizados por Environmental Canada (Agencia Ambiental de Canadá) (EC, 2010; Kilgour et al., 2007). Los mayores niveles de las enzimas de detoxificación encontrados en los peces capturados en RLP fueron consistentes con los niveles altos de concentraciones de hidrocarburos y PCB, reportados históricamente en dicha zona (Colombo et al., 2018) y la inducción de biomarcadores de contaminación analizados en peces recolectados la zona (Scarcia et al., 2012a).

A su vez, los resultados también estarían de acuerdo con el hecho de que algunos fármacos son capaces de inhibir el sistema de biotransformación de fase I, en lugar de inducirlo (Pelkonen et al., 2008). En tal sentido, de los diferentes fármacos analizados en el músculo de *P. lineatus* colectados en RLP y URU, se observó una correlación negativa entre las concentraciones de enalapril y la actividad hepática de BROD (correlación de Pearson, $p = 0,010$), por tanto, la acumulación de este fármaco podría contribuir a la inhibición de la enzima observada en los peces colectados en URU. Por otro lado, se encontró una correlación significativa entre la actividad de BROD y GST (Correlación de Pearson, $p = 0,046$), en concordancia con la relación que se sabe existe entre las enzimas del sistema de biotransformación de fase I y fase II (Rand, 1995).

Es importante resaltar aquí, que esta tesis es el primer trabajo en el que se estudió la actividad de BROD en el hígado de *P. lineatus*, el pez más abundante de la Cuenca del Plata.

El estudio realizado para evaluar, bajo condiciones controladas de laboratorio, el efecto del sildenafil, uno de los fármacos encontrados en el músculo de los peces colectados a campo, sobre la actividad de enzimas del sistema de biotransformación de fase I (EROD y BROD) y de fase II (GST), además de enzimas del sistema

antioxidante (CAT) en el hígado de *P. mesopotamicus*, mostró que este fármaco fue capaz de incrementar en un 50% la actividad de todas las enzimas analizadas en los peces recolectados en la fase de acumulación. Esta tesis es el primer trabajo, dentro de los disponibles a través de publicaciones científicas, en evaluar el efecto del SIL sobre estas enzimas en peces. De acuerdo a estos resultados, el SIL sería capaz de inducir a las isoformas CYP 450 con mayor potencia sobre EROD. Es sabido que la estimulación del CYP 450 promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y que éstas inducen a las enzimas del sistema antioxidante, como CAT. A su vez, los productos oxidados por el CYP 450 estimulan la inducción de las enzimas de biotransformación como GST ([Rand, 1995](#)). Estudios realizados en ratas y conejos muestran de forma similar que el SIL es capaz de inducir significativamente la actividad de CAT, pero sin alterar la de GST ([Sheweita et al., 2015](#); [Sheweita et al., 2020](#)). Además, dichos estudios han mostrado que por lo general el SIL posee capacidad de inhibir varias isoformas del CYP 450 más que inducir las, pero ello puede variar según a isoforma y la concentración ensayada. La diferencia entre la especificidad de las isoformas del CYP 450 entre peces y mamíferos es ampliamente conocida pudiendo ello explicar quizás las diferencias observadas.

En los estudios a campo, se observó una menor actividad de BROD en el área donde los peces presentaron mayores niveles de SIL, pero la comparación con los resultados obtenidos en el laboratorio no es sencilla debido a que los peces en el campo están expuestos a mezclas complejas que podrían causar diferentes efectos.

Las especies estudiadas son importantes recursos pesqueros en la Cuenca del Plata ya sea por su pesca comercial, como es el caso de *P. lineatus*, artesanal, como el caso de *M. obtusidens*, o deportiva, como *S. brasiliensis*. En el caso de *P. maculatus*, es una especie que suele ser muy comúnmente pescada de forma recreativa por

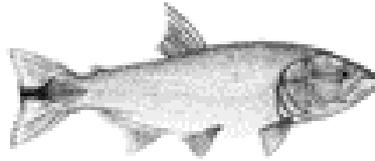
pescadores aficionados. Todas ellas son en mayor o menor grado consumidas por los seres humanos por ello es que en esta tesis se consideró relevante evaluar el riesgo que el consumo de los mismos pudiera representar para la salud humana.

En relación a los LMRs establecidos por diferentes organismos internacionales, se observa que ninguno de los fármacos analizados se encuentra regulado, ni en la legislación argentina, ni el CODEX *Alimentarius* de la FAO, ni en la reglamentación de la Unión Europea. En general, dichas reglamentaciones establecen, por ejemplo, para plaguicidas valores de 0,01 mg kg⁻¹ (10 µg kg⁻¹) como límite por defecto cuando una sustancia no se encuentra explícitamente listada ([SENASA Res 934/10](#), [EU 396/2005](#)). Específicamente para fármacos, se pueden tomar como referencia los LMRs establecidos para otros fármacos y en otras carnes, cómo por ejemplo 5 µg kg⁻¹ para carazolol en músculo porcino ([CODEX Alimentarius, CX/MRL 2-2018](#)) y para diclofenaco en músculo bovino y porcino ([EU 37/2010](#)). Considerando dichos LMRs como referencia, los residuos de atenolol, enalapril y sildenafil en el músculo de las especies de peces estudiadas, lo han excedido en varias oportunidades. Por lo que los datos obtenidos podrían servir como línea de base para el futuro establecimiento de LMRs de los fármacos estudiados.

Desde otro enfoque, las evaluaciones de riesgo ecológico y de salud humana asociado a la exposición ambiental de fármacos son señaladas como una prioridad debido a la falta de conocimiento en la temática ([Jones et al., 2004](#)). Esta tesis es uno de los primeros aportes en tal sentido a nivel regional, específicamente dirigido a evaluar el riesgo para la salud asociado al consumo de peces contaminados por fármacos y que ha sido estimado sobre PNECs para adultos y niños, basados en ADIs y datos de consumo para especies de peces de interés en la Cuenca del Plata. El grado de riesgo para la salud humana obtenido fue bajo, dado que ninguno de los RQ

de los fármacos excedió la unidad. Estos resultados fueron consistentes con los que han sido obtenidos sobre especies comerciales de la región (Griboff et al., 2020) y otras regiones del mundo (Álvarez-Muñoz et al., 2018; Omar et al., 2019; Xie et al., 2019), discutidos previamente. Sin embargo, considerando los factores de incertidumbre que existen, es importante resaltar aquellos fármacos cuyos RQ estuvieron dentro de los dos órdenes de magnitud del parámetro mencionado, que fueron ATE y SIL. Por otra parte, los mayores niveles de concentración encontrados en los peces del Bajo Uruguay y el margen costero sur del Río de La Plata Interior, hicieron que estos valores de riesgo se dieran justamente en dichas zonas. Entre las especies estudiadas, las que presentaron mayores concentraciones de estos fármacos y por tanto representaron un mayor riesgo, fueron *M. obtusidens* y *P. maculatus*.

Conclusión general



En la presente tesis se lograron optimizar e implementar metodologías de pre-tratamiento y condiciones instrumentales para el análisis por HPLC-MS de diferentes familias de fármacos humanos en peces y a partir de ello se pudieron determinar las concentraciones de dichos analitos en las especies de peces de la Cuenca del Plata de importancia para el consumo humano y pertenecientes a distintos niveles tróficos. A partir de los datos obtenidos, se lograron establecer patrones de bioacumulación y ocurrencia de los mismos, y se identificaron sectores de la cuenca donde los peces presentaron mayores niveles de acumulación de estos compuestos.

Complementariamente, en condiciones de laboratorio se evaluaron los factores de bioconcentración de tres de los fármacos detectados en los estudios de campo (ATE, ENA y SIL) y en particular para SIL se estudió la cinética de bioconcentración.

A su vez, se evaluaron enzimas del sistema de biotransformación de fase I (EROD y BROD) y fase II (GST) en peces de campo en relación a la concentración de fármacos acumulada en los tejidos y complementariamente la respuesta de dichas enzimas, más la enzima del sistema antioxidante (CAT), fue evaluada en peces expuestos en condiciones controladas de laboratorio a SIL.

Finalmente, sobre la base de las concentraciones de fármacos humanos detectadas en el tejido muscular de los ejemplares de campo, se estimaron los potenciales riesgos para el consumo de pescado en la región.

Es importante remarcar que ya sea por los fármacos analizados, sitios, especies o enzimas estudiadas, o la combinación de ellos, muchos de los resultados de la presente tesis son únicos a nivel nacional, regional o incluso mundial.

Las principales conclusiones que se obtuvieron en el presente trabajo son:

- Las metodologías de Extracción Líquida Presurizada (PLE) y método de “Extractor Rotatorio” han demostrado ser satisfactorias para el análisis de fármacos humanos en peces, cada una presentando ventajas y desventajas.
- Se reporta por primera vez la presencia de 18 fármacos humanos en el músculo de *M. obtusidens*, *P. lineatus*, *P. maculatus*, y *S. brasiliensis*, cuatro especies de peces característicos de la Cuenca del Plata, recolectados a lo largo de 500 km del Río Uruguay en el tramo compartido entre Argentina y Uruguay y en la margen costero sur del Río de La Plata Interior. En particular, se reportaron por primera vez a nivel mundial, niveles detectables de ENA y SIL bioacumulados en tejidos de peces.
- En referencia a los peces recolectados en la región del Río Uruguay, los compuestos de CBZ y ATE se encontraron con frecuencias de detección superiores al 50%, pero concentraciones siempre por debajo de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, mientras que en la región del Bajo Río Uruguay y Río de La Plata Interior, ATE y SIL, fueron los fármacos humanos más frecuentes ($\geq 50\%$), y en concentraciones superiores a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.
- De un modo semejante a lo hallado por otros autores, no se encontró una relación entre el nivel de bioacumulación y las propiedades fisicoquímicas (es decir, $\log K_{ow}$, pKa) de los fármacos humanos estudiados, por lo que se estima que dicho proceso estaría principalmente relacionado con los hábitos biológicos de los peces, tales como la alimentación o los comportamientos migratorios.
- Tampoco se encontró una tendencia a la biomagnificación para ninguno de los fármacos analizados y no se hallaron variaciones estacionales en los niveles de bioacumulación en ninguna de las especies estudiadas a lo largo del Río Uruguay.

- Los niveles de concentración y frecuencias de detección de los fármacos humanos estudiados en peces, fueron más altos en la región del Bajo Río Uruguay. Particularmente los ejemplares de *P. lineatus* recolectados en el Bajo Río Uruguay mostraron concentraciones superiores estadísticamente significativas para el fármaco ENA, en comparación con los ejemplares recolectados en el Río de La Plata Interior.
- Los bioensayos de 96 h con *C. decemmaculatus*, indicaron que los BCF empíricos observados respetaron el orden de CBZ~ SIL > ENA, coincidiendo con los valores de log K_{ow} de cada compuesto. Si bien los bioensayos detectaron la bioacumulación, los valores de BCF obtenidos fueron <1, indicando un bajo potencial de bioconcentración para estos tres fármacos. De acuerdo al nivel de bioconcentración medido en el laboratorio en comparación con el de los peces de campo, sugiere para CBZ y SIL que el agua sería la vía de exposición más relevante y que las concentraciones en el ambiente serían en promedio menores a las ensayadas mientras que para ENA, podrían existir otras vías relevantes (ej. vía trófica) para justificar las concentraciones medidas en los peces a campo.
- Los bioensayos realizados para evaluar la cinética de bioconcentración del SIL en *C. decemmaculatus* y *P. mesopotamicus* mostraron diferencias entre especies con mayores tiempos de latencia para la especie de mayor tamaño. Además, se observó que los tiempos para alcanzar el equilibrio son mayores a los 7 d. Si bien los BCF serían mayores a los obtenidos a 96 h, los valores estimados por el modelo toxicocinético rondarían un valor de 10, indicando todavía una baja capacidad de bioconcentración.

- Las enzimas del sistema de biotransformación de fase I (EROD y BROD) y de fase II (GST) en ejemplares de *P. lineatus*, recolectados en el margen costero sur del Río de La Plata Interior (RLP) y Bajo Río Uruguay (URU) mostraron diferencias estadísticamente significativas o >25% (efecto crítico considerado por Environmental Canada) entre sitios. Reportando los mayores valores en RLP, la zona en la que históricamente se han reportado mayores niveles de contaminación con PCB e hidrocarburos. A su vez, se encontró una correlación positiva entre las actividades de BROD y GST, consistente con la relación que se sabe existe entre el sistema de biotransformación de fase I y fase II. Ninguna de las enzimas de detoxificación estudiadas correlacionó positivamente con ninguno de los fármacos evaluados, sino que BROD mostró una correlación negativa significativa con ENA, lo cual indicaría una posible acción inhibitoria de dicho fármaco con dicha isoforma del CYP 450.
- Los bioensayos de laboratorio con individuos de *P. mesopotamicus* expuestos a SIL mostraron una inducción significativa de la actividad de EROD y CAT, indicando la capacidad de este fármaco de inducir dicha isoforma del CYP 450, que como es sabido promueve la generación de radicales libres e inducen a las enzimas del sistema antioxidante como CAT. La diferencia observada respecto a los estudios de campo, indicarían que el efecto del SIL debe ser ocultado por el de otros contaminantes presentes, como las complejas mezclas que existen en el ambiente.
- Para los fármacos humanos estudiados no existe en la legislación nacional ni internacional límites de residuos máximos (LMR) en músculo de pescado. En relación con los LMRs admitidos para otros fármacos ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$) y en otros tipos

de carnes, los valores de concentración de fármacos como ATE, ENA, SIL, OH-CBZ y HCT superaron dicho valor en reiteradas ocasiones.

- De acuerdo a los PNECs calculados a partir de los ADIs obtenidos para diferentes fármacos, los niveles de consumo de pescado en la región, y las concentraciones de los fármacos medidas en el músculo de las especies estudiadas de relevancia para el consumo en la Cuenca del Plata, es posible concluir que el riesgo es muy bajo. De todos modos, debe advertirse que la evaluación realizada no contempló el efecto combinado de todos los fármacos ni el posible efecto de las mezclas. Los fármacos cuyo cociente de riesgo (RQ) fue más alto (pero aún debajo de 1) fueron el ATE, ENA y SIL, que representan los fármacos con mayor concentración detectada en el músculo de las especies de peces estudiadas. Por otro lado, la especie que mostró el RQ más elevado fue *P. maculatus* para SIL en el Bajo Uruguay.

Finalmente, cabe resaltar que los resultados obtenidos en la presente tesis realizan un aporte importante, para cubrir un área de vacancia sobre la escasa información existente sobre los patrones de acumulación de estos contaminantes emergentes en especies de peces en general, y en particular, para especies características de la Cuenca del Plata.

El conocimiento generado brinda información útil para la gestión de los recursos naturales y pesqueros de la región, pudiendo ser los datos experimentales de toxicocinética una potencial herramienta para obtener información sobre la concentración esperada de un fármaco de interés en el tejido de un pez, a raíz de datos de campo de concentración en agua, o inversamente, a partir del dato de concentración en tejido determinar el nivel promedio de concentración del fármaco en agua en la que estuvo expuesto el pez.

Los datos generados en la presente tesis podrían ser aplicados para la formulación de futuros Niveles Guías de calidad de agua o posibles Límites Máximos de Residuos en peces de consumo, contribuyendo de esta manera a la formulación de regulaciones respecto al consumo de los peces en la región estudiada, así como también caracterizando posibles efectos tóxicos de los fármacos humanos en peces, mediante respuestas biológicas a nivel bioquímico, como los biomarcadores.

Material suplementario

Tabla suplementaria 1. Información sobre los peces recolectados y agrupados para el análisis químico, durante las campañas de otoño y primavera en cada localidad de muestreo (Capítulo I-Sección I)

Estación	Localidad	Especies	N° Pez	LS (cm)	P (g)	N° Pool	
Otoño	Villa Paranacito_1	<i>P. lineatus</i>	1	42	708	Pool_01	
			2	33	773		
			3	32	825		
			4	31	842		
			5	37	844		
			<i>M. obtusidens</i>	6	39	1997	Pool_02
				7	40	1936	
				8	37	1611	
				9	36	1223	
				19	41	1997	
			<i>S. brasiliensis</i>	11	54	3030	Pool_03
				12	37	1844	
				13	45	1905	
				14	39	1205	
				15	48	2078	
	San Salvador	<i>P. lineatus</i>	16	37	1292	Pool_04	

		17	33	986	
		18	36	1406	
		19	38	1498	
	<i>M. obtusidens</i>	20	39	1626	Pool_05
		21	41	2028	
		22	37	1048	
	<i>S. brasiliensis</i>	23	56	4070	Pool_06
		24	54	3314	
		25	53	3312	
		26	37	950	
Puerto Yerúa	<i>P. lineatus</i>	27	46	2702	Pool_07
		28	34	1216	
		29	34	1352	
		30	32	1084	
	<i>M. obtusidens</i>	31	45	2304	Poo_08
		32	38	1324	
		33	41	1454	
		34	49	2638	
	<i>S. brasiliensis</i>	35	48	2216	Pool_09
		36	47	1706	

			37	42	1492	
	Arapey	<i>P. lineatus</i>	38	38	1498	Pool_10
			39	38	1656	
			40	38	1402	
			41	27	1426	Pool_11
			42	37	1248	
			43	38	1260	
			44	47	2428	
			45	49	2242	Pool_12
			46	38	1120	
			47	23	1306	
<hr/>						
Otoño	Bella Unión	<i>P. lineatus</i>	48	37	1480	Pool_13
			49	30	1668	
			50	43	1806	
			51	34	1246	
		<i>M. obtusidens</i>	52	28	514	Pool_014
			53	31	714	
			54	33	983	
			55	35	1104	
		<i>S. brasiliensis</i>	56	38	1010	Pool_15

57 55 2766

58 30 1506

Primavera	V. Paranacito_2	<i>P. lineatus</i>	59	37	1627	Pool_16
			60	36	1045	
			61	34	1078	
		<i>M. obtusidens</i>	62	41	1762	Pool_17
			63	32	1088	
			64	37	1484	
		<i>S. brasiliensis</i>	65	41	1249	Pool_18
			66	40	1160	
			67	35	922	
	Gualeguaychú	<i>P. lineatus</i>	68	30	764	Pool_19
			69	32	893	
			70	30	744	
		<i>M. obtusidens</i>	71	36	1152	Pool_20
			72	30	854	
			73	34	1036	
		<i>S. brasiliensis</i>	74	47	2194	Pool_21
			75	45	1674	

		76	59	4162	
Concepción del Uruguay	<i>P. lineatus</i>	77	40	1770	Pool_22
		78	34	1068	
	79	36	1148		
	<i>M. obtusidens</i>	80	40	1643	Pool_23
		81	41	1494	
Mocoretá	<i>S. brasiliensis</i>	82	36	1005	
		83	61	5810	Pool_24
		84	41	1409	
	<i>P. lineatus</i>	85	41	1382	
		86	29	690	Pool_25
		87	36	1219	
		88	31	883	
<i>M. obtusidens</i>	89	30	648	Pool_26	
	90	32	758		
	91	39	1353		
	<i>S. brasiliensis</i>	92	48	2166	Pool_27
		93	45	1964	
		94	44	1578	

Tabla suplementaria 2. Frecuencias generales y concentraciones de FH medidos en el músculo de las especies de peces estudiadas en el Río Uruguay (Figura I.5)

P. lineatus

FH	Frec.	Media	ES	Máx	% FHTs
Carbamazepina	100%	0,21 ± 0,091		0,88	11%
Atenolol	44%	0,15 ± 0,033		0,29	4%
Hydrochlorothiazide	33%	0,28 ± 0,050		0,40	6%
Nadolol	22%	0,10 ± 0,012		0,10	2%
2-HydroxyCBZ	22%	5,1 ± 1,2		10,2	59%
Lorazepam	22%	0,23 ± 0,027		0,23	5%
Carazolol	11%	0,19 ± 0,018		0,19	3%
Propranolol	11%	0,21 ± 0,021		0,20	2%
10,11-EpoxyCBZ	11%	0,63 ± 0,070		0,63	5%
Venlafaxina	11%	0,23 ± 0,021		0,23	3%

M. obtusidens

FH	Frec,	Media	ES	Máx	% FHTs
Carbamazepina	100%	0,24 ± 0,065		0,57	6%
Atenolol	100%	0,15 ± 0,067		0,61	4%

Metoprolol	88%	1,11 ± 0,326	2,4	24%
Propranolol	88%	0,60 ± 0,22	1,9	13%
Nadolol	63%	0,20 ± 0,059	0,49	3%
Venlafaxina	38%	1,07 ± 0,184	1,6	12%
Codeina	38%	0,89 ± 0,16	1,1	9%
Hydrochlorothiazide	38%	2,08 ± 0,74	6,0	19%
Sotalol	25%	0,11 ± 0,017	0,15	1%
10,11-EpoxyCBZ	25%	0,23 ± 0,030	0,23	2%
2-HidroxyCBZ	25%	0,21 ± 0,030	0,26	2%
Clopidrogel	25%	0,37 ± 0,057	0,51	3%
Salbutamol	25%	0,19 ± 0,023	0,19	2%

S. brasiliensis

FH	Frec,	Media	ES	Máx	% FHTs
Carbamazepina	78%	0,17 ± 0,039	0,36	20%	
Atenolol	44%	0,067 ± 0,010	0,067	6%	
Metoprolol	33%	0,57 ± 0,13	1,2	32%	
Propranolol	22%	0,17 ± 0,023	0,21	9%	
Diazepam	22%	0,16 ± 0,023	0,19	7%	
Venlafaxine	22%	0,17 ± 0,021	0,17	10%	

2-HydroxyCBZ	22%	0,091 ± 0,015	0,14	4%
Hydrochlorothiazide	22%	0,16 ± 0,019	0,16	9%
Sotalol	11%	0,052 ± 0,0047	0,052	2%

Tabla suplementaria 3. Diferencias entre las concentraciones de FHTs, CBZ y ATE ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en el músculo de las especies de peces estudiadas en el Río Uruguay (Figura I. 6)

FHTs

Especies	Media	±	ES	N	Máx	Mediana	Frec.	p-valor
<i>M. obtusidens</i>	3,7	±	1,3	8	11,5	1,00	100%	0,137
<i>P. lineatus</i>	1,7	±	1,1	9	11,3	0,34	100%	
<i>S. brasiliensis</i>	0,52	±	0,19	9	1,9	0,30	89%	

Carbamazepina

Especies	Media	±	ES	N	Máx	Mediana	Frec.	p-valor
<i>M. obtusidens</i>	0,20	±	0,060	8	0,57	0,085	100%	0,667
<i>P. lineatus</i>	0,22	±	0,079	9	0,88	0,16	100%	
<i>S. brasiliensis</i>	0,14	±	0,034	9	0,36	0,13	78%	

Atenolol

Especies	Media	±	ES	N	Máx	Mediana	Frec.	p-valor
<i>M. obtusidens</i>	0,15	±	0,056	8	0,61	0,07	100%	0,177
<i>P. lineatus</i>	0,075	±	0,030	9	0,29	0,016	44%	
<i>S. brasiliensis</i>	0,040	±	0,009	9	0,067	0,016	44%	

FH: fármacos humanos; FHT: carga total de FH obtenida como la suma de las concentraciones de todos los FH detectados; Media: concentración media; ES: error

estándar; N: número total de muestras analizadas; Mediana: valor mediano considerando todas las muestras, Máx: concentración máxima; Frecuencia: la frecuencia de las muestras por encima del LDM (para FHT todas las muestras con al menos un FH por encima del LDM). Valor p : Análisis ANOVA unidireccional. Los parámetros estadísticos se obtuvieron incluyendo todas las muestras. Los valores para las muestras detectables pero no cuantificables o no detectables se reemplazaron por $(LCM+LDM)/2$ o $LDM/2$, respectivamente. LCM: Límite de cuantificación del método; LCM: Límite de detección método.

Tabla suplementaria 4 Variaciones geográficas de las concentraciones de CBZ, ATE y FHTs ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en el músculo de las especies de peces estudiadas en el Río Uruguay (Figura I.7).

P. lineatus

Localidad	Latitud (grados Sur)	Carbamazepina	Atenolol	FHTs
Villa Paranacito_1	-33,715	0,185	0,074	0,259
Villa Paranacito_2	-33,802	0,877	0,292	2,103
San Salvador	-33,471	0,188	ND	0,299
Gualeduaychú	-33,078	0,171	0,162	11,332
Concepción del Uruguay	-32,484	0,106	ND	0,106
Puerto Yerúa	-31,527	0,162	0,074	0,340
Arapey	-30,949	DNC	ND	DNC
Mocoretá	-30,663	DNC	ND	0,602
Bella Unión	-30,263	DNC	ND	0,422

M. obtusidens

Localidad	Latitud (grados Sur)	Carbamazepina	Atenolol	FHTs
Villa Paranacito_1	-33,715	0,569	0,607	8,462
Villa Paranacito_2	-33,802	0,467	DNC	11,55
San Salvador	-33,471	0,278	0,214	6,815

Concepción del Uruguay	-32,484	DNC	DNC	0,997
Puerto Yerúa	-31,527	DNC	DNC	0,781
Arapey	-30,949	DNC	DNC	0,864
Mocoretá	-30,663	DNC	DNC	0,864
Bella Unión	-30,263	DNC	DNC	0,184

S. brasiliensis

Localidad	Latitud (grados Sur)	Carbamazepina	Atenolol	FHTs
------------------	---------------------------------	----------------------	-----------------	-------------

Villa Paranacito_1	-33,715	DNC	DNC	0,440
Villa Paranacito_2	-33,802	0,148	DNC	1,073
San Salvador	-33,471	0,129	ND	0,302
Gualeduaychú	-33,078	0,239	DNC	0,306
Concepción del Uruguay	-32,484	ND	ND	ND
Puerto Yerúa	-31,527	DNC	ND	0,233
Arapey	-30,949	ND	ND	0,282
Mocoretá	-30,663	0,361	0,067	0,162
Bella Unión	-30,263	0,162	ND	1,924

Concentraciones de las muestras compuestas de cada localidad; FHTs: carga total de productos farmacéuticos humanos calculada como la suma de todos los FH por encima del LDM (las muestras detectables pero no cuantificables se reemplazaron por $(LCM+LDM)/2$), DNC: detectable no cuantificable (en el gráfico reemplazada por $(LDM+LCM)/2$), ND: no detectable (en el gráfico reemplazada por $LDM/2$). LCM: Límite de cuantificación del método, LDM: Límite de detección del método.

Tabla suplementaria 5. Variaciones estacionales en las concentraciones de FHTs, CBZ y ATE ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en el músculo de las especies de peces estudiadas en el Río Uruguay.

P. lineatus

FH	Estación	Media \pm ES	N	Máx	Mediana	<i>p</i>-valor
FHTs	Otoño	0,23 \pm 0,059	5	0,42	0,26	0,186
	Primavera	3,6 \pm 2,3	4	11,3	1,4	
Carbamazepina	Otoño	0,13 \pm 0,021	5	0,19	0,11	0,279
	Primavera	0,32 \pm 0,16	4	0,88	0,17	
Atenolol	Otoño	0,027 \pm 0,010	5	0,070	0,016	0,087
	Primavera	0,14 \pm 0,052	4	0,29	0,12	

M. obtusidens

FH	Estación	Media \pm ES	N	Máx	Mediana	<i>p</i>-valor
FHTs	Otoño	3,4 \pm 1,6	5	8,5	0,86	0,864
	Primavera	4,0 \pm 2,2	4	11,5	1,7	
Carbamazepina	Otoño	0,22 \pm 0,063	5	0,57	0,085	0,777
	Primavera	0,18 \pm 0,083	4	0,47	0,085	
Atenolol	Otoño	0,21 \pm 0,069	5	0,61	0,070	0,286
	Primavera	0,070 \pm 0,000	4	0,070	0,070	

S. brasiliensis

FH	Estación	Media ± ES	N	Máx	Mediana	p -valor
FHTs	Otoño	0,59 ± 0,31	5	1,9	0,30	0,743
	Primavera	0,44 ± 0,18	4	1,1	0,27	
Carbamazepina	Otoño	0,12 ± 0,056	5	0,36	0,085	0,657
	Primavera	0,16 ± 0,027	4	0,24	0,16	
Atenolol	Otoño	0,038 ± 0,012	5	0,070	0,016	0,798
	Primavera	0,043 ± 0,013	4	0,070	0,043	

FH: fármacos humanos; FHTs: carga total de FHs obtenido como la suma de las concentraciones de todos los FHs detectados; Media: concentración promedio; ES: error estándar; N: número total de muestras analizadas; Mediana: valor de la mediana, Máx: concentración máxima; Frec.: frecuencia de muestras por encima del LDM, para FHTs todas las muestras con al menos un FH sobre el LDM. *p*-valor: ANOVA unidireccional. Los parámetros estadísticos y ANOVA se calcularon incluyendo todas las muestras (los valores por debajo de los límites de detección o cuantificación se sustituyeron por <LDM/2 o (LCM+LDM)/2, respectivamente). LCM: límite de cuantificación del método; LDM: límite de detección del método.

Tabla suplementaria 6. Información sobre especies de peces, concentración de fármacos humanos y actividad enzimática

Area	Sitio	Arte	Especie	Sexo	P (g)	LT (cm)	LC (cm)	PH (g)	GP (g)	μg kg ⁻¹				(pmol min ⁻¹ mg prot ⁻¹)		
										ATE	CBZ	ENA	SIL	EROD	BROD	GST
URU	1	R	<i>P. maculatus</i>	M	455	32,0	7,0	3,14	0,21	<LDM	<LDM	28,56	38,33			
URU	3	R	<i>P. maculatus</i>	H	615	36,5	7,5	6,73	1,56	42,28	<LDM	<LDM	71,62			
URU	3	R	<i>M. obtusidens</i>	H	320	27,0	5,5	4,97	0,82	<LDM	45,79	56,88	<LDM			
URU	1	A	<i>M. obtusidens</i>	H	520	36,0	7,0	5,02	0,1	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM			
URU	1	A	<i>M. obtusidens</i>	H	265	26,0	5,0	4,25	<0.1	<LDM	<LDM	<LDM	21,95			
URU	1	A	<i>M. obtusidens</i>	H	355	28,0	5,0	5,27	0,11	<LDM	<LDM	<LDM	56,76			
URU	1	A	<i>S. brasiliensis</i>	H	270	27,0	6,0	6,31	0,2	75,05	<LDM	<LDM	<LDM			
URU	1	A	<i>S. brasiliensis</i>	I	360	29,0	6,0	8,11	<0.1	33,65	34,26	31,14	<LDM			
URU	1	A	<i>S. brasiliensis</i>	I	335	29,0	6,0	10,68	<0.1	42,14	<LDM	<LDM	29,03			
URU	1	A	<i>S. brasiliensis</i>	M	445	32,0	7,0	7,26	<0.1	88,94	<LDM	<LDM	<LDM			

URU	1	R	<i>P. lineatus</i>	H	550	34,0	6,5	4,68	1,47	<LDM	<LDM	<LDM	<LCM	---	68	448
URU	1	R	<i>P. lineatus</i>	H	360	29,0	6,0	4,11	<0.1	<LDM	<LDM	<LDM	<LCM	167	212	424
URU	1	R	<i>P. lineatus</i>	H	1475	47,0	9,5	12,63	6,06	18,04	8,83	<LDM	6,43	101	308	325
URU	1	R	<i>P. lineatus</i>	H	1165	43,0	9,0	14,98	2,48	55,55	15,36	<LDM	<LCM	284	252	330
URU	2	R	<i>P. lineatus</i>	H	1360	45,0	10,0	9,35	3,73	<LCM	<LDM	<LCM	7,29	161	439	250
URU	3	R	<i>P. lineatus</i>	H	1795	47,5	8,0	25,83	6,73	<LDM	9,22	<LDM	<LCM	62	450	324
URU	3	R	<i>P. lineatus</i>	H	1530	44,5	8,5	13,22	8,08	36,09	10,21	<LDM	<LDM	193	356	187
URU	3	R	<i>P. lineatus</i>	H	1885	51,0	10,5	12,55	10,2	60,41	<LCM	21,39	<LDM	639	77	327
URU	1	A	<i>P. lineatus</i>	H	330	26,0	5,0	3,79	0,35	<LDM	<LDM	<LCM	42,23	PMHA	PMHA	PMHA
URU	2	A	<i>P. lineatus</i>	H	245	24,0	5,0	3,99	<0.1	69,41	<LDM	<LDM	5,77	PMHA	PMHA	PMHA
URU	3	A	<i>P. lineatus</i>	H	250	24,0	5,0	3,28	0,28	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	PMHA	PMHA	PMHA
URU	1	A	<i>P. lineatus</i>	I	225	24,0	5,0	3,93	<0.1	21,44	<LDM	<LCM	<LDM	PMHA	PMHA	PMHA
URU	1	A	<i>P. lineatus</i>	I	245	25,0	5,0	3,93	<0.1	13,53	<LDM	<LDM	<LDM	PMHA	PMHA	PMHA

URU	3	A	<i>P. lineatus</i>	I	720	34,0	7,0	10,20	<0.1	31,10	<LDM	<LDM	31,66	PMHA	PMHA	PMHA
URU	3	A	<i>P. lineatus</i>	M	220	23,0	4,5	4,31	<0.1	<LDM	<LDM	12,84	<LDM	235	75	341
URU	3	A	<i>P. lineatus</i>	M	335	27,0	5,5	4,07	<0.1	<LDM	<LDM	22,23	<LDM	239	77	633
URU	3	A	<i>P. lineatus</i>	M	520	30,0	6,0	7,61	<0.1	31,61	<LDM	9,00	<LDM	66	65	180
URU	3	A	<i>P. lineatus</i>	M	220	24,0	5,0	4,71	<0.1	<LCM	<LDM	17,59	8,61	146	129	475
URU	1	R	<i>P. lineatus</i>	M	1.215	45,0	8,5	7,72	0,16	30,62	<LDM	<LDM	13,95	12	58	112
URU	3	R	<i>P. lineatus</i>	M	1.540	45,0	8,5	15,43	0,89	<LCM	<LDM	<LDM	7,95	447	313	333
URU	3	R	<i>P. lineatus</i>	M	1.205	41,0	8,0	10,42	0,35	<LDM	<LDM	<LDM	22,32	50	118	124
URU	3	A	<i>P. lineatus</i>	M	635	33,0	6,0	9,22	0,1	17,02	<LDM	15,66	11,26	275	46	249
RLP	4	R	<i>P. maculatus</i>	M	240	28,0	5,0	2,82	0,21	<LDM	<LDM	<LDM	6,95			
RLP	4	R	<i>P. maculatus</i>	M	250	28,0	5,0	3,92	0,22	33,45	<LDM	<LDM	<LDM			
RLP	4	R	<i>P. maculatus</i>	M	295	29,0	6,0	3,58	0,7	34,88	<LDM	<LDM	16,54			
RLP	4	A	<i>M. obtusidens</i>	I	220	23,0	4,0	3,37	<0.1	40,05	<LDM	<LDM	<LDM			

RLP	4	A	<i>M. obtusidens</i>	I	210	22,0	4,0	4,81	<0.1	<LOD	<LDM	<LDM	71,71			
RLP	4	A	<i>S. brasiliensis</i>	I	250	27,0	5,0	6,70	<0.1	28,42	<LDM	<LDM	17,71			
RLP	4	R	<i>P. lineatus</i>	H	1.675	46,0	9,0	19,64	3,39	7,73	<LDM	<LDM	<LDM	441	307	553
RLP	4	R	<i>P. lineatus</i>	H	2.445	51,0	10,0	36,01	10,2	<LCM	2,06	<LDM	<LDM	294	392	330
RLP	5	R	<i>P. lineatus</i>	H	1.980	51,0	9,0	18,43	4,7	22,98	<LDM	<LDM	<LDM	122	385	230
RLP	6	R	<i>P. lineatus</i>	H	1.410	47,0	9,0	17,74	2,63	6,55	<LDM	<LDM	<LDM	23	66	---
RLP	6	R	<i>P. lineatus</i>	H	1.475	47,0	8,0	15,11	5,42	<LCM	<LDM	<LDM	8,26	348	134	265
RLP	5	A	<i>P. lineatus</i>	H	1.750	50,0	9,0	21,34	3,92	<LCM	3,32	<LDM	<LDM	234	203	309
RLP	6	A	<i>P. lineatus</i>	H	2.390	51,0	10,0	33,93	7,16	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	70	192	451
RLP	6	A	<i>P. lineatus</i>	H	1.900	47,0	9,0	25,44	4,18	22,16	<LDM	<LDM	<LDM	149	164	533
RLP	6	A	<i>P. lineatus</i>	H	2.020	51,0	10,0	25,68	6,5	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	360	222	448
RLP	4	A	<i>P. lineatus</i>	I	225	24,0	5,0	2,14	<0.1	12,85	<LDM	<LDM	<LDM	282	475	603
RLP	4	A	<i>P. lineatus</i>	I	205	23,0	4,0	2,71	<0.1	32,31	<LDM	<LDM	<LDM	514	218	382

RLP	4	R	<i>P. lineatus</i>	M	1.660	48,0	9,0	19,20	0,4	13,21	<LDM	<LDM	<LDM	67	700	505
RLP	4	R	<i>P. lineatus</i>	M	1.600	44,0	9,0	14,82	0,6	<LDM	5,04	<LDM	6,66	229	170	---
RLP	6	R	<i>P. lineatus</i>	M	1.215	44,0	9,0	14,54	0,33	<LDM	2,87	<LDM	7,49	397	240	327
RLP	6	R	<i>P. lineatus</i>	M	1.480	46,0	8,0	8,10	0,11	35,78	<LDM	<LDM	10,01	291	394	683
RLP	6	R	<i>P. lineatus</i>	M	1.240	43,0	8,0	14,57	0,14	13,88	<LDM	9,48	9,64	373	245	632
RLP	5	A	<i>P. lineatus</i>	M	1.585	48,0	9,0	20,58	0,12	<LDM	4,18	<LDM	7,79	98	342	645
RLP	5	A	<i>P. lineatus</i>	M	1.225	45,0	9,0	11,89	0,18	<LDM	0,27	<LDM	7,01	391	493	717
RLP	6	A	<i>P. lineatus</i>	M	1.750	45,0	9,0	31,47	0,24	<LDM	<LDM	<LDM	7,37	73	311	567
RLP	6	A	<i>P. lineatus</i>	M	2.330	50,0	10,0	15,00	0,14	<LDM	<LDM	<LDM	9,08	113	276	304

RLP: Estuario del Río de La Plata; URU: Río Uruguay; R: red de pesca; T: pesca de arrastre; H: hembra; I: indiferenciado; M: macho; P: peso; LT: largo total; LC: longitud de cabeza; PH: peso hígado; PG: peso gónada; <LDM: debajo del límite de detección; <LCM: debajo del límite de cuantificación. PMHA: perdida de muestra de hígado accidental; ---: perdida de alícuota

Tabla suplementaria 7. Efecto matriz promedio (%) de los analitos en extractos de peces (Capítulo I- Sección II)

	<i>P. maculatus</i>			<i>M. obtusidens</i>		
	EM promedio	EE	N	EM promedio	EE	N
Atenolol	-66%	± 0,14	7	-32%	± 0,13	4
Carbamazepina	180%	± 0,02	8	237%	± 0,32	4
Enalapril	272%	± 0,22	6	330%	± 0,25	4
Sildenafil	118%	± 0,13	7	243%	± 0,63	4

	<i>S. brasiliensis</i>			<i>P. lineatus</i>		
	EM promedio	EE	N	EM promedio	EE	N
Atenolol	-98%	± 0,31	7	-68%	± 0,13	6
Carbamazepina	173%	± 0,21	7	79%	± 0,45	4
Enalapril	340%	± 0,47	7	218%	± 0,59	7
Sildenafil	202%	± 0,20	7	134%	± 0,02	7

EM promedio (%): porcentaje de efecto matriz calculado como: (área del analito en matriz sobreagregada - área del analito en el blanco de matriz) /área del analito en el solvente) -1 x 100, EE: Error estándar, N: número total de muestras analizadas.

Tabla suplementaria 8. Resultados del análisis de correlación de Pearson
(Capítulo I-Sección II)

		r(X,Y)	r ²	t	p	N	Cte.	Pdte.
pKa vs.	<i>P. maculatus</i>	-0,37	0,14	-0,57	0,626	3	24,55	-1,05
pKa vs.	<i>M. obtusidens</i>	-0,58	0,33	-1,00	0,422	4	23,94	-1,27
pKa vs.	<i>S. brasiliensis</i>	0,13	0,02	0,18	0,872	4	12,85	0,75
pKa vs.	<i>P. lineatus</i>	-0,14	0,02	-0,20	0,860	4	8,18	-0,19
pKa vs.	FHT	-0,06	0,00	-0,21	0,836	15	16,04	-0,24
		r(X,Y)	r ²	t	p	N	Cte.	Pdte.
log K _{ow} vs.	<i>P. maculatus</i>	0,17	0,03	0,24	0,831	3	13,63	1,28
log K _{ow} vs.	<i>M. obtusidens</i>	0,59	0,35	1,03	0,412	4	8,06	3,49
log K _{ow} vs.	<i>S. brasiliensis</i>	-0,53	0,28	-0,88	0,473	4	30,76	-8,36
log K _{ow} vs.	<i>P. lineatus</i>	-0,50	0,25	-0,81	0,505	4	8,99	-1,85
log K _{ow} vs.	FHT	-0,10	0,01	-0,37	0,721	15	15,38	-1,04
		r(X,Y)	r ²	t	p	N	Cte.	Pdte.
ATE vs.	CBZ	0,35	0,12	2,17	0,037	36	0,95	0,08
ATE vs.	ENA	0,17	0,03	1,00	0,323	36	3,43	0,06
ATE vs.	SIL	-0,15	0,02	-0,89	0,378	36	5,51	-0,05

ATE vs.	FHT	0,92	0,85	13,75	0,000	36	9,89	1,10
CBZ vs.	ENA	-0,22	0,05	-1,32	0,197	36	4,97	-0,38
CBZ vs.	SIL	-0,10	0,01	-0,60	0,554	36	5,20	-0,14
CBZ vs.	FHT	0,38	0,15	2,42	0,021	36	19,73	2,06
ENA vs.	SIL	-0,05	0,00	-0,30	0,763	36	5,11	-0,04
ENA vs.	FHT	0,41	0,17	2,61	0,013	36	18,28	1,28
SIL vs.	FHT	0,09	0,01	0,55	0,583	36	21,88	0,37

Tabla suplementaria 9. Actividad enzimática en machos y hembras de *P. lineatus* de ambos sitios de muestreo.

P. lineatus

	Macho	EE	N	Hembra	EE	n	p-valor
EROD (pmol/min mg prot)	215	± 32,06	14	237	± 40,4	17	0,460
BROD (pmol/min mg prot)	238	± 37,0	21	258	± 38,4	19	0,412
GST (pmol/min mg prot)	422	± 61,2	12	380	± 32,3	13	0,442

EROD: etoxiresorufina-O-deetilasa; BROD: benciloxiresorufina-O- deetilasa; GST: glutation-S-transferasa; la actividad enzimática se muestra como pmol/min mg prot; EE: error estándar

Tabla suplementaria 10. Datos estadísticos sobre correlación entre concentraciones de fármacos humanos individuales vs actividades enzimáticas y actividades enzimáticas entre sí.

	r ²	t	n	Constante	Pendiente
ATE vs.EROD	0,07	1,52	33	199,9	2,47
ATE vs.BROD	0,02	-0,80	33	280,4	-1,31
ATE vs.GST	0,05	-1,21	33	426,0	-2,16
CBZ vs.EROD	0,01	-0,60	33	241,9	-4,54
CBZ vs.BROD	0,03	0,94	33	249,2	6,99
CBZ vs.GST	0,04	-1,18	33	415,2	-9,49
ENA vs.EROD	0,06	1,39	33	207,2	5,89
ENA vs.BROD	0,29	-3,60	33	320,2	-13,06
ENA vs.GST	0,00	0,21	33	392,6	0,97
SIL vs.EROD	0,05	-1,28	33	267,4	-6,79
SIL vs.BROD	0,04	-1,07	33	291,4	-5,70
SIL vs.GST	0,04	-1,13	33	429,8	-6,52
FHT vs.EROD	0,05	1,28	33	189,3	1,77
FHT vs.BROD	0,10	-1,84	33	323,9	-2,46
FHT vs.GST	0,07	-1,49	33	451,8	-2,21
EROD vs.BROD	0,01	-0,48	33	282,48	-0,08
EROD vs.GST	0,05	1,23	33	342,54	0,23

BROD vs.GST

0,12

2,08

33

296,49

0,38

Tabla suplementaria 11. Concentraciones ambientales medidas (MEC) de los fármacos estudiados, según especies y sitios de muestreo

Especie	Sitio	Fármaco	MEC med	MEC max
<i>M. obtusidens</i>	S1	ATE	0,07	0,61
<i>M. obtusidens</i>	S1	CBZ	0,12	0,57
<i>M. obtusidens</i>	S1	CLO	0,06	0,51
<i>M. obtusidens</i>	S1	MET	0,33	2,39
<i>M. obtusidens</i>	S1	NAD	0,06	0,49
<i>M. obtusidens</i>	S1	PRO	0,18	1,90
<i>M. obtusidens</i>	S1	SAL	0,04	0,19
<i>M. obtusidens</i>	S1	VEN	0,19	1,60
<i>M. obtusidens</i>	S2	ATE	0,60	0,75
<i>M. obtusidens</i>	S2	CBZ	0,35	23,18
<i>M. obtusidens</i>	S2	CLO	0,28	0,51
<i>M. obtusidens</i>	S2	ENA	1,15	56,88
<i>M. obtusidens</i>	S2	MET	2,07	2,39
<i>M. obtusidens</i>	S2	NAD	0,26	0,49
<i>M. obtusidens</i>	S2	PRO	1,13	1,90
<i>M. obtusidens</i>	S2	SAL	0,14	0,19
<i>M. obtusidens</i>	S2	SIL	26,50	56,76
<i>M. obtusidens</i>	S2	VEN	1,07	1,60
<i>M. obtusidens</i>	S3	ATE	20,48	40,05
<i>M. obtusidens</i>	S3	CBZ	0,27	0,27
<i>M. obtusidens</i>	S3	ENA	1,15	1,15
<i>M. obtusidens</i>	S3	SIL	26,50	71,71
<i>P. lineatus</i>	S1	ATE	0,05	0,29
<i>P. lineatus</i>	S1	CBZ	0,10	0,88
<i>P. lineatus</i>	S1	CLO	0,05	0,05
<i>P. lineatus</i>	S1	MET	0,02	0,02
<i>P. lineatus</i>	S1	NAD	0,04	0,10
<i>P. lineatus</i>	S1	PRO	0,02	0,20
<i>P. lineatus</i>	S1	SAL	0,02	0,02

<i>P. lineatus</i>	S1	VEN	0,05	0,23
<i>P. lineatus</i>	S2	ATE	9,17	34,85
<i>P. lineatus</i>	S2	CBZ	1,31	8,12
<i>P. lineatus</i>	S2	CLO	0,05	0,05
<i>P. lineatus</i>	S2	ENA	5,67	22,23
<i>P. lineatus</i>	S2	MET	0,02	0,02
<i>P. lineatus</i>	S2	NAD	0,05	0,10
<i>P. lineatus</i>	S2	PRO	0,08	0,20
<i>P. lineatus</i>	S2	SAL	0,02	0,02
<i>P. lineatus</i>	S2	SIL	8,08	42,23
<i>P. lineatus</i>	S2	VEN	0,11	0,23
<i>P. lineatus</i>	S3	ATE	9,32	35,78
<i>P. lineatus</i>	S3	CBZ	1,07	5,04
<i>P. lineatus</i>	S3	ENA	1,57	9,48
<i>P. lineatus</i>	S3	SIL	4,11	10,01
<i>P. maculatus</i>	S2	ATE	21,59	42,28
<i>P. maculatus</i>	S2	CBZ	0,27	0,27
<i>P. maculatus</i>	S2	ENA	14,86	28,56
<i>P. maculatus</i>	S2	SIL	54,97	71,62
<i>P. maculatus</i>	S3	ATE	23,07	34,88
<i>P. maculatus</i>	S3	CBZ	0,27	2,87
<i>P. maculatus</i>	S3	ENA	1,15	1,15
<i>P. maculatus</i>	S3	SIL	8,10	16,54
<i>S. brasiliensis</i>	S1	ATE	0,03	0,07
<i>S. brasiliensis</i>	S1	CBZ	0,15	0,15
<i>S. brasiliensis</i>	S1	CLO	0,02	0,02
<i>S. brasiliensis</i>	S1	MET	0,23	0,38
<i>S. brasiliensis</i>	S1	NAD	0,01	0,01
<i>S. brasiliensis</i>	S1	PRO	0,03	0,21
<i>S. brasiliensis</i>	S1	SAL	0,03	0,03
<i>S. brasiliensis</i>	S1	VEN	0,04	0,17
<i>S. brasiliensis</i>	S2	ATE	30,00	44,51
<i>S. brasiliensis</i>	S2	CBZ	4,44	17,20

<i>S. brasiliensis</i>	S2	CLO	0,02	0,02
<i>S. brasiliensis</i>	S2	ENA	7,86	31,14
<i>S. brasiliensis</i>	S2	MET	0,20	0,38
<i>S. brasiliensis</i>	S2	NAD	0,01	0,01
<i>S. brasiliensis</i>	S2	PRO	0,12	0,21
<i>S. brasiliensis</i>	S2	SAL	0,03	0,03
<i>S. brasiliensis</i>	S2	SIL	7,86	29,03
<i>S. brasiliensis</i>	S2	VEN	0,13	0,17
<i>S. brasiliensis</i>	S3	ATE	28,42	28,42
<i>S. brasiliensis</i>	S3	CBZ	0,27	0,27
<i>S. brasiliensis</i>	S3	ENA	1,15	1,15
<i>S. brasiliensis</i>	S3	SIL	17,71	17,71

MEC med: concentración ambiental media medida, MEC máx: concentración ambiental máxima medida, ATE: atenolol, CBZ: carbamazepina, CLO: clopidrogel; ENA: enalapril, NAD: nadolol, MET: metropolol; PRO: propranolol, SAL: salbutamol, SIL: sildenafil, VEN: venlafaxina

Bibliografía

- 📖 Aebi H. [13] Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105. Academic Press, 1984, pp. 121-126.
- 📖 Akins RE, Tuan RS. Ultrafast protein determinations using microwave enhancement. *Molecular Biotechnology* 1995; 4: 17-24.
- 📖 Al-Ansari AM, Saleem A, Kimpe LE, Sherry JP, McMaster ME, Trudeau VL, et al. Bioaccumulation of the pharmaceutical 17alpha-ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, Canada. *Environ Pollut* 2010; 158: 2566-71.
- 📖 Alvarez-Muñoz D, Huerta B, Fernandez-Tejedor M, Rodríguez-Mozaz S, Barceló D. Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves. *Talanta* 2015; 136: 174-182.
- 📖 Álvarez-Muñoz D, Rodríguez-Mozaz S, Jacobs S, Serra-Compte A, Cáceres N, Sioen I, et al. Pharmaceuticals and endocrine disruptors in raw and cooked seafood from European market: Concentrations and human exposure levels. *Environment International* 2018; 119: 570-581.
- 📖 Álvarez-Muñoz D, Rodríguez-Mozaz S, Maulvault AL, Tediosi A, Fernández-Tejedor M, Van den Heuvel F, et al. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. *Environmental Research* 2015; 143: 56-64.
- 📖 APHA-AWWA-WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 23th. Washington, DC: American Public Health Association - American Water Works Association - Water Environment Federation, 2017.
- 📖 Arnnok P, Singh RR, Burakham R, Pérez-Fuentetaja A, Aga DS. Selective Uptake and Bioaccumulation of Antidepressants in Fish from Effluent-Impacted Niagara River. *Environmental Science and Technology* 2017; 51: 10652-10662.
- 📖 Arnot J, Gobas F. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews - ENVIRON REV* 2006; 14: 257-297.
- 📖 Ashok K, Gautam S, Anroop N, Rishbha S. UPLC: A preeminent technique in pharmaceutical analysis. *Acta poloniae pharmaceutica* 2012; 69: 371-80.
- 📖 Batt AL, Wathen JB, Lazorchak JM, Olsen AR, Kincaid TM. Statistical Survey of Persistent Organic Pollutants: Risk Estimations to Humans and Wildlife through Consumption of Fish from U.S. Rivers. *Environmental Science & Technology* 2017; 51: 3021-3031.
- 📖 Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology* 2012; 56: 952-964.
- 📖 Belden JB, Gilliom RJ, Lydy MJ. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integrated environmental assessment and management* 2007; 3: 364-372.
- 📖 Berbery EH, Barros VR. The hydrologic cycle of the La Plata basin in South America. *Journal of Hydrometeorology* 2002; 3: 630-645.
- 📖 Bizi M. Activated Carbon and the Principal Mineral Constituents of a Natural Soil in the Presence of Carbamazepine. *Water* 2019; 11.
- 📖 Boudou A, Ribeyre F. Aquatic Ecotoxicology: From the Ecosystem to the Cellular and Molecular Levels. *Environmental health perspectives* 1997; 105 Suppl 1: 21-35.
- 📖 Boxall A, A Rudd M, Brooks B, Caldwell D, Choi K, Hickmann S, et al. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions? *Environmental health perspectives* 2012a; 120: 1221-9.
- 📖 Boxall ABA. Chapter 7 - Pharmaceuticals in the Environment and Human Health. In: Boxall ABA, Kookana RS, editors. *Health Care and Environmental Contamination*. Elsevier, Amsterdam, 2018, pp. 123-136.
- 📖 Boxall ABA, Rudd MA, Brooks BW, Caldwell DJ, Choi K, Hickmann S, et al. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: What are the big questions? *Environmental Health Perspectives* 2012b; 120: 1221-1229.

- Brooks B, Kevin Chambliss C, Stanley J, Ramirez A, Banks K, D Johnson R, et al. Determination of Select Antidepressants in Fish From an Effluent-Dominated Stream. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 2005; 24: 464-9.
- Brown HS, Goble R, Tatelbaum L. Methodology for assessing hazards of contaminants in seafood. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1988; 8: 76-101.
- Brox S, Seiwert B, Küster E, Reemtsma T. Toxicokinetics of Polar Chemicals in Zebrafish Embryo (*Danio rerio*): Influence of Physicochemical Properties and of Biological Processes. *Environmental Science and Technology* 2016; 50: 10264-10272.
- Bucheli TD, Fent K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 1995; 25: 201-268.
- Burkina V, Zlabek V, Zamaratskaia G. Effects of pharmaceuticals present in aquatic environment on Phase I metabolism in fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2015; 40: 430-444.
- Burress ED, Duarte A, Gangloff MM, Siefferman L. Isotopic trophic guild structure of a diverse subtropical South American fish community. *Ecology of Freshwater Fish* 2013; 22: 66-72.
- Cañada-Cañada F, Muñoz de la Peña A, Espinosa-Mansilla A. Analysis of antibiotics in fish samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009; 395: 987-1008.
- Cao SS, Duan YP, Tu YJ, Tang Y, Liu J, Zhi WD, et al. Pharmaceuticals and personal care products in a drinking water resource of Yangtze River Delta Ecology and Greenery Integration Development Demonstration Zone in China: Occurrence and human health risk assessment. *Science of the Total Environment* 2020; 721.
- Capó M. *Principios de Ecotoxicología: Diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente*, 2007.
- Carrquiriborde P, Somoza G. ¿Representan nuestros efluentes cloacales un riesgo para los ecosistemas acuáticos y la salud? *Ciencia e investigación* 2015; 65: 72.
- CARU. *Peces del Río Uruguay*. 1996.
- Celander MC. Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquatic Toxicology* 2011; 105: 72-77.
- Cha J, Carlson KH. Occurrence of β -lactam and polyether ionophore antibiotics in lagoon water and animal manure. *Sci Total Environ* 2018; 640-641: 1346-1353.
- Christou A, Karaolia P, Hapeshi E, Michael C, Fatta-Kassinou D. Long-term wastewater irrigation of vegetables in real agricultural systems: Concentration of pharmaceuticals in soil, uptake and bioaccumulation in tomato fruits and human health risk assessment. *Water Research* 2017; 109: 24-34.
- Chu S, Metcalfe CD. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2007; 1163: 112-8.
- Colombo JC, Cappelletti N, Barreda A, Migoya MC, Skorupka CN. Vertical fluxes and accumulation of PCBs in coastal sediments of the Río de la Plata estuary, Argentina. *Chemosphere* 2005; 61: 1345-1357.
- Colombo JC, Cappelletti N, Laschi J, Migoya MC, Speranza E, Skorupka CN. Sources, vertical fluxes, and equivalent toxicity of aromatic hydrocarbons in coastal sediments of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Science and Technology* 2006; 40: 734-740.
- Colombo JC, Cappelletti N, Migoya MC, Speranza E. Bioaccumulation of anthropogenic contaminants by detritivorous fish in the Río de la Plata Estuary: 2-Polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 2007; 69: 1253-1260.
- Colombo JC, Speranza ED, Astoviza M, Migoya MC, Skorupka CN, Morrone M, et al. Long-Term (1970–2017) Temporal Trends of Polychlorinated Biphenyls in Fish, Settling Material, and Sediments from Populated and Remote Sites in Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Science & Technology* 2018; 52: 12412-12418.

- Corcoran J, Winter MJ, Tyler CR. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology* 2010; 40: 287-304.
- Daughton CG, Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental health perspectives* 1999; 107: 907-938.
- Di Giulio RT, Benson HW, Sanders BM, Van Veld PA. Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity. In: Rand GM, editor. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. Taylor and Francis, Washington, D.C., 1995, pp. 523-561.
- Donoho AL. Biochemical Studies on the Fate of Monensin in Animals and in the Environment. *Journal of Animal Science* 1984; 58: 1528-1539.
- Du B, Haddad SP, Luek A, Scott WC, Saari GN, Burket SR, et al. Bioaccumulation of human pharmaceuticals in fish across habitats of a tidally influenced urban bayou. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2016; 35: 966-974.
- Du B, Haddad SP, Luek A, Scott WC, Saari GN, Kristofco LA, et al. Bioaccumulation and trophic dilution of human pharmaceuticals across trophic positions of an effluent-dependent wadeable stream. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2014; 369.
- Duarte IA, Pais MP, Reis-Santos P, Cabral HN, Fonseca VF. Biomarker and behavioural responses of an estuarine fish following acute exposure to fluoxetine. *Marine Environmental Research* 2019; 147: 24-31.
- Dulio V, van Bavel B, Brorström-Lundén E, Harmsen J, Hollender J, Schlabach M, et al. Emerging pollutants in the EU: 10 years of NORMAN in support of environmental policies and regulations. *Environmental Sciences Europe* 2018; 30: 5.
- Duval V, Karlsson MO. Impact of omission or replacement of data below the limit of quantification on parameter estimates in a two-compartment model. *Pharm Res* 2002; 19: 1835-40.
- EC. 2010 Pulp and Paper Environmental Effects Monitoring (EEM) Technical Guidance Document. Environment Canada, 2010, pp. 490.
- Elorriaga Y, Marino DJ, Carriquiriborde P, Ronco AE. Human Pharmaceuticals in Wastewaters from Urbanized Areas of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2013a; 90: 397-400.
- Elorriaga Y, Marino DJ, Carriquiriborde P, Ronco AE. Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina. *International Journal of Environment and Health* 2013b; 6: 330-339.
- Fent K, Weston AA, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 2006; 76: 122-159.
- Gagnon M, Rawson C. Bioindicator species for EROD activity measurements: A review with Australian fish as a case study. *Ecological Indicators* 2017; 73: 166-180.
- Garcia SN, Foster M, Constantine LA, Huggett DB. Field and laboratory fish tissue accumulation of the anti-convulsant drug carbamazepine. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2012; 84: 207-211.
- Gelsleichter J, Szabo NJ. Uptake of human pharmaceuticals in bull sharks (*Carcharhinus leucas*) inhabiting a wastewater-impacted river. *Science of The Total Environment* 2013; 456-457: 196-201.
- Gil MJ. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. 2012.
- Gilliom RJ, Hirsch RM, Gilroy EJ. Effect of censoring trace-level water-quality data on trend-detection capability. *Environmental Science & Technology* 1984; 18: 530-535.
- Gobry V, Bouchard G, Carrupt P-A, Testa B, Girault HH. Physicochemical Characterization of Sildenafil: Ionization, Lipophilicity Behavior, and Ionic-Partition Diagram Studied by Two-Phase Titration and Electrochemistry. *Helvetica Chimica Acta* 2000; 83: 1465-1474.

- 📖 González-Bergonzoni I, D'Anatro A, Vidal N, Stebniki S, Tesitore G, Silva I, et al. Origin of Fish Biomass in a Diverse Subtropical River: An Allochthonic-Supported Biomass Increase Following Flood Pulses. *Ecosystems* 2019.
- 📖 Griboff J, Carrizo JC, Bonansea RI, Valdés ME, Wunderlin DA, Amé MV. Multiantibiotic residues in commercial fish from Argentina. The presence of mixtures of antibiotics in edible fish, a challenge to health risk assessment. *Food Chemistry* 2020; 332.
- 📖 Gros M, Rodríguez-Mozaz S, Barcelo D. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2012; 1248: 104-21.
- 📖 Haddad SP, Luek A, Scott WC, Saari GN, Burket SR, Kristofco LA, et al. Spatio-temporal bioaccumulation and trophic transfer of ionizable pharmaceuticals in a semi-arid urban river influenced by snowmelt. *Journal of Hazardous Materials* 2018; 359: 231-240.
- 📖 Hansch C, Leo A, Hoekman D. Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington, 348 pp.: American Chemical Society, 1995.
- 📖 Helsel D, Hirsch R. Datasets from: *Statistical Methods in Water Resources*, 2002.
- 📖 Helsel DR, Hirsch RM. *Statistical methods in water resources*. Statistical methods in water resources 1992.
- 📖 Honkakoski P, Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochemical Journal* 2000; 347: 321-337.
- 📖 Hua WY, Bennett ER, Maio XS, Metcalfe CD, Letcher RJ. Seasonality effects on pharmaceuticals and s-triazine herbicides in wastewater effluent and surface water from the Canadian side of the upper Detroit River. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2006; 25: 2356-2365.
- 📖 Hued A, Bistoni M. Development and validation of a Biotic Index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiología* 2005; 543: 279-298.
- 📖 Huerta B, Jakimska A, Gros M, Rodríguez-Mozaz S, Barceló D. Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2013; 1288: 63-72.
- 📖 Huerta B, Margiotta-Casaluci L, Rodríguez-Mozaz S, Scholze M, Winter MJ, Barceló D, et al. Anti-anxiety drugs and fish behavior: Establishing the link between internal concentrations of oxazepam and behavioral effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2016; 35: 2782-2790.
- 📖 Huerta B, Rodríguez-Mozaz S, Barceló D. Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: Analytical methods and environmental implications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012; 404: 2611-2624.
- 📖 Huerta B, Rodríguez-Mozaz S, Lazorchak J, Barcelo D, Batt A, Wathen J, et al. Presence of pharmaceuticals in fish collected from urban rivers in the U.S. EPA 2008–2009 National Rivers and Streams Assessment. *Science of the Total Environment* 2018; 634: 542-549.
- 📖 Huggett DB, Cook JC, Ericson JF, Williams RT. A theoretical model for utilizing mammalian pharmacology and safety data to prioritize potential impacts of human pharmaceuticals to fish. *Human and Ecological Risk Assessment* 2003; 9: 1789-1799.
- 📖 Iturburu FG, Bertrand L, Mendieta JR, Amé MV, Menone ML. An integrated biomarker response study explains more than the sum of the parts: Oxidative stress in the fish *Australoheros facetus* exposed to imidacloprid. *Ecological Indicators* 2018; 93: 351-357.
- 📖 Jacobs S, Sioen I, Jacxsens L, Domingo JL, Sloth JJ, Marques A, et al. Risk assessment of methylmercury in five European countries considering the national seafood consumption patterns. *Food and Chemical Toxicology* 2017; 104: 26-34.
- 📖 Jiang QT, Lee TKM, Chen K, Wong HL, Zheng JS, Giesy JP, et al. Human health risk assessment of organochlorines associated with fish consumption in a coastal city in China. *Environmental Pollution* 2005; 136: 155-165.

- 📖 Jones OAH, Voulvoulis N, Lester JN. Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment. *Critical Reviews in Toxicology* 2004; 34: 335-350.
- 📖 Keerthanan S, Jayasinghe C, Biswas JK, Vithanage M. Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) in the environment: Plant uptake, translocation, bioaccumulation, and human health risks. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2020: 1-38.
- 📖 Khetan S, Collins T. Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. *Chemical reviews* 2007; 107: 2319-64.
- 📖 Kilgour BW, Dubé MG, Hedley K, Portt CB, Munkittrick KR. Aquatic Environmental Effects Monitoring Guidance for Environmental Assessment Practitioners. *Environmental Monitoring and Assessment* 2007; 130: 423-436.
- 📖 Kime DE. Endocrine disruption in fish. Boston: Kluwer Academic Publication, 2001.
- 📖 Kookana RS, Williams M, Boxall ABA, Larsson DGJ, Gaw S, Choi K, et al. Potential ecological footprints of active pharmaceutical ingredients: An examination of risk factors in low-, middle- and high-income countries. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2014; 369.
- 📖 Kroon F, Streten C, Harries S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. *PLoS ONE* 2017; 12.
- 📖 Lagesson A, Fahlman J, Brodin T, Fick J, Jonsson M, Byström P, et al. Bioaccumulation of five pharmaceuticals at multiple trophic levels in an aquatic food web - Insights from a field experiment. *Science of The Total Environment* 2016; 568: 208-215.
- 📖 Laville N, Ait-Ässa S, Gomez E, Casellas C, Porcher JM. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 2004; 196: 41-55.
- 📖 Lenartova V, Holovska K, Rafael Pedrajas J, Martinez Lara E, Peinado J, Lopez Barea J, et al. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. *Biomarkers* 1997; 2: 247-252.
- 📖 Li Z-H, Zlabek V, Velisek J, Grabic R, Machova J, Kolarova J, et al. Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2011; 74: 319-327.
- 📖 Li Z, Lu G, Yang X, Wang C. Single and combined effects of selected pharmaceuticals at sublethal concentrations on multiple biomarkers in *Carassius auratus*. *Ecotoxicology* 2012; 21: 353-361.
- 📖 Lindberg RH, Wennberg P, Johansson MI, Tysklind M, Andersson BA. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environ Sci Technol* 2005; 39: 3421-9.
- 📖 Loftsson T, Thorisdóttir S, Fridriksdóttir H, Stefánsson E. Enalaprilat and enalapril maleate eyedrops lower intraocular pressure in rabbits. *Acta Ophthalmol* 2010a; 88: 337-41.
- 📖 Loftsson T, Thorisdóttir S, Fridriksdóttir H, Stefánsson E. Enalaprilat and enalapril maleate eyedrops lower intraocular pressure in rabbits. *Acta Ophthalmologica* 2010b; 88: 337-341.
- 📖 Louro H, Heinälä M, Bessems J, Buekers J, Vermeire T, Woutersen M, et al. Human biomonitoring in health risk assessment in Europe: Current practices and recommendations for the future. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2019; 222: 727-737.
- 📖 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 1951; 193: 265-275.
- 📖 Lynch AJ, Cooke SJ, Deines AM, Bower SD, Bunnell DB, Cowx IG, et al. The social, economic, and environmental importance of inland fish and fisheries. *Environmental Reviews* 2016; 24: 115-121.
- 📖 Mackay D. Correlation of Bioconcentration Factors. *Environmental Science and Technology* 1982; 16: 274-278.
- 📖 Magnarelli G. Exposición ambiental a plaguicidas: biomarcadores en matrices de la tríada madre-placenta-feto. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 2015; 49: 39-53.

- 📖 Marín Galvín R. Contaminación emergente: sustancias prioritarias y preferentes, productos farmacéuticos, drogas de abuso, disruptores endocrinos, microplásticos y patógenos emergentes. 2017.
- 📖 Martínez-Morcillo S, Rodríguez-Gil JL, Fernández-Rubio J, Rodríguez-Mozaz S, Míguez-Santiyán MP, Valdes ME, et al. Presence of pharmaceutical compounds, levels of biochemical biomarkers in seafood tissues and risk assessment for human health: Results from a case study in North-Western Spain. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2020; 223: 10-21.
- 📖 Martínez-Salcido AI, Ruelas-Inzunza J, Gil-Manrique B, Nateras-Ramírez O, Amezcua F. Mercury Levels in Fish for Human Consumption from the Southeast Gulf of California: Tissue Distribution and Health Risk Assessment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2018; 74: 273-283.
- 📖 Masoner J, Kolpin D, Furlong E, Cozzarelli I, Grayx J. Environmental Chemistry LANDFILL LEACHATE AS A MIRROR OF TODAY'S DISPOSABLE SOCIETY: PHARMACEUTICALS AND OTHER CONTAMINANTS OF EMERGING CONCERN IN FINAL LEACHATE FROM LANDFILLS IN THE CONTERMINOUS UNITED STATES. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2015; 35.
- 📖 McCallum ES, Lindberg RH, Andersson PL, Brodin T. Stability and uptake of methylphenidate and ritalinic acid in nine-spine stickleback (*Pungitius pungitius*) and water louse (*Asellus aquaticus*). *Environmental Science and Pollution Research* 2019; 26: 9371-9378.
- 📖 McEneff G, Barron L, Kelleher B, Paull B, Quinn B. The determination of pharmaceutical residues in cooked and uncooked marine bivalves using pressurised liquid extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2013; 405: 9509-9521.
- 📖 Meador JP, Yeh A, Gallagher EP. Determining potential adverse effects in marine fish exposed to pharmaceuticals and personal care products with the fish plasma model and whole-body tissue concentrations. *Environmental Pollution* 2017; 230: 1018-1029.
- 📖 Medina H. USO DE BIOMARCADORES EN PECES COMO HERRAMIENTA PARA EVALUAR LA EXPOSICIÓN Y EFECTO DE CONTAMINANTES AMBIENTALES EN CUERPOS DE AGUA, 2012.
- 📖 Moreno-González R, Rodríguez-Mozaz S, Huerta B, Barcelo D, León V. Do pharmaceuticals bioaccumulate in marine molluscs and fish from a coastal lagoon? *Environmental Research* 2016; 146: 282-298.
- 📖 Muir D, Simmons D, Wang X, Peart T, Villella M, Miller J, et al. Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care product chemicals in fish exposed to wastewater effluent in an urban wetland. *Scientific Reports* 2017; 7.
- 📖 Nallani GC, Paulos PM, Constantine LA, Venables BJ, Huggett DB. Bioconcentration of ibuprofen in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere* 2011; 84: 1371-1377.
- 📖 Newman M. *Quantitative Ecotoxicology- Second Edition*
- 📖 2013.
- 📖 Newman MC. *Fundamentals of Ecotoxicology The Science of Pollution*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2015.
- 📖 Nichols JW, Du B, Berninger JP, Connors KA, Chambliss CK, Erickson RJ, et al. Observed and modeled effects of pH on bioconcentration of diphenhydramine, a weakly basic pharmaceutical, in fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2015; 34: 1425.
- 📖 NRC. *Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process*. National Research Council, The National Academies Press, Washington, DC, 1983.
- 📖 NRC. *Science and Judgment in Risk Assessment*. National Research Council; Division on Earth and Life Studies; Commission on Life Sciences; Board on Environmental Studies and Toxicology; Committee on Risk Assessment of Hazardous Air Pollutants, Washington D.C., 1994.

- 📖 NRC. Science and Decisions: Advancing Risk Assessment. National Research Council; Division on Earth and Life Studies; Board on Environmental Studies and Toxicology; Committee on Improving Risk Analysis Approaches Used by the U.S. EPA, Washington D.C., 2009.
- 📖 Oikari A. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic Toxicology* 2006; 78: 370-381.
- 📖 Omar TFT, Aris AZ, Yusoff FM, Mustafa S. Occurrence and level of emerging organic contaminant in fish and mollusk from Klang River estuary, Malaysia and assessment on human health risk. *Environmental Pollution* 2019; 248: 763-773.
- 📖 Ondarza P, Haddad S, Avigliano E, Miglioranza K, Brooks B. Pharmaceuticals, illicit drugs and their metabolites in fish from Argentina: Implications for protected areas influenced by urbanization. *Science of The Total Environment* 2019; 649.
- 📖 Ondarza PM, Gonzalez M, Fillmann G, Miglioranza KSB. Polybrominated diphenyl ethers and organochlorine compound levels in brown trout (*Salmo trutta*) from Andean Patagonia, Argentina. *Chemosphere* 2011; 83: 1597-1602.
- 📖 Orellana M, Guajardo V. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista médica de Chile* 2004; 132: 85-94.
- 📖 Panné HS. Visión general del sector acuícola nacional - Argentina. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets, Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Rome, 2018, pp. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_argentina/es#tcN90085.
- 📖 Paterson G, Metcalfe C, D. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 2008; 74: 125-130.
- 📖 Payne JF. Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine petroleum pollution. *Science (New York, N.Y.)* 1976; 191: 945-946.
- 📖 Payne JF, Penrose WR. Induction of aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase in fish by petroleum. *Bull Environ Contam Toxicol* 1975; 14: 112-6.
- 📖 Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology* 2008; 82: 667-715.
- 📖 Penchaszadeh P, Darrigran G, Angulo C, Averbuj A, Brogger M, Dogliotti A, et al. Predation of the invasive freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae) by the fish *Leporinus obtusidens* Valenciennes, 1846 (Anostomidae) in the Rio de la Plata, Argentina. Vol 19, 2000.
- 📖 Perez-Moral N, Plankeele JM, Domoney C, Warren FJ. Ultra-high performance liquid chromatography-size exclusion chromatography (UPLC-SEC) as an efficient tool for the rapid and highly informative characterisation of biopolymers. *Carbohydrate Polymers* 2018; 196: 422-426.
- 📖 Perez D, Okada E, Iturburu F, De Gerónimo E, Cantón G, Aparicio V, et al. Monensin occurrence in surface water and its impact on aquatic biota in a stream of the southeast Pampas, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research* 2020; 28: 1-9.
- 📖 Pérez MR, Rossi AS, Bacchetta C, Elorriaga Y, Carriquiriborde P, Cazenave J. In situ evaluation of the toxicological impact of a wastewater effluent on the fish *Prochilodus lineatus*: biochemical and histological assessment. *Ecological Indicators* 2018; 84: 345-353.
- 📖 Prosser RS, Sibley PK. Human health risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in plant tissue due to biosolids and manure amendments, and wastewater irrigation. *Environment International* 2015; 75: 223-233.
- 📖 Quabius ES, Nolan D, Segner H, Wendelaar Bonga S. Confinement stress and starvation modulate the induction of EROD activity after dietary exposure to PCB 126 in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 2001; 25: 109-119.
- 📖 Ramirez AJ, Brain RA, Usenko S, Mottaleb MA, O'Donnell JG, Stahl LL, et al. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: Results of a national pilot study in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2009; 28: 2587-2597.

- 📖 Ramírez AJ, Mottaleb MA, Brooks BW, Chambliss CK. Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 2007; 79: 3155-3163.
- 📖 Rand GM. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. Vol 2nd. Washington, D.C.: Taylor and Francis, 1995.
- 📖 Rattner BA. History of wildlife toxicology. *Ecotoxicology* 2009; 18: 773-783.
- 📖 Reichert G, Hilgert S, Fuchs S, Azevedo JCR. Emerging contaminants and antibiotic resistance in the different environmental matrices of Latin America. *Environmental Pollution* 2019; 255.
- 📖 Richter B, Jones BA, Ezzell JL, Porter NL, Avdalovic N, Pohl C. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. Vol 68, 1996.
- 📖 Rojo M, Alvarez-Muñoz D, Dománico A, Foti R, Rodríguez-Mozaz S, Barcelo D, et al. Human pharmaceuticals in three major fish species from the Uruguay River (South America) with different feeding habits. *Environmental Pollution* 2019; 252.
- 📖 Rojo M, Cristos D, González P, López-Aca V, Dománico A, Carriquiriborde P. Accumulation of human pharmaceuticals and activity of biotransformation enzymes in fish from two areas of the lower Rio de la Plata Basin. *Chemosphere* 2020: 129012.
- 📖 Sarker MAMaSD. Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation. Book 2012.
- 📖 Sasaki H, Miyaura S, Horie K, Isono H. Induction of glutathione S-transferase by phenobarbital in rat hepatocyte culture. *Journal of Pharmacobio-Dynamics* 1989; 12: 775-780.
- 📖 Scarcia P, Calamante G, De La Torre F. Biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*) and native collected fish (*Leporinus obtusidens*) in the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Toxicology* 2012a; 29: 950-960.
- 📖 Scarcia P, Calamante G, de la Torre F. Responses of biomarkers of a standardized (*Cyprinus carpio*) and a native (*Pimelodella laticeps*) fish species after in situ exposure in a periurban zone of Luján River (Argentina). *Environmental toxicology* 2012b; 29.
- 📖 Schultz M, Furlong E, Kolpin D, L Werner S, Schoenfuss H, B Barber L, et al. Antidepressant Pharmaceuticals in Two US Effluent-Impacted Streams: Occurrence and Fate in Water and Sediment, and Selective Uptake in Fish Neural Tissue. Vol 44, 2010.
- 📖 Schwab BW, Hayes EP, Fiori JM, Mastrocco FJ, Roden NM, Cragin D, et al. Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2005; 42: 296-312.
- 📖 Scott T-M, Phillips PJ, Kolpin DW, Colella KM, Furlong ET, Foreman WT, et al. Pharmaceutical manufacturing facility discharges can substantially increase the pharmaceutical load to U.S. wastewaters. *Science of The Total Environment* 2018; 636: 69-79.
- 📖 Sheweita S, Salama B, Hassan M. Erectile dysfunction drugs and oxidative stress in the liver of male rats. *Toxicology Reports* 2015; 2: 933-938.
- 📖 Sheweita SA, Meftah AA, Sheweita MS, Balbaa ME. Erectile dysfunction drugs altered the activities of antioxidant enzymes, oxidative stress and the protein expressions of some cytochrome P450 isozymes involved in the steroidogenesis of steroid hormones. *PLoS ONE* 2020; 15.
- 📖 Sheweita SA, Wally M, Hassan M. Erectile Dysfunction Drugs Changed the Protein Expressions and Activities of Drug-Metabolising Enzymes in the Liver of Male Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016; 2016.
- 📖 Silva L, C. Martins M, Pereira A, M. Meisel L, Gonzalez-Rey M, Bebianno M, et al. Uptake, accumulation and metabolization of the antidepressant fluoxetine by *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution* 2016; 213: 432-437.
- 📖 Simmons DBD, Miller J, Clarence S, McCallum ES, Balshine S, Chandramouli B, et al. Altered expression of metabolites and proteins in wild and caged fish exposed to wastewater effluents in situ. *Scientific Reports* 2017; 7.

- 📖 Sims JL, Burket SR, Franco ME, Lovin LM, Scarlett KR, Steenbeek R, et al. Pharmaceutical uptake kinetics in rainbow trout: In situ bioaccumulation in an effluent-dominated river influenced by snowmelt. *Science of the Total Environment* 2020; 736.
- 📖 SPA. Sistema de Gestión Territorial - Ambiental de La Cuenca del Arroyo Del Gato. Departamento Conservación de Recursos Dirección de Ecología y Recursos Naturales Dirección Provincial De Preservación de la Biodiversidad Subsecretaria de Desarrollo Sustentable Secretaría de Política Ambiental de la Provincia de Buenos Aires La Plata, 2009, pp. 304.
- 📖 Speranza ED, Cappelletti N, Migoya MC, Tatone LM, Colombo JC. Migratory behaviour of a dominant detritivorous fish *Prochilodus lineatus* evaluated by multivariate biochemical and pollutant data. *Journal of Fish Biology* 2012; 81: 848-865.
- 📖 Stegeman JJ. Cytochrome P450 forms in fish: Catalytic, immunological and sequence similarities. *Xenobiotica* 1989; 19: 1093-1110.
- 📖 Stephensen Ek, Sturve J, Förlin L. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2002; 133: 435-442.
- 📖 Stresser DM, Blanchard AP, Turner SD, Erve JCL, Dandeneau AA, Miller VP, et al. Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: Analysis of 27 test compound's with four fluorometric substrates. *Drug Metabolism and Disposition* 2000; 28: 1440-1448.
- 📖 Subedi B, Du B, Chambliss CK, Koschorreck J, Rudel H, Quack M, et al. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in German fish tissue: a national study. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 9047-54.
- 📖 Subedi B, Mottaleb MA, Chambliss CK, Usenko S. Simultaneous analysis of select pharmaceuticals and personal care products in fish tissue using pressurized liquid extraction combined with silica gel cleanup. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218: 6278-6284.
- 📖 Tanoue R, Margiotta-Casaluci L, Huerta B, Runnalls TJ, Nomiya K, Kunisue T, et al. Uptake and Metabolism of Human Pharmaceuticals by Fish: A Case Study with the Opioid Analgesic Tramadol. *Environmental Science & Technology* 2017; 51: 12825-12835.
- 📖 Tanoue R, Nomiya K, Nakamura H, Kim JW, Isobe T, Shinohara R, et al. Uptake and Tissue Distribution of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Wild Fish from Treated-Wastewater-Impacted Streams. *Environmental Science and Technology* 2015; 49: 11649-11658.
- 📖 Tatone L, Bilos C, Skorupka C, Colombo J. Vertical Fluxes and Accumulation of Trace Metals in Superficial Sediments of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 2009; 83: 913-9.
- 📖 Thorn CF, Leckband SG, Kelsoe J, Leeder JS, Müller DJ, Klein TE, et al. PharmGKB summary: carbamazepine pathway. *Pharmacogenetics and genomics* 2011; 21: 906-910.
- 📖 Timbrell JA, Marrs TC. Biotransformation of Xenobiotics. *General, Applied and Systems Toxicology*, 2009.
- 📖 USEPA. Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians. 1975.
- 📖 USEPA. Risk Assessment and Management: Framework for Decision Making (EPA/600/985/002). US Environmental Protection Agency, Office of Policy, Planning and Evaluation Washington, DC, 1984.
- 📖 USEPA. Risk Assessment: Guidance for Superfund Volume 1 Human Health Evaluation Manual (Part A). 1989.
- 📖 USEPA. Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories. Volume 2, Third edition. Risk Assessment and Fish Consumption Limits. Office of Water. EPA 823-B-99-008, Washington, DC, 2000.
- 📖 USEPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. 2002; Fifth Edition.
- 📖 USEPA. Framework for Cumulative Risk Assessment. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Center for Public Health and Environmental

- Assessment (CPHEA), formerly known as the National Center for Environmental Assessment (NCEA), Washington Office, EPA/600/P-02/001F, 2003, pp. 129.
- 📖 USEPA. Emerging Contaminants – Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorooctanoic Acid (PFOA). 2012.
 - 📖 USGS. Illustrated Field Guide for Assessing External and Internal Anomalies in Fish. 2002.
 - 📖 Valdés ME, Amé MV, Bistoni MDLA, Wunderlin DA. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Science of the Total Environment* 2014; 472: 389-396.
 - 📖 Valdés ME, Huerta B, Wunderlin DA, Bistoni MA, Barceló D, Rodríguez-Mozaz S. Bioaccumulation and bioconcentration of carbamazepine and other pharmaceuticals in fish under field and controlled laboratory experiments. Evidences of carbamazepine metabolism by fish. *Science of the Total Environment* 2016; 557-558: 58-67.
 - 📖 Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2003; 13: 57-149.
 - 📖 Wang J, Gardinali PR. Uptake and depuration of pharmaceuticals in reclaimed water by mosquito fish (*Gambusia holbrooki*): A worst-case, multiple-exposure scenario. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2013a; 32: 1752-1758.
 - 📖 Wang J, Gardinali PR. Uptake and depuration of pharmaceuticals in reclaimed water by mosquito fish (*Gambusia holbrooki*): A worst-case, multiple-exposure scenario. 2013b; 32: 1752-1758.
 - 📖 WHO. Principles for the assessment of risks to human health from: exposure to chemicals. *Environmental Health Criteria*, 1999, pp. I-110.
 - 📖 Whyte J, E Jung R, J Schmitt C, E Tillitt D. Ethoxyresorufin- O -deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. *Critical reviews in toxicology* 2000; 30: 347-570.
 - 📖 Xie H, Hao H, Xu N, Liang X, Gao D, Xu Y, et al. Pharmaceuticals and personal care products in water, sediments, aquatic organisms, and fish feeds in the Pearl River Delta: Occurrence, distribution, potential sources, and health risk assessment. *Science of the Total Environment* 2019; 659: 230-239.
 - 📖 Xie Z, Lu G, Yan Z, Liu J, Wang P, Wang Y. Bioaccumulation and trophic transfer of pharmaceuticals in food webs from a large freshwater lake. *Environmental Pollution* 2017; 222: 356-366.
 - 📖 Zapata ME, Rovirosa A, Carmuega E. Changes in the food and beverage consumption pattern in Argentina, 1996-2013. *Salud Colectiva* 2016; 12: 473-486.
 - 📖 Zenker A, Cicero MR, Prestinaci F, Bottoni P, Carere M. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *Journal of Environmental Management* 2014; 133: 378-387.
 - 📖 Zhang X, Oakes KD, Cui S, Bragg L, Servos MR, Pawliszyn J. Tissue-Specific In Vivo Bioconcentration of Pharmaceuticals in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using Space-Resolved Solid-Phase Microextraction. *Environmental Science & Technology* 2010; 44: 3417-3422.