

Resumen

Artemia franciscana "camarón salino", es un crustáceo sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica y de muy diversas estructuras químicas, y de fácil manejo en el laboratorio y con un cultivo relativamente sencillo y barato. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la toxicidad de antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre *A. franciscana*. Con los nauplios II de *A. franciscana*, dentro de las 24 h de eclosión, se procedió a realizar los bioensayos de toxicidad calculando la Concentración letal media (CL_{50}) a 24 h y 48 h de exposición. Se observó la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad a 48 h de exposición para los antiparasitarios: Mebendazol > Albendazol > Metronidazol. Con relación al efecto tóxico letal de seis antimicrobianos comerciales sobre *A. franciscana* se vio la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad a 48 h de exposición: Triclosan > Clotrimazol > Itraconazol > Ketoconazol > Oxitetraciclina > *Mimosa*. El camarón salino mostró efectos de mortalidad por acción de cinco sustancias con propiedades insecticidas, encontrándose el siguiente orden de mayor a menor mortalidad en términos de CL_{50} ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) a 48 h de exposición: Cipermetrina > Rotenona > Carbaryl > Canela > Malation. Las tres sustancias químicas que presentaron mayor toxicidad fueron triclosan, Cipermetrina y Clotrimazol. El índice de Vulnerabilidad (χ) para el desarrollo en base a la relación entre la CL_{50} a 24 h/ CL_{50} a 48 h para *A. franciscana*, indicó que cinco valores de 14 (35,71%): Metronidazol, Mebendazol, Ketoconazol, Clotrimazol e Itraconazol fueron mayores a 3, por lo que se sugiere un efecto dependiente del desarrollo. Se observó que diez (71,42%) de las sustancias químicas mostraron fuerte actividad citotóxica.

Palabras clave: antimicrobiano, antiparasitario, camarón salino, concentración letal, insecticida, letalidad, toxicidad.

Abstract

Artemia franciscana "brine shrimp", is sensitive to a wide range of compounds with biological activity and diverse chemical structures, and easy handling in the laboratory and with a relatively simple and inexpensive crustacean culture. The aim of this study was to evaluate the toxicity of parasiticides, antimicrobials and insecticides on *A. franciscana*. With *A. franciscana* nauplii II, within 24 h of hatching, we proceeded to perform toxicity bioassays calculating the average lethal concentration (LC_{50}) at 24 h and 48 h of exposure. The following sequence of high to low toxicity to 48 h of exposure to antiparasitic was observed: Mebendazole > Albendazole > Metronidazole. Regarding the lethal toxic effect of six commercial antimicrobial about *A. franciscana*, the following sequence of toxicity at 48 h of exposure was observed: Triclosan > Clotrimazole > Itraconazole > Ketoconazole > oxytetracycline > *Mimosa*. The brine shrimp mortality showed effects on five substances with insecticidal properties, meeting the following order from highest to lowest mortality in terms of LC_{50} ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) at 48 h of exposure

Cipermethrin >Rotenone >Carbaryl >Cinnamom >Malathion. The three chemicals that showed higher toxicity were triclosan, Cypermethrin and Clotrimazole. Vulnerability Index (γ) for development based on the relationship between the 24 h LC₅₀/LC₅₀ at 48 h for *A. franciscana*, said five values of 14 (35.71%): Metronidazole, Mebendazole, Ketoconazole, itraconazole and clotrimazole were larger than 3, so a development-dependent effect is suggested. Ten of chemicals (71.42%) showed strong cytotoxic activity.

Keywords: antimicrobial, antiparasitic, brine shrimp, insecticide, lethal concentration, lethality, toxicity.

h) INTRODUCCIÓN

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

Muchos de estos productos farmacéuticos aplicados con propósitos medicinales o como aditivos pueden llegar finalmente al ambiente marino por rutas directas o indirectas (Iannacone & Alvariño 2007). Por ende, la presencia y la evaluación de los productos farmacéuticos en el ambiente acuático es un área de investigación emergente a nivel global (Halling-Sorensen *et al.* 1998, Daughton & Ternes 1999, Jjemba 2006). Por medios de bioensayos de ecotoxicidad se establecen los criterios los criterio de calidad para la protección de la vida acuática, los que posteriormente, se usan para determinar los estándares de calidad ambiental para cada agente químico (Iannacone *et al.* 2000, Iannacone & Alvariño 2002, Burton & Nordstrom 2004).

Artemia franciscana Kellogg, 1906 (Crustacea: Artemiidae) “camarón salino”, “camarón de salmuera” es un crustáceo sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica y de muy diversas estructuras químicas (Michael *et al.* 1956, Cisneros & Vitanea 2009, Asem *et al.* 2010, Pino & Jorge 2010, Borroto *et al.* 2011, Dvorak *et al.* 2012, Nwauzoma *et al.*, 2013). Se propuso su uso con diversas modificaciones para diferentes pruebas de toxicidad

(Vanhaecke *et al.* 1981, González *et al.* 2007, Gutierrez *et al.* 2007; Praveen *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2013) debido a su fácil manejo en el laboratorio y su cultivo relativamente sencillo y barato. *Artemia franciscana* “camarón salino” es el microcrústaceo más empleado como alimento vivo para peces y crustáceos marinos en crianza por su alto valor nutricional (Molina-Salinas & Said-Fernández, 2006). Esta especie es una de las herramientas preliminares para evaluar la toxicidad de (1) toxinas fúngicas, (2) extractos de plantas, (3) metales pesados, (4) cianobacterias, (5) algas, y (6) materiales dentales (Molina-Salinas & Said-Fernández, 2006).

A la fecha, no se tiene una base de datos actualizada que evalué el efecto letal de antiparasitarios (albendazol, metronidazol y mebendazol), antimicrobianos (ketoconazol, clotrimazol, fluoruro de sodio + triclosan, itraconazol y oxitetraciclina) e insecticidas (cipermetrina, carbaril, malation, extracto de canela, extracto de mimosa y barbasco) en el Perú, para su empleo en toxicología, farmacología, medicina y biología. Mediante los resultados obtenidos se realizó una evaluación de riesgos ambientales de estos productos antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas con *A. franciscana* en el ambiente acuático.

A la fecha en Sudamérica no se tienen resultados toxicológicos agudos de los antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre *A. franciscana*.

Importancia económica-social: Al ser *A. franciscana* “camarón salino” el microcrústaceo más empleado en acuicultura como alimento vivo para peces y crustáceos marinos por su alto valor nutricional bajo la forma de nauplio recién nacido por su alto valor en lípidos, la obtención de una base de datos ecotoxicológica de antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas permitirá al acuicultor seleccionar aquellos de menor riesgo al ambiente.

Importancia ambiental: En base a los resultados obtenidos se evaluó la toxicidad de antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas en la matriz ambiental acuática.

Importancia científica-tecnológica: Este biosensor y bioindicador ecológico podrían ser empleados como un “kit” referencial patentado en INDECOPI para determinar la toxicidad de cualquier sustancia química, el cual podría ofrecerse como un “servicio” en consultorías ambientales que evalúan el efecto de antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas.

i) OBJETIVOS

General

Evaluar la toxicidad de antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre *A. franciscana*.

Específicos

Determinar la toxicidad de albendazol, metronidazol y mebendazol sobre *A. franciscana*.

Evaluar la toxicidad de ketoconazol, clotrimazol, triclosan, itraconazol y oxitetraciclina sobre *A. franciscana*.

Determinar la toxicidad de la cipermetrina, carbaryl, malation, extracto de canela, extracto de mimosa y barbasco sobre *A. franciscana*.

j) HIPÓTESIS

Ho₁: No existe efecto tóxico de los antiparasitarios albendazol, metronidazol y mebendazol sobre *A. franciscana*.

Ha₁: Existe efecto tóxico de los antiparasitarios albendazol, metronidazol y mebendazol sobre *A. franciscana*.

Ho₂: No existe efecto tóxico de los antimicrobianos ketoconazol, clotrimazol, fluoruro de sodio+ triclosan, itraconazol y oxitetraciclina sobre *A. franciscana*.

Ha₂: Existe efecto tóxico de los antimicrobianos ketoconazol, clotrimazol, fluoruro de sodio+ triclosan, itraconazol y oxitetraciclina sobre *A. franciscana*.

Ho₃: No existe efecto tóxico de los insecticidas cipermetrina, carbaryl, malation, extracto de canela, extracto de mimosa y barbasco sobre *A. franciscana*.

Ha₃: No existe efecto tóxico de los insecticidas cipermetrina, carbaryl, malation, extracto de canela, extracto de mimosa y barbasco sobre *A. franciscana*.

k) MÉTODO

Los bioensayos toxicológicos con los antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre *A. franciscana* se realizaron en el Laboratorio de Cordados y de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma (URP), Distrito de Santiago de Surco, Lima, Perú, en el 2014.

Muestras e Instrumentos

Antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas

Productos químicos:

Antiparasitarios: (1) albendazol, (2) metronidazol y (3) mebendazol.

Antimicrobianos: (4) ketoconazol, (5) clotrimazol, (6) triclosan, (7) itraconazol, (8) oxitetraciclina y (9) extracto de canela,

Insecticidas: (10) Cipermetrina, (11) carbaryl, (12) malation, (13) extracto de mimosa y (14) rotenona.

Para cada producto químico se indicó su marca comercial representativa del mercado nacional, su CAS químico, el uso del producto químico y su mecanismo de acción (Tabla 1). Se utilizaron de seis a siete concentraciones de los antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas más un

control con cuatro repeticiones por concentración (Tabla 1). Las diluciones de los antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas calculados usaron mayormente un factor de 0,5. El agua de dilución empleada para todos los casos fue agua de mar filtrada.

Tabla 1. Número CAS, Nombre comercial, concentraciones, usos y mecanismo de acciones de las sustancias químicas antiparasitarias, antimicrobianas e insecticidas usadas en el bioensayo con *A. franciscana*.

Sustancia Química	CAS	Nombre Comercial	Concentraciones mg·L ⁻¹	Usos y mecanismo de acción
Albendazol	54965-21-8	Zentel	37,5; 75; 150; 300; 600	Antiparasitario. Se emplea para el control de platelmintos, nematodos y <i>Giardia</i> . Causa alteraciones degenerativas en las células del tegumento y del intestino de vermes al unirse a un sitio de unión específico de la tubulina, inhibiendo así la polimerización y ensamblaje de los microtúbulos.
Metronidazol	443-48-1	Flagyl	312,5; 625; 1250; 2500 y 5000	Antiparasitario. Se emplea contra protozoos: Trichomonas, Amebas y <i>Giardia</i> . Desestabiliza la estructura hélica del ADN en los protozoos, inhibiendo así la síntesis de ácidos nucleicos.
Mebendazol	31431-39-7	Mebendazol Genérico	45; 90, 180; 360 y 720	Antiparasitario. Antihelmíntico.
Ketoconazol	65277-42-1	Ketoconazol Genérico	12,5; 25; 50; 100 y 200	Antimicótico. Disminuye el ergosterol y altera la permeabilidad de las membranas de los hongos lo que lleva a una desestructuración de los orgánulos intracelulares y de la capacidad de división.
Clotrimazol	23593-75-1	Baycutem N Crema	1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 y 50	Antimicótico. Inhibe la división y crecimiento de hongos. Altera la permeabilidad de la pared celular fúngica e inhibe la actividad de enzimas dentro de la célula.
Triclosán	3380-34-5	Colgate Total 12@. Triclosan 0,3%. Fluoruro de Sodio 0.32%.	0,18; 0,37; 0,75; 1,5 y 3	Antibacteriano y Antimicótico. El triclosán difunde a través de la membrana citoplásmica bacteriana e interfiere su metabolismo lipídico. Actúa como un biocida, y en dosis menores tiene efecto bacteriostático.
Itraconazol	84625-61-6	Sporanox 1%	6,25; 12,5; 26, 50 y 100	Antifúngico. Inhibe la enzima CYP51A1, y la formación del ergosterol que forma parte de la pared celular de los hongos.
Oxitetraciclina	79-57-2	Tetrasona 250	312; 625; 1250; 2500 y 5000	Antimicrobiano. Bacteriostático. Inhibidor de la síntesis proteica bacteriana.
Extracto de canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	84649-98-9	Biocinn	87,5; 175; 350; 700; 1400	Insecticida. Acaricida. Fungicida. Actúa por contacto de bajo efecto residual.
alfacipermetrina	52315-07-8	Campeón 10%	0,41; 0,83; 1,66; 3,33;	Insecticida. Estimula el

			6,66	sistema nervioso central, posiblemente por interferencia competitiva con la conductancia catiónica en la capa lipídica de las células nerviosas, bloqueando la transmisión del impulso nervioso.
Carbaryl	63-25-2	Carvadin® 5% DP	0,75; 1,5; 3,6 y 12	Insecticida. Inhibe competitivamente la acción de la acetilcolinesterasa.
Malation	121-75-5	Extrathion 57% EC	12,5; 25; 50; 100 y 200	La toxicidad del malatión se produce por la unión de su metabolito activo, malaoxón, con la acetilcolinesterasa (AChE), la cual se encuentra en los mamíferos, anfibios, peces, reptiles, aves e insectos.
Extracto de Mimosa (<i>Mimosa tenuiflora</i>)	500-44-7	Mimotem	200; 400; 800; 1600 y 3200	Antifúngico y Bactericida.
Barbasco	83-79-4	Extracto	6,25; 12,5; 25; 50 y 100	La acción tóxica de la rotenona radica en su acción sobre la cadena de electrones mitocondrial, ya que tiene la capacidad de inhibir al complejo I de dicha cadena (el complejo NADH-ubiquinona reductasa), bloquea pues la respiración celular.

Organismos pruebas

Material biológico

Artemia franciscana

Los huevos de *A. franciscana* se obtuvieron en Zoofarma® Lima, Perú, de otro laboratorio-Acuario de la ciudad de Lima, Perú, y de las lagunas de Chilca, Lima, Perú. Se procedió a preparar las condiciones para la eclosión de los huevos, con el fin de obtener los individuos en estadio nauplio II, los cuales fueron usados en el presente experimento. Se incorporaron los huevos en un vaso de precipitado de 500 mL conteniendo agua destilada y se expuso a luz intensa por un periodo de tiempo de 1 h. Luego, se utilizó hipoclorito de sodio (lejía Clorox®) que tendrá una concentración de 5,25%. En proporción 100 mL por 900 mL de agua, se agitó constantemente por espacio de 30 min con el fin de facilitar la eclosión de los huevos. Se apreció el cambio de coloración de los huevos de una coloración marrón inicial a una coloración naranja. Seguido se enjuagó bien los huevos con agua destilada, se trasladaron a un vaso de precipitado de 1000 mL conteniendo agua de mar filtrada y 7,5 g de bicarbonato de sodio (NaHCO₃), y luego se llevó este a la incubadora a 27°C durante un periodo de 24 h. Pasado el tiempo de incubación se sometieron los huevos a una fuerte aireación hasta su eclosión. Los cuales eclosionaron a temperatura ambiente (entre 19 °C a 22 °C), dos días después de haber comenzado la fase de aireación (Maguiña & Iannacone 2000, Iannacone & Pérez 2008, Pérez *et al.* 2010).

Procedimientos

Bioensayos

Una vez obtenidos los nauplios II de *A. franciscana*, dentro de las 24 h de eclosión, se procedió a realizar los bioensayos de toxicidad. Se utilizaron mayormente un total de 240 individuos de *A. franciscana* para cada una de las sustancias químicas evaluadas, a excepción de clotrimazol que se empleó 280 individuos; distribuyéndose al azar diez nauplios de II estadio en cada envase de 25 mL de capacidad con 20 mL de solución y en cada una de las cuatro replicas, las cuales contuvieron las seis a siete diferentes diluciones de los antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas. Los nauplios no se alimentaron durante el bioensayo.

Se contó el número de nauplios vivos y muertos en cada una de las diluciones a las 24 y 48 h de exposición. Los ensayos fueron considerados válidos cuando la mortalidad en el control no fue mayor al 10% según el criterio estándar (Calow 1993). Se usaron como criterio de mortalidad la carencia de movilidad a 15 s de observación al microscopio estereoscópico. Antes de efectuar las lecturas se agitaron los envases en forma circular para reactivar el movimiento de los organismos que se posan inmóviles en el fondo (Castillo 2004). Se empleó el bicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como control positivo.

Tratamiento de datos

Las pruebas de toxicidad aguda se evaluaron en siete concentraciones, más un control o testigo con cuatro repeticiones, en un diseño en bloque completamente aleatorio (DBCA) de 6-7x4. La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno, con el fin de ajustar los datos a la normalidad. En el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos y entre las repeticiones se realizó la prueba de Tukey. Los cálculos de la mortalidad corregida se realizaron mediante la fórmula de Abbott en caso de muerte natural en el grupo testigo cuando fue menor al 20% (Macedo *et al.*, 1997). Las $CL(E)_{50}$ se calcularon usando el programa computarizado EPA-Probit versión 1.5. El modelo de regresión fue verificado usando el estadístico Chi-cuadrado. Los resultados para los estadísticos descriptivos e inferenciales se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 19,0.

Se calculó para cada sustancia química evaluada el índice de vulnerabilidad (γ) para el desarrollo en base a la relación entre la CL_{50} a 24 h/ CL_{50} a 48 h, indicando que valores mayores a 3 sugieren un efecto dependiente del desarrollo (Olivero-Verbel *et al.*, 2009). La actividad citotóxica de las catorce sustancias químicas sobre *A. franciscana* fue clasificada en cuatro categorías: (1) Fuerte actividad citotóxica $< 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; (2) Moderada actividad citotóxica entre 100 y $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; (3) Débil actividad citotóxica 500 y $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y (4) No tóxica $> 1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Nguta *et al.*, 2012).

l) RESULTADOS

La Tabla 2 nos muestra los efectos tóxicos letales de tres antiparasitarios comerciales sobre *A. franciscana* a 24 h y 48 h de exposición. Se observó la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad a 48 h de exposición para los antiparasitarios: Mebendazol >Albendazol >Metronidazol.

Con relación al efecto tóxico letal de los seis antimicrobianos comerciales sobre *A. franciscana* se vio la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad a 48 h de exposición: Triclosan >Clotrimazol >Itraconazol >Ketoconazol >Oxitetraciclina >*Mimosa* (Tabla 3).

El camarón salino *A. franciscana* mostró efectos de mortalidad por acción de cinco sustancias con propiedades insecticidas, encontrándose el siguiente orden de mayor a menor mortalidad en términos de CL_{50} ($mg \cdot L^{-1}$) a 48 h de exposición: Cipermetrina >Rotenona >Carbaryl >Canela >Malation (Tabla 4).

Entre las 14 sustancias químicas ensayadas sobre *A. franciscana*, las tres que presentaron la mayor mortalidad en términos de CL_{50} ($mg \cdot L^{-1}$) a 48 h de exposición fueron triclosan, Cipermetrina y Clotrimazol (Tablas 2-4).

La Tabla 5 nos muestra los valores del índice de Vulnerabilidad para el desarrollo en base a la relación entre la CL_{50} a 24 h/ CL_{50} a 48 h, indicando que cinco valores de 14 (35,71%) fueron mayores a 3 por lo que se sugiere un efecto dependiente del desarrollo. Se observó este patrón en 66,66%, 50% y 0% de los antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas, respectivamente (Tabla 5). Con relación a las categorías citotóxicas sobre *A. franciscana* se observó que diez (71,42%) mostraron fuerte actividad citotóxica, uno (7,14%) moderada actividad citotóxica, dos (14,28%) débil actividad citotóxica y uno (7,14%) sin actividad citotóxica (Tabla 5).

m) DISCUSIÓN

La industria química somete todos sus compuestos químicos a diferentes bioensayos para determinar la toxicidad. Muchas pruebas involucran protocolos que trabajan sobre líneas celulares específicas humanas, células de animales o en animales de laboratorio (Treviño *et al.*, 2012).

Se han desarrollado bioensayos económicos, rápidos, reproducibles, fáciles de llevar a cabo, y no necesitan de condiciones extremas de asepsia ni un manipuleo especializado como la prueba que emplea al microcrustáceo, para la detección y aislamiento de sustancias químicas bioactivas/o tóxicas, denominadas como “mortalidad aguda de los nauplios de *Artemia franciscana*” (Carballo *et al.*, 2002; Onocha & Ali, 2010, Luigi *et al.*, 2012; Treviño *et al.*, 2012). El bioensayo con *A. franciscana* ha demostrado ser una alternativa preliminar viable al ensayo con ratones, los cuales son caros y están relacionados con restricciones éticas (Nguta *et al.*, 2012).

Entre las 14 sustancias químicas ensayadas sobre *A. franciscana*, las tres que presentaron la mayor mortalidad ($< 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en términos de CL_{50} a 48 h de exposición fueron Triclosan, Cipermetrina y Clotrimazol. Estas tres sustancias son clasificadas como altamente tóxicas por presentar valores entre $0,1$ a $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Mischke & Avery, 2013).

Chalew & Halden (2009) indicaron que el biocida sintético Triclosan es un agente antimicrobiano popular que forma parte de una amplia variedad de productos de consumo de uso diario. Se ha observado una superposición de las concentraciones ambientales esperadas y los valores de toxicidad para los organismos más sensibles (algas y microcrustáceos) (Neumegen *et al.*, 2005), lo que sugiere posibles efectos ecológicos adversos del Triclosan en el medio acuático (Chalew & Halden, 2009). La toxicidad del Triclosan a 96 h de exposición en peces varió entre $0,26$ a $0,60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para los microcrustáceos acuáticos (*Daphnia magna* y *Ceriodaphnia* sp.), la toxicidad del Triclosan fluctuó entre $0,18$ a $0,39 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Chalew & Halden, 2009). La toxicidad del Triclosan sobre *A. franciscana* presentó un valor de CL_{50} de $0,72 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, el cual fue ligeramente mayor al observado para peces y microcrustáceos acuáticos.

La Alfa-cipermetrina es un insecticida piretroide, que controla intensamente una amplia gama de plagas en el ámbito agropecuario. La alfa-cipermetrina es altamente tóxico para los invertebrados acuáticos (Sarikaya, 2009). Para los microcrustáceos, a las 48 h de exposición, la CE_{50} para *Daphnia magna* es de $0,3 \text{ ug}\cdot\text{L}^{-1}$, y a las 24 h de exposición, la CL_{50} para *Gammarus pulex* es de $0,05 \text{ ug}\cdot\text{L}^{-1}$. La cipermetrina es altamente tóxica para los peces, con valores de CL_{50} a 96 h que oscilan entre $0,7$ y $350 \text{ ug}\cdot\text{L}^{-1}$ (Sarikaya, 2009). La toxicidad de la cipermetrina sobre *A. franciscana* fue de $0,84 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 48 h de exposición. Estos resultados muestran que a pesar de ser la cipermetrina una de las sustancias químicas más tóxicas para *A. franciscana*, presentó menor sensibilidad que otros invertebrados acuáticos y peces, y también a que en el presente ensayo se empleó un producto químico comercial formulado. Sarikaya (2009) señala que para superar las discrepancias y los posibles efectos sinérgicos/antagónicos de los componentes de las formulaciones de los piretroides, las pruebas de toxicidad con formulaciones deben ser incluidas junto con las pruebas de los ingredientes activos. El empleo de únicamente el ingrediente activo del piretroide en las pruebas no es suficiente (Sarikaya 2009).

El clotrimazol pertenece a un grupo de fungicidas inhibidores de la 14 alfa-desmetilasa y es ampliamente utilizado en la medicina humana y veterinaria, por lo que ha sido identificado como un contaminante prioritario para el medio acuático (Porsbring *et al.*, 2009). La aromatasa que es inhibida por el clotrimazol convierte los andrógenos en estrógenos y se sugiere que participen en la diferenciación sexual en los vertebrados (Gyllenhammar *et al.*, 2009). Escher *et al.* (2011) consideran al clotrimazol como un tóxico prioritario en ecotoxicología y evaluación de riegos de productos farmacéuticos en hospitales. El fuerte efecto letal del clotrimazol en *A.*

franciscana con un valor de CL₅₀ a 48 h de exposición de 0,97 mg·L⁻¹ es menos tóxico que la CE₅₀ observada en el alga *Desmodesmus subspicatus* a 72 h de exposición de 0,098 mg·L⁻¹, que al del microcrustáceo *Daphnia magna* con un valor de CE₅₀ a 48 h de exposición de 0,02 mg·L⁻¹ y que al del pez *Brachydanio rerio* a 96 h de exposición de 0,29 mg·L⁻¹ (OSPAR *et al.*, 2005).

Los resultados de toxicidad observados con las sustancias químicas ensayadas muestran una menor sensibilidad de la especie *A. franciscana* a varios agentes químicos o físicos en comparación con los otros organismos de invertebrados usados en bioensayos (Nunes *et al.*, 2006; Dvorak *et al.*, 2013).

El índice de Vulnerabilidad (\bar{x}) para el desarrollo en base a la relación entre la CL₅₀ a 24 h/ CL₅₀ a 48 h para *A. franciscana*, indicó que cinco valores de 14 (35,71%): Metronidazol, Mebendazol, Ketoconazol, Clotrimazol e Itraconazol fueron mayores a 3, por lo que se sugiere un efecto dependiente del desarrollo. Estos cinco productos farmacéuticos: Metronidazol, Mebendazol, Ketoconazol, Clotrimazol e Itraconazol son catalogados en relación a su riesgo por la SCC (2012) en base a una ponderación de tres criterios (persistencia, bioacumulación y toxicidad) como de riesgo insignificante, no puede ser excluido el riesgo, riesgo bajo, no puede ser excluido el riesgo y de riesgo insignificante, respectivamente.

Se observó que diez (71,42%) de las sustancias químicas mostraron fuerte actividad citotóxica según la clasificación de Nguta *et al.* (2012), que incluyeron a la mayoría de los antimicrobianos (ketoconazol, clotrimazol, triclosan, Itraconazol) e insecticidas (cipermetrina, carbaryl, malation, canela y rotenona).

n) REFERENCIAS

- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION), AWWA (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION), WPCF (WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION). 1995. *Standard methods for examination of water and wastewater*. 19th. Ed. American Health Association. Washington, D.C.

-ASEM, A.; RASTEGAR-POUYANI, N. & DE LOS RIOS-ESCALANTE, P. 2010. The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda). I. True and false taxonomical descriptions. *Latino American Journal of Aquatic Research*, 38: 501-506.

- BORROTO J., TRUJILLO R., DE LA TORRE Y., WAKSMAN N., HERNÁNDEZ M., SALAZAR R. 2011. Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L. *Revista Cubana Plantas Medicinales*, 16: 34-42.

-BURTON G.A. & NORDSTROM J.E. 2004. An in situ toxicity identification evaluation method part I: Laboratory validation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23:2844-2850.

-BUSTOS-OBREGON E. & ÁLVARO VARGAS A. 2010. Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. *Biological Research*, 43: 357-362.

- CARBALLO, J.L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z.L.; PÉREZ, P. & GARCÍA-GRÁVALOS, M.D. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2:17. 472-6750/2/17.
- CASTILLO G. 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IMTA. México
- CHARRIEL G. 2003. *Investigación de la actividad de un nuevo antifúngico de interés clínico*. Tesis doctoral, Universidad de Cordova. Disponible en: <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/378/13208548.pdf?sequence1> leído el 10 de noviembre del 2013.
- CISNEROS, R. & VINATEA, E. 2009. Producción de biomasa de *Artemia franciscana* Kellog 1906 utilizando diferentes dietas. *Ecología Aplicada*, 8: 9-14.
- DAUGHTON CG & TERNES TA. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. *Environmental Health Perspectives*, 107: 907-938.
- DVORAK, P.; BENOVA, K. & VITEK, J. 2012. Alternative biotest on *Artemia franciscana*. En. www.intechopen.com leído el 10 de diciembre del 2013.
- FENT K, WESTON A, CAMINADA D. 2006. Ecotoxicología de los productos farmacéuticos humanos. *Aquatic Toxicology*, 76: 122-159.
- GONZÁLEZ A., PRESA M., LATORRE M., LURÁ M. 2007. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 59-61.
- GREGORY B.S. 2005. Estructura y actividad de los antifúngicos. Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar. *Revista Cubana de Farmacología*, 39: En: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v39n2/far12205.pdf> leído el 10 de diciembre del 2013.
- GUTIÉRREZ H., GUTIÉRREZ R., HERLES E., HERNÁNDEZ M., HORNA, P., HOYOS P., HUBY, C., JIMÉNEZ M., JIMÉNEZ L., KOLLMANN A., CASTAÑEDA, B., IBÁÑEZ L., SCOTTO C. 2007. Análisis comparativo de la toxicidad del extracto acuoso en cocimiento de la harina de maca (*Lepidium meyenii*, Walp) en tres especies de animales modelos: *Artemia franciscana* (Crustácea, Anostraca), pez Guppy (*Poecilia reticulata*) y ratón (*Mus musculus*). *Revista Horizonte Médico*, 7: 103-109.
- HALLING-SØRENSEN B., NOR NIELSEN S., LANZKY P.P.F., INGERSLEV F., LÜTZHØFT H.C. & JORGENSEN S.E. 1998. Occurrence, fate, and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere*, 36: 357-393.
- IANNACONE J., PÉREZ D. 2008. Efectos tóxicos de cuatro plantas amazónicas sobre *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905 (Diptera: Chironomidae) y *Artemia franciscana* Kellog 1906 (Anostraca: Artemiidae). *Revista Brasileira de Toxicologia*, 21: 25-32.
- IANNACONE J., DALE W. & ALVARIÑO L. 2000. Monitoreo ecotoxicológico del río Rímac (Lima-Perú) empleando a *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae). *Revista Chilena de Entomología*, 27: 25-34.
- IANNACONE J. & ALVARIÑO L. 2002. Efecto del detergente domestico Alquil Aril Sulfonato de Sodio Lineal (LAS) sobre la mortalidad de tres caracoles dulceacuícolas en el Perú. *Ecología Aplicada*, 1:81-87.

- IANNACONE J. & ALVARIÑO L. 2007. Ecotoxicidad acuática de dos colorantes y de tres antiparasitarios de importancia en acuicultura en *Daphnia magna*. *Ecología Aplicada*, 6: 101-110.
- JJEMBA P.K. 2006. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63: 113-130.
- JURADO, C. 1989. *Toxicología Veterinaria*. 2ª ed., Barcelona: Editorial Salvat.
- LAGARTO, A.; VEGA, R. 1990. *Manual de ensayos de toxicología alternativa*. CIDEM. Cuba.
- MACEDO M.E., CONSOLI R.A., GRANDE T.S., DOS ANJOS A.M., DE OLIVEIRA A.B., MENDES N.M., QUEIROZ R.O. & ZANI C.L. 1997. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92: 565-570.
- MAGUIÑA, A. & IANNACONE, J. 2000. *Artemia franciscana* Kellog, 1906 “Camarón salino” como agente de bioensayo para evaluar cinco extractos crudos de plantas con propiedades antiparasitarias. *Boletín de la Sociedad Química del Perú*, 66: 154-169.
- MICHAEL AS, THOMPSON CG, ABRAMOVITZ M. 1956. *Artemia salina* as test organisms for a bioassay. *Science*, 123: 464.
- MOLINA-SALINAS, G.S. & SAID-FERNANDEZ, S. 2006. A modified micropalte cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacologyonline*, 3: 633-638.
- NGUTA, J.M.; MBARIA, J.M.; GAKUYA, D.W.; GATHUMBI, P.K.; KABASA, J.D. & KIAMA, S.G. 2012. Evaluation of acute toxicity of crude plant extracts from Kenyan Biodiversity using shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). *The Open Conference Proceedings Journal*, 3: 30-34.
- NWAUZOMA, A.B.; CHOUDHARY, M.I.; ZULFIQAR, A. & OLAIYA, C.O. 2013. Biological activity of crude extracts of *Citrus* species from Nigeria. *Nature and Science*, 1: 135-139.
- OLIVERO-VERBEL J.; GUETTE-FERNANDEZ J.; STASHENKO, E. 2009. Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8: 419-427.
- ONOGHA, P. A. & ALI, S.M. 2010. Insecticidal, antimicrobial, phyto- and cytotoxicity of *Chassalia kolly* plant extract. *Archives of Applied Science Research*, 2, 151-156.
- PEREZ D.; IANNACONE J; TUEROS A. 2008. Toxicidad de *Paullinia clavigera* (Sapindaceae) y *Chondrodendron tomentosum* (Menispermaceae) sobre el piojo saltador del Camu Camu *Tuthillia cognata* (Hemiptera: Psyllidae). *Gayana Botánica*, 65: 145-152.
- PÉREZ D.; IANNACONE, J. & PINEDO, H. 2010. Toxicological effect from stem cortex of the amazonian plant soapberry *Paullinia clavigera* (Sapindaceae) upon three arthropods. *Ciencia e Investigación Agraria*, 37: 133-143.
- PINO O. & JORGE F. 2010. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 25: 34-43.
- PRAVEEN, M.; RADHA, K.; KUMAR.R.H.; PADMAJA. V.; MATHEW, A. & KUMAR, P.A. 2012. Preliminary phytochemical, antimicrobial and toxicity studies on *Clerodendrum paniculatum* Linn leaves. *Hygeia J.D.M.*, 4: 41-50.

- SHARMA, N.; GUPTA, P.C.; SINGH, A. & RAO, C.V. 2013. Brine shrimp bioassay of *Pentapetes phoenicea* Linn. And *Ipomaea carnea* Jacq. Leaves. Der Pharmacia Lettre, 5: 162-167.
- THOMAS R. & BARBER K. 2011. Fungal Guide: Clotrimazole. Disponible en: www.fungalguide.ca leído el 10 de diciembre del 2013.
- TREVINO, J.F.; RODRIGUEZ, G.R.G.; VERDE, S.J.; MORALES, R.M.E.; GARZA, P.R.A.; RIVAS, M.C. & ARANDAY, C.A. 2012. Actividad antifúngica de *Stenocereus pruinosus* y *Echinocereus stramineus*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 43: 42-48.
- VANHAECKE P, PERSOONE G, CLAUS C, SORGELOOS P. 1981. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii. Ecotoxicology and Environmental Safety, 5: 382-387.