



UNIVERSIDAD LAICA “ELOY ALFARO” DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA Y TECNOLOGÍAS
CARRERA DE INGENIERIA AMBIENTAL

Modalidad artículo académico
Previo a la Obtención del Título de Ingeniero Ambiental

TEMA:

Evaluación del riesgo ambiental del fármaco clonazepam utilizando las especies *Danio rerio* y *Scenedesmus sp* como bioindicadores

AUTORES:

Guebara Cunalata José Luis
Kevin Steven Plúa Anchundia

TUTORA RESPONSABLE:

Dra. Dayanara Macías Mayorga

Periodo 2024 (2)
MANTA – ECUADOR



CERTIFICACIÓN

En calidad de docente tutora de la Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, CERTIFICO:

Haber dirigido, revisado y aprobado preliminarmente el Trabajo de Integración Curricular bajo la autoría de los estudiantes José Luis Guebara Cunalata y Kevin Steven Plúa Anchundia, legalmente matriculados en la carrera de Ingeniería Ambiental, período académico 2024-2, cumpliendo el total de 384 horas, cuyo tema del proyecto es **“Evaluación del riesgo ambiental del fármaco clonazepam utilizando las especies *Danio rerio* y *Scenedesmus sp* como biondicadores”** La presente investigación ha sido desarrollada en apego al cumplimiento de los requisitos académicos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico y en concordancia con los lineamientos internos de la opción de titulación en mención, reuniendo y cumpliendo con los méritos académicos, científicos y formales, y la originalidad de este, requisitos suficientes para ser sometida a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente. Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

Manta, 16 agosto de 2025

Lo certifico,



Dayanara Macias Mayorga PhD

Docente Tutora

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Guebara Cunalata José Luis y Plúa Anchundia Kevin Steven, egresados de la facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías, de la carrera de Ingeniería ambiental, libre y voluntariamente declaramos que la responsabilidad del contenido de la presente investigación titulada "**Evaluación del riesgo ambiental del fármaco clonazepam utilizando las especies *Danio rerio* y *Scenedesmus sp* como bioindicadores**", corresponde exclusivamente al tutor y patrimonio intelectual del autor, dejando establecido que aquellos aportes intelectuales de otros autores se han referenciado debidamente en el texto de dicho trabajo.

José Luis Guebara Cunalata

Guebara Cunalata José Luis

CI: 1350972863



Plúa Anchundia Kevin Steven

CI: 1316429842

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres, José Luis Guebara y Elena Cunalata, ya que han formado parte fundamental de mi vida brindándome su apoyo en todo momento. A mis hermanos, con quienes he compartido más que la vida: los sueños, las dudas, las risas y los silencios, este logro no hubiera sido posible si no fuera por vosotros, gracias por estar ahí, siempre.

José Luis Guebara Cunalata

DEDICATORIA

Dedico este logro, ante todo, a Dios, por brindarme la fuerza, sabiduría y perseverancia para culminar esta etapa tan importante de mi vida.

A mi madre Julissa Anchundia, por ser el pilar constante de amor, entrega y sacrificio.

A mi padre Hipólito Plúa y a mi padrastro Germán Delgado, por sus enseñanzas, apoyo y ejemplo.

A mis abuelos Pedro Anchundia y Ruth Marlene Delgado, cuyo cariño, consejos y valores me han guiado siempre.

A mi pareja Angie Saldarriaga, por su amor incondicional, por acompañarme en los momentos más difíciles y por ser mi mayor inspiración.

A mi familia, por su apoyo inquebrantable, sus palabras de aliento y por ser parte esencial de este camino.

A mi tutora Dayanara Macías, por su guía, paciencia y compromiso durante el desarrollo de este trabajo. Su acompañamiento fue clave para alcanzar este objetivo.

Y como dice una canción que me ha inspirado a lo largo del proceso: “*And I wonder if you know what it means to find your dreams...*” Kanye West

Esta tesis no es solo un requisito académico, es la manifestación de un sueño que, con esfuerzo, fe y amor, hoy se hace realidad. Gracias a todos por tanto y perdón por tan poco

Kevin Steven Plúa Anchundia

AGRADECIMIENTO

Agradezco mi tutora Dayanara Macías, por la oportunidad, el apoyo y conocimientos brindados, a mis distintitos amigos/as como Erika Oliva, Keira Romero, Oscar Almach, Kenig Zambrano, Luis López, Willy Coveña, Khiaya Barcia y Nicole Yar quienes fueron también un gran apoyo en distintas etapas a lo largo de esta carrera universitaria, agradezco a todos aquellos que de alguna manera han contribuido en mi crecimiento personal y académico pero sobre todo agradezco a Dios, a mis padres por su dedicación y esfuerzos para hacer posible mi formación académica.

José Luis Guebara Cunalata

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todos los docentes que formaron parte de mi formación universitaria. Cada uno, con su conocimiento, vocación y compromiso, dejó una huella invaluable en mi vida académica y personal.

A mi tutora Dayanara Macías, gracias por su orientación constante, su paciencia y su valioso acompañamiento durante el desarrollo de esta investigación.

Al profesor David Mero, por su exigencia académica y por motivarme a dar siempre lo mejor.

Al profesor Enrique De La Montaña, por su dedicación y pasión al enseñar, que inspiraron en mí un mayor interés por la ciencia.

Al profesor Ángel Pérez, por compartir su experiencia con claridad y cercanía.

Al profesor Celio Bravo, por sus enseñanzas que trascendieron el aula.

A la profesora Brígida, por su apoyo y palabras oportunas.

Al profesor Esteban Chirino, por su guía técnica y académica.

Y al profesor Xavier Anchundia, por su acompañamiento en los momentos clave de mi formación.

También agradezco con especial cariño a mis amigos Kenig Zambrano y Óscar Almach, por su amistad, por compartir este camino académico conmigo y por ser un sostén en los momentos difíciles.

Finalmente, un agradecimiento especial a Kanye West, cuya música —en especial la canción "I Wonder"— me acompañó en los momentos de mayor reflexión y esfuerzo. Su obra me recordó que los sueños no son imposibles si se trabaja con pasión, convicción y fe.

A todos, gracias por ser parte de este proceso y por contribuir a que hoy este sueño se haya hecho realidad.

Kevin Steven Plúa Anchundia

Evaluación del riesgo ambiental del fármaco clonazepam utilizando las especies *Danio rerio* y *Scenedesmus sp* como bioindicadores

Guebara Cunalata José Luis; Plúa Anchundia Kevin Steven; Macías-Mayorga Dayanara
Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías.
Carrera de Ingeniería Ambiental.

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el riesgo ambiental del fármaco clonazepam utilizando el pez *Danio rerio* y la microalga *Scenedesmus sp* como bioindicadores. Juveniles del pez cebra fueron utilizados en ensayos de exposición forzada (toxicidad aguda) y no forzada (ensayo de fuga) para evaluar la potencial toxicidad del fármaco clonazepam. Para la determinación de la concentración efectiva media (CE50) en el ensayo de toxicidad aguda, seis concentraciones fueron testadas (0,002; 0,004; 0,008; 0,012; 0,016; 0,020 mg/ml de clonazepam) más un control. Los tratamientos y el control fueron testados por triplicado. Seis individuos del pez cebra fueron colocados en cada unidad experimental. El ensayo tuvo una duración de 24 horas. A las 1, 2, 4 y 24 horas del experimento se verificó el estado de los organismos. En el caso del ensayo de fuga se utilizó un sistema multicompartimentado con siete compartimentos. Se creó un gradiente de contaminación lineal con seis concentraciones (0.0002; 0.0004; 0.0008; 0.0016; 0.0024; 0.0032 mg/ml de clonazepam) más un control, los tratamientos y el control también fueron testados por triplicado. Se contabilizó el número de organismos en cada compartimento cada hora durante 4 horas (tiempo de duración del ensayo). En el ensayo con la especie de microalga *Scenedesmus sp* tres concentraciones del fármaco (0,006; 0,012, 0,024 mg/ml de clonazepam) más un control fueron testadas. Se determinó la densidad celular del cultivo al inicio del ensayo y durante las 24, 48, 72, y 96 horas del experimento. Los resultados demostraron que en la especie *D. rerio* a partir de las concentraciones de 0,012; 0,016; 0,020 mg/ml de clonazepam, los peces se mostraron adormecidos desde la primera hora de ensayo, siendo este efecto proporcional a la concentración de exposición, determinándose una CE50 de 0,012 mg/ml de clonazepam a la primera hora del ensayo. En el ensayo de fuga los peces mostraron un porcentaje de evasión de 59,3% y 66,7% en las concentraciones de 0,0016 y 0,0032 mg/ml de clonazepam respectivamente desde la primera

hora. En la segunda hora el porcentaje de evasión alcanzó un 88,9% en la concentración de 0,0032 mg/l de clonazepam. En el caso de la especie *Scenedesmus sp* la exposición a clonazepam provocó una inhibición del crecimiento en la especie, observándose una significativa disminución de la densidad celular en todos los tratamientos con respecto al control todos los días del experimento ($p < 0,05$). Podemos concluir que el clonazepam representa un riesgo ambiental para los organismos acuáticos, y se valida el uso las especies *D.rerio* y *Scenedesmus sp* como organismos bioindicadores en la evaluación de los potenciales efectos tóxicos de este fármaco.

Palabras claves: Ensayo de fuga, Concentración efectiva media (CE50), Clonazepam, *Danio rerio*, *Scenedesmus sp*

1. INTRODUCCIÓN

El término de contaminantes emergentes (CEs) generalmente se utiliza para referirse a compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos; no obstante, ahora están siendo ampliamente detectados y tienen el potencial de acarrear un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud.

Las características de estos grupos de contaminantes es que no necesitan estar constantemente en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente. Se ha establecido que estos compuestos entran en el ambiente a través de algunas fuentes y vías, tales como aguas residuales de tipo doméstico e industrial de los residuos de las plantas de tratamiento, de los efluentes hospitalarios, de las actividades agrícolas y ganaderas y de los tanques sépticos, los cuales contienen un gran número de componentes orgánicos específicos y CEs que se producen a diferentes concentraciones en las aguas superficiales, cuyos criterios de calidad ambiental aún no se han podido especificar y las plantas de tratamiento convencionales de aguas residuales no están diseñadas para eliminarlos motivo de preocupación científica y para las entidades ambientales reguladoras. (Gil et al. 2012).

Los contaminantes emergentes como lo pueden ser los productos farmacéuticos de cuidado personal se han considerado como una nueva clase de contaminantes, debido a que son sustancias no testadas por los organismos reguladores, en su momento de introducción al mercado, por lo cual no son objeto de controles legales o regulaciones en cuanto a la cantidad permitida en el medio ambiente (Peña y Catillo 2015).

El clonazepam es un fármaco perteneciente al grupo de las benzodiazepinas que actúa sobre el sistema nervioso central, con propiedades ansiolíticas, anti convulsionantes, miorrelajantes, sedantes, hipnóticas y estabilizadoras del estado de ánimo. Se utiliza como antiepiléptico, es particularmente útil en el tratamiento de crisis de ausencia y ausencias atípicas, y altamente efectivo en cualquier desorden de ansiedad. El clonazepam y otras benzodiazepinas (BZD) se unen a ubicaciones particulares de los receptores GABA, mejorando las acciones del GABA y emitiendo un efecto sedante.

Al reducir la ansiedad y aumentar la relajación, el clonazepam puede ser útil en caso de insomnio al promover el sueño. Es fundamental recordar que las BZD, como el clonazepam, también pueden provocar tolerancia, dependencia y síntomas de abstinencia, como deterioro de la memoria, insomnio, irritabilidad, aumento de la ansiedad y la tensión, ataques de pánico, temblores en las manos, vómitos, palpitaciones, dolores de cabeza, dolores musculares y rigidez, así como una variedad de cambios continuos.(Sanar et al. 2024).

Las benzodiazepinas actúan a nivel de las regiones límbicas, talámica e hipotalámica del cerebro produciendo sedación, hipnosis, relajación muscular, actividad anticonvulsivante y coma. Los efectos farmacológicos se deben al efecto del GABA, un neurotransmisor inhibitorio. Al interactuar alostéricamente los receptores benzodiazepínicos con los receptores GABA-érgicos, se potencia el efecto del GABA con la correspondiente inhibición del sistema reticular ascendente. Las benzodiazepinas bloquean además los efectos corticales y límbicos que tienen lugar al estimular las vías reticulares. (Nardi, 2006, pp. 31-42)

Después de una dosis oral, el clonazepam se absorbe rápidamente, distribuyéndose ampliamente por todos los tejidos. Se une a las proteínas del plasma en un 85% aproximadamente. Los efectos farmacológicos del clonazepam se inician a los 20-60 minutos de su administración y duran de 6 a 8 horas en los niños y más de 12 horas en los adultos. La semi-vida de eliminación de este fármaco es de unas 22-33 horas en los niños y entre 19 y 50 horas en los adultos.

Los organismos acuáticos son excelentes bioindicadores de la presencia de contaminantes en el medio ambiente, ya que son altamente capaces de asimilar estos compuestos y son sensibles a sus concentraciones subletales en el agua (Valavanidis et al., 2006).

La selección de organismos de prueba, o bioindicadores, para los ensayos ecotoxicológicos debe tener en cuenta la representatividad ecológica de estos seres vivos, la facilidad de cultivo, así como la existencia previa de conocimientos sobre su biología, fisiología y nutrición. Su sensibilidad también debe ser relativamente constante para que se produzca una buena repetibilidad y reproducibilidad de los resultados (Silva *et al.*, 2015).

Los organismos acuáticos bioindicadores indicados en las normas y en numerosos artículos científicos son generalmente bacterias, como *Vibrio fischeri*, macrófitos, como la lenteja de agua (*Lemna minor*), peces, como el pez cebra (*Danio rerio*) y crustáceos, como *Daphnidae*.

Los diversos estudios antes mencionados demuestran que el clonazepam es un fármaco ampliamente utilizado en el ámbito de la salud, llevando a la continua descarga de aguas residuales cargadas con varios tipos de fármacos en los medios acuáticos, por este motivo este fármaco puede influir en la biología de los organismos acuáticos inhibiendo funciones como la del sistema nervioso central, su crecimiento y reproducción, alterando así las poblaciones de las distintas especies tanto como de flora y fauna.

Debido a la existencia de estos contaminantes emergentes en los cuerpos de agua algunas especies acuáticas como es la microalga *Scenedesmus sp* y el pez *Danio rerio* pueden verse afectadas por la presencia de estos contaminantes emergentes.

Estudiar el efecto del clonazepam en estas dos especies bioindicadores (*Scenedesmus sp* y *Danio rerio*), es crucial debido a la importancia ecológica de estas especies en los ecosistemas acuáticos. Comprender que evaluar el riesgo ambiental del clonazepam utilizando la microalga (*Scenedesmus sp* y *Danio rerio*) ayudará a entender los riesgos ambientales asociados con la liberación de este fármaco en el medio acuático.

2. METODOLOGÍA

2.1 Bioensayo de exposición forzada con la especie *Danio rerio*

Alevines del pez *Danio rerio* fueron utilizados en ensayos de exposición forzada y no forzada para evaluar la potencial toxicidad del fármaco clonazepam. Los organismos fueron obtenidos en tiendas de acuarios. Una vez en el laboratorio los organismos fueron aclimatados durante una semana antes de iniciar los ensayos. Los organismos estuvieron mantenidos a una temperatura de entre 22 – 26 °C y fotoperiodo controlado (12 h luz:12 h oscuridad). Los acuarios estuvieron ubicados en un sitio tranquilo de acuerdo con las pautas de bienestar animal de la Directiva de la Unión Europea 2010/53 sobre el uso de animales con fines científicos.

Un total de 200 individuos de pez cebra fueron colocados en 2 cubetas de plásticos (100 organismos/cubeta) con un volumen de agua de cultivo de 9 L con aireación constante. Durante el proceso de aclimatación los organismos fueron alimentados *ad libitum* con hojuelas para peces.

Este ensayo de toxicidad aguda se realizó en unidades experimentales de 500 ml. Seis concentraciones del fármaco clonazepam fueron testadas (0,002; 0,004; 0,008; 0,012; 0,016; 0,020 mg/ml de clonazepam) más un control. Cada concentración de exposición fue considerada un tratamiento de exposición. Los tratamientos y el control se testaron por triplicado. Seis individuos del pez cebra fueron colocados en cada unidad experimental. El ensayo tuvo una duración de 24 horas, y la respuesta evaluada fue el comportamiento de los organismos durante la exposición. Una vez se determinó la concentración efectiva media (CE50) (concentración que tiene un efecto observable en el 50% de los organismos expuestos) esta fue utilizada como referencia para establecer las concentraciones a utilizar en el posterior ensayo de exposición no forzada (ensayo de fuga).

2.2 Bioensayo de exposición no forzada (Ensayo de fuga o evasión)

Alevines de *Danio rerio* fueron utilizados en ensayos de fuga (avoidance) para evaluar la potencial toxicidad del fármaco clonazepam. Estos ensayos son una herramienta útil ya que nos permiten conocer la capacidad de los organismos a percibir contaminantes e ir a zonas menos contaminadas.

Para los ensayos de fuga se utilizó un sistema multicompartimentado con siete compartimentos. Cada compartimento con una longitud de 27 cm, y capacidad para un volumen de 300 ml. Todo el sistema tiene una longitud de 189 cm y capacidad para un volumen de agua de 2100 ml (Fig.1).

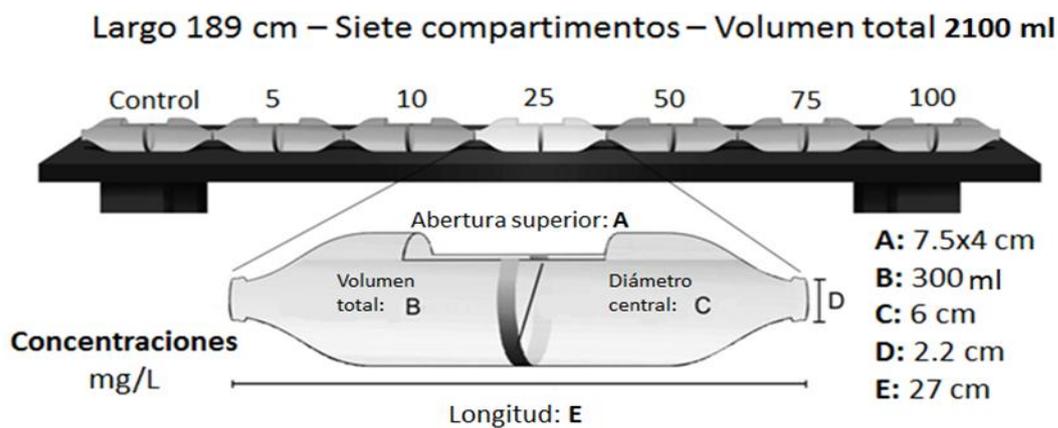


Fig.1 Sistema multicompartimentado para los ensayos de exposición no forza

El ensayo de fuga se llevó a cabo con seis concentraciones de exposición, más un control. Las concentraciones utilizadas fueron: 0.0002; 0.0004; 0.0008; 0.0016; 0.0024; 0.0032 mg/ml de clonazepam. Cada concentración de ensayo fue considerada un tratamiento de exposición. Estos tratamientos fueron colocados de forma individual en un compartimento del sistema tal como lo describe Araújo *et al.* (2014). Cada tratamiento y el control se testaron por triplicados. Una vez preparado el gradiente lineal de contaminación, se introdujeron tres organismos en cada compartimento, con un total de 21 organismos por sistema, y 63 organismos por test. Los experimentos se llevaron a cabo en total oscuridad. Se contabilizó la distribución de los organismos en el sistema cada hora durante 4 horas (tiempo de duración del ensayo).

2.2.1 Cálculo de fuga/evasión

El cálculo de la fuga fue basado en el método descrito por Moreira-Santos et al. 2008:

$$Fugados = (NE - NO)$$

Donde:

(NE)= número de organismos esperados,

(NO)= número de organismos observados.

Para calcular la evasión (fuga) en porcentajes (%) se utilizará la fórmula:

$$Fuga = (Fugados / NE) * 100.$$

Donde:

NE es el número de organismos que se espera en cada compartimento, considerando una distribución homogénea de los organismos observados, lo que supone ninguna preferencia para cualquier concentración de exposición. Se calculará con el número total de organismos observados dentro de los compartimentos, y dividido entre el número correspondiente al compartimento.

Por ejemplo, para la sección más contaminada (#7; 100% de agua del test), el número de organismos que se espera es igual al número total de organismos observados dentro de las secciones #1 a #7 dividido para el número de la sección, en este caso (es decir, 7).

NO es igual a los organismos observados en cada compartimento, sumados a los demás compartimentos con concentraciones más altas dentro de un mismo sistema.

2.3 Bioensayos con la especie *Scenedesmus sp*

El ensayo de toxicidad con microalgas fue realizado en matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad. Tres concentraciones de exposición (0,006; 0,012, 0,025 mg/ml de clonazepam) más un control fueron testadas por triplicado. En cada uno de los ensayos 100 ml del cultivo de microalga fue colocado por matraz (unidad experimental). A cada matraz se le añadió la concentración del fármaco de manera que quede disuelta en los 100 ml de microalga. A las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición se realizó el conteo de microalgas en cada tratamiento, mediante una cámara Neubauer para así determinar la densidad celular.

Para el conteo celular se utilizó una cámara de Neubauer (Fig. 2) de 0,1 mm de profundidad, la cual consta de nueve cuadrados con lados de 1 mm (área total de recuento = 9 mm²). Cada uno de los cuales corresponde a un volumen de 0,1 µl. Para la observación de las microalgas se utilizó el microscopio óptico binocular (LABOMED, modelo Lx500).

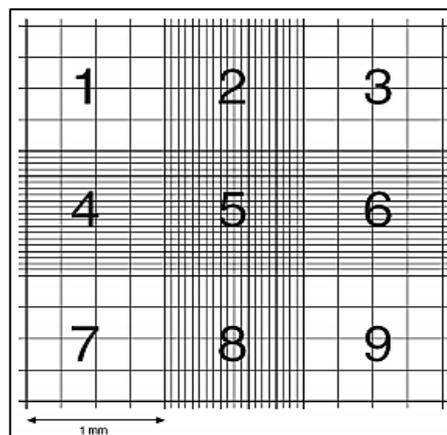


Fig. 2 Cuadrantes de la Cámara Neubauer. Se realizó el conteo de la densidad celular en los cuadrantes 1, 3, 7 y 9.

La fórmula para la determinación de la densidad celular fue la siguiente:

$$DC=N \times 10^4 * (F.d)$$

Dónde:

DC = densidad celular ($\times 10^4$ cel/ml)

N = promedio de células presentes en 1 mm^2 ($0,1 \mu\text{l}$). Este número de células se divide de acuerdo con el número de cuadrantes contados. Por ejemplo, si se contaron 245 en los 4 cuadrantes de una de las dos cámaras, entonces la población de células corresponde a: $61,25 \times 10^4$ cel/ml.

10^4 = factor de conversión de $0,1 \mu\text{l}$ a 1 ml

F.d = factor de dilución (cuando se considera necesario diluir la muestra).

F.d: $(\text{Vol } i. + \text{Vol. F} / \text{vol. } i)$.

2.4 Procesamiento estadístico

La normalidad de los datos fue revisada a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y la homocedasticidad mediante la prueba de Levene. Un análisis de varianza de una vía (ANOVA) fue aplicado para determinar si existe o no diferencia significativa entre los tratamientos de exposición y el control. Los análisis fueron realizados a través del programa estadístico Instad Pad Grafic.

3 RESULTADOS

3.1 Determinación de la CE50 de clonazepam en el pez *Danio rerio*

Durante el ensayo de exposición forzada con el pez *D. rerio* en las concentraciones de 0,002; 0,004, y 0,008 mg/ml de clonazepam no se observó efecto en los peces. A partir de las concentraciones de 0,012; 0,016; 0,020 mg/ml de clonazepam los peces padecieron inmovilidad temporal y lentitud en las respuestas a estímulos externos, determinándose una CE50 de 0,012 mg/ml en la primera hora de ensayo. El efecto observado en los peces fue proporcional a la concentración de exposición.

3.2 Bioensayo de exposición no forzada

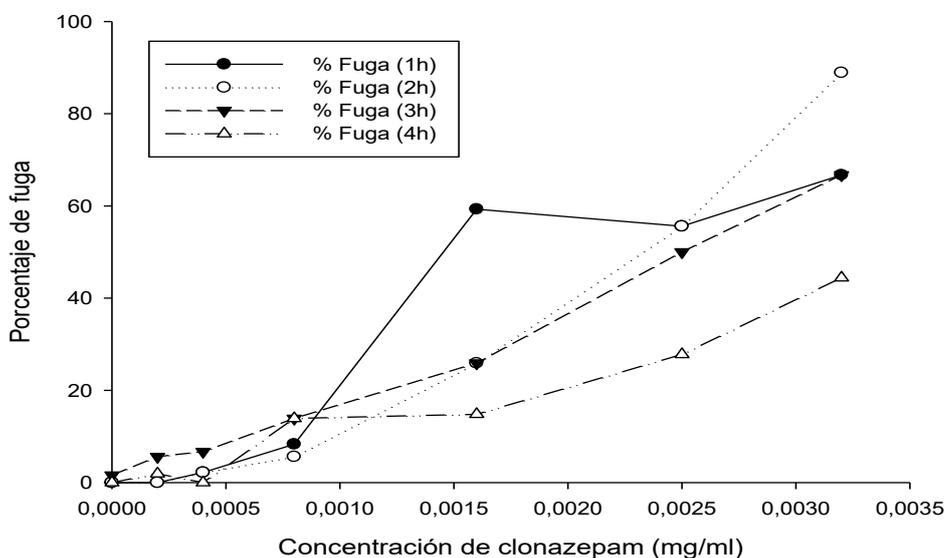


Fig.3 Porcentaje de fuga de la especie de pez *Danio rerio* expuestos a distintas concentraciones de clonazepam

En el ensayo de fuga los peces mostraron un porcentaje de evasión de 59,3% y 66,7% en las concentraciones de 0,0016 y 0,0032 mg/ml de clonazepam respectivamente desde la primera hora. En la segunda hora el porcentaje de evasión alcanzó un 88,9% en la concentración de 0,0032 mg/l de clonazepam (Fig. 3).

3.3 Bioensayo de toxicidad de la especie *Scenedesmus sp*

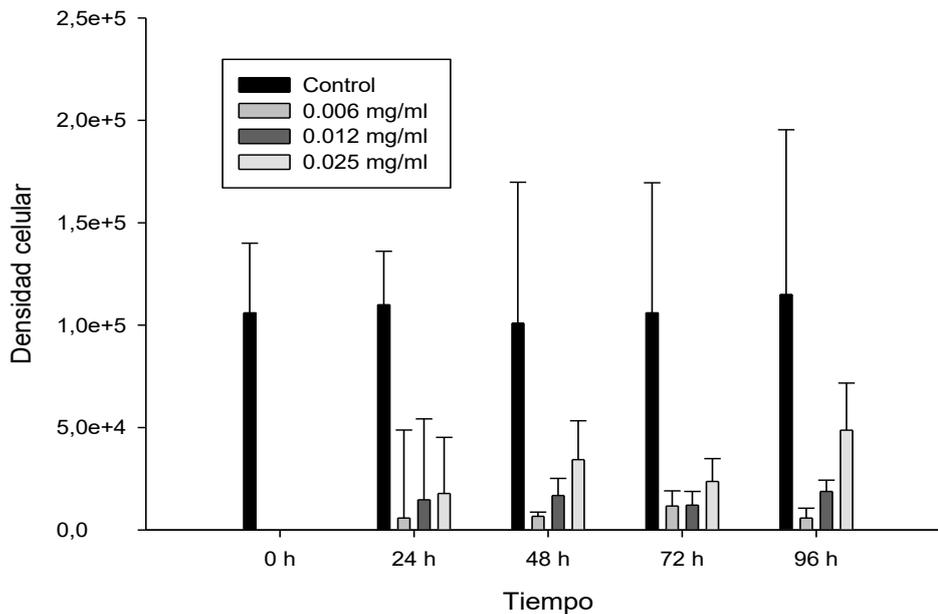


Fig.4 Densidad celular de la microalga *Scenedesmus sp* expuesta a tres concentraciones de clonazepam

En la figura 4 se observa que la exposición a diferentes concentraciones del clonazepam inhibió el crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp* en todos los tratamientos con respecto al control durante todos los días de ensayo ($P < 0,05$).

4 Discusión

Las concentraciones (0.012; 0.016 y 0.020 mg/ml) de clonazepam indujeron efectos neurotóxicos en el *D. rerio*, como sedación y reducción de actividad motora. Esto concuerda con estudios que destacan y vinculan la sensibilidad de los peces a las benzodiazepinas con la alteración del sistema GABAérgico en peces, afectando su comportamiento y supervivencia (Araujo *et al*; 2014). El clonazepam actúa como agonista de los receptores GABA potenciando la neurotransmisión inhibitoria, esto se traduce en la sedación y disminución de la actividad motora. Considerando los resultados obtenidos de la CE50 a 0.012 mg/ml en la primera hora de exposición sugiere que el clonazepam afectó las funciones neurológicas claves antes mencionadas, lo que podía comprometer la percepción de amenazas y supervivencia de muchas especies acuáticas.

En cuanto al estudio realizado con la especie *D. rerio*, la existencia muy elevada de fármacos activos en el ambiente acuático estimula a realizar mayores estudios de impacto ambiental (*Brain et al., 2008*). Sin embargo, los estudios ecotoxicológicos levantados por muchos investigadores para identificar fármacos potencialmente peligrosos para el medio ambiente son aún insuficientes (*Bila & Dezotti, 2003*). Algunos investigadores han analizado el riesgo potencial de algunos fármacos en el medio ambiente a través de la biodegradabilidad, del destino ambiental y de las pruebas de toxicidad con organismos acuáticos (*Castiglioni et al., 2004; Brain et al., 2008; Choi et al., 2008; Park & Choi, 2008*).

Los resultados obtenidos en el bioensayo de exposición no forzada con *D. rerio* demuestran una respuesta conductual clara de tipo evasiva ante la presencia de clonazepam. Este comportamiento sugiere que los organismos poseen la capacidad de detectar el contaminante y desplazarse hacia compartimentos con menor concentración, manifestando una respuesta adaptativa inmediata frente a un estímulo adverso. Este tipo de ensayos de fuga permite evaluar respuestas subletales, altamente sensibles y ecológicamente relevantes, que no necesariamente causan mortalidad, pero sí alteran el comportamiento de los organismos acuáticos (*Moreira-Santos et al., 2008*).

La evitación, en este contexto, puede representar un mecanismo de supervivencia frente a contaminantes neuroactivos que actúan sobre el sistema nervioso central, como es el caso del clonazepam, cuyo mecanismo de acción implica la potenciación del neurotransmisor inhibitorio GABA (*Sanar et al., 2024; Nardi, 2006*).

Estudios previos han demostrado que fármacos psicoactivos presentes en cuerpos de agua pueden alterar la locomoción, el comportamiento social y las respuestas de alerta de organismos acuáticos, incluso en concentraciones ambientalmente relevantes (*Silva et al., 2020; Araújo et al., 2014*). Esto concuerda con lo observado en este estudio, donde la exposición al clonazepam provocó un efecto sedante que redujo progresivamente la capacidad de respuesta de los peces, lo que explica la disminución del porcentaje de fuga en las últimas horas del ensayo.

El uso de *D. rerio* como especie bioindicadora es ampliamente reconocido en estudios ecotoxicológicos debido a su alta sensibilidad, facilidad de mantenimiento en laboratorio y respuestas conductuales bien documentadas ante diversos contaminantes (Valavanidis *et al.*, 2006). Además, la metodología multicompartimental aplicada en este experimento permitió establecer un gradiente de concentración que simula de manera más realista la distribución heterogénea de contaminantes en ecosistemas acuáticos (Araújo *et al.*, 2014).

La inhibición del crecimiento de la microalga observada en la (Fig.4) sugiere que el clonazepam podía interferir en procesos metabólicos clave, como la fotosíntesis o la división celular, estudios similares con otras benzodiazepinas reportan estrés oxidativo en microalgas, generado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan membranas celulares y cloroplastos (Valavanidis *et al.*, 2006). Además, investigaciones recientes han demostrado que el clonazepam puede inducir modificaciones en la integridad de las membranas celulares de las microalgas, afectando la permeabilidad y el transporte iónico, lo cual podría explicar la disminución progresiva en la densidad celular observada en el bioensayo (Pérez *et al.*, 2019). Estos efectos podrían comprometer la resiliencia ecológica de sistemas acuáticos que reciben descargas continuas de aguas residuales sin tratamiento adecuado.

Las microalgas responden de manera sensible a la exposición a benzodiazepinas y otros fármacos neuroactivos, presentando cambios en su morfología, tasa de división celular y viabilidad, incluso a concentraciones muy bajas del contaminante. Estas respuestas fisiológicas reflejan el potencial del clonazepam para afectar la estructura y función de comunidades fitoplanctónicas, lo que podría derivar en alteraciones en la red trófica y en la producción primaria de ecosistemas acuáticos (González-Pleiter *et al.*, 2013).

Por otra parte, el uso de *Scenedesmus sp.* como bioindicador primario en estudios ecotoxicológicos ha ganado relevancia debido a su alta sensibilidad a compuestos tóxicos, su rápida tasa de crecimiento y su rol clave como productor primario en ecosistemas acuáticos. En este estudio, la inhibición significativa del crecimiento celular de *Scenedesmus sp.* ante la exposición al clonazepam puede deberse no solo al estrés oxidativo, sino también a la interferencia directa del fármaco en la síntesis de clorofila y en la actividad fotosintética (Robinson *et al.*, 2021).

Los resultados del presente trabajo refuerzan la preocupación creciente sobre la presencia de contaminantes emergentes en cuerpos de agua y su potencial para afectar negativamente la biodiversidad acuática, incluso a niveles traza. En conjunto con los ensayos de toxicidad realizados con *Scenedesmus sp* y exposición forzada en *D. rerio*, se evidencia que el clonazepam posee un potencial tóxico relevante, capaz de alterar tanto procesos fisiológicos como conductuales en organismos no blanco. Esto subraya la importancia de incorporar este tipo de bioensayos en la evaluación del riesgo ambiental y en futuras normativas sobre calidad del agua.

5 Conclusiones

- El valor de concentración efectiva media (CE50 de 0,012 mg/ml) determinado en la especie *D. rerio*, representa un punto de partida importante en las futuras evaluaciones de la potencial toxicidad de este fármaco en organismos acuáticos. Según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA) este fármaco sería considerado como sustancia peligrosa para el medio ambiente acuático por estar entre $10 < CE50 \leq 100$ mg/L.
- El clonazepam provocó una marcada respuesta de fuga en la especie *D. rerio* e inhibió significativamente el crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp* a concentraciones subletales, sugiriendo interferencia en procesos metabólicos claves. Por ende, podemos concluir que este fármaco representa un riesgo ambiental para los organismos acuáticos.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo, C; Shinn, C; Mendes, L; Delello-Schneider, D; Sanchez, A; Espíndola, E. 2014. Avoidance response of *Danio rerio* to a fungicide in a linear contamination gradient. *Science of the Total Environment*, Vol. 484, pp. 36-42.

Aus Der Beek T, Weber FA, Bergmann A, Hickmann S, Ebert I, Hein A, Küster A. (2022). «Pharmaceuticals in the environment – Global occurrences and challenges. » *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4): 823–835. Disponible en: <https://academic.oup.com/etc/article-abstract/35/4/823/7742012?redirectedFrom=fulltext>

Gil, MJ; Soto, AM; Usma, JI; Gutiérrez, OD. 2012. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia* 7(2):52-73.

González-Pleiter, M.; Gonzalo, S.; Rodea-Palomares, I.; Leganés, F.; Rosal, R.; Boltes, K.; Marco, E.; Fernández-Piñas, F. 2013. Toxicity of five antibiotics and their mixtures to photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(4):937–948. <https://doi.org/10.1002/etc.2133>

Hernández-Quiroz, M; Ruiz-Meza, D; Rojo-Callejas, F; Ponce de León-Hill, C. 2019. Determinación de la distribución de contaminantes emergentes en agua intersticial en sedimentos de humedal mediante la optimización y validación de un método analítico. *Revista internacional de Contaminación Ambiental*. 35(2):407-419. DOI: <https://doi.org/10.20937/rica.2019.35.02.12>

Isidro A. Pérez, M. Luisa Sánchez, M. Ángeles García, Nuria Pardo. Carbon dioxide at an unpolluted site analysed with the smoothing kernel method and skewed distributions

Laura Camila Ávila-Cújar, Brandon Esteban Sotelo-Torres, Juan Andrés Sandoval-Herrera. Selección y comparación de las principales tecnologías para la remoción de compuestos farmacológicamente activos: una revisión.

Moreira-Santos, M; Donato, C; Lopes, I; Ribeiro, R. 2008. Avoidance test with small fish: Determination of the median avoidance concentration and of the lowest-observed- effect gradient. *Environmental Toxicology Chemistry*, 27(7), 1576-1582.

Peña, A; Castillo, A. 2015. Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por micro extracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. Vol. 18(1). Pág. 29-42.

Pérez, R.; Caballero, G.; Martínez, E. 2019. Impacto de contaminantes farmacéuticos en la viabilidad de microalgas: mecanismos fisiológicos y celulares. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(2): 102–115.

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/76558>

Robinson, A. A.; Belden, J. B.; Lydy, M. J. 2021. Toxicity of fluoxetine to algae and aquatic plants: A review of potential impacts in aquatic ecosystems. *Environmental Pollution*, 285:117298.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117298>

Silva, E. L. P; Soares, J; Manchado, M. 2020. Avaliação do perfil de produção de fitoterápicos para o tratamento de ansiedade e depressão pelas indústrias farmacêuticas brasileiras. *Brazilian Journal of Development*. 6(1) 3119-3135

Tejada, C; Quiñonez, E; Peña, M. 2014. Contaminantes Emergentes en Aguas: Metabolitos de Fármacos. Una Revisión. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, Vol. 10. Pág. 80–101.

Tim Aus Der Beek, *y Frank-Andreas Weber, y Axel Bergmann Silke Hickmann Ina Ebert,z Arne Heinz and Anette Küster 2015. Pharmaceuticals in the environment—global occurrences and perspectives.

Valavanidis, A; Vlahogianni, T; Dassenakis, M; Scoullas M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 64 (2) 178-189