



**COORDINACIÓN DE DESARROLLO  
PROFESIONAL E INSTITUCIONAL**

**SUBCOORDINACIÓN DE POSGRADO**

# **T E S I S**

**EFFECTOS ADVERSOS DE INHIBIDORES SELECTIVOS DE  
RECAPTURA DE SEROTONINA. EVALUACIÓN EN DIFERENTES  
NIVELES DE ORGANIZACIÓN BIOLÓGICA.**

Que para obtener el grado de  
**Maestro en**  
**Ciencias y Tecnología del Agua**

presenta  
**Sergio Javier Ponce Jahén**

**Tutor: M. en C. Yolanda Pica Granados.**  
**Cotutor: Dra. María del Pilar Saldaña Fabela.**

Con fundamento en los artículos 21 y 27 de la Ley Federal del Derecho de Autor y como titular de los derechos moral y patrimoniales de la obra titulada “Efectos adversos de Inhibidores Selectivos de Recaptura de Serotonina (ISRS). Evaluación en diferentes niveles de organización biológica”, otorgo de manera gratuita y permanente al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, autorización para que fijen la obra en cualquier medio, incluido el electrónico, y la divulguen entre su personal, estudiantes o terceras personas, sin que pueda percibir por tal divulgación una contraprestación.

**SERGIO JAVIER PONCE JAHÉN**

---

Lugar y fecha

---

Firma

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	V
DEDICATORIAS.....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	VIII
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	1
1.- INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Consumo de los antidepresivos.....	6
1.2 Consumo de Inhibidores Selectivos de Recaptura de Serotonina (ISRS).....	7
1.3 Farmacocinética de ISRS.....	8
1.4 Mecanismos de acción de los ISRS.....	9
1.5 Afectaciones de ISRS sobre organismos no blanco.....	10
1.6 Incidencia de ISRS en el ambiente.....	11
1.7 Propiedades fisicoquímicas y destino ambiental de ISRS.....	13
1.8 Procesos de tratamiento para la remoción de ISRS.....	15
1.8.2 Procesos de tratamiento físicos.....	17
1.8.3 Procesos de tratamiento fisicoquímico.....	17
1.8.4 Procesos de oxidación.....	18
1.8.5 Procesos de oxidación avanzada.....	18
2.- OBJETIVO E HIPÓTESIS.....	20
2.1 Objetivo.....	20
2.2 Hipótesis.....	20
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 Métodos de prueba para Toxicidad Aguda.....	21
3.1.1 Prueba con <i>Vibrio fischeri</i> .....	21
3.1.2 Prueba de inhibición de crecimiento algal.....	22
3.1.3 Ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros <i>Daphnia magna</i> .....	23
3.1.4 Ensayo de toxicidad aguda con <i>Danio rerio</i> .....	23
3.3 Análisis estadístico y confianza analítica.....	27
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1 Toxicidad aguda.....	28
4.1.1 Ampliación del tiempo de exposición para la prueba con <i>Vibrio fischeri</i> y respuesta en mezclas.....	29
4.1.2 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	32
4.1.3 <i>Daphnia magna</i> .....	34
4.1.4 <i>Danio rerio</i> .....	34
4.2 Indicadores de efecto de cronicidad.....	35
4.2.1 <i>Daphnia magna</i> .....	35
4.2.2 <i>Danio rerio</i> .....	39
4.3 Contraste de los niveles de efecto con la eficiencia de los procesos de tratamiento para la remoción de compuestos serotoninérgicos.....	46
5.- CONCLUSIONES.....	48

7.- ANEXOS.....	60
7.1.1 Prueba con <i>Vibrio fischeri</i> (toxicidad aguda).....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
7.1.2 Prueba con <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	61
7.1.3 Prueba con <i>Daphnia magna</i> .....	63
7.1.4 Prueba con <i>Danio rerio</i> .....	65
Resultados. Mortalidad (%) de <i>Danio rerio</i> y cálculo de la CL <sub>50-48h</sub> .....	66
<b>7.2</b> Indicadores de efecto de cronicidad .....	67
7.2.1 <i>Daphnia magna</i> .....	67
7.2.2 <i>Danio rerio</i> .....	112

## **AGRADECIMIENTOS**

Llegado el momento en que doy por finalizado este trabajo, sólo puedo tener palabras de agradecimiento para todas aquellas personas que a lo largo de dos años me han ayudado y me han dado palabras de aliento.

Como suele suceder en estos casos son tantas personas a las que debo dar gracias, que resulta complicado encontrar espacio suficiente para todas. Confío en que las personas que inevitablemente no aparecen reflejadas sabrán entenderlo.

Al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua por permitirme continuar con mi desarrollo profesional.

A mi asesora, la Maestra Yolanda Pica Granados por su apoyo en la culminación de este trabajo, por compartir su conocimiento y siempre alentarme a dar lo mejor, por sus consejos y la confianza que depositó en mí. Muchas gracias maestra por enseñarme a realizar las cosas con pasión, gracias por el crecimiento profesional y personal que logró en mí. Ahora reafirmo que todo el esfuerzo realizado para estar bajo su tutoría valió la pena. Sin dudar, fue la mejor decisión que pude haber tomado.

Al comité evaluador: Dra. María del Pilar Saldaña Fabela, Dra. Petia Mijaylova Nacheva, Dra. Gabriela E. Moeller Chávez y Dra. Maricarmen Espinosa Bouchot, muchas gracias por darme la oportunidad de trabajar con ustedes, por sus acertadas correcciones y porque siempre recibí su apoyo. A través de este texto les ratificó mi aprecio y admiración.

A la Maestra Gissel Trujillo Domínguez, por todo el tiempo que dedicó para este trabajo, gracias por siempre tener la respuesta correcta para cada una de mis preguntas. Sobre todo agradezco la amistad brindada, siempre recordaré los buenos momentos que pasamos en laboratorio.

## **DEDICATORIAS**

Mi tesis la dedico con todo mi cariño a mis padres Ernestina Jahén Leal y Marcelino Ponce Villa, por su sacrificio y esfuerzo, gracias por ser el cimiento para la construcción de mi vida profesional, ustedes sentaron en mi las bases de la responsabilidad y deseos de superación, en ustedes tengo el espejo en el cual me quiero reflejar.

A toda mi familia, en especial a mis hermanas: Fer, Ana y Bere, aunque a veces parece que estamos en una batalla, existen momentos en los que la guerra cesa y nos unimos para lograr nuestros objetivos. Este logro también es suyo.

A mi sobrina Janis Fernanda, tú pequeña siempre sacas lo mejor de mí, tu afecto y cariño son los detonantes de mi felicidad. Aun a tu corta edad me has enseñado muchas cosas en esta vida.

A todos mis amigos presentes y pasados, quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas, gracias a todas aquellas personas que durante estos dos años estuvieron a mi lado apoyándome y lograron que este sueño se haga realidad.

Y, finalmente, a Monserrat Vázquez quien me ha demostrado sobradamente su amor, paciencia y cariño, la ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante para que esta etapa culmine, estuviste a mi lado inclusive en los momentos más complicados, siempre ayudándome. Juntos recorrimos este camino, eres una mujer que me hace llenar de orgullo.

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Prescripciones médicas diarias de antidepresivos en 28 países pertenecientes a la OECD. ....	7
<b>Figura 2</b> Estructura molecular de antidepresivos: ISRS.....	13
<b>Figura 3</b> Ciclo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> calibrado por IMTA .....	25
<b>Figura 4</b> Etapas de desarrollo gestacional de huevos en <i>Daphnia magna</i> ,.....	27
<b>Figura 5</b> Efecto del tiempo de exposición sobre la toxicidad (CE <sub>50</sub> ) a fluoxetina y sertralina en <i>Vibrio fischeri</i> . ....	30
<b>Figura 6</b> Efecto de la mezcla de fluoxetina y sertralina sobre la Concentración Efectiva 50 (CE <sub>50</sub> ) de <i>Vibrio fischeri</i> (Sertralina). ....	31
<b>Figura 7</b> Efecto de la mezcla de fluoxetina y sertralina sobre la Concentración Efectiva 50 (CE <sub>50</sub> ) de <i>Vibrio fischeri</i> (Fluoxetina). ....	31
<b>Figura 8</b> Efecto de inhibitorio de la sertralina en el crecimiento poblacional de la microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	32
<b>Figura 9</b> Efecto de inhibitorio de la fluoxetina en el crecimiento poblacional de la microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	33
<b>Figura 10</b> Variación de la talla en organismos expuestos a fluoxetina ( <i>Daphnia magna</i> ).....	37
<b>Figura 11</b> Abortos espontáneos de huevos de <i>Daphnia magna</i> por exposición a fluoxetina y sertralina. ....	38
<b>Figura 12</b> Niveles de desarrollo asincrónico en huevos de una misma puesta ( <i>Daphnia magna</i> ) Nota: Número = fase de desarrollo de huevo, números iguales denotan una misma etapa de desarrollo. ....	39
<b>Figura 13</b> Incidencia de afectaciones asociadas a la exposición a fluoxetina y sertralina en el desarrollo embrionario del pez <i>Danio rerio</i> . ....	40
<b>Figura 14</b> Incidencia de efectos observados durante el desarrollo embrional del pez <i>Danio rerio</i> , asociados con la exposición a sertralina. ....	42
<b>Figura 15</b> Indicadores de efecto asociados a la Sertralina, en el desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> . Se incluyen imágenes de concentraciones seleccionadas las cuales ejemplifican mejor los efectos observados.....	42
<b>Figura 16</b> Incidencia de mortalidad embrionaria <i>Danio rerio</i> (coagulación) en controles negativos.....	43
<b>Figura 17</b> Incidencia de efectos observados durante el desarrollo embrional del pez <i>Danio rerio</i> , asociados a la exposición de fluoxetina.....	44
<b>Figura 18</b> Indicadores de efecto asociados a la Fluoxetina, en el desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> . ....	45
<b>Figura 19</b> Procesos de tratamiento para la remoción de fluoxetina.....	46

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Incidencia de compuestos farmacéuticos en el mundo.....	4
<b>Tabla 2</b> Relación de valores antecedentes de toxicidad aguda para ISRS en diversas especies modelo. ....	6
<b>Tabla 3</b> Incidencia de Sertralina en el ambiente.....	11
<b>Tabla 4</b> Incidencia de Fluoxetina en el ambiente .....	12
<b>Tabla 5</b> Propiedades fisicoquímicas de los ISRS. Análisis comparativo con otros fármacos y compuestos orgánicos persistentes (COPs). ....	14
<b>Tabla 6</b> Métodos empleados para la remoción de fluoxetina, sertralina. ....	16
<b>Tabla 7</b> Resultados de las pruebas de toxicidad aguda de los ISRS ( $\text{mg L}^{-1}$ ) .....	28
<b>Tabla 8.</b> Modificación de la $\text{CE}_{50}$ para <i>Vibrio fischeri</i> en mezcla de ISRS y bajo un escenario de exposición prolongada.....	29
<b>Tabla 9</b> Concentración de Inhibición Poblacional media ( $\text{CI}_{50-72\text{h}}$ ) de fluoxetina y sertralina en <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . ( $\text{mg L}^{-1}$ ).....	32
<b>Tabla 10</b> Concentraciones Letal 50 ( $\text{CL}_{50}$ ) para <i>Daphnia magna</i> por exposición a ISRS ( $\text{mg L}^{-1}$ ). .....	34
<b>Tabla 11</b> Concentración Letal 50 ( $\text{CL}_{50}$ ) para <i>Danio rerio</i> por exposición a ISRS ( $\text{mg L}^{-1}$ ).....	34
<b>Tabla 12</b> Indicadores de seguimiento <i>Daphnia magna</i> , edad de madurez sexual (d), número de partos por daphnia en 21d, producción total de neonatos 21d y talla (mm).....	35
<b>Tabla 13</b> Incidencia de alteraciones en el desarrollo embrionario del pez <i>Danio rerio</i> . ....	41



## ABREVIATURAS

CE <sub>50</sub>	Concentración Efectiva Media o 50
CG-CE	Cromatografía de Gases con detectores de Captura de Electrones
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CL <sub>50</sub>	Concentración Letal Media o 50
CI <sub>50</sub>	Concentración Inhibición Media o 50
COP	Compuestos Orgánicos Persistentes
FBA	Factor de Bioacumulación
HPF	Horas post Fertilización
HPLC	High-performance liquid chromatography
IMTA	Instituto Mexicano de Tecnología del Agua
ISO	Organización Internacional de Normalización
ISRS	Inhibidores Selectivos de Recaptura de Serotonina
K <sub>d</sub>	Coeficiente de sorción
K <sub>oc</sub>	Coeficiente de adsorción ajustado a la fracción de materia orgánica
K <sub>ow</sub>	Coeficiente de partición octanol-agua
NMX	Norma Mexicana
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
POA	Procesos de Oxidación Avanzada
PTAR	Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
UV	Luz Ultravioleta

## RESUMEN

La creciente incidencia de productos farmacéuticos en el medio acuático ha generado un gran interés en la comunidad científica internacional. Los inhibidores selectivos de recaptura de serotonina (ISRS) son fármacos de alto consumo para el tratamiento de diversos trastornos psiquiátricos. Se han detectado ISRS, tales como sertralina y fluoxetina en sistemas acuáticos a concentraciones subtraza ( $\text{ng}$  o  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sin embargo, no hay información suficiente de sus efectos en procesos biológicos esenciales tales como: desarrollo, reproducción y crecimiento, o letalidad en los organismos expuestos. Por lo tanto, es importante generar evidencia técnica sobre su peligrosidad a través del uso de diversos indicadores de efecto. Para ello se realizaron pruebas de exposición con cuatro especies modelo de diferentes niveles de organización biológica y se determinaron sus efectos letales y subletales. Para el primer caso se emplearon los métodos descritos en las normas mexicanas NMX-AA-112-SCFI-1995, para la bacteria *Vibrio fischeri* y NMX-AA-087-SCFI-2010 para el cladóceros *Daphnia magna*, así mismo se tomaron como referencia otros métodos como el propuesto por Blaise *et al.*, 2000, para el desarrollo de la prueba de inhibición con el microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* y las pautas establecidas en el procedimiento de la OECD 203 (1992) para la prueba de letalidad del pez *Danio rerio*.

Con respecto a las pruebas de cronicidad, éstas se realizaron con base a los procedimientos de la OECD 236 (2013) y OECD 211 (2008), para el ensayo de alteración del desarrollo embrionario de *Danio rerio* y del ciclo reproductivo de *Daphnia magna*, respectivamente, modificados para la búsqueda de nuevos indicadores de efecto.

Los resultados de toxicidad aguda mostraron que la sertralina es de 4 a 30 veces más tóxica que la fluoxetina. En el caso de *Vibrio fischeri* la  $\text{CE}_{50-5\text{min}}$  fue de 8.95 y 297.76  $\text{mg L}^{-1}$ , la  $\text{CL}_{50-48\text{h}}$  para *Daphnia magna* fue 4.65 y 20.65  $\text{mg L}^{-1}$  y de 0.613 y 4.258  $\text{mg L}^{-1}$  para *Danio rerio* para sertralina y fluoxetina, respectivamente. En el caso del microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, las  $\text{CI}_{50-72\text{h}}$  obtenidas fueron similares para ambos compuestos con 0.03  $\text{mg L}^{-1}$  para sertralina y 0.026  $\text{mg L}^{-1}$  para fluoxetina. Las concentraciones antes mencionadas indican que para generar efectos agudos sobre las especies modelo de estudio se requieren valores del orden de  $\text{mg L}^{-1}$ , los cuales son 2 órdenes de magnitud superiores a los valores máximos registrados en los cuerpos de agua (0.00054 y 0.0001  $\text{mg L}^{-1}$  para fluoxetina y sertralina, respectivamente), por lo que es poco factible que estas sustancias puedan generar efectos agudos en especies acuáticas.

Sin embargo, los resultados derivados de las pruebas de cronicidad, demostraron que estas sustancias pueden producir efectos sobre el desarrollo y reproducción de peces y cladóceros a partir de la concentración más baja del ámbito de concentraciones estudiadas de 0.05 a 2000  $\mu\text{g L}^{-1}$  (0.00005 a 2  $\text{mg L}^{-1}$ ).

En el análisis del desarrollo embrionario del pez cebrá (*Danio rerio*) se observaron alteraciones morfológicas diversas. Para la sertralina, la de mayor incidencia fue la coagulación de los huevos (141/630 org.), lo cual evidencia su alto potencial de letalidad. A su vez con una menor proporción, se observó daño cardíaco definido como edema pericárdico (108/630 org.).

En relación a la fluoxetina, el edema pericárdico fue el rasgo más sobresaliente (134/630 org.), dicha alteración demostró el alto potencial cardiotoxico de este compuesto. A su vez, se observaron otras alteraciones relevantes tales como el retraso en la eclosión de los embriones (94/630 org.) y el cuerpo truncado o acortado (41/630 org.), la incidencia de este tipo de afectaciones sugieren su alto potencial teratogénico. Al igual que la sertralina, la fluoxetina produjo la coagulación de los huevos, sin embargo, su incidencia fue menor (64/630 org.).

La escoliosis dorso-ventral o lateral de la columna vertebral de los embriones expuestos fue un rasgo que se presentó en ambos compuestos, sin embargo, su incidencia fue reducida, 11/630 org. Para sertralina y 14/630 org. para fluoxetina.

En lo que respecta a *Daphnia magna*, es de llamar la atención el incremento del número de neonatos a concentraciones  $\geq 750 \mu\text{g L}^{-1}$  de fluoxetina, el cual fue de por lo menos 18% y hasta 40% mayor a los valores observados en los controles (38 a 40.56 neonatos), lo que demuestra que la fluoxetina es capaz de aumentar significativamente ( $p=0.05$ ) la tasa reproductiva de *Daphnia magna*. A su vez, también se observó un aumento de talla en los organismos expuestos a concentraciones de fluoxetina  $\geq 1000 \mu\text{g/L}$ , la cual paso de 3.68 a 3.88 mm, ambos indicadores no mostraron diferencias significativas para la sertralina. En el caso de la madurez sexual, ésta se presentó a los 10 días para los organismos expuestos a sertralina, en especial en las concentraciones más bajas (0.05, 0.1 y  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ), dicha condición es significativamente distinta ( $p=0.05$ ) a la respuesta obtenida en los distintos controles (9 días).

Por otro lado, resulta importante destacar el hallazgo de 2 nuevos indicadores de daño para *Daphnia magna* que se asocian a la exposición de fluoxetina y sertralina: el efecto abortivo y la evolución asincrónica del desarrollo embrionario de los huevos, alteraciones que fueron observadas en todas las concentraciones probadas dentro del ámbito de 0.05 a  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Las pruebas de cronicidad efectuadas en el presente estudio evidenciaron alteraciones en el desarrollo y reproducción de las especies de prueba a partir de las concentraciones más bajas y que corresponden a los valores detectados en ambientes acuáticos, derivado de ello se sugiere que los niveles ambientales reportados de fluoxetina y sertralina pueden afectar procesos biológicos esenciales de organismos no blanco, por ello es recomendable generar mayor evidencia científica relacionada a sus efectos en la biota que sustente su clasificación como contaminantes peligrosos y de riesgo para el ambiente.

Las evidencias obtenidas a partir de la evaluación de los efectos adversos de los inhibidores selectivos de recaptura de serotonina, fluoxetina y sertralina, realizados mediante pruebas de exposición aguda y crónica en organismos de diferentes niveles de organización biológica, demuestran la capacidad de éstas sustancias de producir alteraciones en el desarrollo, reproducción y sobrevivencia de las especies de prueba a concentraciones de exposición similares a las reportadas hasta el momento y que inciden en el ambiente acuático, en aguas residuales y en efluentes de PTAR, incluso de procesos experimentales con altos porcentajes de remoción ( $>90\%$ ), ya que al menos en el 70% de los casos las concentraciones residuales fueron mayores a  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ , valor a partir del cual se verificaron efectos crónicos.

Lo anterior sugiere que deben intensificarse las investigaciones toxicológicas y de riesgo ambiental sobre esta clase de contaminantes a fin de que se logre mayor evidencia sobre su peligrosidad y en su caso se desarrollen estrategias adecuadas para su saneamiento y control,

tomando en cuenta valores de concentración que resulten inocuos en exposiciones crónicas para las especies modelo, como criterio meta en el diseño de procesos de tratamiento.

Por otro lado, la búsqueda de nuevos indicadores de efecto y el empleo de pruebas de exposición crónica son acciones fundamentales en la estimación del peligro asociado a la presencia de contaminantes emergentes, en especial de compuestos farmacéuticos como los ISRS, ya que los indicadores de daño considerados en los métodos de referencia para evaluación toxicológica no logran generar evidencia sobre el riesgo ambiental de esta clase de compuestos para los organismos acuáticos.

# 1.- INTRODUCCIÓN

Desde inicios del presente siglo, diversos estudios provenientes de países como Alemania, Francia, Inglaterra, España, Noruega, Australia, China, Estados Unidos, Canadá y México han reportado la presencia de compuestos farmacéuticos en aguas y lodos residuales, aguas superficiales y efluentes hospitalarios en concentraciones de  $\text{ng L}^{-1}$ . Este tipo de estudios han ido en aumento generando vasta evidencia sobre su relevancia e implicaciones ambientales de contaminación al medio acuático (Tabla 1).

**Tabla 1** Incidencia de compuestos farmacéuticos en el mundo.

País	Fármacos detectados	Fuente	Referencia
Alemania	Sulfapiridina, sulfametoxazol, trimetoprima, azitromicina, claritromicina, roxitromicina, <b>fluoxetina</b> y <b>sertralina</b> .	Influentes, efluentes y lodos de PTAR	Gobel, <i>et al.</i> , 2005; Schlsener, <i>et al.</i> , 2015
Estados Unidos	Carbamazepina, difenhidramina, <b>fluoxetina</b> , cafeína, carbamazepina, clortetraciclina, cimetidina, <b>sertralina</b> , ciprofloxacina, claritromicina, clindamicina, ácido clofíbrico, nicotina (cotinina), diclofenaco, diltiazem, gemfibrozil, ácido salicílico, sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfametiazol, sulfametoxazol, sulfatiazol, sulfisoxazol y tetraciclina.	Influentes, efluentes, lodos de PTAR y agua superficial	Kinney, <i>et al.</i> , 2006; Batt, <i>et al.</i> , 2008; Spongberg y Witter, 2008; Schultz, <i>et al.</i> , 2010; Writer, <i>et al.</i> , 2013; Subedi y Kannan, 2015.
China	Estrona, 17a-estradiol, 17b-estradiol, estriol, 17a-etinilestradiol, mestranol, ácido salicílico, ácido clofíbrico, ibuprofeno, naproxeno, gemfibrozil, y 5b-coprostanol.	Agua superficial	Peng, <i>et al.</i> , 2008
Francia	Ornidazol, sulfametoxazol, sulfametacina, ácidos pipemídico, fluoxetina, oxolínico, carbamazepina, nalidíxico, norfloxacino, ofloxacino, ciprofloxacina y flumequina.	Agua superficial	Tamtam, <i>et al.</i> , 2008; Leclercq, <i>et al.</i> , 2009; González- Rey, <i>et al.</i> , 2015
Corea	Paracetamol, iopromida, naproxeno, ibuprofeno, <b>fluoxetina</b> , carbamazepina y cafeína.	Agua superficial y efluentes de PTAR	Sang, <i>et al.</i> , 2007; Kim, <i>et al.</i> , 2007
Inglaterra	Ibuprofeno, paracetamol, salbutamol, ácido mefenámico y <b>fluoxetina</b> .	Agua superficial, influentes y efluentes de PTAR	Bound, <i>et al.</i> , 2006; Baker y Kasprzyk-Hordern, 2013; Evans, <i>et al.</i> , 2015; Petrie, <i>et al.</i> , 2015.
Canadá	Ácido salicílico, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, diclofenaco, indometacina, <b>fluoxetina</b> , <b>sertralina</b> , fenoprofeno, ácido clofíbrico, estradiol, estrona.	Agua superficial, influentes y efluentes de PTAR.	Lishman, <i>et al.</i> , 2006; MacLeod y Sudhir, 2007; Lajeunesse, <i>et al.</i> , 2008; Metcalfe, <i>et al.</i> , 2010; Lajeunesse, <i>et al.</i> , 2012.
España	Metronidazol, ranitidina, codeína, trimetoprima, atenolol, eritromicina, <b>paroxetina</b> , propranolol, carbamazepina, <b>fluoxetina</b> , <b>sertralina</b> , ketorolaco, paracetamol, ibuprofeno, Diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, carbamazepina, cafeína, diclofenaco, ácido mefenámico, indometacina.	Agua superficial, influentes y efluentes de PTAR, efluentes hospitalario	Gómez, <i>et al.</i> , 2006; Santos, <i>et al.</i> , 2007; Fernández, <i>et al.</i> , 2009; Gross, <i>et al.</i> , 2009; Huerta, <i>et al.</i> , 2011,
Noruega	Paracetamol, metoprolol, diclofenaco, ibuprofeno, 17bestradiol, <b>fluoxetina</b> , <b>sertralina</b> , estriol, estrona, trimetoprima, ciprofloxacina, sulfametoxazol, tetraciclina.	Influentes y efluentes de PTAR, Efluentes hospitalarios.	Vasskog, <i>et al.</i> , 2006; Thomas, <i>et al.</i> , 2007; Vasskog, <i>et al.</i> , 2008.
Australia	Paracetamol, carbamazepina, ácido clofíbrico, diclofenaco, gemfibrozil, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, primidona, fenitoína y ácido salicílico.	Influentes y efluentes de PTAR	Al-Rifai, <i>et al.</i> , 2007
México	Tetraciclina, <b>fluoxetina</b> , <b>sertralina</b> , naproxeno, triclosan, paracetamol, carbamazepina, cafeína, trimetoprim, cocaína, diazepam, mestranol y estronas.	Influentes y efluentes de PTAR	Estrada, <i>et al.</i> , 2016

Dentro de los fármacos enlistados en la Tabla 1, se encuentra la fluoxetina, sertralina y paroxetina, antidepresivos pertenecientes a la familia de Inhibidores Selectivos de Recaptura de Serotonina o ISRS, compuestos cuya incidencia en el ambiente ha sido mayor debido a su creciente consumo (Christensen, *et al.*, 2007; Gu, *et al.*, 2010; Lam, *et al.*, 2013), al aporte continuo de sus residuos y a los diversos usos terapéuticos para los que son destinados, tales como trastornos depresivos, obsesivo-compulsivos, de ansiedad y para el tratamiento de desórdenes alimenticios, fobias sociales y de tensión premenstrual (Otero, *et al.*, 1996; Chávez *et al.*, 2008; Kosjek y Heath, 2010; Oakes, *et al.*, 2010).

La principal fuente de aporte de ISRS al medio acuático son las excretas humanas, las cuales se conducen por medio de los efluentes de las plantas de tratamiento, debido a que éstas últimas no están diseñadas para remover de manera eficiente esta clase de compuestos, por lo que una vez liberados al medio ambiente son encausados a los cuerpos de agua, donde entran en contacto y quedan disponibles para su asimilación por los organismos que los habitan. Como fuentes adicionales y de menor relevancia, se encuentra el vertido directo de medicamentos caducos a las corrientes por disposición clandestina y su arrastre por escorrentías.

Los efectos por la presencia de ISRS en el ambiente acuático ya han sido explorados por algunos autores, cuyos objetivos se han enfocado a documentar principalmente su potencial de toxicidad aguda por medio de la determinación de su letalidad ( $CL_{50}$ ), inhibición ( $CI_{50}$ ) u otros efectos agudos ( $CE_{50}$ ) en organismos modelo (Tabla 2), valores que por lo general resultan del orden de  $mg L^{-1}$ , mismos que son superiores a las concentraciones ambientales detectadas ( $ng$  o  $\mu g L^{-1}$ ), a las cuales no se producen efectos agudos. Sin embargo, teniendo en cuenta que la liberación de ISRS al ambiente ocurre de manera continua y por periodos de exposición prolongados, se puede considerar que su riesgo de afectación es de naturaleza crónica, condición que puede comprometer procesos biológicos esenciales asociados a la reproducción, desarrollo y crecimiento de la biota por medio de alteraciones a nivel de órganos, tejidos, células o biomoléculas afines a los receptores objetivo de los ISRS. Las afectaciones pueden tener como forma de expresión cambios fisiológicos y/o en patrones de comportamiento, inhibición o estimulación del crecimiento y malformaciones embrionarias (Perreault, *et al.*, 2003; Foran, *et al.*, 2004; Brooks, *et al.*, 2005; Nentwig, 2007; Hansen, *et al.*, 2008; Péry, *et al.*, 2008; Morando *et al.*, 2009; Bringolf, *et al.*, 2010; Pica *et al.*, 2012; Hedgespeth, *et al.*, 2014).

**Tabla 2** Relación de valores antecedentes de toxicidad aguda para ISRS en diversas especies modelo.

Organismo de prueba	Valores antecedentes (mgL <sup>-1</sup> )	
	Fluoxetina	Sertralina
<i>Vibrio fischeri</i> (CE <sub>50-5 min</sub> )	-	9.20 <sup>d</sup>
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (CI <sub>50- 72h</sub> )	0.039 <sup>a</sup> 0.024 <sup>a</sup> 0.027 <sup>d</sup>	0.043 <sup>c</sup> 0.14 <sup>d</sup>
<i>Daphnia magna</i> (CL <sub>50-48h</sub> )	5.91 <sup>b</sup> 6.40 <sup>c</sup> 0.82 <sup>a</sup>	1.15 <sup>b</sup> 0.92 <sup>c</sup> 1.30 <sup>d</sup>

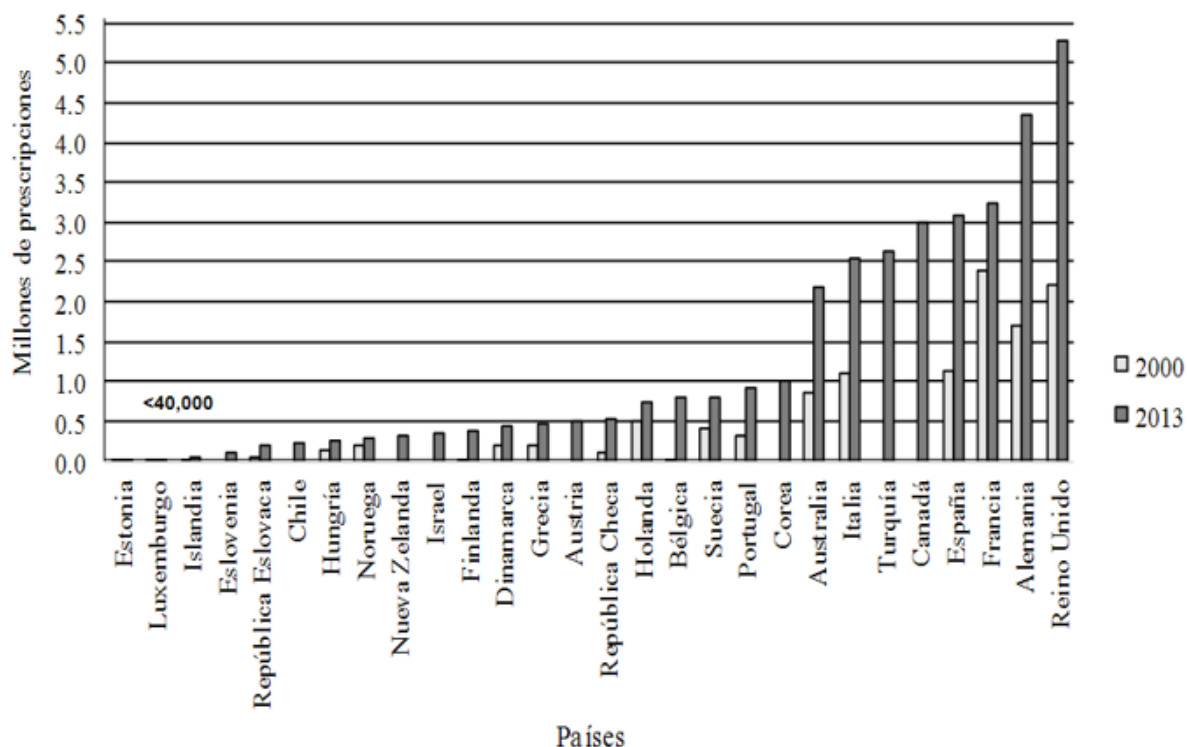
<sup>a</sup> Brooks, *et al.*, 2003, <sup>b</sup> Mínguez, *et al.*, 2014, <sup>c</sup> Christensen, *et al.*, 2007, <sup>d</sup> Minagh, *et al.*, 2009.

Como se puede observar en la Tabla 2, el estudio de los efectos agudos de los ISRS en organismos modelo ha sido de interés para algunos autores. Sin embargo, la información técnica relacionada a las pruebas de exposición crónica es relativamente escasa (Brooks, *et al.*, 2003; Henry, *et al.*, 2004; Schultz, *et al.*, 2011; Campos, *et al.*, 2012; Barry, 2013; Luna, *et al.*, 2015; Panlilio, *et al.*, 2016), por lo que es necesario profundizar en este tema, en especial porque siendo el mecanismo de acción de los ISRS la regulación del contenido de serotonina (5-HT) en la sinapsis nerviosa del cerebro humano, otros organismos también se pueden verse afectados, ya que tanto la serotonina (5-HT) como los receptores asociados a su funcionamiento se encuentran presentes en otros vertebrados e invertebrados, en los que interviene en procesos de reproducción, desarrollo, crecimiento, regulación del comportamiento y vigilia (Fong, 1998; Foran, *et al.*, 2004; Menningen, *et al.*, 2011; Barry, 2013). Por todo lo anterior, la evaluación de riesgos asociados a exposición de organismos acuáticos no blanco a fármacos tales como ISRS, a bajas dosis y por periodos de exposición prolongados, ya ha sido reconocida como una necesidad de investigación en materia ambiental (Fent, *et al.*, 2006).

### 1.1 Consumo de los antidepresivos.

De acuerdo con datos obtenidos de la OECD (2015), el uso de los antidepresivos se triplicó en el periodo de 2000 a 2013, evidenciado a través del incremento en el número de prescripciones médicas que pasaron de 11 676 760 a 34 727 219 diarias (Figura 1). Cabe hacer notar que estas estadísticas sólo incluyeron a 28 países cuya densidad poblacional es reducida y reúne a un total de 644 328 000 habs. Si bien el valor de consumo de antidepresivos presentado es ya elevado, el consumo real a nivel mundial puede ser superior en hasta 10 veces, sí se toma en consideración el total de la población mundial para el mismo año, la cual fue de 7 175 000 000 habs. (Banco Mundial Data Bank).

## Consumo diario de antidepresivos



**Figura 1** Prescripciones médicas diarias de antidepresivos en 28 países pertenecientes a la OECD. Cálculo efectuado con base en los base de datos OECD Health Statistics (2015) (<http://dx.doi.org/10.1787/health-data-en>) y Banco Mundial (<http://datos.bancomundial.org>)

Es importante evidenciar que, México no fue incluido dentro de las estadísticas antes presentadas, por lo que no se tiene precisado el consumo promedio para estos antidepresivos. Sin embargo, considerando que para el año 2013 su población fue de 123 700 000 hab. (Banco Mundial Data Bank), y con base a los valores mínimo y máximo de las prescripciones reportadas en los 28 países (Figura 1), es posible estimar que el número de prescripciones en México podría encontrarse entre las 28 205 y 5 267 200 de prescripciones diarias.

### 1.2 Consumo de Inhibidores Selectivos de Recaptura de Serotonina (ISRS).

Los antidepresivos de segunda generación o Inhibidores Selectivos de Recaptura de Serotonina (ISRS), tales como fluoxetina, citalopram, paroxetina, sertralina y fluvoxamina, comercializados bajo los nombres de Prozac®, Seropram®, Cronadyn®, Altruline® y Luvox®, respectivamente, se han convertido en psicofármacos de primera elección a nivel mundial, desplazando así a los antidepresivos tricíclicos, debido principalmente a su rápida y efectiva forma de acción en la atención de la depresión y otros padecimientos psiquiátricos enunciados en párrafos anteriores, en gran medida porque tienen como ventaja un menor grado de cardiotoxicidad y producen menores efectos de somnolencia, beneficios que superan a los efectos secundarios temporales (Otero, *et al.*, 1996; Chávez, *et al.*, 2008;). Estas cualidades terapéuticas han fomentado su uso durante los últimos años, de tal forma que el número de prescripciones reportadas a partir del 2005 muestran tendencias de importantes incrementos en su consumo, como es el caso de Canadá, país en el que



se registró un incremento de hasta un 39% en prescripciones médicas realizadas por pediatras para el tratamiento de trastornos depresivos en el periodo 2005 – 2009, siendo la fluoxetina el fármaco de mayor demanda en el mercado (Lam, *et al.*, 2013).

De acuerdo a la última encuesta requerida por la Comisión Europea y realizada por la Dirección General de Salud y Consumidores, efectuada en el año 2010, el país que registro el mayor consumo de ISRS dentro de los países pertenecientes a la Unión Europea fue Portugal, con por lo menos dos veces más en número de prescripciones (15%) que las reportadas para Estados Unidos (7%) (Eurobarometer, 2010). En este último país, el mayor número de prescripciones de fármacos lo ocuparon los ISRS suministrados a adultos de edades de entre 20 a 59 años, así mismo, estos antidepresivos ocuparon el tercer lugar en recetas médicas para el tratamiento de adolescentes de entre 12 a 18 años (Gu, *et al.*, 2010). Para ese mismo año, la fluoxetina y sertralina fueron incluidas dentro de la lista de los 100 fármacos más prescritos en Inglaterra, ocupando las posiciones 83 y 84, respectivamente. Tendencias similares se reportaron para Eslovenia, país con alzas de hasta 15% en prescripciones anuales de ISRS. Mientras que, el citalopram y la sertralina fueron los antidepresivos más prescritos en Dinamarca, Noruega y Finlandia (Christensen, *et al.*, 2007).

En lo que respecta a México no se cuenta con bancos de información que permitan estimar el consumo de ISRS. Sin embargo, es posible que la tendencia sea similar o superior a lo reportado para otros países, tomando en cuenta su bajo costo, fácil adquisición en presentación genérica sin receta médica y sus múltiples usos terapéuticos, incluyendo últimamente su uso para la pérdida de peso.

Actualmente, se encuentran disponibles en México todos los ISRS, cuyos mecanismo de acción aun cuando resultan similares, tienen perfiles diferentes en base a su actividad clínica, efectos secundarios e interacciones farmacológicas particulares (Christensen, *et al.*, 2007; Chávez *et al.*, 2008). Estos fármacos han sido debidamente aprobados para su ingesta por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos y cuentan con los siguientes registros sanitarios ante la Comisión de Autorización Sanitaria de México; Fluoxetina (SSA 231M96), Sertralina (SSA 276M2008), Paroxetina (SSA 204M2009), Citalopram (SSA 181M2012) y Fluvoxamina (SSA 297M95).

### *1.3 Farmacocinética de ISRS*

Los ISRS por lo general tienen una buena absorción oral (60 – 80%), aunque lenta, la cual se logra entre las 4 y 8 horas posteriores a su ingesta. Su vida media en el cuerpo humano es de 12 a 24 horas (p.ej. paroxetina, 20 horas) y es superior a la de otros antidepresivos, siendo aún mayor en fluoxetina (24 -72 horas). Un residual de la dosis del fármaco que no fue absorbido es eliminado sin sufrir cambios a través de la orina (5-15 %) y las heces fecales (12-15%), el porcentaje restante corresponde a los metabolitos biotransformados en el hígado tanto aquellos cuya actividad farmacológica es similar al compuesto parental, como la norfluoxetina (para la fluoxetina) o aquellos biológicamente inactivos como la desmetilsertralina (para la sertralina), y otros metabolitos glucuroninados o convertidos en alcoholes y oximas no activos, que se producen en pequeñas proporciones (Ahlford, 2008).

#### 1.4 Mecanismos de acción de los ISRS

Como se ha señalado anteriormente, los ISRS son fármacos que permiten el restablecimiento neuroquímico de pacientes con enfermedades psiquiátricas asociadas a la reducción de los niveles de serotonina en el espacio sináptico, a lo que se conoce comúnmente como depresión.

En condiciones normales el sitio presináptico, libera al neurotransmisor serotonina al espacio sináptico mediante bombas denominadas TSER (transportadoras de serotonina), este neurotransmisor es recaptado por los receptores postsinápticos (5HT) para la transferencia de estímulos eléctricos, pero por lo general un excedente de serotonina queda sin uso en el espacio sináptico, la cual es degradada por enzimas específicas, o en mayor medida, recapturada por los receptores 5HT1A de la neurona presináptica, en un ciclo continuo.

Cuando se suministran ISRS se bloquean los receptores 5HT1A del sitio presináptico, de modo que el exceso de serotonina vertida por las bombas TSER al espacio sináptico y que no fue utilizada por los receptores 5HT (postsinápticos) no puede ser captada nuevamente, lo anterior produce una importante acumulación de serotonina en el espacio sináptico, situación que sucede simultáneamente en todas las áreas cerebrales donde existan neuronas con receptores 5HT1A, produciéndose temporalmente los indeseables efectos secundarios (vértigo, sensibilidad a la luz, calambres, náuseas, sudor excesivo, dolor de cabeza e irritabilidad) (Bostrom, *et al.*, 2016).

Una vez que los receptores presinápticos 5HT1A llevan bastante tiempo bloqueados, se genera información que es llevada al núcleo de la neurona y ésta como reacción genómica los interpreta como innecesarios, como resultado los reduce en número e incluso los desaparece, a este proceso se le denomina desensibilización.

Como la cantidad de receptores 5HT1A es menor y por ende, existe una menor cantidad de serotonina disponible dentro de la célula, la neurona no logra la recaptura de serotonina suficiente para ser reincorporada al interior de la célula, por lo que ésta comienza a producirla en mayor cantidad, situación que con el paso del tiempo bloquea a otros tipos de receptores (2A, 2C y 3) en el sitio postsináptico. De esta manera es regulada la producción, uso y disponibilidad de serotonina en los espacios sinápticos (Stahl, 2010).

Hasta hace algunos años, se creía que los ISRS podían ser suministrados de forma amplia en la población, con muy pocas restricciones de uso, incluso eran prescritos a mujeres embarazadas, niños y adolescentes. Sin embargo, en el año 2004 la Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA) y la Food and Drug Administration (FDA) alertaron sobre su consumo en estos dos últimos grupos de la población en los países de su competencia, dada la poca eficiencia obtenida para los tratamientos de interés. Así mismo, Reefhuis y colaboradores (2015) documentaron que la US National Birth Defects Prevention Study (NBDPS) generó evidencia (sujeta a verificación) sobre los efectos que producen los ISRS en procesos biológicos durante etapas de gestación del neonato, distintos a los relacionados con su mecanismo de acción, centralizados principalmente en el funcionamiento del sistema nervioso central.

Los datos obtenidos por la NBDPS indicaron posibles malformaciones congénitas específicas por la ingesta de ISRS durante el embarazo, cuyo proceso de afectación aún no está adecuadamente documentado. La sertralina se asoció al desarrollo de onfalocelo, defectos del septum cardíaco y anencefalia. A su vez, la fluoxetina se relacionó con craneosinostosis y defectos cardíacos del

neonato. Mientras que, un tercer serotoninérgico, la paroxetina con deterioros cardíacos, en el tubo neural y también con onfalocele y anencefalia. Así mismo, se evidenció un incremento en la tasa abortiva espontánea en hasta 1.45 veces, partos prematuros, bajo peso, problemas respiratorios y convulsiones en el neonato. Su uso durante el tercer trimestre de gestación puede ocasionar una hipertensión pulmonar persistente que, aunque es rara, se asocia con una tasa de mortalidad de 10– 20 %.

### 1.5 Afectaciones de ISRS sobre organismos no blanco

Con base en lo anterior, los ISRS son fármacos capaces de causar efectos negativos sobre procesos biológicos diversos, aun cuando éstos en apariencia no estén asociados a su forma de acción en el cuerpo humano. La alteración de los procesos metabólicos en especies acuáticas no blanco es posible (Brooks, *et al.*, 2003; Boxxal, *et al.*, 2003; Flaherty y Dodson, 2005; Neuwoehner, *et al.*, 2009; Lam, *et al.*, 2013; Weinberger, *et al.*, 2014) debido a que la serotonina (5-HT) es uno de los neurotransmisores más importantes dentro del reino animal (Barry, 2013), modulador directo de algunas funciones celulares (Mossner y Lesch, 1998; Kreke y Dietrich, 2008) y esencial en diversos procesos metabólicos de vertebrados e invertebrados (Fong, 1998; Foran, *et al.*, 2004), regula el comportamiento, agresión, deseo sexual y es fundamental en el apetito y vigilia en vertebrados (Mennigen, *et al.*, 2011). Este neurotransmisor es producido en el sistema nervioso central (Styrishhave, *et al.*, 2010), su mecanismo de acción es aún incierto en algunas especies. No obstante, se postula que su modo de acción en peces es por medio de la alteración de los niveles de serotonina endógena, la cual interviene de manera directa en el proceso reproductivo por la afectación de hormonas relacionadas al comportamiento sexual (Yu, *et al.*, 1991; Khan y Thomas, 1992; Mennigen, *et al.*, 2011).

Por lo anterior, la variación de los niveles de serotonina en especies con receptores afines a la serotonina puede influir directamente sobre los procesos fisiológicos de las especies expuestas, incluidos aquellos derivados de la reproducción, desarrollo, comportamiento y sistema inmune (Park, *et al.*, 2012). Tanto fluoxetina como su metabolito (norfluoxetina) son los serotoninérgicos más investigados en relación a sus afectaciones sobre organismos no blanco (Brooks, *et al.*, 2003; Flaherty y Dodson, 2005; Kwon y Armburst, 2006; Gaworecki, y Klaine, 2008; Hansen, *et al.*, 2008; Morando, *et al.*, 2009; Bringolf, *et al.*, 2010; McDonald, *et al.*, 2011; Mennigen, *et al.*, 2011). Ante esto, existe evidencia científica que documenta respuestas de algunos organismos acuáticos con receptores afines a este neurotransmisor como es el caso de crustáceos y peces (Brooks *et al.*, 2005; Campos, *et al.*, 2012). En el primero de ellos, *Ceriodaphnia dubia*, presentó variaciones en su tasa reproductiva promedio por exposición a fluoxetina, al disminuir el número total de neonatos por hembra a partir de concentraciones de 0.045 mg L<sup>-1</sup>. Este mismo fármaco, incremento la producción neonatal de *Daphnia magna* a concentraciones de 36 µg L<sup>-1</sup>. Sin embargo, este aumento se vio afectado a concentraciones más altas (Flaherty y Dodson, 2005). Un caso particular, se pudo observar en el desarrollo reproductivo del pez *Danio rerio*, el cual manifestó una menor producción de huevos a 0.32 µg L<sup>-1</sup> (Lister, *et al.*, 2009). Por otro lado, para el pez *Oryzias latipes* (pez medaka) Brooks y colaboradores (2003) documentaron la formación de malformaciones embrionarias tales como: afectaciones cardíacas (edema pericárdico), escoliosis e inconcluso desarrollo corporal.

Otras investigaciones denotan efectos como nado descoordinado, letargo, falta de respuesta a estímulos, cambios en patrones de agresividad e interacción con otros individuos en las especies de vertebrados e invertebrados expuestos a ISRS a concentraciones del orden de mg L<sup>-1</sup> (Fong, 1998; Henry, *et al.*, 2004; Barry, 2013).

### 1.6 Incidencia de ISRS en el ambiente

Desde años atrás se han adaptado y desarrollado tecnologías analíticas útiles en la cuantificación de ISRS en muestras biológicas y en el plasma humano (Brunswick, *et al.*, 2002; Magalhaes, *et al.*, 2007; Rahman, 2012; Yuce, *et al.*, 2015), basados en técnicas de cromatografía de gases con detectores de captura de electrones (CG-CE) y de espectrometría de masas (CG-EM), a partir de las cuales se han derivado métodos de análisis para la detección de ISRS en las distintas matrices ambientales como agua y sedimentos (Lamas, *et al.*, 2004; Vanderford y Snyder, 2006; Batt, *et al.*, 2008; Martínez-Bueno, *et al.*, 2011; Tarcomnicu, *et al.*, 2011; Evans, *et al.*, 2015).

Derivado de dicha innovación analítica se han obtenido registros de las concentraciones de fluoxetina y sertralina en sus fuentes contaminantes y en el ambiente (Tabla 3 y 4).

**Tabla 3** Incidencia de Sertralina en el ambiente

ISRS	Tipo de muestra	País	Concentración (ng L <sup>-1</sup> )	Referencia
Sertralina	Influyente PTAR (0.77 a 114 ng/L)	Alemania	49.0	Schlsener, <i>et al.</i> , 2015
		Canadá	6.0-6.1	Lajeunesse, <i>et al.</i> , 2008
			14.0-34.0	Metcalf, <i>et al.</i> , 2010
			20.0	Lajeunesse, <i>et al.</i> , 2012
			31.6-114	Subedi y Kannan, 2015
		Noruega	8.4-19.8	Vasskog, <i>et al.</i> , 2008
		México	0.77- 3.11	Estrada, <i>et al.</i> , 2016
		Portugal	100.4	Silva, <i>et al.</i> , 2014
	República Checa	7.0-27	Golovko, <i>et al.</i> , 2014	
	Efluente PTAR (0.4 a 88.3 ng/L)	Alemania	9.0	Schlsener, <i>et al.</i> , 2015
		Canadá	5.1-5.8	Lajeunesse, <i>et al.</i> , 2008
			12.0	Lajeunesse, <i>et al.</i> , 2012
			57.0-87.0	Batt, <i>et al.</i> , 2008
		15.7-88.3	Subedi & Kannan., 2015	
		Noruega	0.4- 2.4	Vasskog, <i>et al.</i> , 2006
		3.7-14.6	Vasskog, <i>et al.</i> , 2008	
	México	5.9- 7.4	Estrada, <i>et al.</i> , 2016	
	República Checa	3.0-6.0	Golovko, <i>et al.</i> , 2014	
	Agua Superficial (0.5 a 49 ng/L)	Canadá	6.0-17.0	Metcalf, <i>et al.</i> , 2010
		España	11.0	Huerta, <i>et al.</i> , 2011
0.5-37.5			Schultz, <i>et al.</i> , 2010	
Estados Unidos		33.0-49.0	Schultz, <i>et al.</i> , 2011	
		Noruega	0.8-2.4	Vasskog, <i>et al.</i> , 2008

**Tabla 4** Incidencia de Fluoxetina en el ambiente

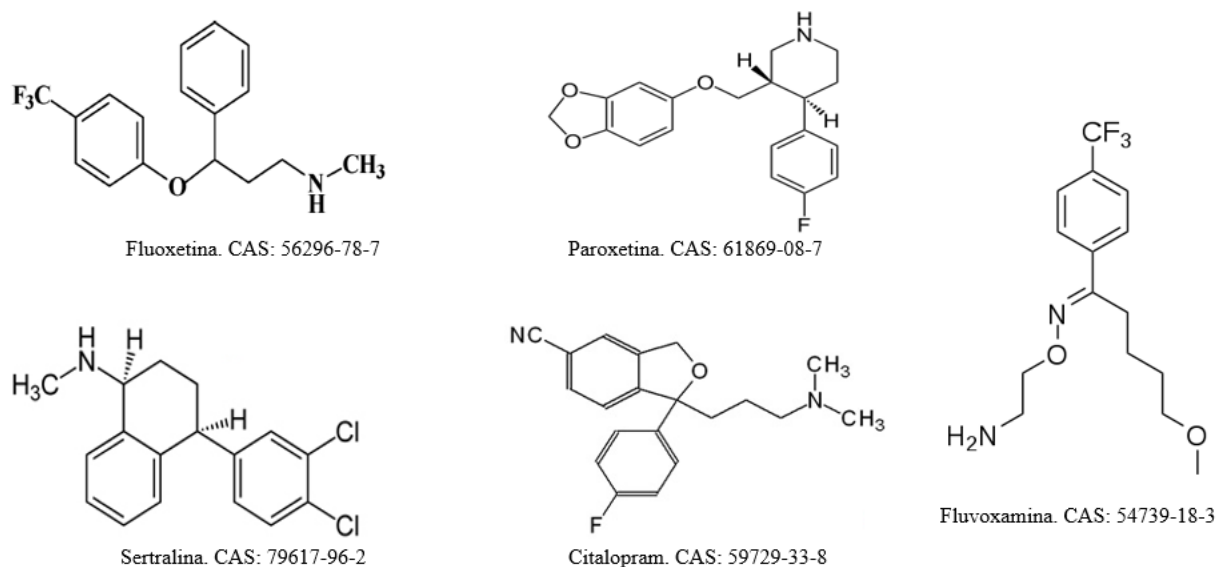
ISRS	Tipo de muestra	País	Concentración (ng L <sup>-1</sup> )	Referencia
Fluoxetina	Influente PTAR (0.4 a 540 ng/L)	Bélgica	8.0-30.0	Tarcomnicu, <i>et al.</i> , 2011
		Canadá	18.0	MacLeod y Sudhir, 2007
			20.0-91.0	
			3.1-3.5	Metcalf, <i>et al.</i> , 2010
			20.0-91.0	
		3.1-3.5	Lajeunesse, <i>et al.</i> , 2012	
		España	26.0	Gross, <i>et al.</i> , 2009
		Inglaterra	86.1	Baker y Kasprzyk-Hordern, 2011
			4.9-175.9	Baker y Kasprzyk-Hordern, 2013
			51.0	Evans, <i>et al.</i> , 2015
		Italia	540.0	Verlicchi, <i>et al.</i> , 2012
		Noruega	0.4-2.4	Vasskog, <i>et al.</i> , 2006
			1.1-18.7	Vasskog, <i>et al.</i> , 2008
	México	2.9-4.41	Estrada, <i>et al.</i> , 2016	
	Portugal	17.0-36.45	Salgado, <i>et al.</i> , 2010	
		105.8-157.4	Silva, <i>et al.</i> , 2014	
	Efluente PTAR (0.6 a 929 ng/L)	Alemania	8.0	Schlsener, <i>et al.</i> , 2015
		Canadá	50.0-99.0	Metcalf, <i>et al.</i> , 2003
			14.0	MacLeod & Sudhir., 2007
			50.0-99.0	Metcalf, <i>et al.</i> , 2003
			11.0	Lajeunesse, <i>et al.</i> , 2012
		Corea del Sur	1.70	Kim, <i>et al.</i> , 2007
		España	19.0-92.90	Bueno, <i>et al.</i> , 2007
			16.0	Gross, <i>et al.</i> , 2009
		Estados Unidos	1.70	Kolpin, <i>et al.</i> , 2002
			40.0-73.0	Batt, <i>et al.</i> , 2008
			11.0-76.0	Writer, <i>et al.</i> , 2013
		Inglaterra	29.3	Baker y Kasprzyk- Hordern, 2011
			5.6-44.9	Baker y Kasprzyk-Hordern, 2013
	26.0		Evans, <i>et al.</i> , 2015	
	Italia	240.0	Verlicchi, <i>et al.</i> , 2012	
	Noruega	0.6-8.4	Vasskog, <i>et al.</i> , 2008	
	México	6.6- 6.93	Estrada, <i>et al.</i> , 2016	
Agua Superficial (0.42 a 141 ng/L)	Canadá	0.42-1.3	Lajeunesse, <i>et al.</i> , 2008	
		4.0-141.0	Metcalf, <i>et al.</i> , 2010	
	España	0.6-66.1	Fernández, <i>et al.</i> , 2010	
		3.0	Gross, <i>et al.</i> , 2009	
		8.0-44.0	González, <i>et al.</i> , 2010	
	Estados Unidos	12.0	Kolpin, <i>et al.</i> , 2002	
		12.0-20.0	Schultz, <i>et al.</i> , 2011	
		0.5-43.2	Schultz, <i>et al.</i> , 2010	
	Francia	1.0-2.0	González- Rey, <i>et al.</i> , 2015	
	Inglaterra	9.0	Baker y Kasprzyk- Hordern, 2011	
5.8-14		Petrie, <i>et al.</i> , 2015		
Polonia	3.2-5.5	Giebultowicz y Jawecki, 2014		

Es importante hacer notar que la mayoría de los países enlistados en las Tablas 3 y 4, son países cuya capacidad tecnológica es elevada, por lo que es de esperarse que la incidencia real de ISRS a nivel mundial sea mayor, aún y en aquellos países que no cuentan con el soporte técnico y económico para evidenciar su presencia en el ambiente.

### 1.7 Propiedades fisicoquímicas y destino ambiental de ISRS

Si bien la detección química de ISRS en fuentes y sistemas acuáticos ha sido bien documentada (Tablas 3 y 4), pocos autores se han enfocado a comprender su comportamiento y transformación durante su estadía en los cuerpos de agua, así como a través del tratamiento de las aguas residuales que los contienen y su destino en las fases ambientales una vez que se liberan a los cuerpos receptores (Lam, *et al.*, 2005; Kosjek y Heath, 2010; Oakes, *et al.*, 2010; Lajeunesse, *et al.*, 2012; Silva, *et al.*, 2012; Carter, *et al.*, 2014; Luo, *et al.*, 2014).

Por ello, las propiedades fisicoquímicas de los ISRS, juegan un papel muy importante para predecir su destino y comportamiento ambiental. Se han efectuado algunos estudios a escala laboratorio para determinar su potencial de degradación, tendencia de acumulación y persistencia en el ambiente (Black, *et al.*, 2005; Kwon y Armbrust, *et al.*, 2006; Redshaw, *et al.*, 2008; Jakimska, *et al.*, 2014).



**Figura 2** Estructura molecular de antidepresivos: ISRS.

Los ISRS son fármacos que aunque su mecanismo de acción es similar, cuentan con estructuras moleculares distintas (Figura 2) y por lo tanto sus propiedades fisicoquímicas también difieren entre sí, influyendo en su dinámica particular dentro de las distintas fases ambientales, de modo que mientras algunos ISRS pueden permanecer más tiempo adsorbidos en los sedimentos, otros pueden ser más afines a lípidos y a acumularse en tejidos de organismos. Así mismo, estas propiedades junto con su estructura molecular determinan la posibilidad de su degradación por procesos físicos, químicos, fisicoquímicos, biológicos, de oxidación o de oxidación avanzada.

Conocer todo lo anterior es de suma importancia tanto para determinar su destino y persistencia en el ambiente, como para elegir las técnicas más apropiadas para su remoción.

**Tabla 5** Propiedades fisicoquímicas de los ISRS. Análisis comparativo con otros fármacos y compuestos orgánicos persistentes (COPs).

No. CAS <sup>a</sup>	Compuesto	Peso Molecular <sup>bf</sup>	Bioacumulación y bioconcentración		Movilidad Ambiental					
			FBC <sup>c,d,e,g,h</sup>	log Kow <sup>b</sup>	log Kd <sup>b</sup>	log Koc <sup>b</sup>	pKa <sup>b</sup>	Solubilidad <sup>bf</sup> mg L <sup>-1</sup>	Presión de vapor <sup>bf</sup> atm m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup>	
COP	309-00-2	Aldrin	364.92	735-20,000	5.17-7.40	N.R.	407.00	8.20	0.02	4.96x10 <sup>-4</sup>
	57-74-9	Clordano	409.78	3,311-11,481	2.78-6.00	370 000	20,000.00	N.R.	56.00	4.80x10 <sup>-5</sup>
	8001-35-2	Toxafeno	413.82	3,100-69,000	3.23-5.50	N.R.	1,500.00	N.R.	550.00	6.30x10 <sup>-2</sup>
	70-44-8	Heptacloro	372.32	200-30,000	4.40-5.50	N.R.	24,000.00	N.R.	180.00	2.30x10 <sup>-3</sup>
	50-29-3	DDT	354.49	600-84,500	4.89-6.91	140 000	100,000.00	N.R.	1.20-5.50	1.29x10 <sup>-5</sup>
FÁRMACOS	29122-68-7	Atenolol	266.34	0.20	0.16	0.05-0.9	1.85-3.20	9.60	13,300.00	1.37x10 <sup>-18</sup>
	66722-44-9	Bisoprolol	325.45	0.20	1.87	0.3-0.8	2.17-2.30	9.60	2,240.00	2.89x10 <sup>-15</sup>
	37350-58-6	Metoprolol	267.36	1.30	1.69	0.2-0.9	2.22-2.24	9.70	4,780.00	1.40x10 <sup>-13</sup>
	318-98-9	Propranolol	257.34	160.00	3.84	0.7-2.2	2.43-4.00	9.40	62.70	7.98x10 <sup>-13</sup>
	3930-20-9	Sotalol	308.83	1.00	0.24	0.1-0.6	1.94-2.15	9.60	137,000.00	2.66x10 <sup>-14</sup>
	85721-33-1	Ciprofloxacino	331.35	3.00	0.28	2.6	4.79	5.90,8.90	30,000.00	5.09x10 <sup>-19</sup>
	79-57-2	Oxitetraciclina	460.44	0.12	0.90	2.6-3.0	4.44-4.97	3.30,9.10	313.00	1.70x10 <sup>-25</sup>
	298-46-4	Carbamazepina	236.28	15.00	2.45	-6.4	2.00-3.42	13.90	17.70	1.08x10 <sup>-10</sup>
	<b>59729-33-8</b>	<b>Citalopram</b>	<b>324.39</b>	<b>&lt; 0.008</b>	<b>3.74</b>	<b>3.9-4.6</b>	<b>5.32-6.02</b>	<b>9.60</b>	<b>31.10</b>	<b>2.6x10<sup>-11</sup></b>
	<b>56296-78-7</b>	<b>Fluoxetina</b>	<b>309.33</b>	<b>8.80-1347.0</b>	<b>4.05</b>	<b>2.9-4.1</b>	<b>4.09-5.49</b>	<b>10.10</b>	<b>60.30</b>	<b>8.90x10<sup>-8</sup></b>
	<b>79617-96-2</b>	<b>Sertralina</b>	<b>306.24</b>	<b>959.00</b>	<b>5.29</b>	<b>2.2-2.9</b>	<b>3.80-4.85</b>	<b>9.50</b>	<b>3.52</b>	<b>5.10x10<sup>-8</sup></b>
	15307-86-5	Diclofenaco	296.16	3.00	4.51	4.7	2.45-3.74	4.20	2.37	4.73x10 <sup>-12</sup>
	15687-27-1	Ibuprofeno	206.29	3.00	3.97	1.7	1.30-2.21	4.90	21.00	1.50x10 <sup>-7</sup>
	22204-53-1	Naproxeno	230.27	3.00	3.18	2.34	N.R.	4.20	15.90	3.39x10 <sup>-10</sup>
103-90-2	Paracetamol	151.17	3.00	0.46	0.4-1.0	2.40-4.10	9.40	14,000.00	6.42x10 <sup>-13</sup>	

FBC= Factor de Bioconcentración, Kd= Coeficiente de sorción, Kow= Coeficiente de partición octanol-agua, Koc= Coeficiente de adsorción ajustado a la fracción de carbono orgánico y pKa= Constante de disociación. N.R.= No reportado <sup>a</sup>Base de datos Toxnet (2017), <sup>b</sup>Lahti, 2012, <sup>c</sup>Base de datos PubChem, <sup>d</sup>Castro, *et al.*, 2015, <sup>e</sup>INE, 2008, <sup>f</sup>base de datos Miliarium, <sup>g</sup>Gust, *et al.*, 2013, <sup>h</sup>Grabicova, *et al.*, 2014.

En la Tabla 5, se presenta un comparativo de las propiedades de los ISRS en relación con otros fármacos de diferente naturaleza química, así como de algunos compuestos orgánicos persistentes (COP). En ella se observa que los ISRS, en comparación con otros fármacos, tienen altos valores de Kd (coeficiente de sorción), Koc (coeficiente de adsorción ajustado a la fracción de carbono orgánico) y Kow (coeficiente de partición octanol -agua), condiciones que indican su fuerte tendencia a incorporarse a sedimentos, lodos, suelos y partículas orgánicas en suspensión y a mantenerse adsorbidos en dichas matrices.

Kwon y Armbrust en 2006, pusieron en evidencia la acción de estas propiedades ya que en sus estudios señalaron que más del 70% de la fluoxetina se encontraba en muestras de biosólidos, como resultado de su adsorción a los ácidos húmicos y material orgánico particulado presentes en las muestras recolectadas e indicaron que en general los ISRS cuentan con una capacidad de adsorción superior al 91% con excepción de la fluvoxamina, cuya capacidad es de aproximadamente 73% (Kwon & Armbrust, 2008).

Esta alta afinidad por parte de los ISRS con la materia orgánica, puede también asociarse a una alta interacción entre fuerzas electroestáticas, ya que ésta última posee carga negativa, mientras que los ISRS positiva, generándose así fuertes campos de atracción entre las moléculas (Tolls, 2001; Schwarzenbach, *et al.*, 2003; Pan, *et al.*, 2009), condición que limita su movilidad hacia otras fases ambientales. Tal es el caso de los experimentos de lixiviación realizados con distintos tipos de suelos efectuados por Wu y colaboradores (2010), en los que se demostró que la fluoxetina quedaba retenida a la matriz sólida y sólo concentraciones reducidas del fármaco se movilizaban a la fase líquida (lixiviados). Así mismo, en lo que respecta a los valores de solubilidad y presión de vapor de los ISRS, éstos indican su poca o nula oportunidad de migrar hacia las fases gaseosa y líquida.

Por otro lado, al comparar las propiedades fisicoquímicas de los ISRS y de los Compuestos Orgánicos Persistentes (COP), se observan diferencias entre los valores de bioacumulación (FBA) y coeficientes de adsorción (Koc), los cuales resultan sumamente inferiores a los reportados para los COP, esto sirve como punto de referencia para comprender los distintos procesos a los que deben ser sometidos para su remoción, los cuales pueden implicar un menor grado de complejidad. En el caso de los valores del coeficiente de partición octanol- agua (Kow), éstos son similares (4-7 unidades), lo que da pauta a fundamentar su peligrosidad y los vuelve sujetos a una posible regulación ambiental ante su eminente peligro de incorporación y bioacumulación en organismos no blanco.

En relación a los procesos de degradación que modulan la permanencia de los ISRS en el ambiente acuático, Kwon y Armbrust (2006) puntualizaron el comportamiento y persistencia de la fluoxetina por medio de experimentos a escala laboratorio, encontrando que es compuesto altamente recalcitrante, no susceptible a la degradación por hidrólisis, fotólisis o acción microbiana, debido a que permanece adsorbido y protegido a las partículas suspendidas del medio, además de ser químicamente estable, la cual tiene una vida media en el ambiente mayor a 100 días a pH 5, 7, y 9.

Por todo lo anterior, los ISRS son compuestos que funcionan como reservorios ambientales, con alta protección a la degradación, la cual sucede sólo en caso de que éstos sean liberados a la fase acuosa bajo condiciones ambientales particulares (Kolpin, *et al.*, 2002).

### *1.8 Procesos de tratamiento para la remoción de ISRS*

Los ISRS al ser compuestos orgánicos diseñados para producir efectos farmacológicos en sitios de acción específicos del órgano blanco en el ser humano, son moléculas químicamente estables, característica que debe ser considerada para los procesos de remoción o degradación que se empleen para el tratamiento de las fuentes contaminantes.



En la búsqueda de remover residuos de ISRS del agua se han empleado algunas tecnologías que evidencian su eficiencia (Tabla 6), las cuales pueden ser clasificadas de acuerdo al principio de remoción (biológico, físico, fisicoquímico, de oxidación y de oxidación avanzada).

**Tabla 6** Métodos empleados para la remoción de fluoxetina, sertralina.

Método empleado		Fluoxetina			Sertralina			Referencia
		Concentración inicial ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Porcentaje de remoción (%)	Concentración residual ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Concentración inicial ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Porcentaje de remoción (%)	Concentración residual ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
Biológicos	Biodegradación	25	1.4	24.65	25	1.2	24.7	Styrishave, <i>et al.</i> , 2011
	Biorreactores de lecho sumergido	<u>2</u>	<u>94</u>	<u>0.12</u>	-	-	-	Flores y Mijaylova, 2017
	Biorreactores	<u>100</u>	<u>~ 90</u>	<u>~ 10</u>	-	-	-	Shon, <i>et al.</i> , 2006;
	con membrana	<u>0.0467</u>	<u>93.7</u>	<u>0.0029</u>	-	-	-	Snyder, <i>et al.</i> , 2006; Radjenovic, <i>et al.</i> , 2007; Kim, <i>et al.</i> , 2014
Físicos	Ultrafiltración	0.045	69	0.0139	-	-	-	Snyder, <i>et al.</i> , 2006
	Nanofiltración	<u>0.045</u>	<u>92</u>	<u>0.0036</u>	-	-	-	
	Luz Ultravioleta	N.E.	<30	-	-	-	-	Snyder, 2008
	Osmosis Inversa	<u>0.564</u>	<u>~ 90</u>	<u>~ 0.114</u>	-	-	-	Snyder, <i>et al.</i> , 2006
Físicoquímicos	Floculación con $\text{FeCl}_3$	N.E.	0	-	-	-	-	Westerhoff, <i>et al.</i> , 2005; Shon, <i>et al.</i> , 2006
	Coagulación con $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	N.E.	15	-	-	-	-	Gibs, <i>et al.</i> , 2007
	Adsorción con carbón activado	<u>1, 5, 10 y 20</u>	<u>91-98</u>	<u>0.4-0.02</u>	-	-	-	Westerhoff, <i>et al.</i> , 2005; Snyder, <i>et al.</i> , 2006; Shon, <i>et al.</i> , 2006; Jaira, <i>et al.</i> , 2015
	Degradación sonoquímica	300	80	60	-	-	-	Serna-Galvis, <i>et al.</i> , 2015
	Hidrolisis	500	0.10-0.13	499.50-499.35	500	1.82	490.9	Styrishave, <i>et al.</i> , 2011
Oxidación	Ozonización	<u>0.09- 100</u>	<u>91-100</u>	<u>0.081, 9 - 0</u>	<u>0.09- 100</u>	<u>99-100</u>	<u>0.0009, 1 - 0</u>	Snyder, <i>et al.</i> , 2006; Snyder, 2008; Antoniou, <i>et al.</i> , 2013; Lajeunesse, <i>et al.</i> , 2013
	Pre oxidación	N.E.	12	-	-	-	-	Snyder, <i>et al.</i> , 2006
	Cloro libre	N.E.	20	-	-	-	-	Westerhoff, <i>et al.</i> , 2005; Shon, <i>et al.</i> , 2006; Snyder, 2008
Oxidación avanzada	Oxidación Ozono / $\text{H}_2\text{O}_2$	<u>0.050-0.3</u>	<u>81-98</u>	<u>0.0095-0.057</u>	-	-	-	Shon, <i>et al.</i> , 2006; Uslu, <i>et al.</i> , 2012; Aghaeinejad <i>et al.</i> , 2014
	Aplicación de $\text{TiO}_2/\text{UV}$	<u>0.011</u>	<u>50</u>	<u>0.0055</u>	-	-	-	Méndez-Arriaga, <i>et al.</i> , 2011
	Aplicación de $\text{UV}/\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$	<u>0.011</u>	<u>70</u>	<u>0.0033</u>	-	-	-	
	Aplicación de $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$	<u>0.011</u>	<u>97</u>	<u>0.00033</u>	-	-	-	
	Aplicación de $\text{UV}/\text{Ozono}$	<u>0.011</u>	<u>100</u>	<u>0.0</u>	-	-	-	
	Fotofenton ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}(\text{II})$ )	<u>2000</u>	<u>99</u>	<u>20</u>	<u>50000</u>	<u>90</u>	<u>5000</u>	Li, <i>et al.</i> , 2012; Pliego, <i>et al.</i> , 2014
	Fotólisis	500	0.23-0.052	498.85-499.74	500	2.05-5.72	471.4-489.75	Styrishave, <i>et al.</i> , 2011
Irradiación con electrones	<u>19.400</u>	<u>90</u>	<u>1940</u>	-	-	-	Silva, <i>et al.</i> , 2016	

N.E.= La concentración inicial empleada en los tratamientos no se especifica y por lo tanto no es posible estimar la concentración residual. **X**= Remoción >90% pero con concentraciones residuales  $\geq 0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ; **X**= Remoción >90% con valores residuales  $\leq 0.05 \mu\text{g L}^{-1}$  asociados a las bajas concentraciones iniciales. **X**= con efectividad del orden del 98 y 100% que logran reducir la concentración residual a valores  $\leq 0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 1.8.1 Procesos de tratamientos biológicos

En lo que respecta a los procesos biológicos de degradación de ISRS por agentes microbianos, éstos parecen no ser eficientes (Styrishave, *et al.*, 2011), lo anterior coincide a lo discutido con base a sus propiedades fisicoquímicas en párrafos previos y con la información reportada por Kwon y Armbrust (2008), por lo que altos valores de remoción de ISRS en sistemas de degradación biológicos sólo pueden explicarse considerando que la mayor parte de la carga de ISRS (>91%) es adsorbida a grasas y lodos primarios en el sistema y no por efecto de asimilación por parte de los microorganismos.

No obstante, la remoción de ISRS por medios biológicos parece ser posible, siempre y cuando se combine con otro tipo de tecnologías, como los biorreactores de membranas sumergidas, los cuales han reportado eficiencias de remoción altas del 90 al 93.7% (Shon, *et al.*, 2006; Radjenovic, *et al.*, 2007; Kim, *et al.*, 2014), o por medio de la implementación de sistemas de baja carga orgánica ( $3 \text{ gCODm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) con distintos materiales de empaque (cintas de polietileno y cubos de poliuretano) tal como lo sugirieron Flores y Mijaylova, 2017 quienes reportaron remociones de fluoxetina del 94% en los sistemas experimentales bajo condiciones de operación con recirculaciones del 50% y altos tiempos de retención hidráulica (3.1 - 4.3 h) y celular (19 - 32 días) (Tabla 6).

### 1.8.2 Procesos de tratamiento físicos

La filtración es otra tecnología probada para remover ISRS del agua, ya sea por ultrafiltración, nanofiltración u osmosis inversa (Shon, *et al.*, 2006; Snyder, *et al.*, 2006). De éstas, la nanofiltración ha sido la más exitosa con eficiencias >90%, específicamente para la retención de fluoxetina, estos altos valores de eficiencia se deben principalmente al tamaño de los poros de sus membranas, los cuales resultan ideales para la remoción de una amplia gama de fármacos, incluyendo los ISRS de muestras de agua, sin retener, como en la ósmosis inversa, las sales y otros tipo de moléculas naturales que no representan peligro ambiental alguno (Krona, *et al.*, 2017).

A su vez, se ha empleado la luz ultravioleta como medio de tratamiento físico para la degradación de fluoxetina. Sin embargo, los resultados muestran remociones pobres (< 30%) a  $40 \text{ mJ/cm}^2$  de calor aplicado (Snyder, 2008).

### 1.8.3 Procesos de tratamiento fisicoquímico

En el caso de procesos de remoción fisicoquímicas, se ha documentado la eliminación de la fluoxetina por medio de su adsorción en carbón activado, las eficiencias alcanzadas son superiores al 90% e incluso pueden alcanzar el 98 % con concentraciones residuales muy reducidas (Snyder, *et al.*, 2006; Jaira, *et al.*, 2015), condición que obedece a su tendencia de adsorción evidenciada por sus valores de Koc, Kd y Kow presentados anteriormente (Tabla 5).

La alta capacidad de adsorción del carbón activado convierte a esta alternativa de tratamiento en una excelente opción para la eliminación de esta clase de fármacos del agua, de ahí la razón por la cual es uso del carbón activado tiene también una aplicación en el tratamiento de intoxicación por sobredosis de ISRS en seres humanos (Acuña, 2011).

Otra tecnología con grados de remoción de fluoxetina relevante (>80%) es la degradación sonoquímica, o comúnmente llamada ultrasonido, aplicada bajo condiciones de operación de 600kHz, con potencias de 20-60W, pH (3-11) sin embargo al ser empleada con concentraciones iniciales de 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Serna-Galvis, *et al.*, 2015) y obteniéndose valores residuales de 60  $\mu\text{g L}^{-1}$  surge la incertidumbre sobre si su eficiencia operara de la misma forma a concentraciones será menores a 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  que son las que por lo general inciden en influentes de plantas de tratamiento (Tabla 4).

Dentro de los tratamientos fisicoquímicos que no han tenido altas eficiencias de remoción para los ISRS se encuentran la hidrólisis (< 5%) (Styrishave, *et al.*, 2011) y la coagulación-floculación (< 15%) (Shon, *et al.*, 2006; Gibs, *et al.*, 2007). Los bajos niveles de eliminación reportados para esta última puede explicarse por los valores de Kow de los ISRS ( $3 \leq 5.29$ ), ya que la coagulación- floculación es idónea para la remoción de fármacos con valores de Kow < 3.

#### 1.8.4 Procesos de oxidación

La cloración también ha sido explorada como medio de remoción de ISRS, la cual al igual que otras tecnologías sólo se ha enfocado en la oxidación de la fluoxetina, con eficiencias < 20% (Shon, *et al.*, 2006; Snyder, 2008). En este caso, es importante señalar las sugerencias realizadas por Bedner y MacCreham (2006) quienes indicaron como inadecuada la oxidación de los ISRS por cloración, ya que tomando como modelo a la fluoxetina se observó la generación de *N*-clorofluoxetina, subproducto altamente reactivo y de mayor hidrofobicidad que su compuesto parental, el cual aumenta su tendencia de adsorción a sedimentos, suelo y membranas biológicas, condición que debe de revisarse para otros ISRS y moléculas similares. Esta última evidencia contribuyó a la inclusión de fluoxetina en la lista de los 10 fármacos potencialmente más peligrosos para el ambiente (Santos, *et al.*, 2013).

A diferencia de la cloración, la ozonización parece ser una vía de eliminación importante para los ISRS en agua, cuya oxidación puede ser del 100%, (Snyder, *et al.*, 2006; Snyder, 2008; Antoniou, *et al.*, 2013; Lajeunesse, *et al.*, 2013). Sin embargo, la implementación de esta tecnología presenta como inconveniente su alto costo de operación y mantenimiento, además de ser apto sólo para aquellos casos en los que no exista material particulado, cloro residual, carbonatos y bicarbonatos en el sistema, y exista un control de los valores óptimos del pH y de la temperatura del sistema (Homem y Santos, 2011).

#### 1.8.5 Procesos de oxidación avanzada

Dentro de los procesos empleados para la remoción de fluoxetina y sertralina del agua residual se encuentran los llamados Procesos de Oxidación Avanzada (POA), cuyo principio radica básicamente en la mineralización de las moléculas orgánicas hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Krona, *et al.*, 2017). En este sentido, ha resultado útil el uso de procesos de oxidación avanzada híbridos que favorezcan la eficiencias de remoción, tal como lo realizaron Mendéz- Arriaga y colaboradores (2011), quienes efectuaron pruebas de oxidación con distintos POA para la remoción de la fluoxetina con concentraciones iniciales reducidas (0.011  $\mu\text{g L}^{-1}$  a 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), los resultados muestran valores de mineralización de por lo menos 50% por la adsorción en el  $\text{TiO}_2$  adicionado en concentraciones de 0.050  $\text{g L}^{-1}$ . La oxidación se incrementó a 70%, una vez que se agregó  $\text{H}_2\text{O}_2$  al sistema experimental, y fue aún mayor (>97%) cuando se empleó fotooxidación con UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$

y también la combinación de UV/Ozono, con esta última se logró un 100% de remoción (Tabla 6).

Otro tipo de tecnologías como el uso de Ozono/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, expresan eliminaciones de por lo menos el 58% para fluoxetina (Snyder, *et al.*, 2006; Shon, *et al.*, 2006; Uslu, *et al.*, 2012; Aghaeinejad, *et al.*, 2014). Las de irradiación con electrones a 0.5 kGy remueven hasta el 90% (Silva, *et al.*, 2016) y aquellas efectuadas por fotooxidación con fotofenton con la adición de 1 a 20 mg L<sup>-1</sup> de Fe (II) (Li, *et al.*, 2012; Pliego, *et al.*, 2014), logran remociones del 90 y 99% para fluoxetina y sertralina respectivamente, sin embargo estos últimos tratamientos fueron ensayados en concentraciones iniciales elevadas de los serotoninérgicos de 2000 a 50 000 µg L<sup>-1</sup>.

En cuanto a la fotólisis, algunas proyecciones realizadas por Styrishave y colaboradores (2011) señalan predicciones para la remoción de la fluoxetina y sertralina en escenarios aeróbicos y anaeróbicos, indican que esta sería menor al 6% basándose en las características de su estructura química, señalando que si este valor se incrementara su remoción estaría asociada a la absorción de los compuestos en los lodos y no a la acción fotocatalítica, a partir de esto califican a este proceso como de baja eficiencia.

## **2.- OBJETIVO E HIPÓTESIS**

### 2.1 Objetivo

Evaluar los efectos en el desarrollo, reproducción y sobrevivencia de especies acuáticas modelo asociados con la exposición a la sertralina y fluoxetina y analizar su relevancia ambiental.

### 2.2 Hipótesis

La forma de acción de los fármacos serotoninérgicos fluoxetina y sertralina y la existencia de receptores de serotonina en una amplia diversidad de organismos acuáticos sugieren que estos fármacos son capaces de generar efectos adversos en procesos biológicos esenciales de organismos no blanco.

### 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

Las soluciones stock de fluoxetina 200 mg L<sup>-1</sup> (CAS 56296-787, ≥98%) y sertralina 10 mg L<sup>-1</sup> (CAS 79559-970, ≥98%) fueron preparadas a partir de estándares grado HPLC, Sigma- Aldrich®. Los reactivos empleados como tóxicos de referencia para cada una de las pruebas fueron los siguientes: prueba con *Vibrio fischeri* y *Danio rerio*, Fenol (CAS 108-95-2, 99.5%), *Daphnia magna* Cr (VI) a partir de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (CAS 7778-50-9, 99.5%) ambos Flucka® y *Pseudokirchneriella subcapitata* Cu II a partir de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (CAS 7758-99-8, 100.5%), Riedel deHaen®. Para la preparación de las soluciones stock de las sustancias se empleó agua destilada y las concentraciones de los tóxicos de referencia fueron verificadas por métodos químicos específicos.

Posteriormente se tomaron alícuotas de estas soluciones para preparar las disoluciones de prueba con agua dura, medio mineral o solución salina, de acuerdo al medio que corresponda a cada protocolo de los organismos modelo.

#### 3.1 Métodos de prueba para Toxicidad Aguda

Para el análisis de toxicidad aguda de sertralina y fluoxetina, se seleccionó como organismos modelo a *Vibrio fischeri* (bacteria), *Pseudokirchneriella subcapitata* (microalga), *Daphnia magna* (cladóceros) y *Danio rerio* (pez) y se emplearon series de 6 -14 disoluciones de prueba cuyo intervalo de concentraciones se ajustó de acuerdo al grado de sensibilidad mostrado por cada especie hasta encontrar el ámbito adecuado para lograr la determinación de la CE<sub>50</sub>, C<sub>150</sub> y CL<sub>50</sub>, según corresponda.

##### 3.1.1 Prueba con *Vibrio fischeri*.

La prueba de toxicidad de la bacteria se determinó tomando como fundamento el método de prueba enunciado en la Norma Mexicana NMX-AA-112-SCFI-1995, el cual se basa en la medición de la bioluminiscencia emitida por *Vibrio fischeri* después de su exposición a muestras problema en un periodo de cinco minutos para determinar la CE<sub>50</sub> que define la concentración de efectos agudos.

En un ensayo adicional el tiempo de exposición se extendió hasta 150 min, con lecturas cada 15 min., para observar si el efecto evaluado puede incrementarse. Esta prueba adicional se efectuó para la fluoxetina y sertralina por separado y también para la mezcla de ambos compuestos. Las concentraciones iniciales de fluoxetina y sertralina fueron de 200 y 10 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente y la mezcla de ambos compuestos se preparó con una concentración de 180 mg L<sup>-1</sup> para fluoxetina y 9 mg L<sup>-1</sup> para sertralina.

Para la determinación de la CE<sub>50</sub>, de empleo tanto en la evaluación de toxicidad aguda como en el ensayo de tiempo de exposición ampliado, una vez concluida la preparación de las soluciones se procedió a efectuar el análisis, para ello se preparó una serie de 9 disoluciones empleando un factor 1:1 a partir de las concentraciones iniciales antes señaladas.

Al ser la bacteria de origen marino fue necesario ajustar la osmolaridad del sistema de prueba al 2%, lo cual se realizó empleando una solución diluyente y de ajuste osmótico conteniendo NaCl (22%). Así mismo, se incluyeron dos controles negativos y el análisis del tóxico de referencia dentro del sistema experimental. Las disoluciones preparadas y los controles se dejaron atemperar a 15°C.

La cepa bacteriana de *Vibrio fischeri* empleada para la prueba se encontraba liofilizada y fue reconstituida con 1000  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada libre de tóxicos (solución de reconstitución) y mantenida a 5.5 °C por alrededor de 15 minutos para lograr su adecuada activación.

Una vez atemperado el sistema y activada la bacteria, se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución bacteriana a cada vial conteniendo las disoluciones y controles mencionados, a partir de ese momento se contabilizó el tiempo de exposición.

Al término del tiempo se efectuó la lectura de la luminiscencia en cada vial con ayuda del luminómetro MICROTOX 500<sup>®</sup>. Los valores obtenidos fueron la base para el cálculo del porcentaje de efecto, mismos que resultaron útiles para el ajuste del efecto observado utilizando el programa probabilístico PROBIT empleado para la determinación de la  $\text{CE}_{50}$ .

### 3.1.2 Prueba de inhibición de crecimiento algal

Esta prueba se realizó tomando como referencia el método propuesto por Blaise *et al.*, 2000 y adecuado por Pica-Granados y colaboradores (2004). Se basa en el cálculo del efecto de inhibición sobre la tasa de crecimiento poblacional de la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* luego de que las células algales han sido expuestas a diversas disoluciones de la muestra problema. La microalga utilizada para el desarrollo de las pruebas de toxicidad fue obtenida a partir de un cultivo axénico, que se prolifera bajo condiciones de temperatura de 20°C  $\pm$  2°C y con una intensidad de luz de 3000 a 4000 luxes con luz fluorescente blanca- fría por aproximadamente 72 horas, tiempo en el cual el cultivo debe alcanzar una densidad celular  $> 15 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ . A partir de este cultivo se preparó un inóculo algal con una densidad de  $2.6 \times 10^6$  cél  $\text{mL}^{-1}$ .

Para el montaje de las pruebas se preparó una serie de 9 a 14 disoluciones empleando un factor 1:1 a partir de las disoluciones iniciales mencionadas anteriormente, para ello se utilizó medio mineral o buffer ( $\text{NaHCO}_3$ ) y viales de borosilicato de vidrio (20 mL). Se incluyeron 3 réplicas para cada concentración probada, así como para los controles negativo y positivo, éste último preparado con una solución de  $\text{Cu}^{+2}$ .

La prueba inició con la preparación de las disoluciones de prueba hasta la determinación del ámbito adecuado para el cálculo del efecto de inhibición del 50% de la población algal ( $\text{CE}_{50}$ ), tal como se especificó anteriormente, la preparación de las diluciones para todas las concentraciones de fluoxetina y sertralina probadas durante el sistema experimental partieron a partir de las soluciones stock antes citadas.

Una vez llenados todos los viales con las disoluciones y controles, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del inóculo algal de *Pseudokirchneriella subcapitata*, posteriormente cada vial fue cubierto con un papel film transparente y agitado manualmente para asegurar la distribución homogénea de las algas en todo el medio. El sistema experimental se mantuvo en las condiciones de temperatura e

iluminación señaladas para la proliferación del cultivo. Al término de 72 h de exposición se efectuó el conteo algal de cada vial con ayuda de un microscopio óptico y de una cámara Neubauer.

La determinación de la  $CI_{50}$  se realizó a partir de los valores de efecto de inhibición obtenidos al contrastar el número de células observadas en control con respecto a las cuantificadas en las diversas disoluciones de fluoxetina y sertralina. La determinación de la  $CI_{50}$  se determinó mediante el programa probabilístico PROBIT.

### 3.1.3 Ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia magna*.

Los ensayos de toxicidad aguda o de letalidad con el cladóceros *Daphnia magna* se desarrollaron con base en el protocolo de la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010.

Los neonatos empleados para los distintos eventos fueron obtenidos del cultivo de hembras reproductoras de *Daphnia magna* del Laboratorio de Toxicología del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). Dicho cultivo se mantiene bajo condiciones de temperatura controlada de  $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , intensidad lumínica de  $\approx 800$  luxes (luz blanca- fría), fotoperiodos de 16:8h luz-oscuridad y alimentados diariamente con células algales de *Scenedesmus spp.*

El diseño experimental de cada prueba incluyó la preparación de 5 a 7 disoluciones a partir de la concentración inicial las cuales se prepararon con agua dura ( $250 \pm 25$  mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ , conductividad de 620-700  $\mu\text{hos}/\text{cm}$  y pH de  $8 \pm 0.2$ ), empleando un factor de disolución 1:1.

Para el montaje de la prueba se emplean recipientes plásticos de 30 mL en los que se vertieron las disoluciones de los compuestos y las correspondientes a los controles por triplicado. El control positivo se preparó con una disolución de  $\text{Cr}^{+6}$ . Posteriormente, en cada recipiente se colocaron 10 neonatos (< 24h edad) y se cubrieron con papel parafilm para evitar la exposición directa a la luz.

La prueba se mantuvo bajo las mismas condiciones del cultivo y al término de 48 horas de exposición se efectuó la lectura por conteo directo o con ayuda de un microscopio estereoscópico determinando el número de organismos muertos (verificado por la ausencia del latido cardíaco) o inmovilidad. Para la determinación de la  $CL_{50}$  se utilizó el programa de cálculo probabilístico PROBIT.

### 3.1.4 Ensayo de toxicidad aguda con *Danio rerio*

El análisis de toxicidad aguda con el pez *Danio rerio* se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de la OECD 212 (1998). Se usaron alevines de recién eclosión (<120h edad) obtenidos a partir del apareamiento de peces del cultivo del Laboratorio de Toxicología del IMTA. Los huevos recién fecundados fueron recuperados, desinfectados con medio E3, el cual fue preparado a partir de 4 sales ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Kcal}$ ,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgSO}_4$ ) y una solución adicional de azul de metileno al 5% (Muncke y Eggen, 2006), posteriormente fueron revisados con ayuda de un microscopio óptico para descartar aquellos huevos que resultaran no viables y verificar su estadio de desarrollo embrionario. Los huevos viables fueron colocados en agua filtrada, desinfectada (UV) y aireada, en recipientes de vidrio bajo las mismas condiciones ambientales que el cultivo de peces adultos



reproductores hasta su eclosión. Las condiciones de su mantenimiento fueron temperatura controlada de  $26 \pm 2$  °C y fotoperiodos de 18:6h luz-oscuridad.

Posteriormente, fueron colocados 10 alevines en cada vaso de precipitados de 300 mL que contenían las distintas concentraciones de fluoxetina y sertralina, así como de la solución del tóxico de referencia (fenol) y el control negativo, éste último fue el agua filtrada de empleo en el cultivo. El diseño experimental considero tres réplicas para cada una de las distintas concentraciones de los compuestos y controles.

Los vasos se cubrieron con papel parafilm para su mantenimiento dentro de acuarios con termostatos que proporcionaron la temperatura idónea ( $26 \pm 2$  °C) para el desarrollo de la prueba y con el mismo fotoperiodo de los lotes de mantenimiento. Una vez transcurridas las 72 horas de la prueba se verificó el número de organismos muertos en cada vaso. Los resultados de mortalidad se emplearon para la determinación de la  $CL_{50}$  utilizando el programa PROBIT.

### 3.2 Métodos de prueba de Toxicidad Crónica

En el caso de los ensayos de toxicidad crónica basados en el análisis del desarrollo embrionario del pez *Danio rerio* y del ciclo reproductivo de *Daphnia magna*, se utilizaron 14 concentraciones de prueba (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.75, 1, 2, 10, 100, 750, 1000, 1500 y 2000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), ámbito que parte de los valores medios de sertralina y fluoxetina reportados para aguas superficiales, los cuales fueron señalados en párrafos anteriores (Tabla 4). Es importante hacer notar que cada una de las pruebas realizadas contó con sus respectivos controles y réplicas.

#### 3.2.1 Prueba de alteración del desarrollo embrionario (ADE) con huevos de *Danio rerio*

La prueba crónica basada en el análisis del desarrollo embrionario del pez *Danio rerio*, se efectuó tomando como base el protocolo de la OECD 236 (2013) y se consideraron las pautas de otros procedimientos que le son comunes como: US EPA 712-C-96-118(1996), OPPTS 850.1075 y OECD 212 (1998). Para la experimentación se emplearon huevos fecundados viables de  $\leq 4$  hpf horas de desarrollo embrionario (horas post fertilización) que equivale a etapa de blástula, los cuales fueron previamente desinfectados con medio E3, cuya composición se describe en párrafos previos.

##### - Obtención de huevos

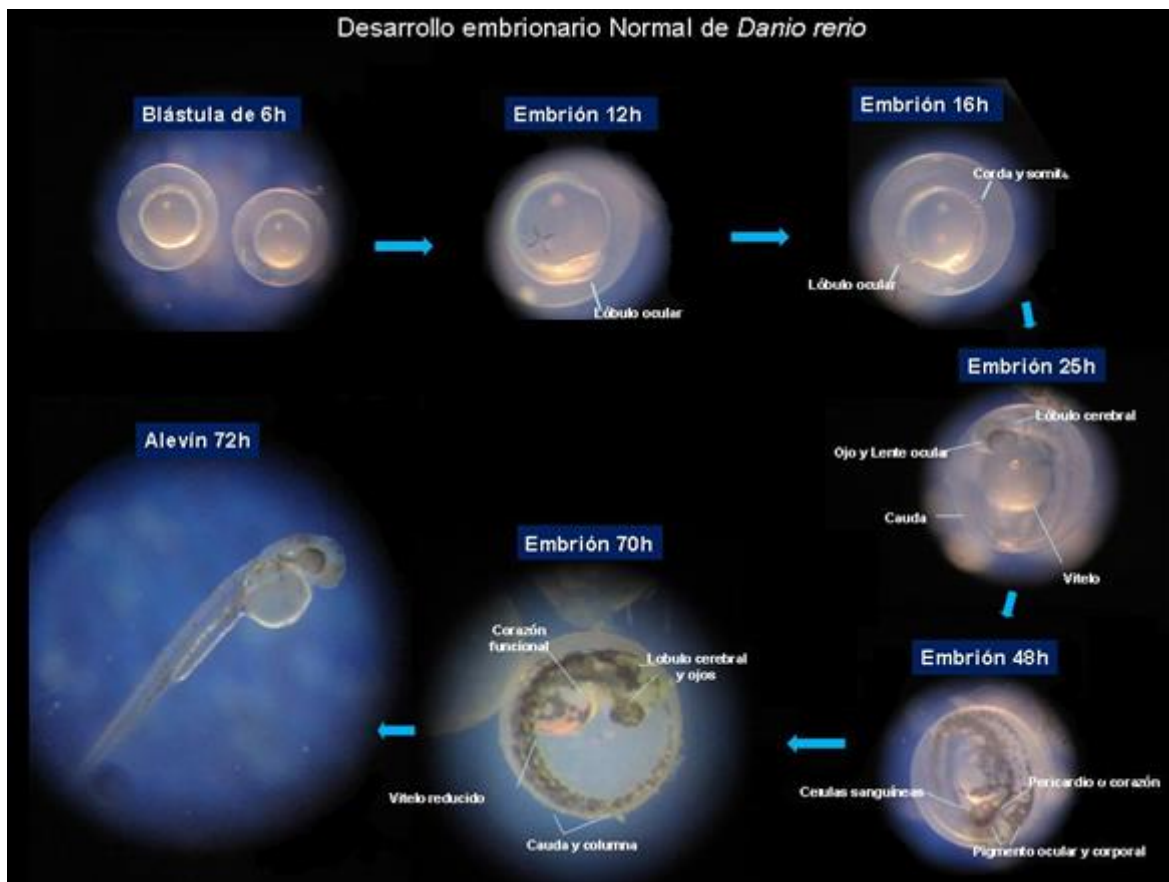
Para la obtención de huevos de *Danio rerio* en etapa de blástula se procedió a estimular el apareamiento de peces en edad reproductiva provenientes del cultivo del Laboratorio de Toxicología del IMTA. En un acuario de 40 L, conteniendo una charola de vidrio en el fondo para la recepción de huevos y una canastilla que permitiera aislar a los reproductores del fondo del acuario, en cada lote de apareamiento fueron colocados machos y hembras en una relación 2:1. Esta operación fue realizada al atardecer para que las pautas de apareamiento y estimulación gonádica se desarrollaran durante la noche y el estímulo lumínico del amanecer promoviera la expulsión de huevos ya fecundados.

Previo al apareamiento de los reproductores, se acondicionó a los peces suplementando su alimentación con una ración más de hojuelas Wardley® al día y el suministro de alimento vivo (*Artemia spp*).

- Preparación de la prueba

Para la preparación de las 14 disoluciones de prueba y los respectivos controles se utilizó agua filtrada y desinfectada (UV) y aireada. El diseño experimental consistió en tres replicas por concentración y empleo de placas de poliestireno de 12 pozos con una capacidad de 4 mL. En cada pozo se colocaron 5 huevos con desarrollo  $\leq 4$  hpf (horas post fertilización). El sistema de prueba se mantuvo a temperatura controlada de  $26 \pm 2$  °C y fotoperiodos de 18:6h luz-oscuridad durante las 72 h de exposición.

A lo largo de dicho periodo, a las 3, 24, 48 y 72 hpf, se efectuaron observaciones para verificar la evolución del desarrollo embrionario, detectar cambios contrastando con las imágenes obtenidas del grupo control y con aquellas generadas durante la calibración del método (Figura 3) y para tomar evidencia fotográfica con ayuda de un estereomicroscopio Nikon® con procesador de imagen acoplado.



**Figura 3** Ciclo del desarrollo embrionario de *Danio rerio* calibrado por IMTA (Pica-Granados *et al.*, 2014).

Para el seguimiento de los indicadores de alteración del desarrollo se emplearon tanto aquellos que sugieren letalidad y que han sido enunciados en el protocolo de la OECD 236 (2013), como otros más que han surgido derivados de diversos estudios y que refieren daño subletal (McGrath, 2012; Pica-Granados, *et al.*, 2012) y que incluyen :

Indicadores de letalidad: 1- Ausencia de desarrollo de Somitas 2.- Cola adherida al Vitelo, 3.- Coagulación de huevo o embrión, 4.- Sin latido Cardíaco.

Indicadores de Subletalidad: 1-Alteración de la forma del vitelo, blástula o gástrula, 2-Microcefalia o Macroftalmia, 3- Pigmentación reducida o nula, 4-Edema pericárdico o del saco vitelino, 5- Cuerpo acortado, 6- Escoliosis, 7- Alteración en la forma de aletas y 8- Otros.

Durante el desarrollo de las pruebas se revisó la morfología de todos los organismos expuestos a ambos fármacos a fin de determinar otro tipo de indicadores de subletalidad o crónicos, distintos a los enunciados y que pudieran proveer de información adicional sobre los efectos de la exposición de este tipo de sustancias. Esta experimentación se repitió en tres eventos independientes. El registro de la incidencia de cada uno de los indicadores observados se realizó en hojas de cálculo para su posterior análisis.

### 3.2.2 Prueba de reproducción y ciclo gestacional con *Daphnia magna* (21 días)

El protocolo de prueba que se empleó para evaluar la alteración del ciclo reproductivo del cladóceros *Daphnia magna* está basado en el método de la OECD 211 (2008) y en lo que respecta a las pautas para el control y mantenimiento del cultivo del cladóceros, éstas se efectuaron de acuerdo a los protocolos de la OECD 202/2004 y NMX-AA-087-SCFI-2010.

La prueba tuvo como objetivo determinar el efecto que tienen los fármacos, fluoxetina y sertralina, sobre el ciclo reproductivo del cladóceros, verificando cambios en la tasa de producción de los neonatos a lo largo de la etapa reproductiva del organismo, acotada a 21 días. El número de neonatos se contrastó con aquel observado en la prueba del sistema control o testigo.

Adicionalmente se efectuó el seguimiento a otros indicadores que permitieran analizar con mayor detalle el proceso reproductivo de las hembras, los cuales fueron: 1-edad de madurez sexual, 2-el número de puestas o partos observados para los primeros 21 días del periodo reproductivo, 3- medición de la talla, 4- identificación de presencia de grasa ovárica, 5- la revisión exhaustiva del número de huevos en desarrollo dentro de la madre, 6- su etapa gestacional y 7- la evolución sincrónica del desarrollo del ovario, 8- así como la búsqueda de otras anomalías que pudieran ser detectadas. Estos indicadores fueron verificados diariamente tomando evidencia fotográfica con ayuda de un estereomicroscopio Nikon® con procesador de imagen acoplado. El diseño experimental incluyó tres replicas para el grupo control y para cada una de las 14 concentraciones de prueba, cada ensayo se ejecutó en tres eventos independientes.

Los neonatos seleccionados fueron obtenidos del cultivo de hembras reproductoras de *Daphnia magna* del IMTA, mantenidos bajo condiciones de temperatura controlada de  $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , intensidad lumínica de  $\approx 800$  luxes (luz blanca-fría), fotoperiodos de 16:8h luz-oscuridad en medio de desarrollo ISO con  $\text{pH} = 8,0 \pm 0,2$ , dureza de  $250 \text{ mg/L} \pm 25 \text{ mg/L}$  como  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  y conductividad de 620-700  $\mu\text{hos/cm}$  y con la adición de selenito de sodio y vitaminas (Biotina, y Tiamina), y alimentados diariamente con células algales de *Scenedesmus spp.*

Los organismos empleados para la prueba crónica fueron los mismos en la prueba de toxicidad aguda, sin embargo la exposición crónica sólo se efectuó incluyendo las concentraciones en las que no se observó efecto de mortalidad y los controles correspondientes. Para ello, se seleccionaron tres daphnias por cada concentración, colocando cada una en vasos de precipitado de 100 mL que contenía la misma concentración a la que había sido expuesta en sus primeras 48h de vida. La prueba de exposición crónica duró 21 días, periodo durante el cual los cladóceros

fueron alimentados con un cultivo de *Scenedesmus spp* y se efectuaban las acciones de limpieza, eliminación de exhubias, conteo de neonatos y restitución del volumen de cada disolución de prueba perdido durante este proceso.

El análisis de la evolución de los huevos en desarrollo y ovario se realizó con base en el ciclo gestacional de la *Daphnia magna* (Figura 4)

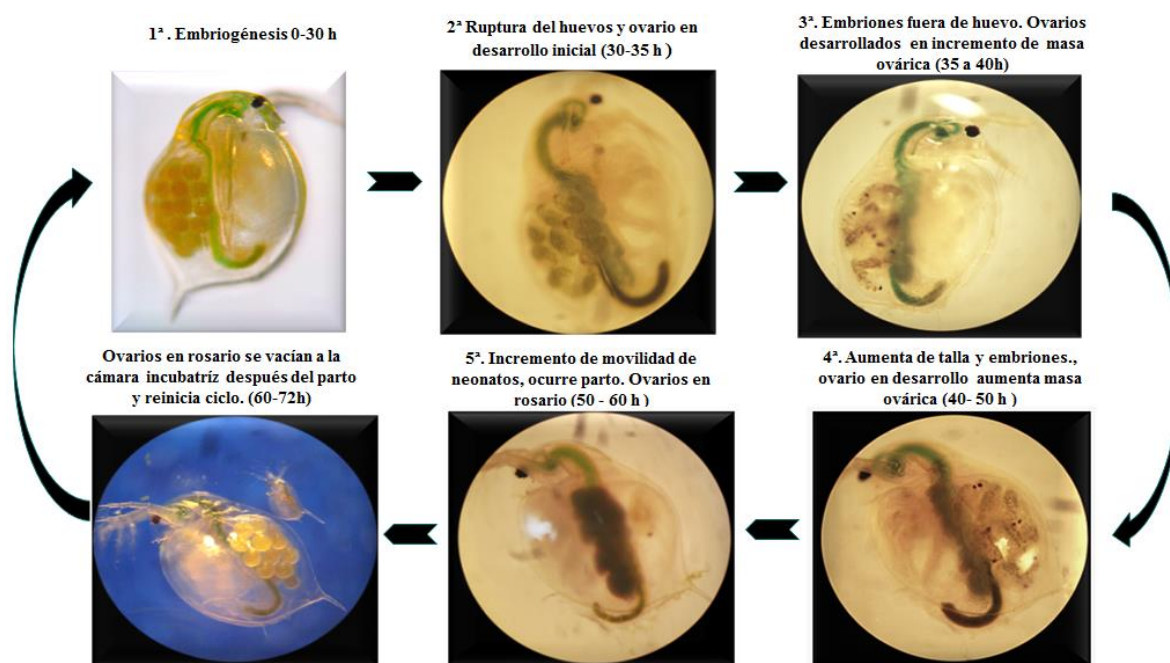


Figura 4 Etapas de desarrollo gestacional de huevos en *Daphnia magna*, (Pica-Granados et. al, 2012).

### 3.3 Análisis estadístico y confianza analítica

La determinación de la  $CE_{50}$ ,  $CI_{50}$  y  $CL_{50}$ , según corresponda, para cada uno de los ensayos de toxicidad aguda, fue efectuada mediante el uso del programa de cálculo probabilístico PROBIT. Para el caso de los ensayos de cronicidad del pez *Danio rerio* y *Daphnia magna*, la incidencia de las alteraciones y la consistencia de los datos tanto en réplicas como entre eventos de análisis fue efectuado mediante el análisis de parámetros de estadística básica. Con respecto al nivel de significancia de los de los indicadores de subletalidad en la prueba de *Daphnia magna* derivados de la exposición a fluoxetina y sertralina se realizó un análisis comparativo de medias mediante el uso de la prueba t-student ( $p= 0.05$ ). Los resultados de todos los ensayos antes mencionados fueron verificados generando por lo menos tres eventos de análisis para cada caso y cabe hacer notar que cada ensayo a su vez fue previamente calibrado y protocolizado dentro del Sistema de Gestión de la Calidad de Laboratorio de Calidad del Agua del IMTA.

## 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Toxicidad aguda

Los resultados de toxicidad aguda obtenidos para fluoxetina y sertralina se resumen en la Tabla 7 y se comparan con aquellos registros derivados de publicaciones previas.

**Tabla 7** Resultados de las pruebas de toxicidad aguda de los ISRS (mg L<sup>-1</sup>)

Organismo de prueba	Fluoxetina		Sertralina	
	Este estudio	Valores antecedentes	Este estudio	Valores antecedentes
<i>Vibrio fischeri</i> (CE <sub>50-5 min.</sub> )	297.76	N.R.	8.95	9.20 <sup>d</sup>
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (CI <sub>50</sub> )	0.026	0.039 <sup>a</sup> 0.024 <sup>a</sup> 0.027 <sup>d</sup>	0.031	0.043 <sup>c</sup> 0.14 <sup>d</sup>
<i>Daphnia magna</i> (CL <sub>50</sub> )	20.65	5.91 <sup>b*</sup> 6.40 <sup>c*</sup> 0.82 <sup>a*</sup>	4.65	1.15 <sup>b*</sup> 0.92 <sup>c*</sup> 1.30 <sup>d*</sup>
<i>Danio rerio</i> (CL <sub>50</sub> )	4.258	N.R.	0.613	N.R.

<sup>a</sup> Brooks, *et al.*, 2003 (\*US EPA), <sup>b</sup> Minguez (\*ISO), *et al.*, 2014, <sup>c</sup> Christensen, *et al.*, 2007 (\*OECD 2011), <sup>d</sup> Minagh, *et al.*, 2009 (ISO). N.R.= No Reportado.

Nota: En las referencias, se indica entre paréntesis el medio empleado en cada estudio para la prueba con *Daphnia magna*.

De manera general, los valores de toxicidad presentados en la Tabla 7 indican que la sertralina es de 4, 7 y 33 veces más tóxica que la fluoxetina para *Daphnia magna*, *Danio rerio* y *Vibrio fischeri* respectivamente, condición que ha sido referida en estudios previos (Brooks, *et al.*, 2003; Minagh, *et al.*, 2009; Christensen, *et al.*, 2007; Minguez, *et al.*, 2014). La excepción se observa en la prueba con *Pseudokirchneriella subcapitata* en la cual los valores de CI<sub>50</sub> no muestran diferencias significativas (p=0.05) entre las toxicidad de la sertralina y fluoxetina, condición que no ha sido documentada y en lo que respecta a la función de la serotonina en plantas, tampoco ha sido suficientemente abordada y resulta limitada la inferencia que es posible hacer para explicar el comportamiento sobre la respuesta homogénea a ambos ISRS, sin embargo es claro que la sensibilidad de las microalgas a la exposición de fluoxetina y sertralina es dos órdenes de magnitud superior al de los otros organismos empleados en este estudio y que su comportamiento como modelo vegetales es distinto a que presentan los animales.

En relación a la prueba con el pez *Danio rerio*, no se cuenta con estudios que nos permitan hacer una comparación sin embargo los resultados indican que es un organismo de considerable sensibilidad para la detección de sertralina y fluoxetina.

### Mayor sensibilidad

### Menor sensibilidad

*Pseudokirchneriella subcapitata* > *Danio rerio* > *Daphnia magna* > *Vibrio fischeri*

#### 4.1.1 Ampliación del tiempo de exposición para la prueba con *Vibrio fischeri* y respuesta en mezclas

En la Tabla 8 se muestran los valores de la  $CE_{50-5}$  a 150 min obtenidos para la prueba con la bacteria *Vibrio fischeri*, realizada para fluoxetina y sertralina así como para la mezcla de ellas.

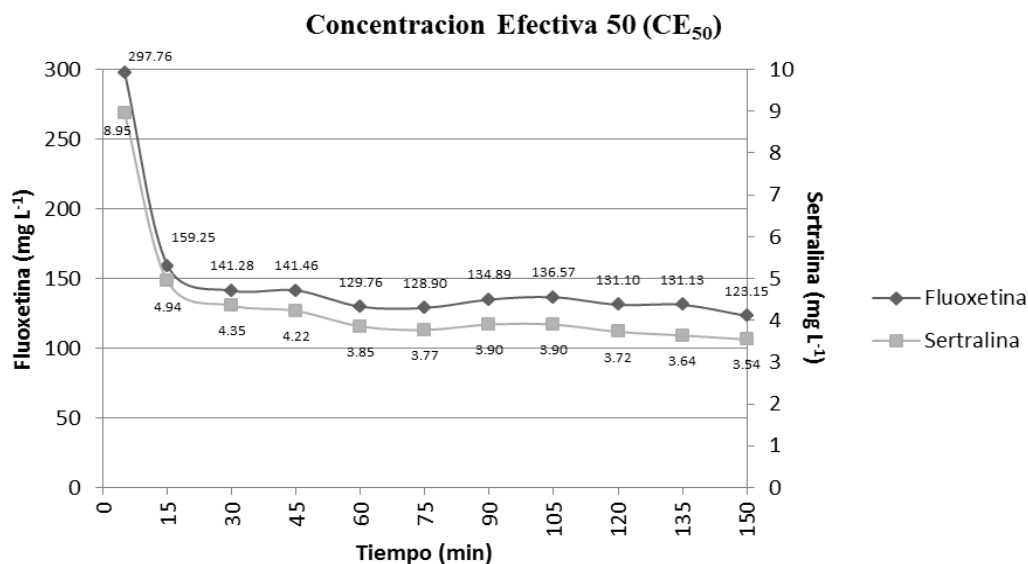
**Tabla 8.** Modificación de la  $CE_{50}$  para *Vibrio fischeri* en mezcla de ISRS y bajo un escenario de exposición prolongada

Tiempo de exposición (min)	Concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) mg L <sup>-1</sup>			
	Fluoxetina	Sertralina	Mezcla (2:1)	
			Fluoxetina	Sertralina
5	297.76	8.95	132.71	7.36
15	159.25	4.94	80.03	4.48
30	141.28	4.35	78.95	4.64
45	141.46	4.22	82.49	4.44
60	129.76	3.85	78.25	4.11
75	128.90	3.77	73.90	3.92
90	134.89	3.90	79.70	4.43
105	136.57	3.90	79.47	4.42
120	131.10	3.72	71.97	4.00
135	131.13	3.64	74.20	4.12
150	123.15	3.54	68.78	3.82

Los resultados indican  $CE_{50-5min}$  de 297.76 y 8.95 mg L<sup>-1</sup> para fluoxetina y sertralina, respectivamente. Estos valores se reportan de acuerdo al tiempo de lectura establecido en la Norma Mexicana NMX-AA-112-1995-SCFI. Para sertralina la  $CE_{50-5min}$  obtenida fue similar a lo reportado por Minagh y colaboradores (9.20 mg L<sup>-1</sup>) en el 2009. Para el caso de fluoxetina, no se cuenta con información científica relacionada a los valores de efecto para *Vibrio fischeri*, por lo que el valor determinado en el presente estudio puede servir como referencia para futuras investigaciones.

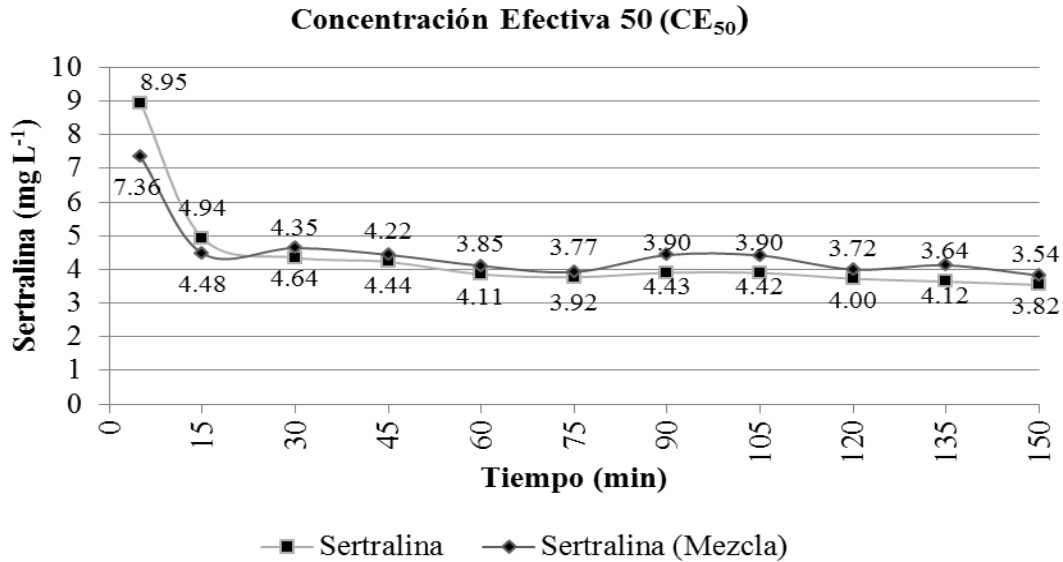
De manera general, se observa para ambas sustancias un aumento de la toxicidad en función del incremento del tiempo de exposición, alcanzando la concentración mínima en la lectura de 30 min, el cual es casi el doble del detectado a los 5 minutos (Figura 13 y 14), debido a este comportamiento puede decirse que es recomendable que en futuros estudios de sustancias similares a la fluoxetina y sertralina, el tiempo de exposición reportado sea 30 minutos. En este sentido, debemos recordar que el valor de la  $CE_{50}$  señala la concentración que es capaz de generar

un daño de inhibición media por lo que en la medida en que su valor sea menor significará un potencial tóxico superior (Figura 5).



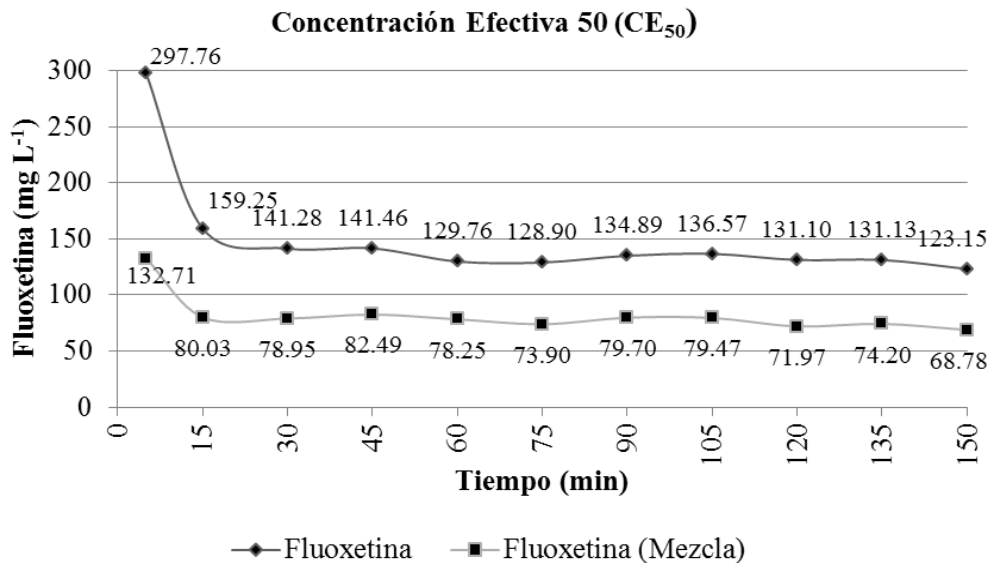
**Figura 5** Efecto del tiempo de exposición sobre la toxicidad (CE<sub>50</sub>) a fluoxetina y sertralina en *Vibrio fischeri*.

Derivado del análisis a la mezcla de ambos compuestos, se observó una reducción de los valores de la CE<sub>50</sub> (Figura 6 y 7), lo que implica un aumento de su toxicidad para *Vibrio fischeri*, este comportamiento se observó en especial para la fluoxetina que en presencia de sertralina reduce su CE<sub>50</sub>, determinada para los 5, 15 y 30 minutos aproximadamente a la mitad, lo que sugiere que en efluentes con contenido de fármacos serotoninérgicos la concentración residual de estas sustancias deberá establecerse con base en los valores de efecto del fármaco más tóxico en la mezcla toda vez que será ese nivel de daño el que impere en la mezcla.



**Figura 6** Efecto de la mezcla de fluoxetina y sertralina sobre la Concentración Efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de *Vibrio fischeri* (Sertralina).

El incremento de la toxicidad por parte de la fluoxetina ante la presencia de sertralina, evidencia un efecto sinérgico. Condición que implica un riesgo ambiental ante su incidencia con indeterminado número de contaminantes, incluyendo los compuestos farmacéuticos.



**Figura 7** Efecto de la mezcla de fluoxetina y sertralina sobre la Concentración Efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de *Vibrio fischeri* (Fluoxetina).



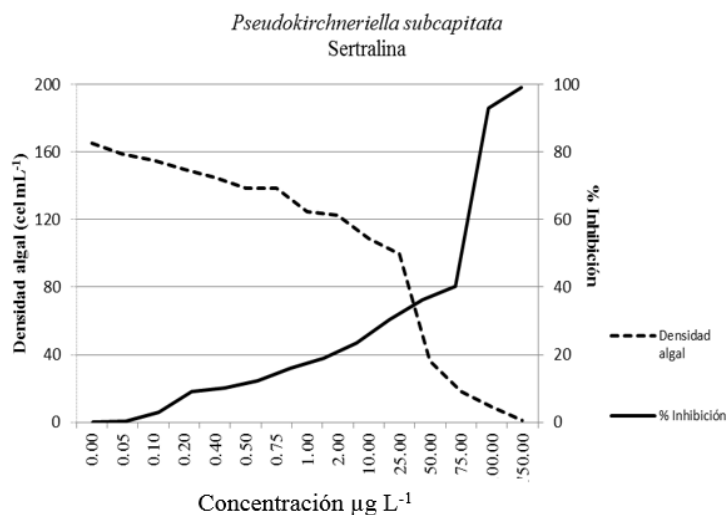
#### 4.1.2 *Pseudokirchneriella subcapitata*

En relación al efecto de inhibición sobre la densidad poblacional del microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, las concentraciones medias ( $CI_{50-72h}$ ) fueron similares a los antecedentes presentados en la Tabla 7 para ambos compuestos. Dichos valores fueron derivados a partir del análisis de tres eventos independientes (Tabla 9).

**Tabla 9** Concentración de Inhibición Poblacional media ( $CI_{50-72h}$ ) de fluoxetina y sertralina en *Pseudokirchneriella subcapitata*. ( $mg L^{-1}$ )

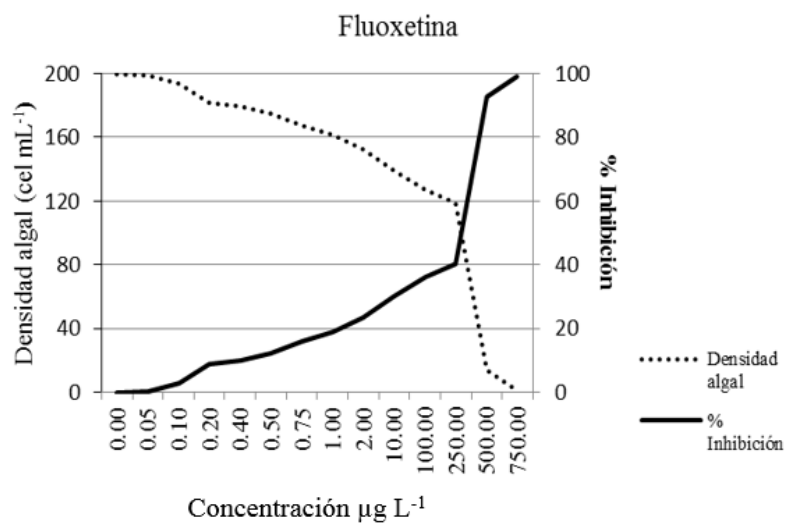
<i>P. subcapitata</i>	Eventos de análisis			$\bar{x}$	$\sigma$	Cv
	1	2	3			
Fluoxetina	0.027	0.026	0.025	<b>0.026</b>	0.0010	0.0385
Sertralina	0.033	0.031	0.028	<b>0.031</b>	0.0025	0.0808

Los valores de efecto encontrados en el presente estudio son de 2 órdenes de magnitud inferiores al resto de concentraciones de efecto determinadas para las bacterias, cladóceros y peces. Ésta mayor sensibilidad por parte de la microalga coincide con lo ya enunciado por Brooks y colaboradores (2003), quienes establecieron a esta especie como el organismo de mayor sensibilidad durante la evaluación de la toxicidad aguda de fluoxetina y sertralina.



**Figura 8** Efecto de inhibitorio de la sertralina en el crecimiento poblacional de la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*

En las Figuras 8 y 9 se ilustra el comportamiento inhibitorio de la sertralina y fluoxetina en el crecimiento poblacional de *Pseudokirchneriella subcapitata*. Para la sertralina el efecto inhibitorio se incrementa a concentraciones  $\geq 25 \mu g L^{-1}$  mientras que para la fluoxetina esto sucede a valores  $\geq 10 \mu g L^{-1}$ , concentraciones a las cuales el efecto es del 30% y alcanza el 50% a  $26 \mu g L^{-1}$  ( $0.026 mg L^{-1}$ ), y  $31 \mu g L^{-1}$  ( $0.031 mg L^{-1}$ ), respectivamente.



**Figura 9** Efecto de inhibitorio de la fluoxetina en el crecimiento poblacional de la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*

#### 4.1.3 *Daphnia magna*

En el caso de *Daphnia magna*, las concentraciones letales fueron superiores en aproximadamente 4 veces a todos los registros previos presentados en la Tabla 7, esta discrepancia en los valores de letalidad sólo puede explicarse a los distintos medios de desarrollo (US EPA y OCDE) en los cuales se llevaron a cabo los distintos experimentos, toda vez que los resultados obtenidos fueron verificados, llevando a cabo 3 eventos independientes de análisis (Tabla 10).

**Tabla 10** Concentraciones Letal 50 (CL<sub>50</sub>) para *Daphnia magna* por exposición a ISRS (mg L<sup>-1</sup>).

<i>Daphnia magna</i>	Eventos de análisis			$\bar{x}$	$\sigma$	Cv	—
	1	2	3				
Fluoxetina	21.09	20.81	20.04	20.65	0.546	0.026	
Sertralina	4.96	4.67	4.31	4.65	0.325	0.07	

Los valores letales fueron de 20.65 ( $\pm 0.546$ ) mg L<sup>-1</sup> para fluoxetina y de 4.65 ( $\pm 0.325$ ) mg L<sup>-1</sup> para sertralina. De manera general, se observó nuevamente a sertralina como el compuesto más tóxico con respecto a fluoxetina. Este mayor potencial de toxicidad por parte de la sertralina deja en evidencia el distinto mecanismo de acción entre ambos compuesto, a pesar de su similar forma de acción en el ser humano.

#### 4.1.4 *Danio rerio*

Referente a los ensayos de toxicidad aguda para *Danio rerio* no se encontraron registros previos para analizar y comparar las concentraciones letales medias obtenidos en el presente estudio, las cuales fueron de 0.614 y 4.25 mg L<sup>-1</sup> para sertralina y fluoxetina, respectivamente (Tabla 11).

**Tabla 11** Concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>) para *Danio rerio* por exposición a ISRS (mg L<sup>-1</sup>)

<i>Danio rerio</i>	Eventos			$\bar{x}$	$\sigma$	Cv
	1	2	3			
Fluoxetina	4.359	4.162	4.255	4.258	0.098	2.31E <sup>-02</sup>
Sertralina	0.614	0.614	0.613	0.614	0.001	9.41E <sup>-04</sup>

## 4.2 Indicadores de efecto de cronicidad

### 4.2.1 *Daphnia magna*

En relación al seguimiento de los indicadores de efecto asociados a la exposición de *Daphnia magna* a fluoxetina y sertralina Los resultados obtenidos para ambos compuestos se resumen en la Tabla 12.

**Tabla 12** Indicadores de seguimiento *Daphnia magna*, edad de madurez sexual (d), número de partos por daphnia en 21d, producción total de neonatos 21d y talla (mm)

Indicadores de efecto	Edad de madurez sexual (d)		Número de partos por daphnia en 21d		Total de neonatos por daphnia en 21d		Talla (mm)		
	Fluoxetina	Sertralina	Fluoxetina	Sertralina	Fluoxetina	Sertralina	Fluoxetina	Sertralina	
ISRS									
Control	9 ± 0.10		3.89 ± 0.33	3.78 ± 0.44	38.00 ± 3.00	40.56 ± 2.55	3.68 ± 0.03	3.70 ± 0.03	
Concentraciones µg L <sup>-1</sup>	0.05	9.22 ± 0.44	10.33 ± 0.50	3.56 ± 0.53	3.67 ± 0.50	37.11 ± 7.17	38.67 ± 3.00	3.68 ± 0.05	3.65 ± 0.07
	0.1	9.56 ± 0.53	10.44 ± 0.52	3.44 ± 0.53	3.67 ± 0.50	40.22 ± 9.47	38.44 ± 3.47	3.72 ± 0.04	3.64 ± 0.10
	0.2	9.56 ± 0.88	10 ± 0.70	3.44 ± 0.53	3.78 ± 0.44	39.11 ± 4.83	41.67 ± 3.84	3.62 ± 0.10	3.73 ± 0.03
	0.4	9.67 ± 0.71	9.67 ± 0.50	3.33 ± 0.50	3.67 ± 0.50	37.78 ± 8.27	40.78 ± 4.15	3.67 ± 0.09	3.71 ± 0.04
	0.5	9.89 ± 0.78	9.53 ± 0.53	3.44 ± 0.53	3.67 ± 0.50	38.22 ± 9.28	41.67 ± 3.28	3.67 ± 0.07	3.70 ± 0.05
	0.75	9.56 ± 0.73	9.67 ± 0.70	3.56 ± 0.53	3.78 ± 0.44	43.44 ± 11.29	42.67 ± 2.74	3.69 ± 0.06	3.72 ± 0.04
	1	9.78 ± 0.83	9.44 ± 0.53	3.56 ± 0.53	3.44 ± 0.53	38.56 ± 9.76	42.78 ± 2.05	3.71 ± 0.05	3.68 ± 0.06
	2	9.56 ± 0.73	9.44 ± 0.73	3.22 ± 0.44	3.67 ± 0.50	46.22 ± 12.82	43.22 ± 2.35	3.68 ± 0.10	3.71 ± 0.05
	10	9.33 ± 0.71	9.56 ± 0.53	3.22 ± 0.44	3.67 ± 0.50	37.44 ± 11.97	43.33 ± 2.35	3.72 ± 0.06	3.69 ± 0.04
	100	9.33 ± 0.50	9.44 ± 0.53	3.44 ± 0.53	3.67 ± 0.50	42.67 ± 6.06	44.11 ± 2.62	3.66 ± 0.15	3.69 ± 0.07
	750	9.11 ± 0.60	9.44 ± 0.53	3.11 ± 0.33	3.44 ± 0.53	52.33 ± 6.32	43.33 ± 3.00	3.77 ± 0.14	3.67 ± 0.04
	1000	9.22 ± 0.44	9.44 ± 0.53	3.33 ± 0.50	3.67 ± 0.50	50.56 ± 5.53	42.11 ± 2.26	3.81 ± 0.13	3.69 ± 0.06
	1500	9.00 ± 0.50	9.56 ± 0.72	3.11 ± 0.33	3.67 ± 0.50	44.89 ± 5.04	44.11 ± 2.93	3.84 ± 0.06	3.64 ± 0.08
2000	8.67 ± 0.50	9.22 ± 0.44	3.44 ± 0.53	3.78 ± 0.44	53.44 ± 7.57	43.78 ± 2.05	3.88 ± 0.06	3.67 ± 0.07	

En lo que respecta a la edad de madurez sexual del organismo, ésta se define como, el tiempo a partir de su nacimiento que le lleva a las daphnias reproducirse. Para el caso del control, el número de días en que esto sucedió fue de 9 d y por lo que general no existieron desviaciones significativas de este valor en todo el sistema experimental. Dicho periodo fue precisado a partir del análisis de seis eventos de evaluación (Anexo 7.2.1).

En el caso de la exposición de *Daphnia magna* a la sertralina, la madurez sexual se alcanzó entre los 9.42 y 10.33 días, se observó un retraso para las concentraciones más bajas (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 0.5 y 0.75  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), con respecto al control. Mientras que para los experimentos con fluoxetina, la madurez se alcanzó entre los 8.67 – 9.89 días. El retraso observado para la sertralina podría considerarse una anomalía asociada a la forma de acción de la sustancia ya que un periodo de madurez sexual superior a los 10 días sale de la tendencia normal de los datos analizados en el presente estudio ( $p$  0.05,  $t$ -student).

En relación al número de partos totales acontecidos durante el periodo reproductivo de los cladóceros previo a los 21 días de vida, se obtuvieron valores entre el rango de 3.11- 3.56 y de 3.44 - 3.78 para la fluoxetina y sertralina, respectivamente, valores que solamente resultaron significativos distintos para las concentraciones de fluoxetina  $> 750 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $p$  0.05,  $t$ -student) en relación al control. Lo que sugiere que el ciclo gestacional del desarrollo de neonatos no se ve afectado por la exposición a sertralina bajo ninguna concentración probada.

En cuanto a la producción de neonatos, es de llamar la atención el incremento del número de neonatos para las últimas 4 concentraciones de fluoxetina probadas, la cual es del 18% y hasta el 40% mayor al observado en los controles (38 - 40.56 neonatos), lo que demuestra que la fluoxetina a concentraciones  $\geq 750 \mu\text{g/L}$  aumenta significativamente ( $p$  0.05,  $t$ -student) la tasa reproductiva de *Daphnia magna*.

Esta tendencia de incremento en el número de neonatos gestados por el cladóceros ante el aumento de la concentración de fluoxetina coincide con lo previamente enunciado por Flaherty y Dodson (2005), quienes señalaron la misma condición pero a partir de concentraciones  $\geq 36 \mu\text{g L}^{-1}$  de fluoxetina. En lo que respecta a la sertralina, la producción de neonatos no refiere cambios significativos respecto al control o testigo.

Referente al seguimiento de la talla, definida como el tamaño de los organismos al término de la prueba, se observó que para los organismos expuestos a sertralina el crecimiento fue similar al control para todas las concentraciones de prueba, sin embargo, para las concentraciones de fluoxetina  $\geq 1000 \mu\text{g L}^{-1}$  se observaron incrementos significativos de su talla ( $p$  0.05,  $t$ -student) que se aprecian como aumento del contenido de grasa y ensanchamiento corporal de los organismos, cambios que no se presentaron a concentraciones menores. Este incremento de la talla por parte de *Daphnia magna* difiere con lo documentado por Péry y colaboradores (2008), quienes efectuaron un estudio multigeneracional para evaluar los efectos de la fluoxetina y encontraron que a concentraciones de exposición de 30 - 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ , los organismos de la tercera generación presentaron tallas menores.

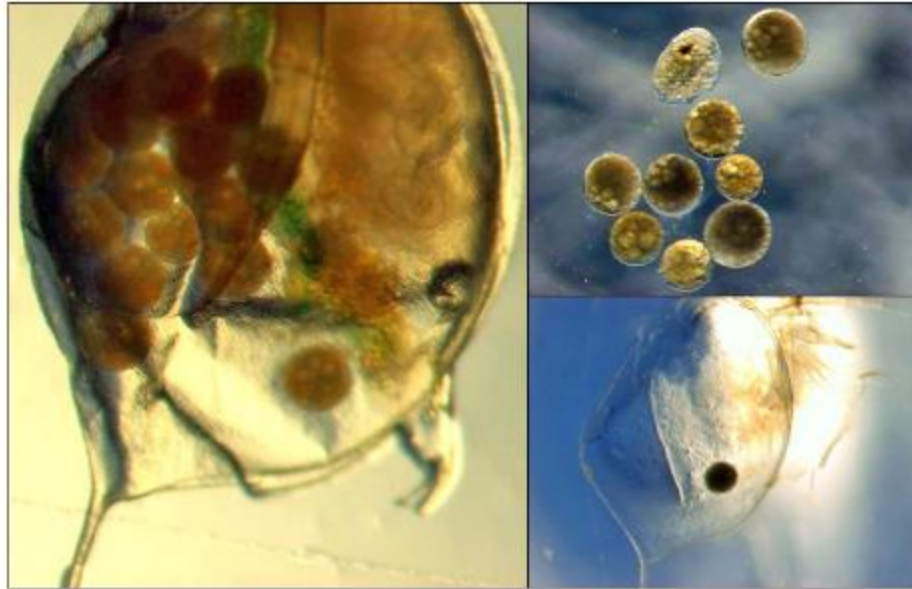
En lo que respecta a la grasa corporal, su contenido en los organismos expuestos a ambos serotoninérgicos fue siempre similar al observado en el control, con la excepción del incremento observado para los organismos expuestos a concentraciones de fluoxetina  $\geq 750 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 10), lo cual puede guardar relación con el aumento en la talla antes mencionado.



**Figura 10** Variación de la talla en organismos expuestos a fluoxetina (*Daphnia magna*)

Observaciones adicionales mostraron un efecto abortivo por parte de las hembras reproductoras para ambos compuestos a partir de la concentración más baja probada ( $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ), debido a que los organismos no lograban retener los huevos en su interior hasta su nacimiento (Figura 11).

El fenómeno abortivo en *Daphnia magna* ha sido documentado por Threlkeld en 1979, sin existir reportes más recientes a este respecto, en el mismo se señala que el aborto de la comunidad cladóceros ocurre de manera natural, siempre y cuando hayan sido sometidos a estrés asociado a condiciones ambientales inadecuadas e incluso es posible que este efecto se observe también en ambientes con florecimientos algales. Sin embargo, poca atención se ha prestado sobre este indicador en las investigaciones toxicológicas actuales, mismo que puede ser de utilidad para la clasificación de compuestos altamente peligrosos para el ambiente, por las implicaciones ambientales que puede ocasionar para futuras generaciones del cladóceros.



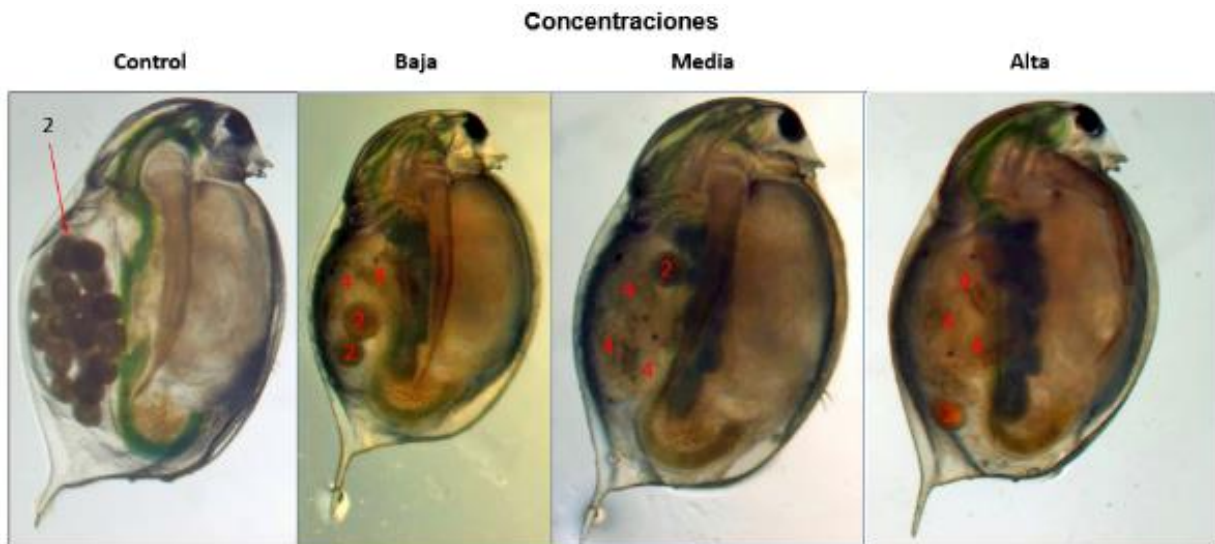
**Figura 11** Abortos espontáneos de huevos de *Daphnia magna* por exposición a fluoxetina y sertralina.

Otros estudios denotan la degeneración de huevos de *Daphnia magna* como resultado del análisis de exposición a bromuro de sodio ( Leeuwen, *et al.*, 1986), triazina (Fitzmayer, *et al.*, 1982), y 3,4-dicloroanilina (Crossland y Hillaby, 1985), compuestos que generan efectos directos sobre el desarrollo de los embriones contenidos en la cámara incubatriz de la hembra, manifestándose como alteraciones morfológicas de los huevos, por lo que las hembras como respuesta fisiológica expulsan aquellos huevos defectuosos que no serán capaces de sobrevivir. En el caso de la incidencia de los abortos de huevos registrados se puede asociar a exposición a fluoxetina y sertralina, toda vez que no dicha condición no fue observada en el grupo control.

De manera adicional se observó algunos casos en los que los huevos expulsados concluyeron su desarrollo embrionario fuera de la cámara incubatriz, mientras que en otros el desarrollo se detuvo, por ello y considerando los antecedentes mencionados, es posible que tanto fluoxetina como sertralina tengan efectos sobre el desarrollo embrionario del organismos.

El efecto abortivo y la capacidad de los huevos de concluir su desarrollo fuera de la hembra reproductora, son rasgos de efecto no reportados hasta el momento para ninguna sustancia, sin embargo se considera que deben ser considerados en las observaciones en materia de efectos asociados a la exposición a fármacos.

Otro efecto de daño también sin antecedentes y como resultado de la exposición a ambos compuestos fue la presencia de huevos con evolución asincrónica en la cámara incubatriz de la daphnia, condición que es anómala toda vez que bajo condiciones normales, evidenciadas en el control, el desarrollo gestacional de la totalidad de los huevos fue homogéneo (Figura 12).



**Figura 12** Niveles de desarrollo asincrónico en huevos de una misma puesta (*Daphnia magna*)  
 Nota: Número = fase de desarrollo de huevo, números iguales denotan una misma etapa de desarrollo.

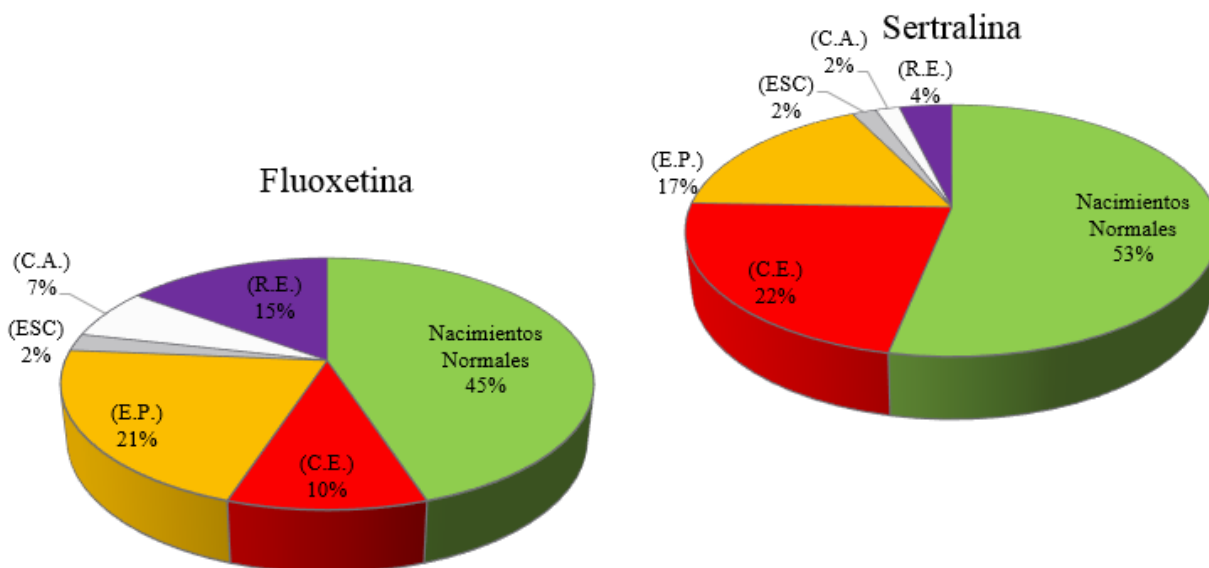
La evolución asincrónica de huevos es un rasgo del cual no se tiene registro antecedente alguno. Sin embargo, existe la posibilidad que los huevos con etapas menores sean organismos afectados durante las fases tempranas del desarrollo celular e incluso organismos sin vida, dicho indicador puede guardar relación con el efecto abortivo observado para todas las concentraciones, por lo que estos huevos podrían ser liberados por las madres posteriormente, como resultado de una respuesta fisiológica del organismo a descartar aquellos organismos que presenten alteración gestacional.

#### 4.2.2 *Danio rerio*

Los ensayos de embriotoxicidad de *Danio rerio* se llevaron a cabo con una población total de 630 huevos para fluoxetina y sertralina, los cuales se realizaron a lo largo de tres eventos independientes con el fin de verificar la consistencia analítica de los resultados y la incidencia de los diferentes rasgos o alteraciones asociadas a la presencia de ambos compuestos.

En este sentido, los huevos expuestos a fluoxetina y sertralina manifestaron efectos, algunos de los cuales coinciden con los reportados por Brooks y colaboradores (2003) tal como el edema pericárdico, la escoliosis y el incompleto desarrollo corporal, mismos que se expresaron a concentraciones de fluoxetina de 0.1–5  $\mu\text{g L}^{-1}$ . En el caso de la sertralina no se cuenta con reportes de naturaleza similar respecto a los cuales los resultados puedan ser comparados y así mismo no fue posible inferir los efectos de la sertralina a partir de lo observado para fluoxetina, ya que al comparar los efectos encontrados entre ambos compuestos, se observaron diferencias en la proporción cada indicador (Figura 13).





**Figura 13** Incidencia de afectaciones asociadas a la exposición a fluoxetina y sertralina en el desarrollo embrionario del pez Danio rerio. Nota: CE.= Coagulación del embrión o mortalidad, EP.= Edema pericárdico (daño cardíaco), ESC.= Escoliosis lateral o dorso-ventral CA.= Cuerpo acortado o truncado y R.E. = Retraso en eclosión (>72 hpf)

De acuerdo con la Figura 13 se observa que el 55 y 47 % de la población total de huevos expuesta a fluoxetina y sertralina, respectivamente manifestaron algún daño. La alteración que mostraron mayor incidencia fue la coagulación del huevo (141/630 org.).

Por otro lado, se observaron otras afectaciones como el retraso en la eclosión de los huevos y el cuerpo acortado con una incidencia del 15% y 7% para fluoxetina y del 4% y 2%, para la sertralina. En el caso de la escoliosis lateral y/o dorso-ventral, el porcentaje de organismos afectados resultó similar para ambos compuestos (Tabla 14).

Lo anterior pone en evidencia que a pesar de la semejanza química y uso terapéutico de la fluoxetina y sertralina, los mecanismos de acción de cada uno de ellos difieren sobre los organismos no blanco y que el análisis de los efectos asociados tanto a exposiciones crónicas como agudas, demuestran su diferencia entre el potencial tóxico y teratogénico de cada uno de los compuestos. En este sentido, se observó que la sertralina tiene un mayor potencial de letalidad tanto en las pruebas de embriotoxicidad como en aquellas de exposición aguda llevadas a cabo con los demás organismos de prueba (Tabla 7), ya que el porcentaje de huevos coagulados es prácticamente el doble del observado para la fluoxetina y en lo que respecta a la teratogenicidad, ambos compuestos son cardiotónicos y en menor medida actúan a nivel de la estructura de la corda, promoviendo su desviación ya sea dorso ventral o lateral sin impedir la formación del cuerpo y el desarrollo del resto de los órganos del alevín.

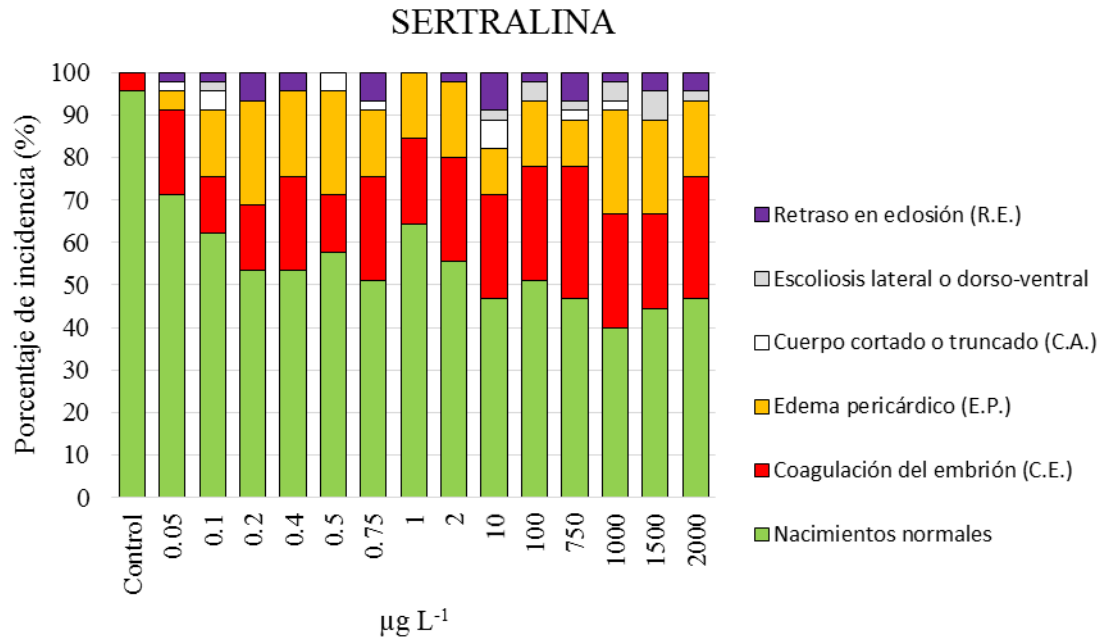
En casos extraordinarios se observaron deformaciones severas, principalmente en el caso de la fluoxetina, la cual mostró un mayor potencial de daño en el desarrollo neuromotriz (41/630), impidiendo la formación de la cauda, aletas y en general del cuerpo del alevín (cuerpo truncado).

**Tabla 13** Incidencia de alteraciones en el desarrollo embrionario del pez *Danio rerio*.

Población analizada por compuesto: 630 huevos (210 por evento)	Fluoxetina		Sertralina	
	Incidencia	%	Incidencia	%
Nacimientos Normales	283	44.92	335	53.17
Coagulación Embrional (CE)	64	10.16	141	22.38
Edema Pericárdico (EP)	134	21.27	108	17.14
Escoliosis Lateral o Dorso-ventral (ESC)	14	2.22	11	1.75
Cuerpo Acortado o truncado (CA.)	41	6.51	11	1.75
Retraso en Eclosión (RE)	94	14.92	24	3.81

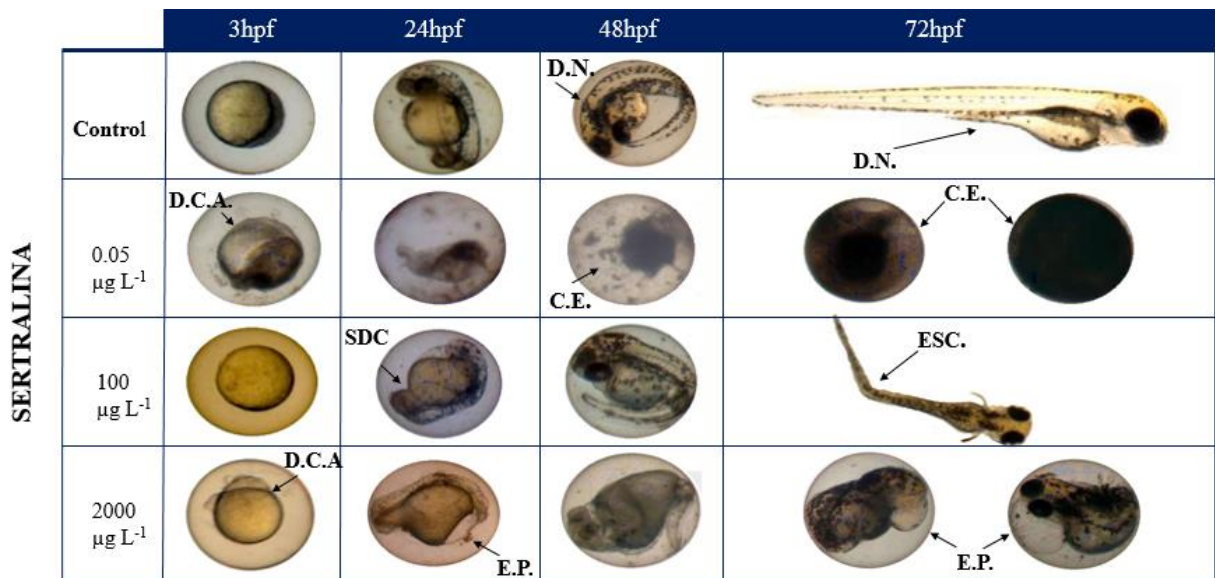
Si bien la Tabla 13 resume de manera general el total de afectaciones observadas durante los ensayos de embriotoxicidad efectuados con el pez *Danio rerio* para ambos compuestos, ésta no expresa la proporción de alteraciones observadas para las distintas concentraciones de prueba. Por ello se presenta un análisis más profundo de los efectos derivados de la exposición a fluoxetina y sertralina, de acuerdo al ámbito de concentraciones antes mencionadas.

*Sertralina*. De manera general y contrastando con el grupo control, la sertralina resultó ser un compuesto con la capacidad de generar mayor mortalidad embrionaria en los huevos de *Danio rerio* (4% - 32%), la cual se manifestó por medio de la coagulación del mismo durante las etapas primera de desarrollo del organismo (<24h), los valores más altos de coagulación se observaron a partir de la concentración  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ , condición que permaneció constante para las concentraciones mayores. Así mismo, como se mencionó anteriormente, este compuesto también puede producir a su vez malformaciones embrionarias. Sin embargo, éstas se limitan en su mayoría al daño cardíaco, definido como edema pericárdico, indicador que puede asociarse a la hiperacumulación de líquidos en el espacio intersticial del pericardio como resultado de una contracción cardíaca, lo que aumenta su tamaño. Dicha alteración puede derivar en la muerte del organismo. No obstante, la comprobación de dicha hipótesis queda sujeta a verificación en próximas investigaciones. El edema pericárdico se expresó a partir de las 24 horas de desarrollo de los organismos y afectó al 5-25 % de los embriones expuestos, principalmente a concentraciones superiores a  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ . En casos excepcionales y con una incidencia <7% se observaron otros efectos tales como el cuerpo acortado o truncado, el retraso en la eclosión del embrión y la escoliosis lateral, los cuales se hicieron evidentes a partir de las 48 horas de desarrollo de la prueba.



**Figura 14** Incidencia de efectos observados durante el desarrollo embrional del pez *Danio rerio*, asociados con la exposición a sertralina.

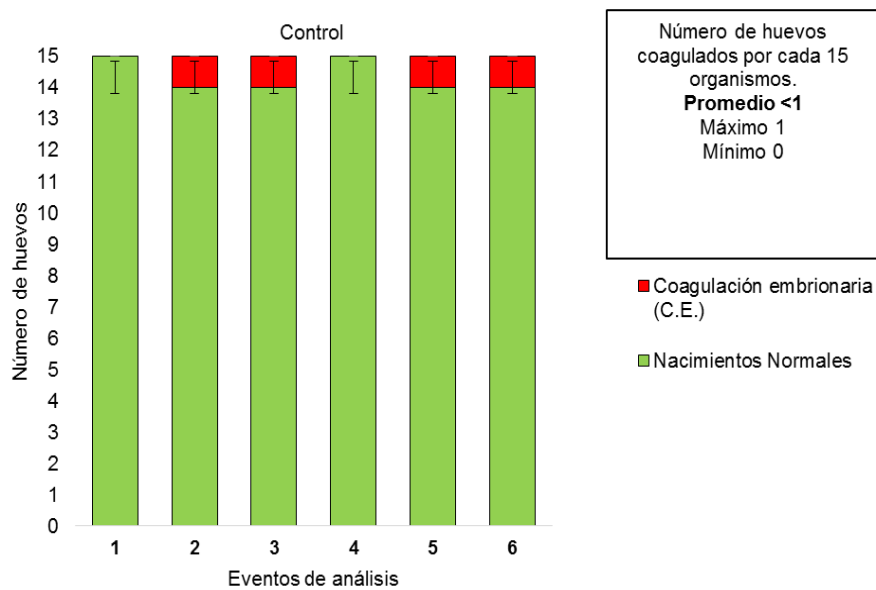
En el caso de los ensayos de cronicidad de la sertralina, las afectaciones observadas no guardan relación con el incremento de las concentraciones debido a que éstas únicamente mostraron un aumento significativo para las primeras concentraciones (0.05- 0.2 µg L<sup>-1</sup>), después de éstas la incidencia de efectos de subletalidad y la mortalidad embrionaria permanecieron prácticamente constantes en su expresión. Condición que sugiere una posible saturación de los receptores del organismo que responden a este fármaco, por lo que ya no es posible una mayor expresión del daño a concentraciones mayores de su máximo nivel de respuesta (Figura 14 y 15).



**Figura 15** Indicadores de efecto asociados a la Sertralina, en el desarrollo embrionario de *Danio rerio*. Se incluyen imágenes de concentraciones seleccionadas las cuales ejemplifican mejor los

efectos observados. Nota: División Celular Alterada (**DCA**), Desarrollo Normal (**DN**), Sin Desarrollo de Cauda (**SDC**), Cuerpo Acortado o truncado (**CA**), Coagulación del Embrión o muerte (**CE**), Edema Pericárdico (**E.P.**), Escoliosis lateral o dorso-ventral (**ESC.**) y Retraso en eclosión del embrión (**RE**). Horas post fertilización (**hpf**).

*Mortalidad en los controles.* La coagulación de los embriones también fue un indicador presente en los distintos eventos realizados. Sin embargo, a partir de ensayos previos de calibración del método, se observó que su incidencia en condiciones normales es menor al 5% (1/15 org.) de la población total expuesta (Figura 16), por lo que de existir una mayor incidencia de coagulación en el sistema experimental sólo puede ser explicado por la forma de acción de la fluoxetina y sertralina sobre el ciclo embrionario del *Danio rerio*.

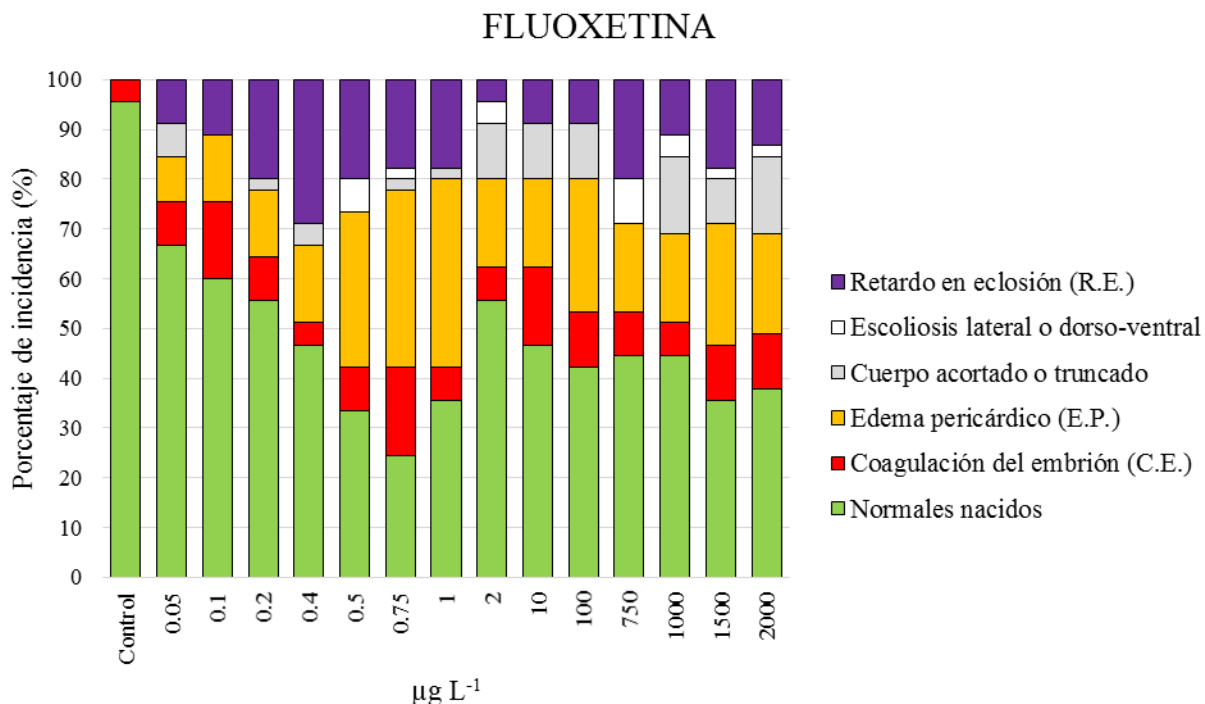


**Figura 16** Incidencia de mortalidad embrionaria *Danio rerio* (coagulación) en controles negativos.

*Fluoxetina.* En el caso de la fluoxetina la mortalidad de los huevos fue menor a lo reportado para la sertralina, en algunos casos el número de organismos afectados fue similar a lo encontrado en los controles negativos (Figura 16) y sólo en 6 de las 14 concentraciones probadas afectó al 10 - 15% del total de organismos expuestos, su incidencia ocurrió principalmente entre las concentraciones de 0.05 a 0.75  $\mu\text{g L}^{-1}$  a mayor concentración, ésta se presentó de forma aleatoria (Figura 16). Sí bien la fluoxetina generó una moderada mortalidad, contrario a la sertralina, ésta tuvo un mayor potencial teratogénico (15 - 60% en la población total expuesta), observando la generación de malformaciones embrionarias, gestadas desde la etapa de gástrula ( $\geq 10$  h de desarrollo), las cuales se manifestaron progresivamente a lo largo de la embriogénesis.

En el caso particular de la fluoxetina, las alteraciones embrionarias aumentaron en número en función del incremento de la concentración, pero sólo dentro del intervalo de 0.05 - 0.75  $\mu\text{g L}^{-1}$ , a partir de ésta última y hasta la máxima concentración (2000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) la incidencia de malformaciones se estabilizó afectando a aproximadamente 50% de la población expuesta (Figura 17). Este comportamiento ocurrió sólo para las ocho concentraciones más altas por lo que es posible pensar en dos hipótesis: a) que los tejidos dañados por la acción de la fluoxetina tienen la capacidad de recuperarse tras sufrir una alteración y b) que sólo a aquellos peces cuya

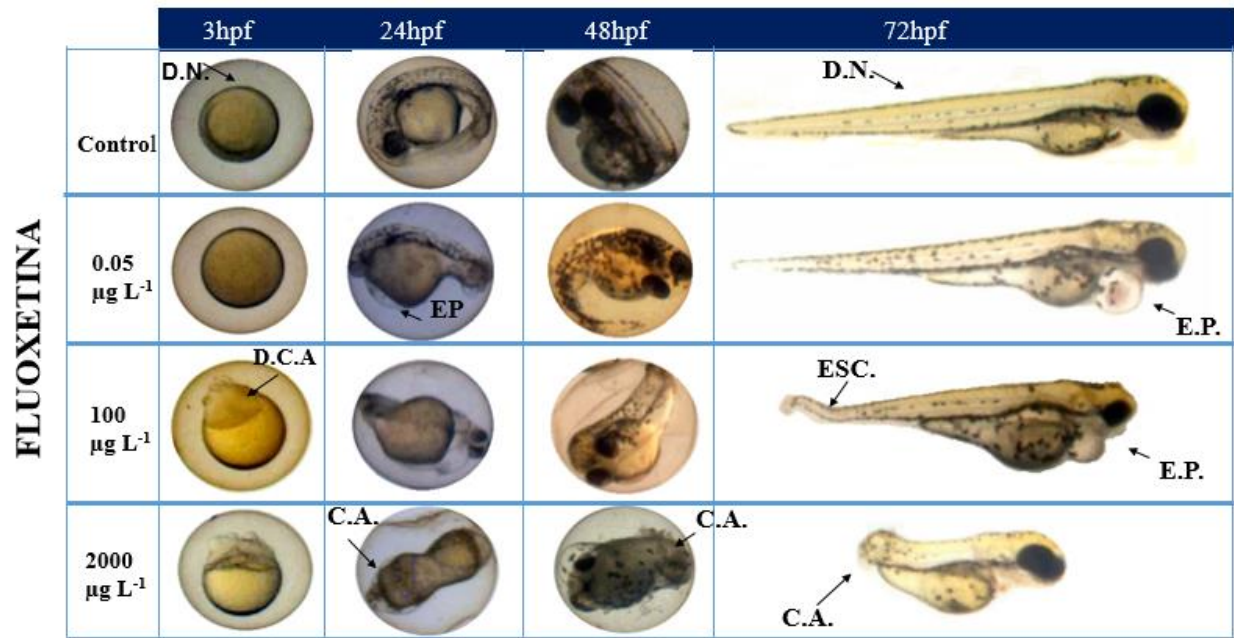
sensibilidad está genéticamente determinada y distribuida en la población responderán a la presencia de fluoxetina en el medio. En la primera hipótesis, se tiene como sustento la capacidad que tiene el corazón del pez *Danio rerio*, para recuperarse tras sufrir alguna lesión cardíaca, debido a que las células presentes en el mismo se dividen rápidamente para revertir el daño, gracias a la enzima telomerasa (Bednarek, *et al.*, 2015).



**Figura 17** Incidencia de efectos observados durante el desarrollo embrional del pez *Danio rerio*, asociados a la exposición de fluoxetina.

En el caso de la segunda hipótesis, algunos estudios a nivel molecular efectuados por Park y colaboradores (2012), los cuales surgieron con el fin de comprender el mecanismo de acción de fluoxetina y sertralina en el pez *Danio rerio*, los resultados evidenciaron variaciones en la expresión de genes involucrados en rutas bioquímicas asociadas al desarrollo del pez, en el caso de fluoxetina el número de genes diferencialmente expresados respecto al grupo control fue menor conforme se incrementó la concentración de prueba (288 a 25 µg L<sup>-1</sup> y 131 genes expresados a 250 µg L<sup>-1</sup>) lo cual sugiere que a dosis bajas se puede tener un importante efecto sobre la regulación de la expresión genética en etapas tempranas de desarrollo del pez *Danio rerio* mientras que para la sertralina el número de genes que expresaron cambios fue mayor a la concentración de prueba más alta (33 a 25 µg L<sup>-1</sup> y 52 a 250 µg L<sup>-1</sup>)

Las alteraciones embrionarias que se manifestaron durante la exposición a la fluoxetina fueron principalmente el edema pericárdico, la coagulación de los huevos y el retraso en la eclosión de los embriones y menor medida la escoliosis (2-6%). A concentraciones superiores a 2 µg L<sup>-1</sup>, la incidencia de cuerpo acortado se presentó en 5-15% del total de huevos expuestos. En casos extraordinarios se observaron embriones con malformaciones múltiples como es el caso de las imágenes que corresponden a la concentración de 100 µg L<sup>-1</sup> (Figuras 17 y 18)



**Figura 18** Indicadores de efecto asociados a la Fluoxetina, en el desarrollo embrionario de Danio rerio. Se incluyen imágenes de concentraciones seleccionadas las cuales ejemplifican mejor los efectos observados. Nota: División Celular Alterada (**DCA**), Desarrollo Normal (**DN**), Sin Desarrollo de Cauda (**SDC**), Cuerpo Acortado o truncado (**CA**), Coagulación del Embrión o muerte (**CE**), Edema Pericárdico (**E.P.**), Escoliosis lateral o dorso-ventral (**ESC**) y Retraso en eclosión del embrión (**RE**). Horas post fertilización (**hpf**).

Durante el desarrollo de las pruebas de embriotoxicidad el edema pericárdico fue un indicador con alta incidencia para fluoxetina y sertralina, el cual estuvo presente en todo el rango de concentraciones efectuadas. De acuerdo con algunos autores, esta afectación puede explicarse por una súper hidratación del órgano implicado, debido a la existencia de un daño a nivel molecular en la membrana celular, cuya regulación osmótica se ve dañada, lo que deriva en la hiperacumulación de líquidos. (Hollet, *et al.*, 2003), Por otro lado, Lin en el año 2007 enunció que este padecimiento también se debe a una hiperacumulación, pero en este caso por el exceso de células rojas dentro de la cabeza del pez, lo que deriva en una pronunciación de la zona pericárdica.

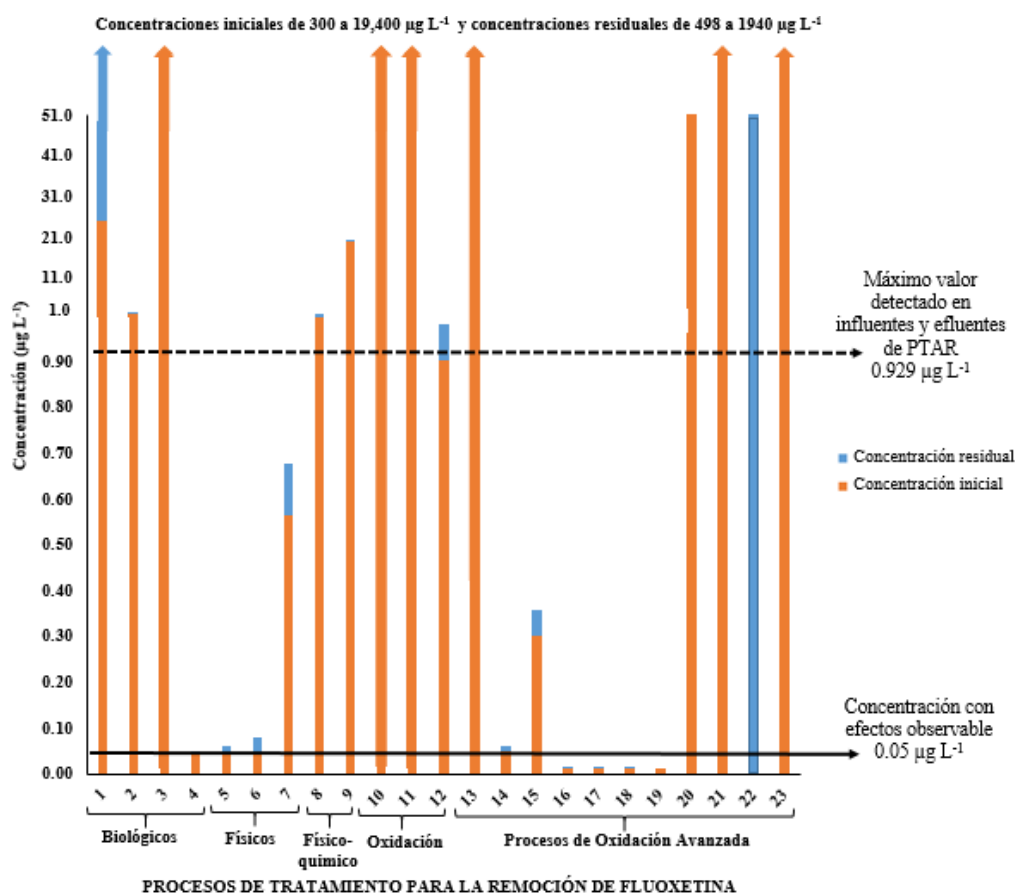
Otros autores han relacionado esta afectación a nivel enzimático, ya que se afecta directamente el óptimo funcionamiento de la acetilcolinesterasa, la cual es una enzima que se encuentra presente en los peces y que se relaciona con la regulación de la presión sanguínea del organismo, por lo que al producirse una variación de la presión interna del órgano también se ocasiona un decremento en el ritmo cardíaco del organismo (Roex, *et al.*, 2003).

Por último, Richards y colaboradores (2004) sugirieron el posible mecanismo de acción de la fluoxetina, la cual conduce a un incremento en las concentraciones de serotonina en el plasma de los peces, lo que contrarresta la vascularización (Nilsson y Sundin, 1998), lo cual desencadena una alteración del intercambio gaseoso y a una hipotaxia, lo que deriva en la muerte del organismo (Brooks, *et al.*, 2003)

Sí bien, todas las afectaciones observadas en *Danio rerio* sirven como referencia para evidenciar el peligro inminente que representan los ISRS probados (fluoxetina y sertralina) para el ambiente acuático, es posible pensar que algunos de estos efectos pueden afectar en menor grado a los pacientes que los consumen, ya que si *Danio rerio* carece de algunos órganos propios de mamíferos como el pulmón, la próstata y glándulas mamarias, éstos comparten muchos órganos y tejidos, incluyendo el cerebro, sistema nervioso central, corazón y sistema vascular. (Lewis y Eisen, 2003; Moens y Prince, 2002; Wilson, *et al.*, 2002). Lo anterior cobra relevancia con la completa secuenciación del genoma del pez cebra, mismo que muestra una homología de aproximadamente el 85% con el genoma humano (McCollum, *et al.*, 2011, Renier, *et al.*, 2007)

#### 4.3 Contraste de los niveles de efecto con la eficiencia de los procesos de tratamiento para la remoción de compuestos serotoninérgicos

El análisis de la información previa la cual pone en evidencia el potencial tóxico que tienen los ISRS sertralina y fluoxetina sobre especies no blanco en escenarios de exposición crónica a concentraciones subtraza ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) nos permiten proyectar de forma más adecuada las implicaciones ambientales y visualizar el nivel de saneamiento que se requiere lograr de las aguas con contenidos farmacéuticos, en especial en lo que respecta a ISRS.



**Figura 19** Procesos de tratamiento para la remoción de fluoxetina. **1-**Styrishave, *et al.*, 2011, **2-**Flores y Mijaylova, 2017, **3-**Shon, *et al.*, 2006, **4-**Snyder, *et al.*, 2006; Radjenovic, *et al.*, 2007; Kim, *et al.*, **5-** Snyder, *et al.*, 2006, **6-** Snyder, 2008, **7-** Snyder, *et al.*, 2006, **8-** Westerhoff, *et al.*, 2005; Shon, *et al.*, 2006, **9-**Gibs, *et al.*, 2007, **10-** Westerhoff, *et al.*, 2005, Snyder, *et al.*, 2006; Shon, *et al.*, 2006 Jaira, *et al.*, 2015, **11-** Serna-Galvis, *et al.*, 2015, **12-** Styrishave, *et al.*, 2011,

**13-** Snyder, et al., 2006; Snyder, 2008; Antoniou, *et al.*, 2013; Lajeunesse, *et al.*, 2013, **14-** Snyder, *et al.*, 2006, **15-** Westerhoff, *et al.*, 2005; Shon, *et al.*, 2006; Snyder, 2008, **16-** Shon, et al., 2006; Uslu, et al., 2012; Aghaeinejad et al., 2014, **17-20** Méndez-Arriaga, *et al.*, 2011, **21-** Li, *et al.*, 2012; Pliego, *et al.*, 2014, **22-** Styris have, *et al.*, 2011, **23-** Silva, *et al.*, 2016

Haciendo un análisis de los antecedentes de tratamientos experimentales logrados hasta el momento y que eventualmente pudieran ser empleados para la remoción de éstas sustancias en influentes contaminados, se observan para muchos de ellos remociones del orden del 90% o mayores, sin embargo cuando se hace una comparación entre las concentraciones residuales asociadas a dichos valores porcentuales se observa que éstas resultan muy elevadas en relación a la concentración en el que estas sustancias son capaces de generar efectos crónicos y que como resultado de este estudio se señala  $0.05\mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 19), de modo que esta reducida concentración puede considerarse un valor meta que permite enfocar las mejoras necesarias a los procesos de tratamiento. Con base en esto y considerando el aporte de diversos autores a este tema, se puede observar en la figura 19 que el tratamiento de remoción de fluoxetina con carbón activado y la ozonación (Snyder, *et al.*, 2006, 2014; Snyder, 2008; Snyder, *et al.*, 2006; Westerhoff, *et al.*, 2005; Shon, *et al.*; Antoniou, *et al.*, 2013 y Lajeunesse, *et al.*, 2013), prometen ser hasta el momento los más efectivos, ya que a pesar del uso de concentraciones iniciales elevadas, se logra la total eliminación de la fluoxetina del agua, compuesto que ha sido empleado como patrón en los trabajos experimentales mencionados. En este sentido es importante hacer notar que dado que la sertralina tiene comportamientos más severos a concentraciones más reducidas, en especial en indicadores de letalidad, se considera recomendable que esta sustancia también sea considerada como compuesto problema para la experimentación y desarrollo de nuevos procesos de tratamiento y remoción de fármacos en aguas .



## 5.- CONCLUSIONES

Los resultados derivados de pruebas de toxicidad aguda evidenciaron que la sertralina es de 4 a 30 veces más tóxica que la fluoxetina. En el caso de *Vibrio fischeri* la  $CE_{50-5min}$  fue de 8.95 y 297.76  $mg L^{-1}$ , la  $CL_{50-48h}$  para *Daphnia magna* fue 4.65 y 20.65  $mg L^{-1}$  y de 0.613 y 4.258  $mg L^{-1}$  para *Danio rerio* para sertralina y fluoxetina, respectivamente. Para *Pseudokirchneriella subcapitata*, las  $CI_{50-72h}$  fueron similares para ambos compuestos con 0.03  $mg L^{-1}$  para sertralina y 0.026  $mg L^{-1}$  para fluoxetina.

Las concentraciones de efectos agudos de fluoxetina y sertralina son 2 órdenes de magnitud superiores a los valores máximos registrados en los cuerpos por lo que es poco factible que estas sustancias puedan generar efectos agudos en especies acuáticas.

Los resultados derivados de las pruebas de cronicidad demostraron que estas sustancias son capaces de producir efectos sobre el desarrollo, reproducción y sobrevivencia de peces y cladóceros a partir de la concentración más baja (0.05  $\mu g L^{-1}$ ) del ámbito de concentraciones estudiadas.

En el caso de los embriones de *Danio rerio* expuestos a fluoxetina y sertralina mostraron afectaciones, tales como: la coagulación del huevo, edema pericárdico, retraso en la eclosión, escoliosis lateral y cuerpo truncado o acortado, lo que sugiere que estos compuestos son en distinta proporción teratogénicos, cardiotoxicos y letales.

En lo que respecta a los indicadores de efecto de las pruebas de cronicidad con el cladóceros *Daphnia magna*, los organismos expuestos a concentraciones de fluoxetina  $\geq 750 \mu g L^{-1}$  aumentaron su tasa reproductiva significativamente (18-40%) e incrementaron su talla a partir de concentraciones de 1000  $\mu g L^{-1}$  del mismo fármaco.

En el caso de la sertralina, las daphnias expuestas a concentraciones de 0.05, 0.1 y 2  $\mu g L^{-1}$  mostraron un retraso en la edad de madurez sexual, la cual se alcanzó a los 10 días, condición que resulto significativamente distinta ( $p=0.05$ ) a la respuesta obtenida en los grupos controles.

Las pruebas de cronicidad efectuadas con el cladóceros *Daphnia magna* evidenciaron la presencia de dos nuevos indicadores de efecto asociados a la exposición a fluoxetina y sertralina, los cuales fueron el efecto abortivo y la evolución asincrónica del desarrollo embrionario de los huevos, dichas alteraciones fueron observadas en todas las concentraciones probadas dentro del ámbito de 0.05 a 2000  $\mu g L^{-1}$ .

Las evidencias obtenidas a partir de la evaluación de los efectos adversos de los inhibidores selectivos de recaptura de serotonina, fluoxetina y sertralina, realizados mediante pruebas de exposición aguda y crónica en organismos de diferentes niveles de organización biológica, demuestran la capacidad de éstas sustancias de producir alteraciones en el desarrollo, reproducción y sobrevivencia de las especies de prueba a concentraciones de exposición similares a las reportadas hasta el momento y que inciden en el ambiente acuático, en aguas residuales y en efluentes de PTAR, incluso de procesos experimentales con altos porcentajes de remoción (>90%), ya que al menos en el 70% de los casos las concentraciones residuales resultaron superiores 0.05  $\mu g L^{-1}$ , valor a partir del cual se verificaron efectos crónicos.

Todo lo anterior sugiere que es necesario intensificar las investigaciones toxicológicas y de riesgo ambiental sobre esta clase de contaminantes a fin de que se logre mayor evidencia sobre su peligrosidad y en su caso se desarrollen estrategias adecuadas para su saneamiento y control, tomando en cuenta valores de concentración que resulten inocuos en exposiciones crónicas para las especies modelo, como criterio meta en el diseño de procesos de tratamiento.

Por otro lado, la búsqueda de nuevos indicadores de efecto y el empleo de pruebas de exposición crónica son acciones fundamentales en la clasificación de la peligrosidad de compuestos emergentes, en especial de fármacos, ya que los actuales indicadores de daño para evaluación toxicológica no sustentan el riesgo ambiental que esta clase de compuestos para los organismos acuáticos.

## 6. – REFERENCIAS

- Aghaeinejad-Meybodi, A. Ebadi, A., Shafiei, S., Khataee, A. y Rostampour, M. (2015) Degradation of antidepressant drug fluoxetine in aqueous media by ozone/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. Process optimization using central composite design. *Environ Technol.* **36**(9-12):1477-1488.
- Ahlford, K. (2008) Tesis: Environmental risk assessment of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) fluoxetine, citalopram, sertraline, paroxetine and the benzodiazepine oxazepam. 1-48.
- Al-Rifai, J., Gabelish, C. y Schafer, A. (2007) Occurrence of pharmaceutically active and non-steroidal estrogenic compounds in three different wastewater recycling schemes in Australia. *Chemosphere.* **69**(5), 803-815.
- Banco Mundial Data Bank en: [datos.bancomundial.org/indicador/SP.POP.TOTL](http://datos.bancomundial.org/indicador/SP.POP.TOTL)
- Batt, A.L., Kostich, M.S. y Lazorchak, J.M. (2008) Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **80**(13), 5021–5030.
- Baker, D.R. y Kasprzyk-Hordern, B. (2011) Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* **1218**(12), 1620-1631.
- Baker, D.R. y Kasprzyk-Hordern, B. (2013) Spatial and temporal occurrence of the pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments. *Sci Total. Envir.* **454-455**, 442-456.
- Barry, M.J. (2013) Effects of fluoxetine on the swimming and behavioural responses of the Arabian killifish. *Ecotoxicology.* **22**(2), 425–432.
- Bedner, M. y MacCrehan, W. (2006) Reactions of the amine- containing drugs fluoxetine and metoprolol during chlorination and dechlorination processes used in wastewater treatment. *Chemosphere.* **66**(1), 2130-2137.
- Benotti, M.J., Stanford, B.D., Wert, E.C. y Snyder, S.A. (2009) Evaluation of a photocatalytic reactor membrane pilot system for the removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds from water. *Water Res.* **43**(1), 1513-1522.
- Black, M.C., Armbrust, K.L., Henry, T. B. y Kwon, J.W. (2005) Progress Report: The environmental, occurrence, fate and ecotoxicity of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in aquatic environments. EPA Project. Disponible en: [https://cfpub.epa.gov/ncer\\_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.highlight/abstract/1755/report/2004](https://cfpub.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.highlight/abstract/1755/report/2004)
- Blaise, C., Forget, G. y Trottier, S. (2000) Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-hour exposure *Selenastrum capricornutum* Assay, *Environmental Toxicology* **15**, 352-359.
- Bostrom, M.L., Ugge, G., Jonsson, J.A. y Berglund, O. (2016) Bioaccumulation and trophodynamics of the antidepressants sertraline and fluoxetine in laboratory-constructed, 3-level aquatic food chains. *Environ. Toxicol. Chem.* **34**(4), 1029-1037.
- Bound, J.P. y Voulvoulis, N. (2006) Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. *Water Res.* **40**, 2885-2892.
- Boxxal, A.B.A., Kolpin, D.W., Halling-Sorensen, B. y Tolls, J. (2003) Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ. Sci. Technol.* **37**(15), 287-294.
- Bringolf, R.B., Heltsley, R.M., Newton, T.J., Eads, C.B., Fraley, S.J., Shea, D. y Cope, W.G. (2010) Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. *Environ. Toxicol. Chem.* **29**(6), 1311-1318.

- Brooks, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J.J., Glidewell, E.A., Foran, C.M., Slattery, M., La Point, T.W. y Hugget, D.B. (2003) Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere* **52**(1), 135–142.
- Brooks, B.W., Chambliss, C.K., Stanley, J.K., Ramírez, A., Banks, K.E., Johnson, R.D. y Lewis RJ. (2005) Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ Toxicol Chem.* **24**(2), 464–469.
- Brown, A.K., Challis, J.K., Wong, C.S. y Hanson, M. (2015) Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and B-blocker transformation products may not pose a significant risk of toxicity to aquatic organisms in wastewater effluent-dominated receiving waters. *Integrated Environmental Assessment and Management.* **11**(4), 618-639.
- Brunswick, D.J., Amsterdam, J.D., Fawcett, J., Quitkin, F.M., Reimherr, F.W., Rosenbaum, J.F. y Beasley Jr, C.M. (2002) Fluoxetine and norfluoxetine plasma concentrations during relapse-prevention treatment. *J Affect Disord.* **68**(2-3), 243–249.
- Campos, B., Piña, B. y Barata, C. (2012) Mechanisms of action of selective serotonin reuptake inhibitors in *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* **46**(5), 2943–2950.
- Carter, L.J., Garman, C.D., Ryan, J., Dowle, A., Bergstrom, E.D., Thomas-Oates. (2014) Fate and Uptake of Pharmaceuticals in Soil–Earthworm Systems. *Environ Sci Technol.* **48**(10), 5955–5963.
- Castro, L., Baños, M.I., López, M.A. y Torres. B.L. (2015) Ecofarmacovigilancia en México: perspectivas para su implementación. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **46**(3), 16-40.
- Chávez-León, E., Ontiveros-Uribe, M.P. y Serrano-Gómez, C. (2008) Los antidepresivos inhibidores selectivos de recaptura de serotonina (ISRS, ISR-5HT). *Salud Mental.* **31**, 307-319.
- Christensen, A.M., Faaborg-Andersen, S., Ingerslev, F. y Baun, A. (2000) Mixture and single-substance toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors toward algae and crustaceans. *Environ. Toxicol. Chem.* **26**(1), 85-91.
- Chu, S. y Metcalfe, C.D. (2007) 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.* **1163**(1-2), 112-118.
- Crossland, N.O. y Hillaby, J.M. (1985) Fate and effects of 3-4-dichloroaniline in the laboratory and in outdoor ponds. II. Chronic toxicity to *Daphnia* spp., and other invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* **4**, 489-499.
- Dorota Bednarek, Juan Manuel González-Rosa, Gabriela Guzmán-Martínez, Óscar Gutiérrez-Gutiérrez, Tania Aguado, Carlota Sánchez-Ferrer, Inês João Marques, María Galardi-Castilla, Irene de Diego, Manuel José Gómez, Alfonso Cortés, Agustín Zapata, Luis Jesús Jiménez-Borreguero, Nadia Mercader, Ignacio Flores. ‘Telomerase Is Essential for Zebrafish Heart Regeneration’. *Cell Reports.* **12** (10), 1691-1703.
- Estrada, E.B., Cortés, J.E., González, A., Calderón, C.G., Rivera, M., Ramírez, E., Montellano, L., Gelover, S.L., Pérez, S., Cardoso, L., Martín, A. Y García, L. (2016) Assessment of full-scale biological nutrient removal systems upgraded with physico-chemical processes for the removal of emerging pollutants present in wastewaters from Mexico. . *Sci Total Environ.* **571**, 1172-1182.
- Eurobarometer (2010) Mental Health Part 1. Report. **345**, (73.2), 1-64.
- Evans, S.E., Davies, P., Lubben, A. y Kasprzyk- Horden. B. (2015) Determination of chiral pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and sludge using microwave assisted extraction, solid-phase extraction and chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **882**, 112-126.

- Fent, K., Weston, A.A. y Caminada, D. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* **76**(2), 122-159.
- Fernández. C., González- Doncel, M., Pro, J., Carbonell, G. y Tarazona, J.V. (2010) Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the henares-jarama-tajo river system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. *Sci Total Environ.* **408**(3), 543–551.
- Fitzmayer, L.M., Geiger, J.G. y Avyle, M.J.V.D. (1982) Effects of chronic exposure to simazine on the cladoceran, *Daphnia pulex*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **11**, 603-609.
- Flaherty, C.M. y Dodson, S.I. (2005) Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* **61**(2), 200–207.
- Flores-Velázquez, Y. y Mijaylova-Nacheva, P. (2017) Removal of pharmaceuticals from wastewater by aerated submerged attached growth reactors. *J Environ Manage.* **192**, 243-253.
- Fong, P.P. (1998) Zebra Mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biological Bulletin.* **194**(2), 143-149.
- Foran, C.M., Weston, J., Slattery M., Brooks, B.W. y Hugget, D.B. (2004) Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Arch Environ Contam Toxicol.* **46**(4):511-517.
- Gaworecki, K.M. y Klaine, S.J. (2008) Behavioural and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure. *Aquat. Toxicol.* **88**, 207–213.
- Giebultowicz, J. y Nalecz-Jawecki, G. (2014) Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata Rivers and in tap water in Warsaw (Poland). *Ecotoxicol Environ Saf.* **104**, 103-9.
- Gobel, A., Thomsen, A., McArdell, C.S., Alder, A.C., Giger, W., Theib, N., Löffler, D. y Ternes, A. (2005) Extraction and determination of sulfonamides, macrolines, and trimethoprim in sewage sludge. *J Chromat. A.* **1085** (2), 179-189.
- Golovko, O., Kumar, V., Fedorova, G., Randak, T. y Grabic, R. (2014) Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines, and lipid regulators in a wastewater treatment plant. *Chemosphere.* **111**, 418-26.
- González, A.S., Catalá, M., Maroto, R.R., Gil, J.L., De Miguel, A.G. y Valcárcel, Y. (2015) Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environ Int.* **36**(2), 195-201.
- González-Rey, M., Tapie, N., Le Menach, K., Dévier, M.H., Budzinski, H. y Bebianno, M.J. (2015) Occurrence of pharmaceutical compounds and pesticides in aquatic systems. *Marine Pollution Bulletin.* **96**(1-2), 384-400.
- Gómez J, Petrovic M, Fernández-Alba A and Barceló D. (2006) Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography– tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *J Chromat. A.* **1114**(2), 224-233.
- Grabicova, K., Grabic, R., Blaha, M., Kumar, V., Cervený, D., Fedorova, G. y Randak, T. (2014) Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. *Water Res.* **72**, 145-153.
- Gross, M., Petrovic, M., y Barceló D. (2009) Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Anal. Chem.* 2009, **81**(3), 898–912.
- Gu, M.D., Dillon, C.F. y Burt, V.L. (2010) Prescription drug use continues to increase: U.S. Prescription drug data for 2007-2008. *NCHS Data brief.* **42**, 1-8.

- Gust, M., Olive, C., Bulete, A., Buronfosse, T. y Garric, J. (2013) Fluoxetine accumulation and metabolism as exposure biomarker to better understand biological effects in gastropods. *Journal of Xenobiotics*. **1**, 8-10.
- Hansen, L.K., Frost, P.C., Larson, J.H. y Metcalfe, C.G. (2008) Poor elemental food quality reduces the toxicity of fluoxetine on *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* **86**(1), 99–103.
- Hedgespeth, M.L., Nilsson, P.A. y Berglund, O. (2014) Ecological implications of altered fish foraging after exposure to an antidepressant pharmaceutical. *Aquat. Toxicol.* **151**, 84–87.
- Henry, T.B., Kwon, J.W., Armbrust, K.L. y Black, M.C. (2004) Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**(9), 2229-2233.
- Hollet, H., Keiter, S., König, N. Rudolf, M., Ulrich, M. y Braunbeck T. (2003) A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Soils Sediments*. **3**, 197-207.
- Homem, V. y Santos, L. (2011) Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices- A review. *Journal of the environmental management*. **92**(1), 2304-2347.
- Huerta-Fontela, M., Galceran, M.T. y Ventura, Francesc. (2011) Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Res.* **45**, 1432-1442.
- Instituto Nacional de Ecología (INE) (2008) Diagnóstico de contaminantes orgánicos persistentes (COP) en el Valle del Yaquí. Reporte Final Disponible en : [http://www.inecc.gob.mx/descargas/sqre/2008\\_rep\\_final\\_cop\\_yaqui.pdf](http://www.inecc.gob.mx/descargas/sqre/2008_rep_final_cop_yaqui.pdf)
- ISO 11348-2 Water quality Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 2: Method using liquid-dried bacteria.
- Jakimska, A., Sliwka, K.M., Nagorski, P., Kot, W.A. y Namiesnik, J. (2014) Environmental fate of two psychiatric drugs, diazepam and sertraline: phototransformation and investigation of their photoproducts in natural waters. *J. Chromatogr.* **5**(6), 1-12-
- Johnson, D.J., Sanderson, H., Brain, R.A., Wilson, C.J. y Solomon, K.R. (2007) Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. *Ecotoxicol Environ Saf.* **67**(1), 128-139.
- Kim, S.D., Cho, J., Kim, I.S., Vanderford, B. y Snyder, S.A. (2007) Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptor in South Korean surface, drinking, and waste water. *Water Res.* **41**(5), 1013-1021.
- Kinney, C.A., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Burkhardt, M.R., Cahill, J.D., y Jørgensen G.R. (2006) Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application. *Environ. Sci. Technol.* **40**(23), 7207-7215.
- Khan, I.A., Thomas, P., (1992) Stimulatory effects of serotonin on maturational gonadotropin release in the Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*. *Gen Comp Endocrinol.* **88**(3), 388-396.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. y Buxton, H.T. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol.* **36**(18), 1202-1211.
- Kosjek, T. y Heath, E. (2010) Tools for evaluating selective serotonin re-uptake inhibitor residues as environmental contaminants. *Trends in Analytical Chemistry*, **29**(8), 832-847.
- Kwon, J.W. y Armbrust, K.L. (2006) Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environ Toxicol Chem.* **25**(10), 2561-2568.
- Krona, J. (2017) Evaluation of a bark adsorbent for removal of pharmaceuticals from wastewater. (Tesis) Uppsala Uiversitet. Disponible en: [http://www.w-program.nu/filer/exjobb/Johanna\\_Krona.pdf](http://www.w-program.nu/filer/exjobb/Johanna_Krona.pdf)

- Kreke, N., y Dietrich, D.R. (2008) Physiological endpoints for potential SSRI interactions in fish. *Crit Rev Toxicol.* **38**(3), 215-47.
- Lahti, M. (2012) The fate aspects of pharmaceuticals in the environment. Biotransformation, sedimentation and exposure of fish. Department of Biological and Environmental Science, University of Jyväskylä. ISBN 978-951-39-4729-3
- Lajeunesse, A., Gagnon, C., y Sauvé S. (2008) Determination of basic antidepressants and their N-Desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid- phase extraction and liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **80**(14), 5325-5333.
- Lajeunesse, A., Smyth S.A., Barclay, K., Sauvé, S. y Gagnon, C. (2012) Distribution of the antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. *Water Res.* **46**(17), 5600-5612.
- Lajeunesse, A., Blais, M., Barbeau, B., Sauvé, S. y Gagnon, C. (2013) Ozone oxidation of antidepressants in wastewater- treatment evaluation and characterization of new by-products by LC-QToFMS. *Chem Cent J.* **7**(1), 7-15.
- Lam, D., Gorman, D.A., Patter, S. y Pringsheim, T. (2013) The pharmacoepidemiology of selective serotonin reuptake inhibitors for children and adolescents in Canada from 2005 to 2009: a database analysis. *Pediatr Drugs.* **15**(4), 319-327.
- Lamas, J.P., Salgado-Petinal, C., García-Jares, C., Llompарт, M., Cela, R. y Gómez, M. (2004) Solid-phase microextraction –gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of the selective serotonin reuptake inhibitors in environmental water. *J. Chromatogr. A* **1046**(1-2), 241-247.
- Leeuwen, C.J.V., Rijkboer, M. y Niebeek, G. (1986) Population dynamics of *Daphnia magna* as modified by chronic bromide stress. *Hydrobiologia.* **133**, 277-285.
- Leclercq, M., Mathieu, O., Gómez, E., Casellas, C., Fenet, H. y Hillairie-Buys, D. (2009) Presence and fate of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites at wastewater treatment plants. *Arch Environ Contam Toxicol.* **56**(3), 408-415.
- Lewis, K.E. y Eisen. J.S. (2003) From cells to circuits: development of the zebrafish spinal cord. *Prog Neurobiol.* **69**(1):419-449.
- Lin, C.C., Hui, M.N. y Cheng, S.H. (2007) Toxicity and cardiac effects of carbaryl in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Toxicol Appl Pharmacol.* **222**(2):159-68.
- Lishman, L., Smyth, S.A., Sarafin, K., Kleyweg, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Servos, M., Beland, M. y Seto, P. (2006) Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogen by municipal wastewater treatment plants in Ontario Canada. *Sci. Total. Environ.* **367**(2-3), 544-558.
- Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J. y Van Der Kraak, G. (2009) Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic evaluation. *Aquat Toxicol.* **95**(4), 320-329.
- Luna, T.O., Plautz, S.C. y Salice, C.J. (2015) Chronic effects of 17- $\alpha$ -ethinylestradiol, fluoxetine and the mixture on individual and population- level end points in *Daphnia magna*. *Arch Environ Contam Toxicol.* **68**(4), 603-611.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D. y Hai, F.I. (2014) A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total. Environ.* **473-474**, 619-641.
- McCollum, M., Ducharme, N.A., Bondesson, M. y Gustafsson, J.A. (2011) Developmental toxicity screening in zebrafish. Birth defects Res C Embryo Today. *Discov Today*, **13**(9-10), 394-401.

- McDonald, M.D., González, A. y Sloman, K.A. (2011) Higher levels of aggression are observed in socially dominant toadfish treated with the selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **153**(1), 107–112.
- McGrath Patricia 2012. *Zebrafish: Methods for Assessing Drug Safety and Toxicity*, John Wiley & Sons, Inc. ISBN 9780470425138, pag. 326.
- MacLeod, S.L., Sudhir, P. y Wong, C.S. (2007) Stereoisomer analysis of wastewater-derived B-blockers, selective serotonin re-uptake inhibitors, and salbutamol by high-performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1170**(1), 23–33.
- Magalhaes-Nunes, A.P., Badaue-Passos, D., Rizo-Ventura, R., Da Silva-Guedes, D., Pereira-Araujo, J., Camargo-Granadeiro, P., Milanez-Barbosa, H.K., Da Costa-Sousa, R.H., De Medeiros, M.A., Antunes-Rodrigues, J. y Reis, L.C. (2007) Sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, affects thirst, salt appetite and plasma levels of oxytocin and vasopressin in rats. *Exp Physiol*, **92**(5), 13–922.
- Martínez-Bueno, M.J., Agüera, A., Gomez, M.J., Hernando, M.D., Garcia-Reyes, J.F. y Fernández-Alba, A.R. (2007) Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Anal. Chem.*, **79**(24), 9372-9384.
- Mendez- Arriaga, F., Otsum T., Oyama, T., Gimenez, J., Esplugas, S., Hidaka, H. y Serpone, N. (2011) Photooxidation of antidepressant drug Fluoxetine (Prozac) in aqueous media by hibrid catalytic/ozonition processes. *Water Res.* **45**(1). 2782-2794.
- Menningen, J.A., Stroud, P., Zamora, J.M., Moon, T.W. and Trudeau, V.L. (2011) Pharmaceuticals as neuroendocrine disruptors: Lessons learned from fish on Prozac. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.*, **14** (5-7), 387-412.
- Minagh, E., Hernan, R., o'Rourke, K., Lyng, F.M. y Davoren, M. (2009) Aquatic ecotoxicity of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride in a battery of freshwater test species. *Ecotoxicol Environ Saf.* **72**(2), 434-40.
- Metcalf, C.D., Miao, X.D., Koenig, B.G., y Struger, D. (2003) Distribution of acidic and neutral drugs in Surface waters near sewage treatment plants in the lower great lakes, Canada. *Environ Toxicol Chem.* , **22**(12):2881-9.
- Metcalf, C.D., Chu, S., Judt, C., Li, H., Oakes, K.D., Servos, M.R. y Andrews, D.M. (2010) Antidepressant and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environ Toxicol Chem.* **29**(1), 79-89.
- Mínguez, L., Di Poi, C., Farcy, E., Ballandonne, C., Benchouala, A., Bojic, C., Cossu-Leguille, C., Costil, K., Serpentine, A., Lebel, J-M. & Halm-Lemeille, M-P. (2014) Comparison of the sensitivity of seven marine and fresh water bioassays as regard antidepressant toxicity assessment. *Ecotoxicol.* **23**(9), 1744-1754.
- Moens, C.B. y Prince, V.E.(2002) Constructing the hindbrain: insights from the zebrafish. *Dev Dyn* **224**(1) ,1–17.
- Morando, M.B., Medeiros, L.R., McDonald, M.D., (2009) Fluoxetine treatment affects nitrogen waste excretion and osmoregulation in a marine teleost fish. *Aquat Toxicol.* **93**(4), 253–260.
- Mossner, R. y Lesch, K.P. (1998) Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun.* **12**(4), 249-71.
- Muncke J1, Eggen RI. 2006. Vitellogenin 1 mRNA as an early molecular biomarker for endocrine disruption in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem.* **25**(10):2734-41.



- Nilsson, S. y Sundin, L. (1998) Gill blood flow control. *Comp. Bioche Physiol.* **119**, 137-147.
- Nentwig, G. (2007) Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: The antidepressant drug fluoxetine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **52**, 163–170.
- Neuwoehner, J., Fenner, K. y Escher, B.I. (2009) Physiological modes of action fluoxetine and its human metabolites in algae. *Environ. Sci. Technol.* **43**(17), 6830–6837.
- NMX-AA-087-SCFI-2010. Análisis de agua - Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (crustacea - cladóceras) - Método de prueba. Diario Oficial de la Federación.
- Oakes, K.D., Coors, A., Escher, B.I., Fenner, K., Garric, J., Gust, M., Knacker, T., Kuster, A., Kussatz, C., Metcalfe, C.D., Monteiro, S., Moon, T.W., Menningen, J.A., Parrot, J., Péry, A.R.R., Ramil, M., Roennefahrt, I., Tarazona, J.V., Sánchez, P., Ternes, T.A., Tréau, V.L., Boucard, T., Van Der Kraak, G. y Servos, M.R. (2010) Environmental risk assessment for the serotonin re-uptake inhibitor fluoxetine: Case study using the European risk assessment framework. *Integr Environ Assess Manag.*, **6**(1), 524-539.
- Obreshkova, V., Fraser, A.W. (1940) Growth and differentiation of *Daphnia magna* eggs in vitro. *The biological bulletin*, **78**(3), 428-436.
- OECD, Guideline for Testing of Chemicals, 212. (1998) Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages.
- OECD, Guideline for Testing of Chemicals, 202. (2004) *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test.
- OECD, Guideline for Testing of Chemicals, 236. (2013) Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.
- OECD. (2015) Health at a Glance: Pharmaceutical sector. Disponible en: [http://www.oecd-ilibrary.org/sites/health\\_glance-2015-en/10/04/index.html?itemId=/content/chapter/health\\_glance-2015-68-en&mimeType=text/html](http://www.oecd-ilibrary.org/sites/health_glance-2015-en/10/04/index.html?itemId=/content/chapter/health_glance-2015-68-en&mimeType=text/html)
- OECD. (2015) Health Statistics. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1787/health-data-en>
- Otero, M.J., Santos, L., Santos, D. y Domínguez, A. (1996) Farmacocinética clínica de los Inhibidores Selectivos de La Recaptación de Serotonina. *Farm. Hosp.* **20** (2), 73-85.
- Pan, B., Ning, O. y Xing, B. (2009) Part V- Sorption of pharmaceuticals and personal care products. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **16**(1), 342-351.
- Panlilio, J.M., Marin, S., Lobl, M.B. y McDonald, M.D. (2016) Treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine, attenuates the fish hypoxia response. *Scientific Reports.* **6**(31148), 1-12.
- Park, J.W., Heah, T.P., Gouffon, J.S., Henry, T.B. y Sayler, G.S. (2012) Global gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*) exposed to selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine and sertraline) reveals unique expression profiles and potential biomarkers of exposure. *Environ Pollut.* **167**, 163-170.
- Peng, X., Yu, Y., Tang, C., Tan, J., Huang, Q. y Wang, Z. (2008) Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceuticals residues in urban riverine water of the Pearl River Delta South China. *Sci. Total. Environ.* **397**(1-3), 158-166.
- Péry, A.R.R., Gust, M., Vollat, B., Mons, R., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T. y Garric, J. (2008) Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere* **73**(3), 300-304.
- Petrie, B., Barden, R. y Kasprzyk-Hordén, B. (2015) A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* **30**, 1-25.
- Perreault, H.A.N., Semsar, K., Godwin, J., (2003) Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiol. Behav.* **79**(4-5), 719–724.

- Pica-Granados, Y., Trujillo-Domínguez, G., Hernández- Salgado, H. y Rosales-Espinoza, K. (2012) Informe final. Herramientas biológicas para el análisis de toxicidad y detección de efectos asociados a contaminantes, en sistemas acuáticos epicontinentales, costeros y aguas de uso antropogénico. (2da parte). Desarrollo, adaptación y calibración de tecnologías. Disponible en: <http://repositorio.imta.mx:8080/cenca-repositorio/bitstream/123456789/1389/1/TC-1209.1.pdf>
- PubChem database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)
- Rahman, M.A., Iqbal, Z., Mirza, M.A. y Hussain, A. (2012) Estimation of sertraline by chromatographic (HPLC-UV) technique under hydrolytic stress conditions. *Pharm Methods* **3**(2), 62-67.
- Redshaw, C.H., Cooke, M.P., Talbot, H.M., McGrath, S. y Rowland, S.J. (2008) Low biodegradability of fluoxetine HCl, diazepam and their human metabolites in sewage sludge-amended soil. *J Soils Sediments*. **8**,217–230.
- Reefhuis, J., Devine, O., Friedman, J.M., Louik, C. y Honein, M.A. (2015) Specific SSRIs and birth defects: Bayesian analysis to interpret new data in the context of previous reports. *BMJ*. **351**, 1-8.
- Renier, C., Faraco, J.H., Bourgin, P., Motley, T. Bonaventure, P., Rosa, F. (2007) Genomic and functional conservation of sedative-hypnotic targets in the zebrafish. *Pharmacogenet Genomics*, **17**, 237-253.
- Richards, S.M., Wilson, C.W., Johnson, D.J., Castle, D.M., Lam, M., Mabury, S.A., Sibley, P.K. y Solomon, K. (2004) Effects of pharmaceuticals in aquatic ecosystems. *Environ Toxicol Chem* **23**(4),1035-1044.
- Roex, E.W., Keijzers, R., van Gestel, C.A., (2003) Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicol*. **64**(4), 451-460.
- Salgado, R. Noronha, J.P., Oehmen, A., Carvalho, G. y Reis, A.M. (2010) Analysis of 65 pharmaceuticals and personal care products in 5 wastewater treatment plants in Portugal using a simplified analytical methodology. *Water Sci Technol*. **62**(12):2862-71.
- Sang K., Jaeweon, C., In, K., Brett, V. y Shane S. (2007) Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Res*. **41**, 1013-1021.
- Santos, J.L., Aparicio, I. y Alonso, E. (2007) Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environ Intern*. **33**(4), 596-601.
- Santos, L., H., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D. y Montenegro, M.C. (2013) Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci Total Environ*. **461-462**, 302-316.
- Schlusener, M.P., Hardencriker, P., Nilson, E., Schulz, M., Viergurtz, C. y Ternes, T.A. (2015) Occurrence of venlafaxine, other antidepressants and selected metabolites in the Rhine catchment in the face of climate change. *Environmental Pollution*, **196**,247-256.
- Schultz, M.M., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L., Barber, L.B., Blazer, V.S., Norris, D.O. y Vajda, A.M. (2010) Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent- impacted streams: Occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environ. Sci. Technol*. **44**(6), 1918–1925.
- Schultz, M.M., Painter, M.M., Bartell, S.E., logye, A., Furlong, E.T., Werner, S.L. y Schoenfuss, H.L. (2011) Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant

- antidepressant pharmaceutical exposure on male fathead minnows. *Aquat Toxicol.* **104**(1-2):38-47.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M. y Imboden, D.M. (2003) *Environmental Organic Chemistry*, 2 ed. Wiley, New Jersey.
- Silva, L.J.G., Pereira, A.M.P, Meisel, L.M., Lino, C.M. y Pena, A. (2014) A one-year follow-up analysis of antidepressants in Portuguese wastewaters: Occurrence and fate, seasonal influence, and risk assessment. *Sci Total Environ.* **490**, 279-87.
- Stahl, S. (2010). Antidepressivos. En S. Stahl, *Psicofarmacología esencial de Stahl*, Madrid: Grupo aula médica, 511-666.
- Sponberg, A. y Witter, J. (2008) Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. . *Sci Total. Envir.* **397**(1-3), 148-157.
- Styrishave, B., Halling-Sorensen, B. y Ingerslev, F. (2010) Environmental risk assessment of three selective serotonin reuptake inhibitors in the aquatic environment: A case study including a cocktail scenario. *Environ Toxicol Chem.* **30**(1):254-261.
- Subedi, B. y Kannan, K. (2015) Occurrence and fate of select psychoactive pharmaceuticals and antihypertensives in two wastewater treatment plants in New York State, USA. *Sci Total. Envir.* **514** (1), 273-280.
- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Ding Q.T., Clément, M., y Chevreuil, M. (2008) Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Sci Total Environ.* **393**(1), 84-95.
- Tarcomnicu, I., Van Nuijs, A.L.N., Simons, W., Bervoets, L., Blust, R., Jorens, P.G., Neels, H. y Covaci, A. (2011) Simultaneous determination of 15 top-prescribed pharmaceuticals and their metabolites in influent wastewater by reversed-phase liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta* **83**(3), 795–803.
- Thomas, K., Dye, C., Schlabach, M. y Langford K. (2007) Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works. *J Environ Monit.* **9**(12), 1410-1418.
- Threlkeld, S.T. (1979) Estimating cladoceran birth rates. Importance of egg mortality and the eggs age distribution. *Limnol.* **22**(1), 3083-3087.
- Tolls. J. (2001) Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environ.Sci. Technol.* **35**, 3397-3406.
- Toxnet. Toxicology Data Network. U.S. National Library of Medicine. Disponible en: <https://toxnet.nlm.nih.gov/>
- USEPA U.S. Environmental Protection Agency. (1996), Ecological Effects Test Guidelines: OPPTS 850.1075 Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and Marine EPA 712-C-96-118, April 1996. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- Uslu, M.O., Feisal-Rahman, M., Jasim, S.Y., Yanful, E.K. y Biswas, N. (2012) Evaluation of the reactivity of organic pollutants during O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process. *Water Air Soil Pollut.* **223**(1),3173-3180.
- Vanderford, B.J. y Snyder, S.A. (2006) Analysis of pharmaceuticals in water by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **40**(23), 7312-732.
- Vasskog, T., Berger, U., Samuelsen, P.J., Kallenborn, R., y Jensen, E. (2006) Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromso, Norway. *J. Chromatogr. A.* **1115**(1-2), 187–195.
- Vasskog, T., Anderssen, T., Pedersen-Bjergaard S., Kallenborn, R. y Jensen, E. (2008) Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. *J. Chromatogr. A.* **1185**(2), 194–205.
- Verlicchi, P., Aukidy, M.A. y Zambello, E. (2012) Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment- A review. *Sci Total Environ.* **429**, 123-55.

- Weinberger II, J. y Klaper, R. (2014) Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). *Aquat Toxicol.* **151**, 77-83.
- Williams, G.V., Rao, S.G. y Goldman-Rakic, P.S. (2002) The physiological role of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in working memory. *J Neurosci.* **22**(7), 2843–2854,
- Wilson, S.W., Brand, M. y Eisen, J.S. (2002) Patterning the zebrafish central nervous system. *Results Probl Cell Differ*, **40**(1), 181–215.
- Writer, J.H., Ferrer, I., Barber, L.B. y Thurman, E.M. (2013) Widespread occurrence of the neuro-active pharmaceuticals and metabolites in 24 Minnesota rivers and wastewaters. *Sci Total. Envir.* **461-462**, 519-527.
- Wu, C., Spongber, A.L., Witter, J.D., Fang, M., Czajkowski, K.P. y Ames, A. (2010) Dissipation and leaching potential of selected pharmaceutically active compounds in soil amended with biosolids. *Arch. Environ Contam Toxicol.* **59**, 343-351.
- Yu, K.L. Rosenblum, P.M. y Peter, R.E. (1991) In vitro release of gonadotropin-releasing hormone from the brain preoptic-anterior hypothalamic region and pituitary of female goldfish. *Gen Comp Endocrinol.* **81**(2), 256-267.
- Yuce-Artun, N., Ozel-Kizil, E.T., Baskak, B., Ozguven, H.D., Duyce, Y. y Suzen, S. (2015) Determination of sertraline and its metabolite by high pressure liquid chromatography in plasma. *Rev. Roum. Chum.* **60**(5-6), 543-548.

## 7.- ANEXOS

### Resultados

Variación del efecto de inhibición de la bioluminiscencia en función del tiempo. *Fluoxetina*

Fluoxetina		Tiempo										
		5 min	15 min	30min	45min	60min	75min	90min	105min	120min	135min	150min
mg L <sup>-1</sup>	Control	94.0	88.5	73.0	62.0	58.0	53.0	46.5	42.5	40.0	37.5	37.5
	6.35	7.4	11.9	5.5	-3.2	0.0	-1.9	-9.7	-10.6	-15.0	-12.0	-6.7
	12.5	12.8	17.5	11.0	6.5	12.1	9.4	5.4	1.2	5.0	4.0	9.3
	50	17.0	24.3	20.5	14.5	17.2	17.0	9.7	10.6	12.5	9.3	12.0
	100	26.6	36.7	35.6	32.3	36.2	35.8	31.2	29.4	32.5	33.3	36.0
	200	45.7	59.3	64.4	66.1	69.0	69.8	72.0	71.8	72.5	73.3	76.0
	CE <sub>50</sub>	297.8	159.3	141.3	141.5	129.8	128.9	134.9	136.6	131.1	131.1	123.2

Variación del efecto de inhibición de la bioluminiscencia en función del tiempo. *Sertralina*

Sertralina		Tiempo										
		5 min	15 min	30min	45min	60min	75min	90min	105min	120min	135min	150min
mg L <sup>-1</sup>	Control	94	88.5	73	62	58	53	46.5	42.5	40	37.5	37.5
	0.635	5.32	9.60	10.96	1.61	3.45	5.66	1.08	-1.18	0.00	-1.33	4.00
	12.5	8.51	17.51	10.96	8.06	10.34	9.43	5.38	8.24	10.00	9.33	12.00
	2.5	22.34	33.33	34.25	35.48	37.93	37.74	35.48	36.47	37.50	38.67	38.67
	5	35.11	49.15	50.68	51.61	55.17	56.60	56.99	55.29	57.50	57.33	60.00
	10	53.19	68.36	73.97	77.42	79.31	81.13	80.65	81.18	82.50	84.00	84.00
	CE <sub>50</sub>	8.95	4.94	4.35	4.22	3.85	3.77	3.90	3.90	3.72	3.64	3.54

Prueba de sinergia de la mezcla de Fluoxetina y Sertralina. Variación del efecto de inhibición de la bioluminiscencia en función del tiempo. Resultados obtenidos para detectar el cambio de la CE<sub>50</sub> de la Fluoxetina

FLUOXETINA		Tiempo										
(Mezcla)		5 min	15 min	30min	45min	60min	75min	90min	105min	120min	135min	150min
mg L <sup>-1</sup>	Control	93	88.5	73	62	58	53	46.5	42.5	40	37.5	37.5
	11.25	9.68	17.51	12.33	4.84	6.90	5.66	-3.23	-5.88	-5.00	-9.33	-6.67
	22.5	19.35	28.81	26.03	19.35	18.97	18.87	13.98	12.94	17.50	14.67	20.00
	45	21.51	31.07	28.77	24.19	25.86	28.30	22.58	20.00	25.00	22.67	28.00
	90	38.71	50.28	52.05	56.45	58.62	60.38	59.14	60.00	65.00	62.67	65.33
	180	61.29	71.75	75.34	79.03	81.03	83.02	82.80	85.88	87.50	89.33	89.33
	CE50	132.71	80.03	78.95	82.49	78.25	73.90	79.70	79.47	71.97	74.20	68.78

Prueba de sinergia de la mezcla de Fluoxetina y Sertralina. Variación del efecto de inhibición de la bioluminiscencia en función del tiempo. Resultados obtenidos para detectar el cambio de la CE<sub>50</sub> de la Sertralina

SERTRALINA		Tiempo										
(Mezcla)		5 min	15 min	30min	45min	60min	75min	90min	105min	120min	135min	150min
mg L <sup>-1</sup>	Control	93.0	88.5	73.0	62.0	58.0	53.0	46.5	42.5	40.0	37.5	37.5
	0.625	9.68	17.51	12.33	4.84	6.90	5.66	-3.23	-5.88	-5.00	-9.33	-6.67
	1.25	19.35	28.81	26.03	19.35	18.97	18.87	13.98	12.94	17.50	14.67	20.00
	2.5	21.51	31.07	28.77	24.19	25.86	28.30	22.58	20.00	25.00	22.67	28.00
	5	38.71	50.28	52.05	56.45	58.62	60.38	59.14	60.00	65.00	62.67	65.33
	10	61.29	71.75	75.34	79.03	81.03	83.02	82.80	85.88	87.50	89.33	89.33
	CE50	7.4	4.5	4.6	4.4	4.1	3.9	4.4	4.4	4.0	4.1	3.8

### 7.1.2 Prueba con *Pseudokirchneriella subcapitata*

**Resultados.** Densidad algal de *Pseudokirchneriella subcapitata*, porcentaje de inhibición y cálculo de la  $CI_{50-72h}$

<b>Fluoxetina</b>								
Concentraciones de prueba $\mu\text{g L}^{-1}$	Eventos de análisis						$\bar{x}$ Densidad algal	$\bar{x}$ Inhibición (%)
	1		2		3			
	Densidad algal	Inhibición (%)	Densidad algal	Inhibición (%)	Densidad algal	Inhibición (%)		
Control	219.67	0.00	176.33	0.00	202.33	0.00	119.67	0.00
0.05	221.00	-0.61	175.00	0.76	199.67	1.32	119.16	0.49
0.10	209.33	4.70	172.67	2.08	199.00	1.65	117.56	2.81
0.20	192.00	12.59	162.33	7.94	190.00	6.10	112.97	8.88
0.40	187.00	14.87	159.67	9.45	191.00	5.60	112.40	9.97
0.50	182.00	17.15	154.00	12.67	188.33	6.92	110.83	12.24
0.75	179.00	18.51	146.33	17.01	177.67	12.19	107.71	15.91
1	179.67	18.21	139.33	20.98	165.33	18.29	104.71	19.16
2	172.00	21.70	133.67	24.20	152.00	24.88	100.71	23.59
10	150.33	31.56	125.33	28.92	141.33	30.15	95.50	30.21
100	131.67	40.06	118.67	32.70	131.67	34.93	90.95	35.90
250	121.00	44.92	112.67	36.11	123.67	38.88	87.67	39.97
500	19.00	91.35	9.33	94.71	14.67	92.75	45.81	92.94
750	1.33	99.39	2.67	98.49	1.00	99.51	40.58	99.13
<b><math>CI_{50}</math> (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>	<b>0.027</b>		<b>0.026</b>		<b>0.025</b>		<b>0.026</b>	
<b><math>\sigma</math></b>	<b>0.001</b>							
<b>Cv</b>	<b>0.039</b>							

<b>Sertralina</b>								
Concentraciones de prueba $\mu\text{g L}^{-1}$	Eventos de análisis						$\bar{x}$ Densidad algal	$\bar{x}$ Inhibición (%)
	1		2		3			
	Densidad algal	Inhibición (%)	Densidad algal	Inhibición (%)	Densidad algal	Inhibición (%)		
Control	93.33	0.00	185.00	0.00	217.00	0.00	165.11	0.00
0.05	88.67	5.00	176.33	4.68	211.67	2.46	158.89	4.05
0.1	86.33	7.50	171.67	7.21	206.33	4.92	154.78	6.54
0.2	79.33	15.00	164.33	11.17	204.67	5.68	149.44	10.62
0.4	77.33	17.14	161.00	12.97	196.00	9.68	144.78	13.26
0.5	71.00	23.93	158.67	14.23	186.33	14.13	138.67	17.43
0.75	62.67	32.86	157.33	14.95	194.67	10.29	138.22	19.37
1	59.33	36.43	144.00	22.16	171.00	21.20	124.78	26.60
2	57.67	38.21	146.00	21.08	164.33	24.27	122.67	27.86
10	57.33	38.57	126.67	31.53	142.67	34.25	108.89	34.79
25	56.67	39.29	115.67	37.48	127.00	41.47	99.78	39.41
50	30.33	67.50	47.00	74.59	32.00	85.25	36.44	75.78
75	20.00	78.57	20.67	88.83	14.33	93.39	18.33	86.93
100	11.33	87.86	9.00	95.14	7.67	96.47	9.33	93.15
750	1.00	98.93	0.33	99.82	2.00	99.08	1.11	99.28
<b><math>CI_{50}</math> (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>	<b>0.033</b>		<b>0.031</b>		<b>0.028</b>		<b>0.030</b>	
<b><math>\sigma</math></b>	<b>0.003</b>							
<b>Cv</b>	<b>0.082</b>							

### 7.1.3 Prueba con *Daphnia magna*



**Resultados.** Mortalidad de *Daphnia magna* y cálculo de la  $CL_{50-48h}$

<b>FLUOXETINA</b>		<b>Número de organismos muertos por evento</b>		
		<b>Eventos de análisis</b>		
<b>Concentraciones de prueba</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
mg L <sup>-1</sup>	Control	0	0	0
	19	6	5	6
	20	7	10	8
	20.5	15	11	15
	21	16	16	15
	21.5	19	20	19
	22	20	22	21
	23	20	22	21
	<b>CL<sub>50</sub></b>	21.097	20.811	20.040
<b><math>\bar{x}</math></b>		<b>20.650</b>		
<b><math>\sigma</math></b>		<b>0.554</b>		
<b>Cv</b>		<b>0.02</b>		

<b>SERTRALINA</b>		<b>Número de organismos muertos por evento</b>		
		<b>Eventos de análisis</b>		
<b>Concentraciones de prueba</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
mg L <sup>-1</sup>	Control	0	0	0
	2	2	0	0
	3	6	3	3
	3.5	11	7	3
	4	14	10	14
	4.5	14	14	16
	5	15	17	17
	6	20	21	19
	<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>4.96</b>	<b>4.67</b>	<b>4.31</b>
<b><math>\bar{x}</math></b>		<b>4.647</b>		
<b><math>\sigma</math></b>		<b>0.325</b>		
<b>Cv</b>		<b>0.07</b>		

#### 7.1.4 Prueba con *Danio rerio*

Resultados. Mortalidad (%) de *Danio rerio* y cálculo de la CL<sub>50-48h</sub>

<b>FLUOXETINA</b>		<b>Número de organismos muertos por evento</b>		
<b>Concentraciones de prueba</b>	<b>Eventos de análisis</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
Control	0	0	0	
3 500	10	11	10	
4 000	13	15	13	
4 500	16	17	16	
5 000	17	18	17	
5 500	20	21	22	
CL <sub>50</sub>	<b>4359.42</b>	<b>4161.76</b>	<b>4255.43</b>	
<b>x</b>	<b>4258.87</b>			
<b>σ</b>	<b>98.87</b>			
<b>Cv</b>	<b>2.32E<sup>-02</sup></b>			

<b>SERTRALINA</b>		<b>Número de organismos muertos por evento</b>		
<b>Concentraciones de prueba</b>	<b>Eventos</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
Control	0	0	0	
550	3	2	2	
600	10	13	13	
650	14	16	16	
700	29	28	28	
CL <sub>5</sub>	<b>614</b>	<b>614</b>	<b>613.981</b>	
<b>x</b>	<b>613.99</b>			
<b>σ</b>	<b>0.01</b>			
<b>Cv</b>	<b>1.79E<sup>-05</sup></b>			

## **7.2** Indicadores de efecto de cronicidad

### *7.2.1 Daphnia magna*

*Resultados. Indicadores de efecto de cronicidad con Daphnia magna*

*Indicador: Edad de madurez sexual (edad en días)*

FLUOXETINA	Eventos de análisis									Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación.	Varianza
	1			2			3						
	a	b	c	a	b	c	a	b	c				
<b>Control</b>	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9.00	0.00	0.00	0.00
<b>µg L<sup>-1</sup></b>	<b>0.05</b>	9	10	9	9	9	9	9	10	9.22	0.44	0.05	0.17
	<b>0.1</b>	10	9	10	10	9	10	9	10	9.56	0.53	0.06	0.25
	<b>0.2</b>	9	10	9	9	9	11	11	9	9.56	0.88	0.09	0.69
	<b>0.4</b>	10	9	10	10	9	9	11	9	9.67	0.71	0.07	0.44
	<b>0.5</b>	9	9	10	9	10	11	10	10	9.89	0.78	0.08	0.54
	<b>0.75</b>	10	9	9	9	9	11	10	10	9.56	0.73	0.08	0.47
	<b>1</b>	10	9	10	9	9	9	11	10	9.78	0.83	0.09	0.62
	<b>2</b>	10	9	9	10	9	9	10	11	9.56	0.73	0.08	0.47
	<b>10</b>	9	9	9	9	9	9	11	10	9.33	0.71	0.08	0.44
	<b>100</b>	9	10	9	9	9	9	9	10	9.33	0.50	0.05	0.22
	<b>750</b>	9	9	10	9	9	9	8	9	9.11	0.60	0.07	0.32
	<b>1000</b>	10	9	9	9	9	9	9	10	9.22	0.44	0.05	0.17
	<b>1500</b>	9	9	9	9	9	9	8	10	9.00	0.50	0.06	0.22
<b>2000</b>	9	9	9	9	8	9	8	9	8.67	0.50	0.06	0.22	

SERTRALINA	Eventos de análisis									Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación.	Varianza
	1			2			3						
	a	b	c	a	b	c	a	b	c				
<b>Control</b>	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9.00	0.00	0.00	0.00
<b>µg L<sup>-1</sup></b>	<b>0.05</b>	10	11	10	11	10	10	10	10	10.33	0.50	0.05	0.22
	<b>0.1</b>	10	11	11	10	10	11	10	10	10.44	0.53	0.05	0.25
	<b>0.2</b>	10	10	10	11	10	9	10	9	10.00	0.71	0.07	0.44
	<b>0.4</b>	10	9	10	10	10	9	10	9	9.67	0.50	0.05	0.22
	<b>0.5</b>	9	10	9	10	10	10	9	10	9.56	0.53	0.06	0.25
	<b>0.75</b>	10	10	9	9	11	9	10	10	9.67	0.71	0.07	0.44
	<b>1</b>	10	10	9	10	9	9	9	9	9.44	0.53	0.06	0.25
	<b>2</b>	10	9	10	9	9	11	9	9	9.44	0.73	0.08	0.47
	<b>10</b>	10	10	10	9	10	9	9	10	9.56	0.53	0.06	0.25
	<b>100</b>	10	10	10	9	9	9	9	9	9.44	0.53	0.06	0.25
	<b>750</b>	10	10	10	9	9	9	10	9	9.44	0.53	0.06	0.25
	<b>1000</b>	10	9	10	9	10	9	9	9	9.44	0.53	0.06	0.25
	<b>1500</b>	11	10	10	9	9	9	10	9	9.56	0.73	0.08	0.47
<b>2000</b>	10	10	9	9	9	9	9	9	9.22	0.44	0.05	0.17	

*Análisis estadístico para la diferencia de medias (Prueba t-student)*

*Edad de madurez sexual (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) “fluoxetina”</i>	<i>Control</i>	<i>0.05 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.44
Varianza	0	0.78
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-1.512	
P(T<=t) una cola	0.085	
Valor crítico de t (una cola)	1.860	
P(T<=t) dos colas	0.169	
Valor crítico de t (dos colas)	2.306	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) “fluoxetina”</i>	<i>Control</i>	<i>0.1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.56
Varianza	0	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-2.16	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.01	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) “fluoxetina”</i>	<i>Control</i>	<i>0.2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.56
Varianza	0	0.78
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-1.89	
P(T<=t) una cola	0.05	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.10	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Continuación edad de madurez sexual (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "fluoxetina"</i>	Control	0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$
Media	9	9.67
Varianza	0	0.50
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-2.83	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.02	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>		<b>Significativo</b>

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "fluoxetina"</i>	Control	0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$
Media	9	9.89
Varianza	0	0.61
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-3.41	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.01	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>		<b>Significativo</b>

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "fluoxetina"</i>	Control	0.75 $\mu\text{g L}^{-1}$
Media	9	9.56
Varianza	0	0.53
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-2.29	
P(T<=t) una cola	0.03	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>		<b>No significativo</b>

*Continuación edad de madurez sexual (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.78
Varianza	0	0.69
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-2.80	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.02	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.56
Varianza	0	0.53
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-2.31	
P(T<=t) una cola	0.03	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>10 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.33
Varianza	0	0.50
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-1.41	
P(T<=t) una cola	0.10	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.20	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	



*Continuación edad de madurez sexual (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) “fluoxetina”</i>	<i>Control</i>	<i>100 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.33
Varianza	0	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-2	
P(T<=t) una cola	0.04	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.08	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) “fluoxetina”</i>	<i>Control</i>	<i>750 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.11
Varianza	0	0.36
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-0.55	
P(T<=t) una cola	0.30	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.59	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) “fluoxetina”</i>	<i>Control</i>	<i>1000 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.22
Varianza	0	0.19
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-1.51	
P(T<=t) una cola	0.08	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.17	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Continuación edad de madurez sexual (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) “fluoxetina”</i>	<i>Control</i>	<i>1500 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9
Varianza	0	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	0	
P(T<=t) una cola	0.50	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	1.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) “fluoxetina”</i>	<i>Control</i>	<i>2000 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	8.66
Varianza	0	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	2	
P(T<=t) una cola	0.04	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.08	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Análisis estadístico para la diferencia de medias (Prueba t-student)*

- *Edad de madurez sexual (sertralina)*

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.05 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	10.333
Varianza	0	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-8	
P(T<=t) una cola	2.18E-05	
Valor crítico de t (una cola)	1.86E+00	
P(T<=t) dos colas	4.37E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31E+00	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	10.4444
Varianza	0	0.2778
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-8.22	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	10
Varianza	0	0.5
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-4.24	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	

**Diferencia real de medias**  
*Continuación edad de madurez sexual (sertralina)*

**Significativo**

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.4 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.67
Varianza	0	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-4	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.5 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.56
Varianza	0	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-3.16	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.01	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.75 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.67
Varianza	0	0.5
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-2.83	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.02	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

*Continuación edad de madurez sexual (sertralina)*

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.44
Varianza	0	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-2.53	
P(T<=t) una cola	0.02	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.04	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.444
Varianza	0	0.528
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-1.84	
P(T<=t) una cola	0.05	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.10	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>10 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.56
Varianza	0	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-3.16	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.01	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

*Continuación edad de madurez sexual (sertralina)*

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>100 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.44
Varianza	0	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-2.53	
P(T<=t) una cola	0.02	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.04	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>750 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.44
Varianza	0	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-2.530	
P(T<=t) una cola	0.018	
Valor crítico de t (una cola)	1.860	
P(T<=t) dos colas	0.035	
Valor crítico de t (dos colas)	2.306	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>1000µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.44
Varianza	0	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-2.53	
P(T<=t) una cola	0.02	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.04	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

*Continuación edad de madurez sexual (sertralina)*

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>1500 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.56
Varianza	0	0.53
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-2.29	
P(T<=t) una cola	0.03	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (edad de madurez sexual) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>2000 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	9	9.22
Varianza	0	0.19
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-1.51	
P(T<=t) una cola	0.08	
Valor crítico de t (una cola)	1.86	
P(T<=t) dos colas	0.17	
Valor crítico de t (dos colas)	2.31	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Indicador: Tasa reproductiva a 21 días (número de organismos)*

FLUOXETINA	Eventos de análisis									Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación.	Varianza	
	1			2			3							
	a	b	c	a	b	c	a	b	c					
Control	40	41	42	34	33	38	39	38	37	38.00	3.00	0.08	8.00	
μg L <sup>-1</sup>	0.05	43	32	40	25	43	43	32	45	31	37.11	7.17	0.19	45.65
	0.10	32	48	53	24	32	39	40	48	46	40.22	9.47	0.24	79.73
	0.20	43	40	44	39	34	35	31	45	41	39.11	4.83	0.12	20.77
	0.40	44	46	48	37	20	35	35	36	39	37.78	8.27	0.22	60.84
	0.50	44	53	50	32	30	26	40	37	32	38.22	9.28	0.24	76.62
	0.75	54	56	42	42	41	19	45	38	54	43.44	11.29	0.26	113.36
	1	48	50	49	36	39	25	39	23	38	38.56	9.76	0.25	84.69
	2	49	45	57	48	56	66	27	30	38	46.22	12.82	0.28	146.17
	10	40	52	46	43	40	30	36	40	10	37.44	11.97	0.32	127.36
	100	40	48	40	38	38	36	41	50	53	42.67	6.06	0.14	32.67
	750	57	57	59	43	53	47	57	55	43	52.33	6.32	0.12	35.56
1000	52	43	42	58	50	56	55	51	48	50.56	5.53	0.11	27.14	
1500	45	55	41	45	48	45	47	38	40	44.89	5.04	0.11	22.54	
2000	60	56	48	62	46	40	60	58	51	53.44	7.57	0.14	50.91	

SERTRALINA	Eventos de análisis									Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación.	Varianza	
	1			2			3							
	a	b	c	a	b	c	a	b	c					
Control	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9.00	0.00	0.00	0.00	
μg L <sup>-1</sup>	0.05	10	11	10	11	10	10	10	11	10	10.33	0.50	0.05	0.22
	0.1	10	11	11	10	10	11	10	10	11	10.44	0.53	0.05	0.25
	0.2	10	10	10	11	10	9	10	9	11	10.00	0.71	0.07	0.44
	0.4	10	9	10	10	10	9	10	9	10	9.67	0.50	0.05	0.22
	0.5	9	10	9	10	10	10	9	10	9	9.56	0.53	0.06	0.25
	0.75	10	10	9	9	11	9	10	10	9	9.67	0.71	0.07	0.44
	1	10	10	9	10	9	9	9	9	10	9.44	0.53	0.06	0.25
	2	10	9	10	9	9	11	9	9	9	9.44	0.73	0.08	0.47
	10	10	10	10	9	10	9	9	10	9	9.56	0.53	0.06	0.25
	100	10	10	10	9	9	9	9	9	10	9.44	0.53	0.06	0.25
	750	10	10	10	9	9	9	10	9	9	9.44	0.53	0.06	0.25
	1000	10	9	10	9	10	9	9	9	10	9.44	0.53	0.06	0.25
	1500	11	10	10	9	9	9	10	9	9	9.56	0.73	0.08	0.47
2000	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9.22	0.44	0.05	0.17	



*Análisis estadístico para la diferencia de medias (Prueba t-student)*

*Tasa reproductiva (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.05 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	38	37.11
Varianza	9	51.36
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	0.34	
P(T<=t) una cola	0.37	
Valor crítico de t (una cola)	1.80	
P(T<=t) dos colas	0.74	
Valor crítico de t (dos colas)	2.20	

**Diferencia real de medias** No significativo

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	38	40.22
Varianza	9	89.69
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	-0.67	
P(T<=t) una cola	0.26	
Valor crítico de t (una cola)	1.81	
P(T<=t) dos colas	0.52	
Valor crítico de t (dos colas)	2.23	

**Diferencia real de medias** No significativo

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	38	39.11
Varianza	9	23.36
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	13	
Estadístico t	-0.59	
P(T<=t) una cola	0.28	
Valor crítico de t (una cola)	1.77	
P(T<=t) dos colas	0.57	
Valor crítico de t (dos colas)	2.16	

**Diferencia real de medias** No significativo

*Continuación tasa reproductiva (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.4 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	38	37.78
Varianza	9	68.44
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	0.076	
P(T<=t) una cola	0.471	
Valor crítico de t (una cola)	1.812	
P(T<=t) dos colas	0.941	
Valor crítico de t (dos colas)	2.228	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.5 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	38	38.22
Varianza	9	86.19
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	-0.07	
P(T<=t) una cola	0.47	
Valor crítico de t (una cola)	1.81	
P(T<=t) dos colas	0.95	
Valor crítico de t (dos colas)	2.23	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.75µg L<sup>-1</sup></i>
Media	38	43.44
Varianza	9	127.53
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	-1.40	
P(T<=t) una cola	0.10	
Valor crítico de t (una cola)	1.83	
P(T<=t) dos colas	0.20	
Valor crítico de t (dos colas)	2.26	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Continuación tasa reproductiva (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	38	38.556
Varianza	9	95.278
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	-0.163	
P(T<=t) una cola	0.437	
Valor crítico de t (una cola)	1.833	
P(T<=t) dos colas	0.874	
Valor crítico de t (dos colas)	2.262	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	38	46.22
Varianza	9	164.44
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	-1.87	
P(T<=t) una cola	0.05	
Valor crítico de t (una cola)	1.83	
P(T<=t) dos colas	0.09	
Valor crítico de t (dos colas)	2.26	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>10 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	38	37.44
Varianza	9	143.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	0.14	
P(T<=t) una cola	0.45	
Valor crítico de t (una cola)	1.83	
P(T<=t) dos colas	0.90	
Valor crítico de t (dos colas)	2.26	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Continuación tasa reproductiva (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) “fluoxetina”</i>	<i>Control</i>	<i>100 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	38	42.67
Varianza	9	36.75
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	12	
Estadístico t	-2.070	
P(T<=t) una cola	0.030	
Valor crítico de t (una cola)	1.782	
P(T<=t) dos colas	0.061	
Valor crítico de t (dos colas)	2.179	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) “fluoxetina”</i>	<i>Control</i>	<i>750 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	38	52.33
Varianza	9	40
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	-6.14	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.80	
P(T<=t) dos colas	0.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.20	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) “fluoxetina”</i>	<i>Control</i>	<i>1000µg L<sup>-1</sup></i>
Media	38	50.56
Varianza	9	30.53
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	12	
Estadístico t	-5.99	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.78	
P(T<=t) dos colas	0.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.18	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

*Continuación tasa reproductiva (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>1500µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.84
Varianza	0.00	0.00
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	12	
Estadístico t	-7.37	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.78	
P(T<=t) dos colas	0.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.18	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>2000µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.88
Varianza	0.00	0.00
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	-8.36	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.80	
P(T<=t) dos colas	0.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.20	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

*Análisis estadístico para la diferencia de medias (Prueba t-student)*

*Tasa reproductiva (sertralina)*

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.05 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	40.56	38.67
Varianza	6.53	9.00
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	1.44	
P(T<=t) una cola	0.08	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.17	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	40.556	38.44
Varianza	6.53	12.03
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	15	
Estadístico t	1.47	
P(T<=t) una cola	0.08	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.16	
Valor crítico de t (dos colas)	2.13	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	40.56	41.66
Varianza	6.53	14.75
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	-0.72	
P(T<=t) una cola	0.24	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P(T<=t) dos colas	0.48	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	

**Diferencia real de medias**  
**Continuación tasa reproductiva (sertralina)**

No significativo

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.4 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	40.56	40.78
Varianza	6.53	17.19
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	13	
Estadístico t	-0.14	
P(T<=t) una cola	0.45	
Valor crítico de t (una cola)	1.77	
P(T<=t) dos colas	0.89	
Valor crítico de t (dos colas)	2.16	

**Diferencia real de medias**

No significativo

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.5 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	40.56	41.67
Varianza	6.53	10.75
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	15	
Estadístico t	-0.80	
P(T<=t) una cola	0.22	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.44	
Valor crítico de t (dos colas)	2.13	

**Diferencia real de medias**

No significativo

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.75µg L<sup>-1</sup></i>
Media	40.56	42.67
Varianza	6.53	7.50
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-1.69	
P(T<=t) una cola	0.06	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.11	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	

**Diferencia real de medias**  
**Continuación tasa reproductiva (sertralina)**

No significativo

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	40.56	42.78
Varianza	6.53	4.19
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	15	
Estadístico t	-2.036	
P(T<=t) una cola	0.030	
Valor crítico de t (una cola)	1.753	
P(T<=t) dos colas	0.060	
Valor crítico de t (dos colas)	2.131	

**Diferencia real de medias**

No significativo

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	40.56	43.22
Varianza	6.53	10.19
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	15	
Estadístico t	-1.96	
P(T<=t) una cola	0.03	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.07	
Valor crítico de t (dos colas)	2.13	

**Diferencia real de medias**

No significativo

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>10 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	40.56	43.33
Varianza	6.53	5.50
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-2.10	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.03	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	

**Diferencia real de medias**

No significativo



*Continuación tasa reproductiva (sertralina)*

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) “sertralina”</i>	<i>Control</i>	<i>100 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	40.56	44.11
Varianza	6.53	6.86
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-2.92	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.01	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) “sertralina”</i>	<i>Control</i>	<i>750 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	40.56	43.33
Varianza	6.53	9
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-2.11	
P(T<=t) una cola	0.03	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) “sertralina”</i>	<i>Control</i>	<i>1000µg L<sup>-1</sup></i>
Media	40.56	42.11
Varianza	6.53	5.11
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-1.37	
P(T<=t) una cola	0.10	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.19	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Continuación tasa reproductiva (sertralina)*

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) “sertralina”</i>	<i>Control</i>	<i>1500µg L<sup>-1</sup></i>
Media	40.6	44.1
Varianza	6.5	8.6
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-2.74	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.01	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (tasa reproductiva) “sertralina”</i>	<i>Control</i>	<i>2000</i>
Media	40.56	43.78
Varianza	6.53	4.19
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	15	
Estadístico t	-2.95	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.01	
Valor crítico de t (dos colas)	2.13	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

*Indicador: Talla alcanzada a los 21 días (mm.).*

FLUOXETINA	Eventos de análisis									Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación.	Varianza	
	1			2			3							
	a	b	c	a	b	c	a	b	c					
Control	3.71	3.71	3.65	3.65	3.71	3.65	3.71	3.71	3.65	3.68	0.03	0.01	0.00	
µg L <sup>-1</sup>	0.05	3.71	3.65	3.76	3.59	3.65	3.71	3.71	3.71	3.65	3.68	0.05	0.01	0.00
	0.1	3.71	3.76	3.76	3.71	3.71	3.76	3.65	3.71	3.76	3.72	0.04	0.01	0.00
	0.2	3.59	3.59	3.59	3.71	3.65	3.59	3.42	3.71	3.76	3.62	0.10	0.03	0.01
	0.4	3.48	3.76	3.71	3.65	3.65	3.71	3.65	3.71	3.76	3.67	0.09	0.02	0.01
	0.5	3.71	3.65	3.53	3.76	3.65	3.76	3.65	3.71	3.65	3.67	0.07	0.02	0.00
	0.75	3.71	3.65	3.59	3.71	3.71	3.76	3.65	3.71	3.76	3.69	0.06	0.02	0.00
	1	3.76	3.71	3.71	3.71	3.71	3.71	3.76	3.76	3.59	3.71	0.05	0.01	0.00
	2	3.82	3.76	3.71	3.65	3.71	3.76	3.53	3.53	3.65	3.68	0.10	0.03	0.01
	10	3.71	3.65	3.82	3.76	3.71	3.76	3.71	3.76	3.65	3.72	0.06	0.02	0.00
	100	3.48	3.48	3.48	3.76	3.82	3.82	3.71	3.76	3.65	3.66	0.15	0.04	0.02
	750	3.65	3.71	3.76	3.88	3.93	3.88	3.53	3.93	3.71	3.77	0.14	0.04	0.02
	1000	3.59	3.88	3.71	3.93	3.93	3.82	3.82	3.65	3.93	3.81	0.13	0.03	0.02
1500	3.88	3.88	3.76	3.82	3.93	3.88	3.76	3.82	3.82	3.84	0.06	0.01	0.00	
2000	3.82	3.76	3.82	3.93	3.93	3.88	3.93	3.93	3.88	3.88	0.06	0.02	0.00	

SERTRALINA	Eventos de análisis									Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación.	Varianza	
	1			2			3							
	a	b	c	a	b	c	a	b	c					
Control	3.71	3.71	3.71	3.65	3.76	3.71	3.65	3.71	3.71	3.70	0.03	0.01	0.00	
µg L <sup>-1</sup>	0.05	3.71	3.65	3.48	3.71	3.65	3.71	3.71	3.65	3.65	0.07	0.02	0.00	
	0.10	3.76	3.65	3.76	3.65	3.59	3.59	3.71	3.42	3.65	3.64	0.10	0.03	0.01
	0.20	3.76	3.76	3.71	3.71	3.71	3.71	3.76	3.71	3.76	3.73	0.03	0.01	0.00
	0.40	3.76	3.76	3.71	3.71	3.65	3.71	3.71	3.65	3.71	3.71	0.04	0.01	0.00
	0.50	3.71	3.71	3.71	3.59	3.65	3.76	3.71	3.76	3.71	3.70	0.05	0.01	0.00
	0.75	3.71	3.71	3.76	3.76	3.65	3.76	3.71	3.71	3.76	3.72	0.04	0.01	0.00
	1	3.76	3.76	3.65	3.71	3.65	3.65	3.65	3.71	3.59	3.68	0.06	0.02	0.00
	2	3.71	3.82	3.71	3.71	3.71	3.65	3.65	3.71	3.71	3.71	0.05	0.01	0.00
	10	3.76	3.65	3.65	3.71	3.71	3.65	3.65	3.71	3.71	3.69	0.04	0.01	0.00
	100	3.71	3.53	3.71	3.65	3.65	3.71	3.71	3.76	3.76	3.69	0.07	0.02	0.00
	750	3.59	3.65	3.71	3.65	3.71	3.71	3.71	3.65	3.71	3.67	0.04	0.01	0.00
	1000	3.65	3.65	3.65	3.65	3.65	3.76	3.76	3.71	3.76	3.69	0.06	0.02	0.00
1500	3.65	3.53	3.65	3.71	3.71	3.65	3.65	3.71	3.48	3.64	0.08	0.02	0.01	
2000	3.71	3.59	3.53	3.65	3.65	3.71	3.71	3.76	3.71	3.67	0.07	0.02	0.00	

**Análisis estadístico para la diferencia de medias (Prueba t-student)**

**Talla mm (fluoxetina)**

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.05 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.68
Varianza	0.00	0.00
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	13	
Estadístico t	0	
P(T<=t) una cola	0.50	
Valor crítico de t (una cola)	1.77	
P(T<=t) dos colas	1.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.16	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.72
Varianza	0.00	0.00
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	15	
Estadístico t	-2.65	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.02	
Valor crítico de t (dos colas)	2.13	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.62
Varianza	0.00	0.01
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	1.65	
P(T<=t) una cola	0.07	
Valor crítico de t (una cola)	1.83	
P(T<=t) dos colas	0.13	
Valor crítico de t (dos colas)	2.26	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

**Continuación talla (fluoxetina)**

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.4 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.67
Varianza	0.00	0.01
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	0.21	
P(T<=t) una cola	0.42	
Valor crítico de t (una cola)	1.81	
P(T<=t) dos colas	0.84	
Valor crítico de t (dos colas)	2.23	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.5 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.67
Varianza	0.00	0.00
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	0.25	
P(T<=t) una cola	0.40	
Valor crítico de t (una cola)	1.80	
P(T<=t) dos colas	0.81	
Valor crítico de t (dos colas)	2.20	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.75µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.69
Varianza	0.00	0.00
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	12	
Estadístico t	-0.60	
P(T<=t) una cola	0.28	
Valor crítico de t (una cola)	1.78	
P(T<=t) dos colas	0.56	
Valor crítico de t (dos colas)	2.18	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Continuación talla (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.71
Varianza	0.00	0.00
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	13	
Estadístico t	-1.56	
P(T<=t) una cola	0.07	
Valor crítico de t (una cola)	1.77	
P(T<=t) dos colas	0.14	
Valor crítico de t (dos colas)	2.16	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.68
Varianza	0.00	0.01
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	-2.6E-14	
P(T<=t) una cola	5.0E-01	
Valor crítico de t (una cola)	1.8E+00	
P(T<=t) dos colas	1.0E+00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.3E+00	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>10 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.72
Varianza	0.00	0.00
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	12	
Estadístico t	-2.06	
P(T<=t) una cola	0.03	
Valor crítico de t (una cola)	1.78	
P(T<=t) dos colas	0.06	
Valor crítico de t (dos colas)	2.18	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Continuación talla (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>100 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.66
Varianza	0.00	0.02
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	0.38	
P(T<=t) una cola	0.36	
Valor crítico de t (una cola)	1.83	
P(T<=t) dos colas	0.71	
Valor crítico de t (dos colas)	2.26	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>750 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.77
Varianza	0.00	0.02
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	-2.00	
P(T<=t) una cola	0.04	
Valor crítico de t (una cola)	1.83	
P(T<=t) dos colas	0.08	
Valor crítico de t (dos colas)	2.26	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>1000µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.81
Varianza	0.00	0.02
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	-2.85	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	1.83	
P(T<=t) dos colas	0.02	
Valor crítico de t (dos colas)	2.26	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

*Continuación talla (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>1500<math>\mu</math>g L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.84
Varianza	0.00	0.00
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	12	
Estadístico t	-7.37	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.78	
P(T<=t) dos colas	0.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.18	
<b>Diferencia real de medias</b>		<b>Significativo</b>

<i>Comparación de medias (talla mm) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>2000<math>\mu</math>g L<sup>-1</sup></i>
Media	3.68	3.88
Varianza	0.00	0.00
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	-8.36	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.80	
P(T<=t) dos colas	0.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.20	
<b>Diferencia real de medias</b>		<b>Significativo</b>



*Análisis estadístico para la diferencia de medias (Prueba t-student)*

**Talla mm (sertralina)**

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.05 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.70	3.65
Varianza	0.00	0.01
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	1.66	
P(T<=t) una cola	0.06	
Valor crítico de t (una cola)	1.80	
P(T<=t) dos colas	0.12	
Valor crítico de t (dos colas)	2.20	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.70	3.64
Varianza	0.00	0.01
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	1.55	
P(T<=t) una cola	0.07	
Valor crítico de t (una cola)	1.81	
P(T<=t) dos colas	0.15	
Valor crítico de t (dos colas)	2.23	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.70	3.73
Varianza	0.001	0.001
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-2.08	
P(T<=t) una cola	0.03	
Valor crítico de t (una cola)	1.74	
P(T<=t) dos colas	0.05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Continuación talla (sertralina)*

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.4 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.70	3.71
Varianza	0.00	0.002
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-0.36	
P(T<=t) una cola	0.36	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.72	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	

**Diferencia real de medias** No significativo

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.5</i>
Media	3.70	3.70
Varianza	0.00	0.003
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	0	
P(T<=t) una cola	0.5	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P(T<=t) dos colas	1.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	

**Diferencia real de medias** No significativo

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.75</i>
Media	3.70	3.72
Varianza	0.00	0.002
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-1.44	
P(T<=t) una cola	0.09	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.17	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	

**Diferencia real de medias** No significativo

Continuación talla (sertralina)

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.70	3.68
Varianza	0.00	0.00
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	13	
Estadístico t	0.85	
P(T<=t) una cola	0.21	
Valor crítico de t (una cola)	1.77	
P(T<=t) dos colas	0.41	
Valor crítico de t (dos colas)	2.16	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.70	3.71
Varianza	0.00	0.002
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	-0.316	
P(T<=t) una cola	0.378	
Valor crítico de t (una cola)	1.761	
P(T<=t) dos colas	0.756	
Valor crítico de t (dos colas)	2.145	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>10 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.70	3.69
Varianza	0.00	0.002
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	0.72	
P(T<=t) una cola	0.24	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.48	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	

Continuación talla (sertralina)

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>100 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.70	3.69
Varianza	0.00	0.005
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	12	
Estadístico t	0.49	
P(T<=t) una cola	0.32	
Valor crítico de t (una cola)	1.78	
P(T<=t) dos colas	0.63	
Valor crítico de t (dos colas)	2.18	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>750 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.699	3.673
Varianza	0.001	0.002
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	15	
Estadístico t	1.41	
P(T<=t) una cola	0.09	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.18	
Valor crítico de t (dos colas)	2.13	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>1000µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.699	3.692
Varianza	0.001	0.003
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	13	
Estadístico t	0.29	
P(T<=t) una cola	0.39	
Valor crítico de t (una cola)	1.77	
P(T<=t) dos colas	0.78	
Valor crítico de t (dos colas)	2.16	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Continuación talla (sertralina)*

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>1500<math>\mu</math>g L<sup>-1</sup></i>
Media	3.70	3.64
Varianza	0.00	0.01
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	2.20	
P(T<=t) una cola	0.03	
Valor crítico de t (una cola)	1.80	
P(T<=t) dos colas	0.05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.20	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (talla mm) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>2000<math>\mu</math>g L<sup>-1</sup></i>
Media	3.70	3.67
Varianza	0.00	0.005
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	12	
Estadístico t	1.22	
P(T<=t) una cola	0.12	
Valor crítico de t (una cola)	1.78	
P(T<=t) dos colas	0.25	
Valor crítico de t (dos colas)	2.18	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Indicador: Número de puestas en 21 días.*

FLUOXETINA	Eventos de análisis									Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación.	Varianza	
	1			2			3							
	a	b	c	a	b	c	a	b	c					
Control	4	4	4	4	4	4	3	4	4	3.89	0.33	0.09	0.10	
$\mu\text{g L}^{-1}$	0.05	4	3	4	4	3	3	4	3	4	3.56	0.53	0.15	0.25
	0.1	3	4	3	3	4	3	4	3	4	3.44	0.53	0.15	0.25
	0.2	3	4	3	4	3	4	3	4	3	3.44	0.53	0.15	0.25
	0.4	4	4	3	3	4	3	3	3	3	3.33	0.50	0.15	0.22
	0.5	4	3	3	3	3	4	4	3	4	3.44	0.53	0.15	0.25
	0.75	4	4	3	4	4	3	3	3	4	3.56	0.53	0.15	0.25
	1	4	4	4	4	3	4	3	3	3	3.56	0.53	0.15	0.25
	2	3	3	4	3	3	4	3	3	3	3.22	0.44	0.14	0.17
	10	3	4	3	3	3	3	3	3	4	3.22	0.44	0.14	0.17
	100	4	3	4	4	4	3	3	3	3	3.44	0.53	0.15	0.25
	750	3	3	3	3	3	3	3	3	4	3.11	0.33	0.11	0.10
	1000	3	3	3	4	3	4	3	4	3	3.33	0.50	0.15	0.22
1500	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3.11	0.33	0.11	0.10	
2000	3	4	4	4	3	3	4	3	3	3.44	0.53	0.15	0.25	

SERTRALINA	Eventos de análisis									Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación.	Varianza	
	1			2			3							
	a	b	c	a	b	c	a	b	c					
Control	4	3	3	4	4	4	4	4	4	3.78	0.44	0.12	0.17	
$\mu\text{g L}^{-1}$	0.05	4	3	4	4	4	4	4	3	3	3.67	0.50	0.14	0.22
	0.1	4	4	3	4	4	4	3	3	4	3.67	0.50	0.14	0.22
	0.2	4	4	4	4	3	4	4	3	4	3.78	0.44	0.12	0.17
	0.4	4	4	3	4	4	3	4	4	3	3.67	0.50	0.14	0.22
	0.5	3	4	4	4	4	4	3	4	3	3.67	0.50	0.14	0.22
	0.75	4	3	4	4	3	4	4	4	4	3.78	0.44	0.12	0.17
	1	3	4	3	3	4	3	4	4	3	3.44	0.53	0.15	0.25
	2	4	3	4	4	4	3	3	4	4	3.67	0.50	0.14	0.22
	10	4	3	3	4	4	4	4	4	3	3.67	0.50	0.14	0.22
	100	3	4	3	4	4	4	4	3	4	3.67	0.50	0.14	0.22
	750	4	3	4	3	3	3	4	4	3	3.44	0.53	0.15	0.25
	1000	4	4	3	4	3	4	4	3	4	3.67	0.50	0.14	0.22
1500	3	4	3	4	4	4	3	4	4	3.67	0.50	0.14	0.22	
2000	4	3	4	4	4	4	4	3	4	3.78	0.44	0.12	0.17	

*Análisis estadístico para la diferencia de medias (Prueba t-student)*

*Número de puestas o partos en 21d (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.05 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.56
Varianza	0.11	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	1.60	
P(T<=t) una cola	0.07	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P(T<=t) dos colas	0.13	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.44
Varianza	0.11	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	2.14	
P(T<=t) una cola	0.03	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P(T<=t) dos colas	0.05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.44
Varianza	0.11	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	2.14	
P(T<=t) una cola	0.03	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P(T<=t) dos colas	0.05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	

**Diferencia real de medias**  
**Continuación Número de puestas o partos en 21d (fluoxetina)**

No significativo

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.4 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.33
Varianza	0.11	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	2.77	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P(T<=t) dos colas	0.01	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	

**Diferencia real de medias**

Significativo

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.5 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.44
Varianza	0.11	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	2.14	
P(T<=t) una cola	0.03	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P(T<=t) dos colas	0.05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	

**Diferencia real de medias**

No significativo

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.75 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.56
Varianza	0.11	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	1.60	
P(T<=t) una cola	0.07	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P(T<=t) dos colas	0.13	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	

**Diferencia real de medias**

No significativo



*Continuación Número de puestas o partos en 21d (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.56
Varianza	0.11	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	1.60	
P(T<=t) una cola	0.07	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P(T<=t) dos colas	0.13	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.56
Varianza	0.11	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	1.60	
P(T<=t) una cola	0.07	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P(T<=t) dos colas	0.13	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>10 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.22
Varianza	0.11	0.19
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	15	
Estadístico t	3.62	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.13	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

*Continuación Número de puestas o partos en 21d (fluoxetina)*

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>100 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.44
Varianza	0.11	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	2.14	
P(T<=t) una cola	0.03	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P(T<=t) dos colas	0.05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>750 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.11
Varianza	0.11	0.11
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	4.95	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>1000 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.33
Varianza	0.11	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	2.77	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P(T<=t) dos colas	0.01	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

**Continuación Número de puestas o partos en 21d (fluoxetina)**

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>1500 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.11
Varianza	0.11	0.11
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	4.95	
P(T<=t) una cola	0.00	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.00	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "fluoxetina"</i>	<i>Control</i>	<i>2000 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.89	3.44
Varianza	0.11	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	2.15	
P(T<=t) una cola	0.03	
Valor crítico de t (una cola)	1.76	
P(T<=t) dos colas	0.05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.14	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>Significativo</b>	

*Análisis estadístico para la diferencia de medias (Prueba t-student)*

- *Número de puestas o partos en 21d (sertralina)*

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.05 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.78	3.67
Varianza	0.19	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	0.5	
P(T<=t) una cola	0.31	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.62	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.78	3.67
Varianza	0.19	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	0.5	
P(T<=t) una cola	0.31	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.62	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.78	3.78
Varianza	0.19	0.19
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	0	
P(T<=t) una cola	0.5	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	1	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Continuación Número de puestas o partos en 21d (sertralina)*

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.4 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.78	3.67
Varianza	0.19	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	0.5	
P(T<=t) una cola	0.31	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.62	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	No significativo	

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.5 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.78	3.67
Varianza	0.19	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	0.5	
P(T<=t) una cola	0.31	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.62	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	No significativo	

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>0.75µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.78	3.78
Varianza	0.19	0.19
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	0	
P(T<=t) una cola	0.5	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	1	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	No significativo	

*Continuación Número de puestas o partos en 21d (sertralina)*

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>1 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.78	3.44
Varianza	0.19	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	1.46	
P(T<=t) una cola	0.08	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.16	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>2 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.78	3.67
Varianza	0.19	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	0.5	
P(T<=t) una cola	0.31	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.62	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>10 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.78	3.67
Varianza	0.19	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	0.5	
P(T<=t) una cola	0.31	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.62	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Continuación Número de puestas o partos en 21d (sertralina)*

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>100 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.78	3.67
Varianza	0.19	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	0.5	
P(T<=t) una cola	0.31	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.62	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>750 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.78	3.44
Varianza	0.19	0.28
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	1.46	
P(T<=t) una cola	0.08	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.16	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>1000 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.78	3.67
Varianza	0.19	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	0.5	
P(T<=t) una cola	0.31	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.62	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

*Continuación Número de puestas o partos en 21d (sertralina)*

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>1500 µg L<sup>-1</sup></i>
Media	3.78	3.67
Varianza	0.19	0.25
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	0.5	
P(T<=t) una cola	0.31	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	0.62	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	

<i>Comparación de medias (número de partos) "sertralina"</i>	<i>Control</i>	<i>2000</i>
Media	3.78	3.78
Varianza	0.19	0.19
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	0	
P(T<=t) una cola	0.5	
Valor crítico de t (una cola)	1.75	
P(T<=t) dos colas	1	
Valor crítico de t (dos colas)	2.12	
<b>Diferencia real de medias</b>	<b>No significativo</b>	



### *7.2.2 Danio rerio*

**Resultados. Indicadores de efecto asociados a la exposición de ISRS durante el desarrollo embrional del pez *Danio rerio***

Concentraciones de prueba	Nacimientos Normales				Coagulación del Embrion (C.E.)				Edema pericárdico				
	Sertralina		Fluoxetina		Sertralina		Fluoxetina		Sertralina		Fluoxetina		
	Incidencia	%	Incidencia	%	Incidencia	%	Incidencia	%	Incidencia	%	Incidencia	%	
Control	43	95.56	43	95.56	2	4.44	2	4.44	0	0.00	0	0.00	
µg L <sup>-1</sup>	0.05	32	71.11	30	66.67	9	20.00	4	8.89	2	4.44	4	8.89
	0.1	28	62.22	27	60.00	6	13.33	7	15.56	7	15.56	6	13.33
	0.2	24	53.33	25	55.56	7	15.56	4	8.89	11	24.44	6	13.33
	0.4	24	53.33	21	46.67	10	22.22	2	4.44	9	20.00	7	15.56
	0.5	26	57.78	15	33.33	6	13.33	4	8.89	11	24.44	14	31.11
	0.75	23	51.11	11	24.44	11	24.44	8	17.78	7	15.56	16	35.56
	1	29	64.44	16	35.56	9	20.00	3	6.67	7	15.56	17	37.78
	2	25	55.56	25	55.56	11	24.44	3	6.67	8	17.78	8	17.78
	10	21	46.67	21	46.67	11	24.44	7	15.56	5	11.11	8	17.78
	100	23	51.11	19	42.22	12	26.67	5	11.11	7	15.56	12	26.67
	750	21	46.67	20	44.44	14	31.11	4	8.89	5	11.11	8	17.78
	1000	18	40.00	20	44.44	12	26.67	3	6.67	11	24.44	8	17.78
1500	20	44.44	16	35.56	10	22.22	5	11.11	10	22.22	11	24.44	
2000	21	46.67	17	37.78	13	28.89	5	11.11	8	17.78	9	20.00	
<b>Total de Incidencias</b>	<b>335</b>	<b>53.17</b>	<b>283</b>	<b>44.92</b>	<b>141</b>	<b>22.38</b>	<b>64</b>	<b>10.16</b>	<b>108</b>	<b>17.14</b>	<b>134</b>	<b>21.27</b>	

**(Continuación)**

Concentraciones de prueba	Cuerpo acortado o truncado (C.A)				Escoliosis lateral o dorso-ventral (ESC)				Retraso en Eclosión (R.E.)				
	Sertralina		Fluoxetina		Sertralina		Fluoxetina		Sertralina		Fluoxetina		
	Incidencia	%	Incidencia	%	Incidencia	%	Incidencia	%	Incidencia	%	Incidencia	%	
Control	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
µg L <sup>-1</sup>	0.05	1	2.22	3	6.67	0	0.00	0	0.00	1	2.22	4	8.89
	0.1	2	4.44	0	0.00	1	2.22	0	0.00	1	2.22	5	11.11
	0.2	0	0.00	1	2.22	0	0.00	0	0.00	3	6.67	9	20.00
	0.4	0	0.00	2	4.44	0	0.00	0	0.00	2	4.44	13	28.89
	0.5	2	4.44	0	0.00	0	0.00	3	6.67	0	0.00	9	20.00
	0.75	1	2.22	1	2.22	0	0.00	1	2.22	3	6.67	8	17.78
	1	0	0.00	1	2.22	0	0.00	0	0.00	0	0.00	8	17.78
	2	0	0.00	5	11.11	0	0.00	2	4.44	1	2.22	2	4.44
	10	3	6.67	5	11.11	1	2.22	0	0.00	4	8.89	4	8.89
	100	0	0.00	5	11.11	2	4.44	0	0.00	1	2.22	4	8.89
	750	1	2.22	0	0.00	1	2.22	4	8.89	3	6.67	9	20.00
	1000	1	2.22	7	15.56	2	4.44	2	4.44	1	2.22	5	11.11
1500	0	0.00	4	8.89	3	6.67	1	2.22	2	4.44	8	17.78	
2000	0	0.00	7	15.56	1	2.22	1	2.22	2	4.44	6	13.33	
<b>Total de Incidencias</b>	<b>11</b>	<b>1.75</b>	<b>41</b>	<b>6.51</b>	<b>11</b>	<b>1.75</b>	<b>14</b>	<b>2.22</b>	<b>24.00</b>	<b>3.81</b>	<b>94.00</b>	<b>14.92</b>	