



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

**INVESTIGACIÓN Y EVALUACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES
(PRODUCTOS FARMACÉUTICOS) PRESENTES EN LA CUENCA DEL
RÍO APATLACO EN EL ESTADO DE MORELOS**

TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS
CON OPCIÓN TERMINAL EN TECNOLOGÍA QUÍMICA

PRESENTA:
MICA JOSÉ ABRAHAM RIVERA JAIMES

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ROSA MARÍA MELGOZA ALEMÁN

CODIRECTOR DE TESIS:
DRA. MIREN LÓPEZ DE ALDA VILLAIZÁN

SINODALES DRA. CECILIA CUEVAS ARTEAGA
 DR. ARMANDO HUICOHEA RODRÍGUEZ
 DR. ANTONIO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
 DRA. MARTHA LILIA DOMÍNGUEZ PATIÑO
 DR. HUGO ALBEIRO SALDARRIAGA NOREÑA

CUERNAVACA MOR.

JUNIO 2018



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
COORDINACIÓN DE POSGRADO EN INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS



ASUNTO: APROBACIÓN DE TESIS
Cuernavaca, Morelos, 04 de diciembre de 2017

RIVERA JAIMES JOSÉ ABRAHAM
PRESENTE

Por este conducto le notifico que su tesis de Doctorado titulada, "INVESTIGACIÓN Y EVALUACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES (PRODUCTOS FARMACÉUTICOS) PRESENTES EN LA CUENCA DEL RÍO APATLACO EN EL ESTADO DE MORELOS"

Fue aprobada en su totalidad por el jurado revisor y examinador integrado por los ciudadanos

NOMBRE	FIRMA
DRA. CECILIA CUEVAS ARTEAGA	
DR. ARMANDO HUICOCHEA RODRÍGUEZ	
DR. ANTONIO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ	
DRA. MARTHA LILIA DOMÍNGUEZ PATIÑO	
DR. HUGO ALBEIRO SALDARRIAGA NOREÑA	
DRA. MIREN LÓPEZ DE ALDA VILLATZÁN	
DRA. ROSA MARÍA MELGOZA ALEMÁN	

FIRMA

Por consiguiente, se autoriza a editar la presentación definitiva de su trabajo de investigación para culminar en la defensa oral del mismo.

Sin otro particular aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
POR UNA HUMANIDAD CULTA

DR. JOSÉ ALFREDO HERNÁNDEZ PÉREZ
COORDINADOR DE POSGRADO
EN INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS



Av. Universidad 2001, Cof. Chamapa, Cuernavaca, Morelos, México, C.P. 62200
Tel: (+52) 777 329 7000 ext. 6212 (+52) 777 329 7064
Correo: ciica_posgrado@unam.mx



Resumen

En las últimas dos décadas se han identificado grupos de contaminantes denominados emergentes en aguas residuales crudas y tratadas a niveles de concentración que van desde $\mu\text{g/L}$ hasta ng/L y que se caracterizan por una alta persistencia y baja degradación en el medio ambiente. Estos compuestos y sus metabolitos pueden causar efectos toxicológicos a los organismos acuáticos o microorganismos. Por lo anterior, el propósito del presente trabajo fue investigar la presencia de productos farmacéuticos de diferentes clases terapéuticas en aguas residuales crudas y tratadas y aguas superficiales de la Cuenta del Río Apatlaco.

Se desarrolló una metodología analítica por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masa en tándem (CLAR-EM-EM). Un total de 12 fármacos fueron detectados en las muestras de agua analizadas. Los fármacos que presentaron mayores concentraciones en el Río Apatlaco fueron el naproxeno ($4,880 \text{ ng/L}$), acetaminofén ($4,460 \text{ ng/L}$), bezafibrato ($2,100 \text{ ng/L}$), diclofenaco ($1,398 \text{ ng/L}$) e ibuprofeno ($1,106 \text{ ng/L}$). El atenolol (32 ng/L) y la carbamazepina (276 ng/L) presentaron las menores concentraciones.

A pesar de que algunos de los compuestos más abundantes mostraron eficiencias de remoción $>97\%$ durante el tratamiento del agua residual, algunas concentraciones encontradas aguas abajo (AS1) de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Acapantzingo (PTARM-A) fueron sólo ligeramente inferiores a las concentraciones encontradas aguas arriba (AS2). Esto indica la existencia de entradas adicionales de aguas residuales crudas al río.

De acuerdo a la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) en México, el 43% de las aguas residuales no reciben tratamiento y en esas condiciones son utilizadas en el riego agrícola o son vertidas directamente a los cuerpos de agua generando un fuerte problema de contaminación y un alto riesgo para la biota acuática y salud humana.

Se estimó el riesgo ambiental calculando los cocientes de riesgo (CRs) para los fármacos detectado en la Cuenca del Río Apatlaco. Los resultados obtenidos para el ibuprofeno, sulfametoxazol, naproxeno y diclofenaco presentaron valores de $CR > 10$, mientras que el bezafibrato, trimetoprim y ácido salicílico presentaron valores de CR entre 1 y 10 que representa un riesgo moderado. Estos resultados muestran que estos fármacos podrían representar un alto riesgo de toxicidad para el ecosistema acuático de la Cuenca del Río Apatlaco, y es necesario tomar medidas apropiadas para salvaguardar el ecosistema y la salud humana.

Abstract

In the last two decades, groups of pollutants named in raw and treated wastewater have been identified at concentration levels ranging from $\mu\text{g/L}$ to ng/L and characterized by high persistence and low degradation in the environment. These compounds and their metabolites can cause toxic effects in aquatic organisms or microorganisms. Therefore, the use of this resource was the presence of pharmaceutical products from different therapeutic classes in raw and treated wastewater and surface water from the Apatlaco River Basin.

An analytical methodology was developed by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS). A total of 12 drugs were detected in the water samples analyzed. The drugs with the highest concentrations in the Apatlaco River Basin were naproxen (4,880 ng/L), acetaminophen (4,460 ng/L), bezafibrate (2,100 ng/L), diclofenac (1,988 ng/L) and ibuprofen (1,106 ng/L). Atenolol (32 ng/L) and carbamazepine (276 ng/L) had the lowest concentrations.

Although some of the most abundant compounds showed removal efficiencies $> 97\%$ during wastewater treatment, some concentrations found downstream (AS1) of the Acapantzingo Wastewater Treatment Plant (PTARM-A) were only slightly lower to the concentrations found upstream (AS2). This indicates the existence of additional inputs of raw wastewater to the River.

According to the National Water Commission (CONAGUA) in Mexico, 43% of the wastewater is not treated and under these conditions they are used in agricultural irrigation or are discharged directly into the bodies of water generating a strong pollution problem and a high risk for aquatic biota and human health.

The environmental risk was estimated by calculating the Hazard Quotients (HQs) for the drugs detected in the Apatlaco River Basin. The results obtained for ibuprofen, sulfamethoxazole, naproxen and diclofenac showed values of $HQ > 10$, while bezafibrate, trimethoprim and salicylic acid showed HQ values between 1 and 10, which represents a moderate risk. These results show that these drugs could represent a high risk of toxicity to the aquatic ecosystem of the Apatlaco River Basin, and it is necessary to take appropriate measures to safeguard the ecosystem and human health.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación en Ingeniería y Ciencias Aplicadas (CIICAp).

A mi tutora la **Dra. Rosa María Melgoza alemán**, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su tiempo y paciencia que tuvo conmigo y que gracias a sus enseñanzas me permitió alcanzar esta meta.

En especial a la **Dra. Miren López de Alda**, por ser una persona excepcional y permitirme formar parte de su excelente grupo de trabajo, gracias por sus enseñanzas y su paciencia en la realización del presente trabajo, pero sobre todo por su amistad.

Muy especialmente a la **Dra. Cristina Postigo Rebolledo**, por valiosa ayuda en el desarrollo del método multi-residual y por su ayuda en el manejo del cromatógrafo de líquidos.

A la **Dra. Martha Lilia Domínguez Patiño**, Porque a pesar de las complicaciones y obstáculos que se me presentaron, siempre me apoyo y motivo a seguir adelante con el trabajo.

Al **Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña**, por sus valiosos comentarios y ayuda de cómo mejorar el trabajo.

Al comité tutorial y revisor por el tiempo dedicado a la revisión del trabajo y por sus comentarios y sugerencias para mejorarlo.

Al **Consejo Español de Investigaciones Científicas (CSIC)** por el financiamiento parcial otorgado dentro del programa i-COOP+2015 (ref. COOPA20095) para realizar 2 estancias de investigación en el IDAEA-CSIC ubicado en Barcelona, España.

A la **Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (FCQel)** por permitirme hacer uso de sus instalaciones para realizar parte del desarrollo experimental.

A todos mis amigos y seres queridos que con su ayuda, consejos y amistad me motivaron a seguir adelante (Juan, Rulo, Suni y Mary).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante todo el posgrado, así como el apoyo para irme 6 meses de estancia al IDAEA-CSIC como complemento en mi formación profesional y humano.

Dedicatorias

Dios, tu amor y tu bondad no tienen límites, me permites tener vida y salud para ver y sonreír ante todos mis logros que son resultado de tu ayuda, y cuando caía me dabas las fuerzas y sabiduría para seguir adelante y cumplir mis metas.

A mí madre **ELVIA RIVERA JAIMES** por motivarme cada día para culminar mis estudios y apoyarme incondicionalmente cuando más la necesitaba.

A mi hermano **GERARDO BARCENAS RIVERA** por apoyarme incondicionalmente cuando más lo necesitaba y por sus recomendaciones y consejos para seguir adelante con el desarrollo del presente trabajo.

Abreviaturas/nomenclatura

AC	Acetaminofén
ACN	Acetonitrilo
AS	Ácido salicílico
AS1	Agua superficial río arriba de la descarga de la PTARM
AS2	Agua superficial río abajo de la descarga de la PTARM
AS3	Mezcla de AS1 y AS2
ATN	Atenolol
BTX	Betaxolol
BZB	Bezafibrato
CA	Ácido clofíbrico
CAM	Concentración Ambiental Medida
CBZ	Carbamazepina
CE ₅₀	Concentración Efectiva 50%
CENO	Concentración de Efecto no Observado
CEs	Contaminantes Emergentes
CL ₅₀	Concentración Letal 50%
CG-EM	Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas
CHL	Cloramfenicol
CL-EM	Cromatografía de Líquidos Acoplada a Espectrometría de Masas
CLT	Clembuterol
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CLAR-EM-EM	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Acoplada a Espectrometría de Masas

CMT	Cimetidina
CPSE	Concentración Prevista Sin Efecto
CLUR-MEAR	Cromatografía de Líquidos de Ultra Rendimiento con Detección de Masa Exacta de Alta Resolución
CRs	Cocientes de Riesgo
CRZ	Carazolol
CTM	Cromatograma de las Transiciones Monitorizadas
C ₂ H ₇ NO ₂	Acetato de Amonio
HCOOH	Ácido Fórmico
DER	Desviación Estándar Relativa
DCF	Diclofenaco
DZP	Diazepam
EC	Energía de Colisión
ECCACIV	Empresa para el Control de la Contaminación del Agua de Civac
EFL	Efluente de la PTARM de Acapantzingo
EFS	Extracción en Fase Sólida
EM	Espectrometría de Masas
EMZ	Efecto Matriz
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
ENA	Enalapril
ERA	Evaluación de Riesgo Ambiental
IES	Ionización por Electrospray
FAM	Famotidina
FLU	Fluoxetina
FUR	Furosemida
FS	Factor de Seguridad
GFB	Gemfibrozil
GLM	Glibenclimida
H	Horas

HDT	Hidroclorotiazida
IBU	Ibuprofeno
IND	Indometacina
INF	Influente de la PTARM de Acapantzingo
LAC	Lodos Activados Convencionales
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
Log K_{ow}	Logaritmo del Coeficiente de Reparto Octanol-Agua
K_{biol}	Cinética de Biodegradación
K_d	Coeficiente de Partición Sólido-Líquido
KPF	Ketoprofeno
MA	Ácido mefenámico
$M+H^+$	Molécula protonada
MeOH	Metanol
MRS	Monitorización de Reacciones Seleccionadas
M/Z	Relación Masa/Carga
NAD	Nadolol
Na_2EDTA	Sal Disódica del Ácido Étilendiaminotetraacético Deshidratada
NPX	Naproxeno
PD	Potencial de Descomposición
PCPs	Productos de Cuidado Personal
PFs	Productos Farmacéuticos
PKa	Logaritmo Negativo de la Constante de Disociación Ácida de un Ácido Débil
PIN	Pindolol
PIs	Puntos de Identificación
PITs	Patrones Internos (deuterados)
PEs	Patrones Estándares
POAs	Procesos de Oxidación Avanzada

PPM	Concentración Partes Por Millón
PRO	Propifenzona
PRP	Propanolol
PSD	Potencial de Salida de Celda
PT	Producto de Transformación
PTARs	Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales
PTARMs	Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales
PTARM-A	Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales de Acapantzingo
PTB	Pentobarbital
r^2	Factor de Correlación
S	Desviación Estándar
SAL	Salbutamol
SMZ	Sulfametoxazol
SOT	Sotalol
SC	Suma de Cuadrados
S/R	Relación Señal/Ruido
SPE	Solución de Patrón Estándar
SPIT	Solución de Patrón Interno
SRM	Monitoreo de Reacción Seleccionada
TIM	Timolol
TMP	Trimetoprim
TR	Tiempo de Retención
TRH	Tiempo de Retención Hidráulica
TRL	Tiempo de Retención de Lodos
UE	Unión Europea

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	III
Abstract.....	V
Agradecimientos.....	VI
Dedicatorias.....	IX
Abreviaturas/nomenclatura.....	X
Índice.....	XIV
Índice de Tablas.....	XVIII
Índice de Figura.....	XX
Capítulo I. Introducción.....	1
Objetivos.....	5
Objetivo general.....	5
Objetivos específicos.....	5
Hipótesis.....	5
Capítulo II. Marco teórico.....	6
2.1. Cuenca del Río Apatlaco.....	6
2.2. Contaminantes emergentes.....	8
2.3. Fuentes y distribución de PFs en el medio ambiente acuático.....	12
2.4. Presencia de productos farmacéuticos en aguas superficiales y residuales de México.....	19
2.5. Métodos analíticos utilizados para la determinación de PFs en agua.....	21
2.5.1. Muestreo.....	24
2.5.2. Preservación de la muestra.....	25

2.5.3. Almacenamiento de la muestra.....	26
2.5.4. Técnicas de extracción.....	26
2.5.5. Técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas.....	28
2.5.5.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).....	30
2.5.5.2. Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (CL-EM).....	31
2.5.5.2.1. Interfases.....	31
2.5.6. Estabilidad de los analitos en las muestras.....	32
2.5.7. Estabilidad de los analitos en las soluciones estándares.....	33
2.5.8. Pérdidas debido a la adsorción de los analitos al contenedor.....	34
2.6. Productos de transformación de los fármacos presentes en el medio ambiente acuático.....	39
2.6.1. Clasificación de los productos de transformación.....	39
2.6.1.1. Productos de transformación formados por reacciones bióticas.....	40
2.6.1.2. Productos de transformación formados por el metabolismo microbiano.....	40
2.6.1.3. Productos de transformación (metabolitos) formados en el cuerpo humano.....	44
2.6.1.4. Productos de transformación formados en la vida silvestre.....	
2.6.1.4. Productos de transformación formados por procesos abióticos en sistemas acuáticas.....	44
2.7. Remoción de productos farmacéuticos durante el tratamiento de agua residual.....	45
2.8. Evaluación del riesgo ambiental (ERA).....	48

Capítulo III. Desarrollo experimental	55
3.1. Estrategia experimental.....	55
3.2. Metodología primera etapa.....	57
3.2.1. Preselección de los PFs.....	57
3.2.2. Preparación de las disoluciones madres	58
3.2.2.1. Preparación de las diluciones de trabajo.....	58
3.2.3. Protocolo de muestreo.....	59
3.2.3.1. Materiales y equipos.....	59
3.2.3.2. Zona de muestreo	60
3.2.3.3. Ubicación de los puntos de muestreo.....	60
3.2.3.4. Muestreo.....	63
3.2.4. Preparación de la muestra (pretratamiento).....	65
3.2.4.1. Filtración.....	65
3.2.4.2. Extracción en Fase sólida (EFS).....	66
3.2.4.2.1. Extracción.....	66
3.2.4.2.2. Elución.....	67
3.2.4.2.3. Preconcentración de los PFs.....	67
3.3. Metodología segunda etapa.....	68
3.3.1. Análisis de las muestras de agua mediante CLAR-EM-EM.....	68
3.3.1.2. Equipo.....	68
3.3.1.3. Condiciones de operación del equipo CLAR Symbiosis.....	69
3.3.1.4. Condiciones del espectrómetro de masas 4000QTRAP.....	70
3.3.1.5. Análisis de las muestras.....	71

3.3.2. Validación del método analítico.....	71
3.3.2.1. Linealidad (curva de calibración).....	71
3.3.2.2. Recuperación.....	72
3.3.2.3. Repetibilidad.....	72
3.3.2.4. Límite de detección y cuantificación.....	72
3.3.2.5. Efecto matriz.....	73
3.3.2.6. Análisis estadístico de las muestras.....	73
3.4.1. Metodología tercera etapa.....	73
3.4.1. Evaluación del riesgo ambiental (ERA).....	73
Capítulo IV. Resultados y discusión.....	75
4.1. Primera etapa.....	75
4.1.1. Muestreo.....	75
4.1.2. Preselección de los productos farmacéuticos.....	78
4.2. Segunda etapa.....	82
4.2.1. Validación del método analítico.....	82
4.2.1.1. Condiciones de operación del equipo 4000QTRAP.....	82
4.2.1.2. Linealidad.....	85
4.2.1.3. Recuperación.....	85
4.1.1.4. Repetibilidad.....	87
4.1.1.6. Efecto matriz.....	88
4.3. Tercera etapa.....	89
4.3.1. Identificación, cuantificación y remoción de los PFs de la zona de estudio.....	89

4.3.2 Analgésicos/anti-inflamatorios.....	98
4.3.2.1. Remoción en PTARM-A.....	100
4.3.3. Antibióticos.....	101
4.3.3.1. Remoción en PTAR-A.....	102
4.3.4. Beta-bloqueantes.....	104
4.3.4.1. Remoción en PTARM-A.....	104
4.3.5. Reguladores de lípidos.....	105
4.3.5.1. Remoción en PTARM-A.....	106
4.3.6. Drogas psiquiátricas.....	107
4.3.6.1. Remoción de drogas psiquiátricas.....	108
4.5. Cuarta etapa.....	109
4.5.1. Evaluación de riesgo ambiental por la presencia de los PFs.....	109
4.5.2. Análisis estadístico de los datos.....	117
Capítulo V. Conclusiones	118
5.1. Recomendaciones.....	121
5.2. Perspectivas.....	122
Referencias	123
Apéndice A	144
Apéndice B	153
Anexo A	166

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de contaminantes emergentes.....	8
Tabla 2a. Productos farmacéuticos detectados en distintos cuerpos de agua	16
Tabla 2b. Productos farmacéuticos detectados en distintos cuerpos de agua.....	17
Tabla 2c. Productos farmacéuticos detectados en distintos cuerpos de agua	18
Tabla 3. Productos farmacéuticos detectados en aguas superficiales y residuales de México.....	20
Tabla 4. Ejemplos de PFs excretados en su forma inalterada y como conjugados hidrolizables.....	37
Tabla 5. Porcentajes de remoción (%) de productos farmacéuticos en diferentes PTARs.....	47
Tabla 6. Datos toxicológicos crónicos para organismos acuáticos expuestos a fármacos humanos.....	49
Tabla 7. Uso terapéutico y posibles impactos negativos a la salud de los PFs identificados en aguas residuales.....	50
Tabla 8. Lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión Europea.....	54
Tabla 9. Frecuencia de muestreo.....	63
Tabla 10. Parámetros y métodos de análisis en campo.....	64
Tabla 11. Gradiente de elución en modo IES+.....	69
Tabla 12. Gradiente de elución en modo IES-.....	69
Tabla 13. Preparación de los 11 puntos de la recta de calibración.....	71
Tabla 14. Condiciones óptimas del CLAR-EM-EM para el análisis de los PFs seleccionados en modo de ionización negativa y para los correspondientes PITs.....	83
Tabla 15. Condiciones óptimas del CLAR-EM/EM para el análisis de los PFs seleccionados en modo de ionización positiva y para para los correspondientes PITs.....	84
Tabla 16. Eficiencia del método analítico utilizado para la determinación de los PFs estudiados en aguas superficiales y residuales.....	86
Tabla 17. Concentración de los PFs detectados en el área de estudio.....	95
Tabla 18. Concentraciones de fármacos en el influente en otros estudios.....	99

Tabla 19.	Porcentajes de remoción reportados en otros Estudios.....	100
Tabla 20.	Porcentajes de remoción reportados en otros Estudios.....	103
Tabla 21.	Porcentajes de remoción reportados en otros Estudios.....	105
Tabla 22.	Porcentajes de remoción reportados en otros Estudios.....	106
Tabla 23.	Porcentajes de remoción reportados en otros Estudios.....	109
Tabla 24.	Valores CPSEs ($\mu\text{g/L}$) calculados a partir de datos de toxicidad reportados en la literatura para cada PF detectado en las muestras AS y EFL.....	112
Tabla 25.	Datos de toxicidad (mg/L) reportados para la alga, dafnia y pez	111
Tabla 26.	Cocientes de riesgo (CRs) de los PFs detectados en agua superficial antes (AS1) y después de la descarga de la PTARM-A (AS2).....	113
Tabla 27.	Cocientes de riesgo (CRs) de los PFs detectados en el efluente de la PTARM-A.....	113
Tabla 28.	Severidad de riesgo que representa la presencia de PFs en agua superficial y tratada suponiendo la presencia de e especies tróficas.....	113

Índice de Figura

Figura 1. Representación gráfica del Río Apatlaco y sus principales afluentes	6
Figura 2. Fuentes directas e indirectas de entrada al ciclo del agua de los contaminantes emergentes.....	11
Figura 3. Principales vías de liberación de PFs en el medio ambiente.....	13
Figura 4. Diagrama del procedimiento metodológico utilizado para estimar PFs y metabolitos en el medio ambiente acuático.....	14
Figura 5. Procedimiento típico para el análisis de PFs en muestras acuosas	22
Figura 6. Fuentes y posibles procesos que afectan la estabilidad de los PFs en las muestras antes del análisis.....	23
Figura 7. Técnicas analíticas aplicadas para la mayoría de los PFs en aguas superficiales y residuales.....	29
Figura 8. Espectros de masas de iones producto obtenidos para epoxicarbamazepina (epoxi) y trans-carbamazepina (TRANS) en un instrumento cuadrupolo-Orbitrap a 10 eV, y vía de fragmentación propuesta para la trans-carbamazepina.....	39
Figura 9. Principales metabolitos del diclofenaco formados en el cuerpo humano.....	42
Figura 10. Esquema de la estrategia experimental para la determinación de PFs en las muestras de agua.....	56
Figura 11. Equipo Orbitrap-cuadrupolo híbrido conectado a un espectrómetro de masas de alta resolución Q Exactive.....	58
Figura 12. PTARM-A y Cuenca del Río Apatlaco.....	60
Figura 13. Sistema de filtración a vacío.....	65
Figura 14. Sistema de extracción en fase sólida (EFS).....	66
Figura 15. Elución de los PFs.....	67
Figura 16. Equipo Turbo Vap® (izquierda) y Reacti-vap® (derecha).....	67
Figura 17. Equipo CLAR Symbiosis conectado a un 4000QTRAP.....	68
Figura 18. Optimización de las condiciones EM-EM en el equipo 4000QTRAP.....	70
Figura 19a. Parámetros analizados en el 1ero y 2do muestreo.....	76
Figura 19b. Parámetros analizados en el 1ero y 2do muestreo.....	77

Figura 20a. Parámetros analizados durante el 3er muestreo.....	77
Figura 20b. Parámetros analizados durante el 3er muestreo.....	77
Figura 21a. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras.....	79
Figura 21b. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras.....	80
Figura 21c. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras.....	80
Figura 21d. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras.....	80
Figura 21e. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras.....	81
Figura 21f. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras.....	81
Figura 21g. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras.....	81
Figura 21h. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras.....	82
Figura 22. Efecto matriz (%) observado en el caso de los PFs analizados en modo de ionización negativa en las diferentes matrices de agua evaluadas.....	88
Figura 23. Efecto matriz (%) observado en el caso de los PFs analizados en modo de ionización positiva en las diferentes matrices de agua evaluadas.....	89
Figura 24. Concentraciones promedio de los PFs detectados en AS1 y AS2 para las campañas de muestreo 2015 y 2016.....	91
Figura 25. Concentración promedio de los PFs detectados en el INF y EFF en el año 2016. Así como su eficiencia de remoción de cada fármaco durante el tratamiento del agua residual.....	93

Capítulo I. Introducción

Actualmente uno de los desafíos más grandes a nivel mundial es garantizar la calidad de los recursos hídricos, dado que cotidianamente se vierten a los ecosistemas acuáticos desechos industriales, urbanos y productos utilizados para el bienestar humano a través de las aguas residuales (Robledo *et al.*, 2017).

En las últimas 2 décadas se han identificado grupos de contaminantes denominados emergentes que son compuestos que no se encuentran regulados en las legislaciones ambientales vigentes en ninguna parte del mundo y, por lo tanto, pueden estar presentes en los recursos hídricos a concentraciones que van desde unos pocos ng/L a varios µg/L (Barceló, 2003).

Entre el amplio grupo de contaminantes emergentes, los productos farmacéuticos (PFs) son una de las principales preocupaciones para la comunidad científica, debido a que son ampliamente utilizados en la medicina humana y veterinaria y pueden llegar al medio ambiente acuático a través de diferentes rutas, la principal ruta de entrada es a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs); sin embargo no se logra la remoción total de estos compuestos, lo que puede ocasionar efectos adversos a los organismos acuáticos (Kümmerer, 2011).

El análisis químico de dichos compuestos en muestras ambientales, se constituye en todo un reto, específicamente por la cantidad de interferencias y por las bajas concentraciones que algunos de los compuestos presentan. Una de las etapas más críticas dentro del análisis químico, es la extracción de los compuestos de interés desde la muestra de agua, para ello se utilizan cartuchos de extracción en fase sólida (EFS), que permiten eliminar algunas interferencias y al mismo tiempo concentra los analitos de interés.

El análisis químico, se realiza mediante el uso de cromatografía de gases y de líquidos, ambas acopladas a espectrometría de masas. Dichas configuraciones han permitido realizar una vigilancia y control del medio ambiente por la presencia de contaminantes emergentes, dada la alta sensibilidad y selectividad que estas metodologías poseen (Guillén *et al.*, 2012).

En México se tiene poca información científica sobre la presencia de mezclas complejas de contaminantes emergentes, que tienen diversos orígenes y que representan un problema ambiental. Los trabajos de Siemens *et al.*, 2008; Durán-Álvarez *et al.*, 2014; 2015 han abierto estas investigaciones en este país, centrándose en la cuantificación, transporte y biodegradación de PFs como el naproxeno, carbamazepina y triclosan entre otros.

La escasez de información sobre los contaminantes emergentes dificulta su regulación a través de las normas mexicanas, encargadas de vigilar la calidad del agua. Esto es relevante en un contexto de escasez creciente de agua dulce y donde se buscan alternativas para disponer de aguas residuales tratadas para su reutilización en la agricultura. Por otro lado, las PTARs que operan en México fueron diseñadas para depurar sólidos, materia orgánica disuelta y nutrientes, por lo que muchos compuestos tóxicos pasan el proceso de tratamiento con poca o ninguna modificación en su concentración (Robledo-Zacarías *et al.*, 2017).

Por lo anterior, el propósito de la presente investigación fue determinar la presencia de productos farmacéuticos en el influente y efluente de una PTARM, así como en el Río Apatlaco, cuerpo receptor donde descarga su efluente esta planta. Para dicho fin se desarrolló un método analítico multiresiduo utilizando CLAR-EM-EM.

El presente trabajo se dividió en 5 capítulos: en el capítulo I se muestra la importancia y el porqué del estudio de los contaminantes emergentes, específicamente de los PFs con base a la literatura consultada. El capítulo II expone todo lo relacionado a contaminantes emergentes, clasificación, productos farmacéuticos, sus principales fuentes y distribución de entrada al medio ambiente acuático, la presencia y concentraciones de éstos a nivel mundial.

Los métodos analíticos desarrollados para su determinación y transformación de los PFs durante los distintos tratamientos del agua, su remoción en las PTARs y las recomendaciones generales que se deben de considerar para la determinación en agua superficiales y residuales. En el capítulo III se describe detalladamente como se llevó a cabo muestreo, así cómo el desarrollo y la validación del método multiresiduo que se utilizó para el análisis de las muestras de agua superficial y residual en el área de estudio utilizando la técnica analítica CLAR-EM-EM.

En el capítulo IV se presentan los resultados de la validación del método, los PFs identificados en ambos muestreos con sus respectivas concentraciones y finalmente, se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de riesgo realizada utilizando las concentraciones obtenidas. Finalmente en el capítulo V se presentan las conclusiones y perspectivas y prospectivas del presente trabajo. Adicionalmente en el apéndice A se presentan los cromatogramas de los PFs detectados en las muestras de agua y en el apéndice B el análisis estadístico de los muestreos 2015 y 2016.

Justificación

Según los estudios de los índices de calidad del agua, el 60.95% de los ríos de la región Balsas en México están contaminados, entre ellos está el Río Apatlaco, contaminado principalmente por materia orgánica, nitrógeno, patógenos y posiblemente por contaminantes emergentes, entre ellos están los productos farmacéuticos y sus subproductos (metabolitos), que no se encuentran regulados por ningún tipo de normativa, y cuyos efectos sobre el medio ambiente en general (seres humanos y biota) no son bien conocidos pero pueden representar grandes riesgos para la salud humana.

Si bien no se trata de compuestos persistentes, éstos son constantemente utilizados y desechados del organismo, a través de orina y heces fecales que son vertidos a los sistemas de tratamiento convencionales de aguas residuales, las cuales no los eliminan totalmente, lo que permite que su concentración aumente en los ecosistemas, lo que sugiere el desarrollo de nuevos sistemas de tratamiento para que sean eliminados. La Cuenca del Río Apatlaco es la más importante en el estado de Morelos y atraviesa una gran parte de los asentamientos humanos; asimismo durante su recorrido recibe una cantidad importante de descargas provenientes de la actividad agrícola. Es por ello que este estudio se enfocó en determinar la presencia de contaminantes emergentes (productos farmacéuticos) en la Cuenca del Río Apatlaco y la evaluación del posible riesgo a éste por la presencia de los PFs.

Objetivos

Objetivo general

Investigar la presencia de contaminantes emergentes (productos farmacéuticos) en la cuenca del Río Apatlaco ubicada en el estado de Morelos y evaluar el riesgo ambiental por la presencia de éstos.

Objetivos específicos

- 1) Investigar el estado del arte acerca de los productos farmacéuticos consumidos en México para seleccionar aquellos de mayor consumo por parte de la población para identificar cuales pueden estar presentes en la cuenca del Río Apatlaco.
- 2) Seleccionar la zona de estudio aguas arriba y abajo de la PTARM Acapantzingo y diseñar el protocolo de muestreo con base en la norma NMX-AA-003-1980.
- 3) Desarrollar un método analítico multiresiduo para la determinación de productos farmacéuticos presentes en aguas, utilizando CL-EM-EM.
- 4) Determinar cuantitativamente las concentraciones de los productos farmacéuticos encontrados en las aguas superficiales, residuales y tratadas.
- 5) Evaluar el riesgo ambiental debido a la presencia de productos farmacéuticos presentes en la cuenca del Río Apatlaco mediante la obtención de los cocientes de riesgo (CRs).

Hipótesis

Es posible determinar la presencia de contaminantes emergentes del tipo productos farmacéuticos a niveles de trazas en aguas residuales y superficiales utilizando Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem, ya que éstos fármacos representan un significativo riesgo ambiental a la Cuenca del Río Apatlaco.

Capítulo II. Marco teórico

2.1. Cuenca del Río Apatlaco

El río Apatlaco nace en el municipio de Huitzilac, donde se le conoce como Barranca de Indio y Barranca de Chalchihuapan; en Cuernavaca adquiere su nombre, al unirse los ríos Coajomulco y San Antón, con aportaciones de diversos manantiales, principalmente el de Chapultepec, que aumenta su caudal con los escurrimientos de las barrancas Atlacomulco, Cantarranas y Flores Magón. Continúa hacia el sur y recibe las aportaciones de El Túnel, el río del Pollo (drenaje natural del poniente de la ciudad de Cuernavaca), así como de los arroyos Pilcaya y Panocheras, y del Río Tetlama por su margen derecho. Por el izquierdo confluyen el Río Palo Escrito y el arroyo Poza Honda. El cauce principal tiene una longitud de 45 km desde la unión del arroyo Chapultepec hasta su confluencia con el río Yautepec, y una pendiente promedio de 4.5% (Figura 1) (Villafaña, 2010; CONAGUA, 2008).



Figura 1. Representación gráfica del Río Apatlaco y sus principales afluentes (Villafaña, 2010).

El Río Apatlaco se abastece de dos afluentes principales: el Pollo y Chapultepec; aunque también confluyen los arroyos permanentes el Salto y Ojo de Agua; los manantiales el Limón, Chapultepec, Santa María Tepeiti y el Túnel. Nace como cauce continuo en los manantiales de Chapultepec y recibe las aguas de las barrancas del centro y occidente de Cuernavaca, destacándose el Túnel, el Pollo (drenaje natural del poniente de la ciudad), Pilcaya, Amanalco, el Limón, Tlazala y los Sabinos. Aumenta su caudal por los aportes del Río Cuentepec y los arroyos Salado, Fría, Salto de Agua, Colotepec y Poza Honda. El Río Apatlaco es un cuerpo receptor tipo “B” con uso público urbano en los municipios de Huitzilac, Cuernavaca y Temixco. Así, el río y algunos de sus afluentes deberían recibir el 62.5% de los promedios diarios de los parámetros: sólidos suspendidos totales (SST) y demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) (CONAGUA, 2008).

De acuerdo con un estudio del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), la calidad del agua del Río Apatlaco no era apta para actividades agrícolas, causando daños a los productores y diversos sectores de la población. Las descargas de aguas residuales medidas como DBO₅, han ido en aumento en los últimos años. Se aportan 44.8 millones de kilogramos y se descargan 2,498 L/S por segundo de aguas residuales, correspondientes al 83% a origen industrial y 17% a origen urbano. Por lo tanto, La Cuenca del Río Apatlaco se ha convertido en un grave riesgo sanitario para los habitantes de por lo menos 10 municipios del estado de Morelos, debido al alto grado de contaminación, pues el agua no era apta para consumo humano ni para actividades agrícolas. Este problema afecta la salud humana y animal, ya que podrían consumir productos regados con esa agua, por lo que pudieran resultar contaminados. Muestra del daño ocasionado es la devastación, que pudiera ser irreparable, de la fauna acuática que habita el cauce del río (El sol de Mexico, 2016).

2.2. Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes (CEs) corresponden, en la mayoría de los casos a contaminantes no regulados, que pueden ser candidatos a futuras regulaciones dependiendo de investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud y los datos de monitoreo con respecto a su incidencia. Algunos de estos contaminantes, son utilizados en grandes cantidades diariamente e incluye una amplia variedad de compuestos (Tabla 1) como: productos farmacéuticos (PFs), esteroides y hormonas, productos para el cuidado personal (PCPs), antisépticos, surfactantes y metabolitos de éstos, retardantes de flama aditivos de las gasolinas, aditivos industriales y subproductos de la desinfección del agua que comúnmente están presentes en el medio acuático a concentraciones de trazas, que van desde unos pocos ng/L a varios µg/L (Barceló, 2003).

Tabla 1. Clasificación de contaminantes emergentes (Barceló, 2003).

Clases de compuestos	Ejemplos
1. Productos farmacéuticos	
Antibióticos	Trimetoprim, eritromicina, amoxicilina, ofloxacina, ciprofloxacina, lincomicina, sulfametoxazol, azitromicina, tilosin A, tilmicosin y cloranfenicol.
Analgésicos y anti-inflamatorios	Ketoprofeno, naproxeno, ibuprofeno, indometacina, diclofenaco, ácido mefenámico, acetaminofén, ácido salicílico y propifenazona.
Drogas psiquiátricas	Diazepam, doxepin, lorazepam, sertralina, alprazolam, citalopram, venlafaxina, carbamazepina.

Tabla 1. Continuación

Clases de compuestos	Ejemplos
Reguladores de lípidos	Bezafibrato, ácido clofibrico, ácido fenofibrico, gemfibrozil y atorvastatin.
Beta-bloqueadores	Atenolol, metoprol, nadolol, pindolol, propanolol, sotalol, betaxolol y carazolol.
3. Esteroides y Hormonas	Estriol, testosterona, estrona y 17- β -estradiol.
4. Productos de cuidado personal	
Perfumes	Fragancias, policíclicos y macrocíclicos
Agentes de protección solar	Benzofenona, metilbencilideno alcanfor
Repelentes de insectos	N,N-dietiltoluamida.
5. Antisépticos	Triclosan, clorofeno.
6. Retardantes de flama	Difenil éteres polibrominados (PBDEs), Tetrabromo bisfenol A, Tris(2-cloroetil) fosfato.
7. Aditivos y agentes industriales	Agentes quelantes (EDTA), sulfonatos aromáticos.
8. Aditivos de la gasolina	Dialquil éteres, metil-t-butil éter (MTBE).
9. Subproductos de desinfección	Yodo-trihalometanos, bromoácidos, bromoacetnitrilos, bromoaldehídos, cianoformaldehído, bromato.

Muchos de estos contaminantes son tóxicos y por lo tanto, son clasificados como disruptores endocrinos, lo que implica que una exposición a los mismos puede dar lugar a alteraciones en el crecimiento, desarrollo, reproducción y comportamiento de los organismos vivos (Bolong *et al.*, 2009).

Este tipo de contaminantes son compuestos de los cuales no se sabe mucho, acerca de su presencia e impacto en las distintas esferas ambientales, razón por la cual que no hayan sido regulados; asimismo se requiere de la optimización de metodologías analíticas más específicas y sensibles.

Otra particularidad de estos compuestos, es que, debido a su elevada producción y consumo y a la continua introducción de los mismos en el medio ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos. La aparición de los CEs y la variación en las concentraciones en el medio ambiente, dependen de sus propiedades físico-químicas, como; constantes de partición, solubilidades o constantes cinéticas que caracterizan los diferentes fenómenos dinámicos como las reacciones bióticas y abióticas como la biodegradación, hidrólisis, fotodegradación, volatilización, procesos de adsorción, así como condiciones ambientales externas, como la composición de la matriz, procesos biológicos, condiciones hidrológicas y climatológicas (Guillén *et al.*, 2012).

Los CEs tienen su origen en fuentes directas e indirectas de entrada al ciclo del agua, donde en alguna parte de este ciclo, en el cual confluyen distintas esferas ambientales y actividades humanas, se produce la alteración de su calidad. De acuerdo con este ciclo, las principales vías de entrada de contaminantes en el medio ambiente acuático son las aguas residuales, entre las que se incluyen las urbanas, industriales y las de origen agrícola o ganadero (Figura 2). Algunas de estas aguas alcanzan aguas superficiales (ríos y lagos) y finalmente aguas subterráneas (Petrović *et al.*, 2003).

Por lo tanto, estos compuestos son capaces de llegar a cualquier medio natural y representar un grave riesgo por el consumo de agua potable, sin embargo, estos riesgos son difíciles de precisar, debido a que para la mayoría de estos contaminantes no se cuentan con datos de toxicidad, por lo que es difícil predecir los efectos sobre la salud en seres humanos y organismos acuáticos que resultan en efectos potencialmente dañinos (Fent *et al.*, 2006). Como consecuencia de este problema, se ha sugerido la aplicación de nuevas tecnologías de tratamientos avanzados con el fin de eliminar las trazas de CE's y mejorar la calidad del agua (Klavarioti *et al.*, 2009).

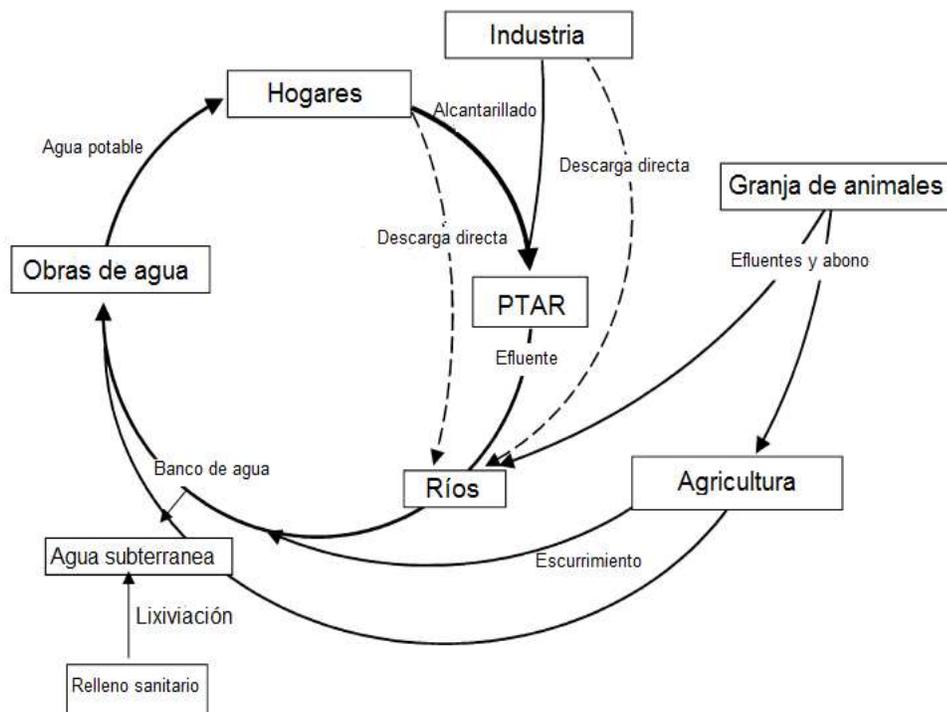


Figura 2. Fuentes directas e indirectas de entrada al ciclo del agua de los contaminantes emergentes (Petrović *et al.*, 2003).

2.3. Fuentes y distribución de PFs en el medio ambiente acuático

En las últimas tres décadas los CEs que han despertado una considerable preocupación son los PFs debido a que su presencia en el medio ambiente y su impacto toxicológico aún son pocos conocidos y, por lo tanto, su uso aún no está sujeto a ninguna regulación. Además, los PFs no necesitan persistir en el medio ambiente para causar efectos nocivos debido a su introducción continua en el medio ambiente y el hecho de que son sustancias biológicamente activas pueden transformarse en otros productos, a menudo desconocidos, que pueden ser más persistentes y tóxicos que el compuesto original y presentar efectos biológicos no deseados en los organismos expuestos (Farré *et al.*, 2008).

Los PFs pueden llegar al medio ambiente al ser transportados y distribuidos a través de diferentes rutas (Figura 3). Las principales rutas son los residuos generados por la industria farmacéutica, efluentes de las PTARs debido a la incompleta absorción y metabolización de los fármacos por el cuerpo humano, dando como resultado, la porción no metabolizada es descargada al ambiente acuático a través de la orina y las heces finalizando en el drenaje, por escorrentía de suelos tratados con lodos provenientes de PTARs, escorrentía de suelos con estiércol que contenía medicamentos veterinarios, etc. (Boxall *et al.*, 2012).

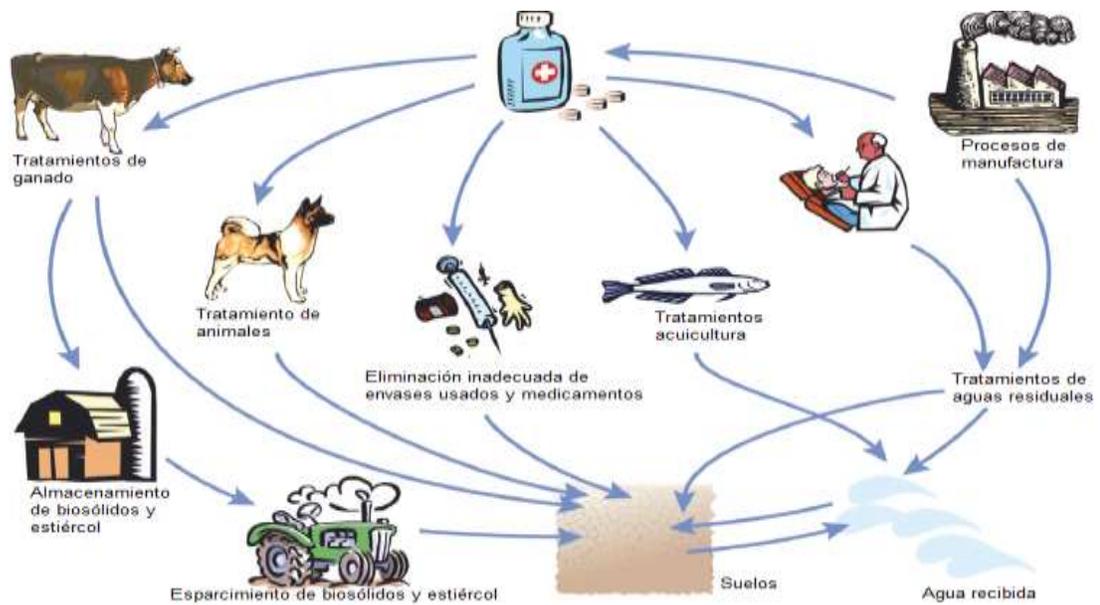


Figura 3. Principales vías de liberación de PFs en el medio ambiente (Boxall *et al.*, 2012).

La presencia de los PFs en el medio ambiente puede estar en función de: a) la cantidad manufacturada de estas sustancias, b) la cantidad ingerida y frecuencia de la dosis; c) el índice de excreción del compuesto original y sus metabolitos; d) la propensión de estos fármacos a adsorberse en los sólidos suspendidos del agua residual y e) las transformaciones metabólicas sufridas en los sistemas de tratamiento del agua residual (Durán, 2009).

En el estudio de Ortiz de García *et al.*, (2013), seleccionaron ciertos PFs de acuerdo al consumo por parte de la población en España y su presencia en el medio acuático europeo, desarrollaron un procedimiento para estimar los PFs y sus metabolitos en el medio ambiente acuático a partir de su prescripción y/o venta (Figura 4).

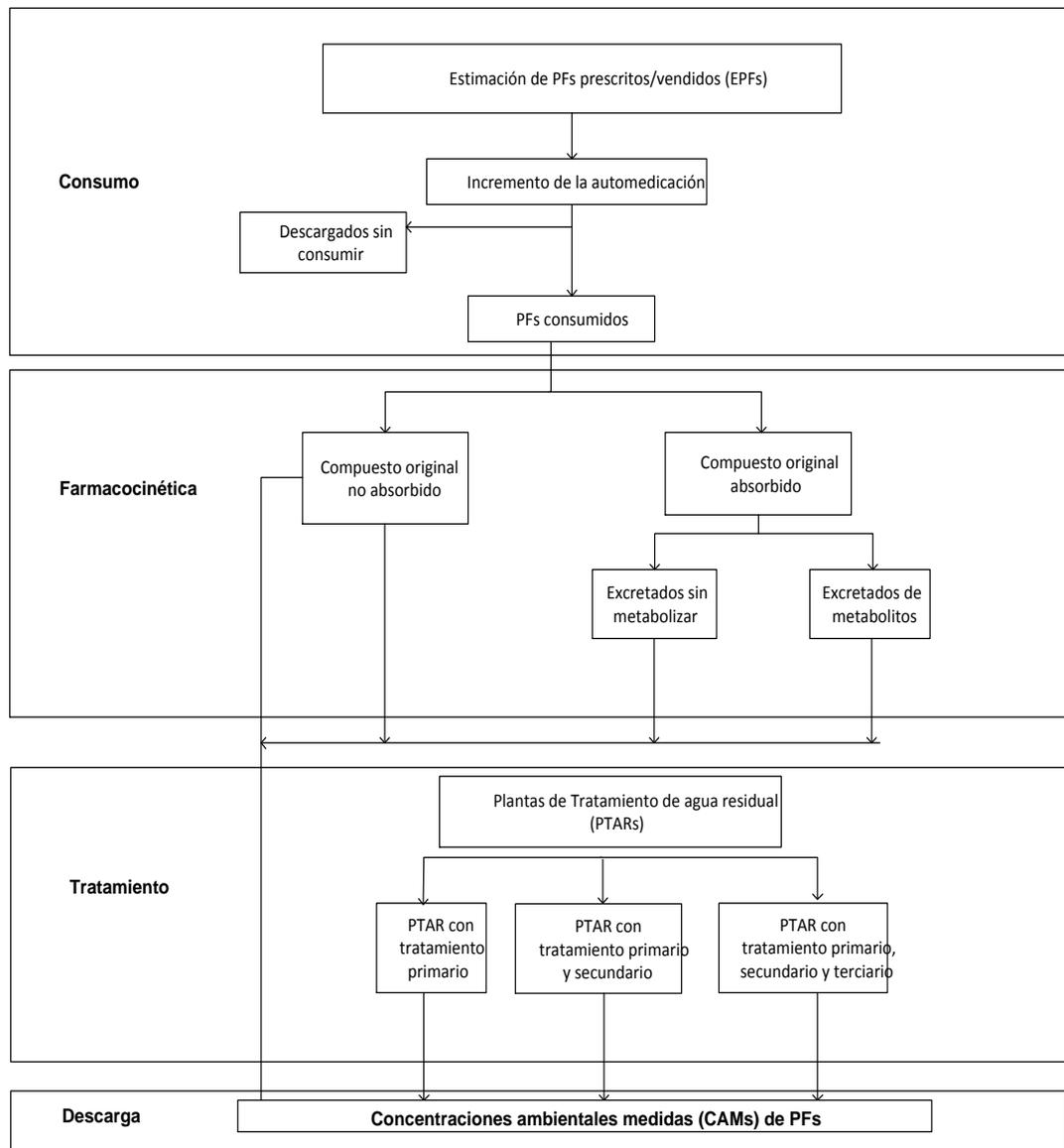


Figura 4. Diagrama del procedimiento metodológico utilizado para estimar PFs y metabolitos en el medio ambiente acuático (Ortiz de García *et al.*, 2013).

Respecto a concentraciones de PFs encontrados en PTARs, Verlicchi *et al.*, (2012) reportaron la presencia de 118 PFs, pertenecientes a 17 diferentes clases terapéuticas, determinados en el influente y efluente de 244 PTARs en toda Europa. Ellos encontraron que los PFs mostraban rangos de concentraciones variables, siendo más altas en el influente en comparación con las concentraciones encontradas en el efluente.

El grupo terapéutico detectado con mayores concentraciones en el influente, fue el de los analgésicos/anti-inflamatorios, aunque en el efluente se detectaron a niveles por debajo de los observados para los reguladores de lípidos y los beta-bloqueadores.

Entretanto Hughes *et al.*, (2013), analizaron a escala mundial los datos reportados sobre la presencia de 203 PFs en efluentes de PTARs y agua superficial en 41 países, encontrando que la carbamazepina, el bezafibrato, el ácido clofíbrico, el ibuprofeno y el diclofenaco fueron los PFs más frecuentemente detectados en el efluente y agua superficial.

Recientemente, Spongberg *et al.*, (2011) analizaron 34 Productos Farmacéuticos y de Cuidado Personal (PFCPs) en 86 muestras individuales de agua recolectadas de aguas superficiales y costeras en Costa Rica. Los sitios de muestreo incluyeron áreas impactadas tanto por aguas residuales tratadas como no tratadas, y escorrentía superficial.

Mientras que en Italia, Meffe y de Bustamante, (2014) realizaron la primera revisión sobre la presencia de PFs en aguas superficiales, donde encontraron que de los 66 PFs detectados, el acetaminofén (3,590 ng/L), furosemida (605 ng/L), sotalol (504 ng/L), carbamazepina (345 ng/L), ofloxacina (306.1 ng/L), naproxeno (264 ng/L), hidroclorotiazida (255.8 ng/L), lincomicina (248.9 ng/L), atenolol (241.9 ng/L), sulfadiazina (236 ng/L), ibuprofeno (210 ng/L), ácido salicílico (205 ng/L) y bezafibrato (202.7 ng/L) presentaban las máximas concentraciones.

En las Tablas 2a, b y c se resumen las concentraciones de PFs detectados en influentes y efluentes de PTARs, así como aguas superficiales en diferentes países.

Tabla 2a. Productos farmacéuticos detectados en distintos cuerpos de agua

Compuestos	Concentración (ng/L)			
	Influyente	Efluente	Agua superficial	Referencias
Acetaminofén	^a 62-2452; ^b 4,160-1,5600; ^e 130-26,090; ^f 68,107-482,687; ^j 6,813-7,515; ^k 59-16,900; ^l 430-3,280; ^m 20,1300	^b 1060; ^e 5,990; ^f 80-24,525; ⁱ 201,000; ^j 4.7-7,443; ^k 80; ^l 37-494; ⁿ 2-19	^b 39; ^e 250; ^f 1.5-1,534; ⁱ 1,968; ^l 144-305; ^h 1,794-2,190; ⁿ 4.1-73	^a Papageorgiou <i>et al.</i> , 2016 ^b Gros <i>et al.</i> , 2009
Ácido clofibrico	^b 30; ^e 110; ^f 1-57; ^j 17-48; ^l 308-740; ⁿ 610	^b 3-31; ^e 20-30; ^f 1-75; ^h 94-112; ^j 13; ^l 64-203; ⁿ 96	^b 0.4-18; ^e 10-20; ^a 877; ^l 105-168; ^f 0.3-8; ^h 18.6-23.4	^c Petrović <i>et al.</i> , 2014 ^d Grujić <i>et al.</i> , 2009 ^e Gros <i>et al.</i> , 2006 ^f Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2009
Ácido mefenámico	^b 130; ^e 5; ^f 17-1,269	^b 60; ^e 10; ^f 5-222	^e 3; ^f 0.3-33	^g Ferrer <i>et al.</i> , 2010
Ácido salicílico	^a 1,192; ^b 3,810; ^f 1,479-32,082; ^l 576-1,673; ^m 276,700	^b 70; ^f 1-497 ⁱ 80,000; ^l 46.8-224; ^m 236,100	^a 153; ^b 42; ^c 2.7; ^f 0.3-140; ⁱ 1160; ^l 86.7-184	^h Nödler <i>et al.</i> , 2010 ⁱ Gracia-Lor <i>et al.</i> , 2011 ^j Yan <i>et al.</i> , 2014 ^k Pereira <i>et al.</i> , 2015 ^l Stamatis y Konstantinou, 2013
Atenolol	^b 120-1310; ^e 740; ^f 3090-33106	^b 104-1160; ^e 1150; ^f 1260-7602; ^h 229-261	^b 27; ^c 50.6; ^e 250; ^f 5-560; ^h 62-69	^m Gracia-Lor <i>et al.</i> , 2010 ⁿ Kim <i>et al.</i> , 2009
Bezafibrato	^b 179-841; ^e 50; ^f 135-1,391; ^j 98-140; ^k 0.7-1,348; ^m 460	^b 10-464; ^e 10; ^f 85-667; ^h 157-179; ⁱ 312; ^j 26-151; ^k 240; ^m 390	^b 0.3-25; ^c 1.6; ^e 10; ^f 10-90; ^h 26-31; ⁱ 49	ⁿ Bo <i>et al.</i> , 2015.

Tabla 2b. Productos farmacéuticos detectados en distintos cuerpos de agua

Compuestos	Concentración (ng/L)			Referencia
	Influyente	Efluente	Agua superficial	
Carbamazepina	^a 7-114; ^b 37-277; ^e 950; ^f 104-3,110; ^l 326-1,012; ^j 9.8-20.1;	^b 114-277; ^e 630; ^f 152-4,596; ^h 1,383-1,475; ^l 172-552; ⁱ 12.1-22; ⁿ 73-729	^b 1-60; ^c 35.5; ^d 8-130; ^e 110; ^f 0.5-647; ^g 21-147; ^h 255-275; ^l 92-186; ⁿ 4.5-61;	^a Papageorgiou <i>et al.</i> , 2016 ^b Gros <i>et al.</i> , 2009 ^c Petrović <i>et al.</i> , 2014
Diclofenaco	^a 4,869; ^b 270-1,250; ^e 50-540; ^f 26-1,161; ^j 5.81-6.21; ^k 635.5; ^l 99.9-696; ^m 1,490; ⁿ 566-22,800	^b 10-640; ^e 390; ^f 6-496; ^h 1,403-1,581; ⁱ 690; ^j 2.8-6.37; ^k 177.4; ^l 33.5-242; ^m 740; ⁿ 8.8-127; ⁿ 167-7,010	^b 219; ^c 324; ^e 60; ^f 0.5-261; ^h 150-162; ⁱ 358; ^l 51.1; ⁿ 1.1-6.8;	^d Grujić <i>et al.</i> , 2009 ^e Gros <i>et al.</i> , 2006 ^f Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2009 ^g Ferrer <i>et al.</i> , 2010 ^h Nödler <i>et al.</i> , 2010
Gemfibrozil	^b 26-1040; ^e 360; ^j 12.7-18.2; ^k 1138.5; ^l 471-1252; ^m 2120; ⁿ 490-76100;	^b 2-378; ^e 320; ⁱ 2008; ^j 26.7; ^k 169; ^l 126-394; ^m 1214; ⁿ 3.9-17; ⁿ 115-627	^a 986; ^b 0.7-76; ⁱ 304; ^l 145-301; ⁿ 3.9-17	ⁱ Gracia-Lor <i>et al.</i> , 2011 ^j Yan <i>et al.</i> , 2017 ^k Pereira <i>et al.</i> , 2015
Ibuprofeno	^b 7,320-18,410; ^e 900; ^f 968-6,328; ^j 243.8-296.5; ^k 1,266.9; ^l 1,258; ^m 39,800	^b 12,070; ^e 40-800; ^f 65-491; ⁱ 15,100; ^j 11.1-320.2; ^k 116.9; ^l 78.9; ⁿ 10-137;	^b 129; ^c 346; ^e 150; ^f 5-62,0.3-74; ⁱ 2,850; ⁿ 11-38	^l Stamatis y Konstantinou, 2013 ^m Gracia-Lor <i>et al.</i> , 2010 ⁿ Kim <i>et al.</i> , 2009
Indometacina	^b 80	^b 80	^b 30; ^c 19.5; ^e 10	ⁿ Bo <i>et al.</i> , 2015.

Tabla 2c. Productos farmacéuticos detectados en distintos cuerpos de agua

Compuestos	Concentración (ng/L)			Referencia
	Influyente	Efluente	Agua superficial	
Ketoprofeno	^e 160-970; ^f 4-119,31-346	^e 130-620; ^f 3-37; ⁱ 583	^f 0.5-12; ⁱ 70	^b Gros <i>et al.</i> , 2009
Metoprolol	^f 39-146	^f 34-130, ^h 2352-2674	^c 26.3; ^f 0.5-12; ^h 315-359	^c Petrović <i>et al.</i> , 2014 ^e Gros <i>et al.</i> , 2006
Propifenazona	^c 99.5		^c 9.09	^f Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2009
Salbutamol	^f 2-321	^f 1-234	^f 0.5-5	
Sotalol	^e 120-200	^e 210	^b 16 ^e 70;	^g Ferrer <i>et al.</i> , 2010 ^h Nödler <i>et al.</i> , 2010
Sulfametoxazol	^b 163-909; ^e 870; ^f 3-274; ^j 2460, 4-3180	^b 13-448; ^e 820; ^f 3-44; ^h 474-544; ⁱ 432; ^j 1,060.3-1,908.2; ⁿ 3.8-407	^b 50; ^f 0.5-8; ^g 5-210; ^h 88.6-97.4; ⁱ 33; ⁿ 1.7-36	ⁱ Gracia-Lor <i>et al.</i> , 2011 ^j Yan <i>et al.</i> , 2017 ^l Stamatis y Konstantinou, 2013
Trimetroprim	^f 464-6796	^f 625-3,052; ^h 653-709; ⁿ 10-188	^c 8.1; ^f 0.5-183; ^g 105; ^h 90.8-99.2; ⁿ 3.2-5.3	ⁿ Kim <i>et al.</i> , 2009 ^ñ Bo <i>et al.</i> , 2015.

2.4. Presencia de productos farmacéuticos en aguas superficiales y residuales de México

México es un país líder en el reúso del agua residual para irrigación a nivel de Latinoamérica y mundial, cerca de 350000 hectáreas son regadas con esta agua, las cuales se distribuyen en 30 distritos de riego a lo largo del territorio nacional. De estos Distritos destacan los empleados en el Valle de Tula, Hidalgo, los cuales representan cerca del 43% de la demanda total de agua residual para riego, y el 33% del área total irrigada en el país. Cerca del 90% del agua residual producida en la Ciudad de México es transportada al Valle de Tula mediante el emisor central, poniente y el gran canal (Jiménez y Chávez, 2002; Durán, 2009). Por lo tanto, varios estudios se han realizado en la zona del Valle de Tula con la finalidad de conocer la calidad del agua residual con la que es regada suelos de la zona. Por un lado, Gibson *et al.*, (2007), demostraron que la infiltración del agua residual a través del suelo es efectiva para la remoción de fármacos ácidos (gemfibrozil, ketoprofeno y naproxeno). Pero para compuestos como, triclosán, 4-nonilfenoles y ácido salicílico son capaces de pasar a través de la zona vadosa del suelo y llegar al acuífero.

Por otra parte, Siemens *et al.*, (2008), estudiaron la movilidad de PFs seleccionados en diferentes puntos del sistema de riego de aguas residuales del Valle de Mezquital en la Ciudad de México. Encontrando que las especies aniónicas de sustancias farmacéuticamente activas son móviles en los suelos arcillosos del valle del Mezquital y muestran poca eliminación durante el almacenamiento del yacimiento, mientras que los compuestos catiónicos o neutros son eficientemente retenidos. Mientras que Durán (2009), estudio la presencia y distribución del ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y carbamazepina en dos clases de suelo (Phaeozem y Leptosol) con dos edades bajo riego (10 y 90 años), encontrando que los fármacos presentes en el agua residual que se emplea para riego en el Valle de Tula se encontraban en el

suelo que las recibe y estos compuestos se distribuían en el suelo en función de su contenido de materia orgánica.

En un estudio realizado por el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), se evaluó la presencia de 15 PFs en aguas del río Yautepec y Cuautla y en el efluente de una PTARM de Yautepec ubicada en Morelos. En cuanto a los resultados obtenidos en el efluente de la PTAR se detectaron los fármacos atenolol (6.75-9.10 ng/ mL), sulfametoxazol (87-136 ng/mL), propranolol (2.85-6.25 ng/mL), naproxeno (1.45-1.86 ng/mL). En el caso del río, los fármacos encontrados en mayores concentraciones fueron metoprolol (0.6-7.2 ng/mL), sulfametoxazol (3- 204.5 ng/mL) en agua de río de Yautepec, Morelos. En agua de río de Cuautla no se detectó la presencia de ningún fármaco (Avilés *et al.*, 2015). En la Tabla 3 se muestran los PFs detectados en otros estudios realizados en México.

Tabla 3. Productos farmacéuticos detectados en aguas superficiales y residuales de México

Compuesto	Matriz	Concentración min-max (ng/L)	Referencia
Ácido salicílico	Agua residual	* ^c 29867; ** ^d 72979	^c Castro, 2008 ^d Chávez <i>et al.</i> , 2011
	Agua superficial	^e 29-309	^e Félix-Cañedo <i>et al.</i> , 2013
Bezafibrato	Agua residual	^b 30-650	^b Siemens <i>et al.</i> , 2008
Diclofenaco	Agua residual	^a 1720-6360; ^b 2500-5000; ^c 1607; ** ^d 3768	^a Gibson <i>et al.</i> , 2007 ^b Siemens <i>et al.</i> , 2008 ^c Castro, 2008 ^d Chavéz <i>et al.</i> , 2011
	Agua superficial	28-32	Félix-Cañedo <i>et al.</i> , 2013

Tabla 3. Continuación

Compuesto	Matriz	Concentración min-max (ng/L)	Referencia
Gemfibrozil	Agua residual	^a 640-680; ^b 20; ^c 680	^a Gibson <i>et al.</i> , 2007 ^b Siemens <i>et al.</i> , 2008 ^c Castro, 2008
	Agua superficial	9-10	Félix-Cañedo <i>et al.</i> , 2013
Ibuprofeno	Agua residual	^a 4380-5090; ^b 2200-3800; ^c 2500; ^d 4700	^a Gibson <i>et al.</i> , 2007 ^b Siemens <i>et al.</i> , 2008 ^c Castro, 2008 ^d Chavéz <i>et al.</i> , 2011
	Agua superficial	15-45	Félix-Cañedo <i>et al.</i> , 2013
Naproxeno	Agua residual	^a 15220-16650; ^b 4800-5600; ^c 13620; ^d 16336	^a Gibson <i>et al.</i> , 2007 ^b Siemens <i>et al.</i> , 2008 ^c Castro, 2008 ^d Chavéz <i>et al.</i> , 2011
	Agua superficial	52-186	Félix-Cañedo <i>et al.</i> , 2013

*Concentración promedio; **concentración máxima

2.5. Métodos analíticos utilizados para la determinación de PFs en agua

En las últimas décadas, se ha intensificado el interés por el desarrollo de técnicas analíticas que permitan la detección de concentraciones en el orden de ng/L en medios acuosos, principalmente debido a que una gran variedad de los contaminantes emergentes se encuentran por debajo del límite de detección instrumental. Es por ello, que la primera condición previa para seleccionar un compuesto para estudio es que dicho compuesto pueda ser detectado en cualquier tipo de influente.

Esto es particularmente importante porque generalmente los efluentes derivados del agua residual experimentan una dilución con agua proveniente de otras fuentes después de ser descargadas (Castro, 2008).

Aunque existen numerosas metodologías analíticas desarrolladas para la determinación de PFs en muestras acuosas y en donde se sigue un procedimiento típico ya conocido de acuerdo a Fatta *et al.*, (2007) y se muestra en la Figura 5. Sin embargo, actualmente aun falta mejorar algunos aspectos metodológicos, que permitan disminuir la incertidumbre en la detección.

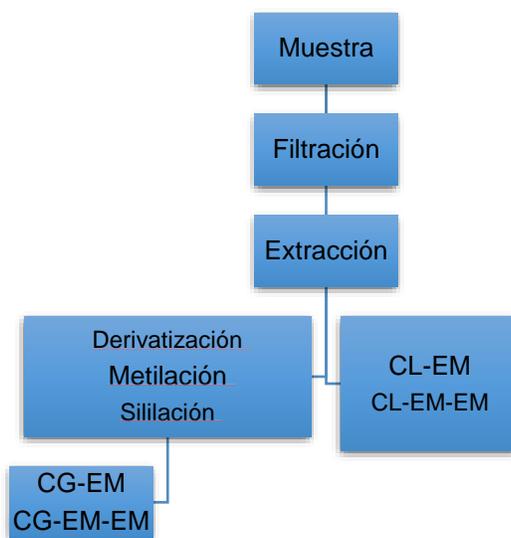


Figura 5. Procedimiento típico para el análisis de PFs en muestras acuosas (Fatta *et al.*,2007).

La trazabilidad de los analitos desde la colecta de las muestras, el transporte, el almacenamiento y el tratamiento analítico son los factores más importantes en el análisis de muestras ambientales, debido a que pueden conducir a datos e interpretaciones erróneas de los resultados. Además, se debe de tomar en cuenta que en algunas ocasiones hay obstáculos logísticos que obligan a que el análisis inmediato de las muestras no sea posible y se tengan que almacenar durante períodos largos de tiempo que pueden conducir a alteraciones significativas en las propiedades del agua

(Eljarrat, 2012; Llorca *et al.*, 2014). Algunos parámetros críticos que pueden afectar la estabilidad de los PFs en las muestras de agua son: la naturaleza de la matriz, la luz, la temperatura, el material del contenedor donde se almacena la muestra y la adición de preservantes en la muestra. Durante todo el proceso desde la colecta hasta el análisis, las muestras pueden experimentar diversas alteraciones, tales como, oxidación, reducción, hidrólisis de compuestos y formación de complejos químicos, despolimerización, cambio de pH, fotodegradación, biodegradación, transformaciones abióticas, etc. (Mompelat *et al.*, 2013) (Figura. 6).

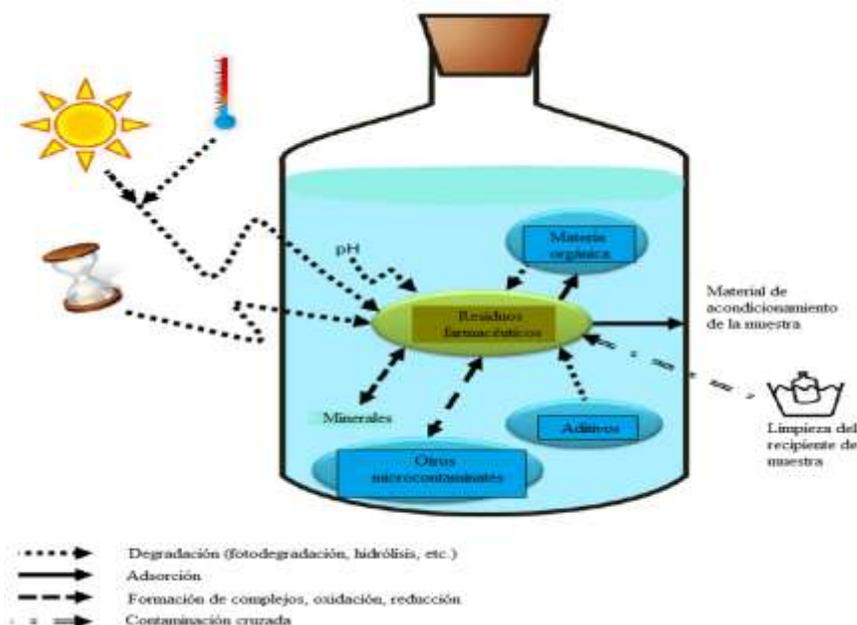


Figura 6. Fuentes y posibles procesos que afectan la estabilidad de los PFs en las muestras antes del análisis (Mompelat *et al.*, 2013).

Todas las posibles alteraciones que presentan los PFs desde que se colectan las muestras hasta su análisis representan obstáculos en las estrategias de muestreo; siendo, la representatividad y conservación de las muestras, estabilidad de los PFs presentes en las muestras, la estabilidad de las soluciones estándares utilizadas, además de las posibles pérdidas de analito debido a la adsorción en el material del recipiente contenedor y/o materiales

del filtro, aspectos que deben analizarse cuidadosamente para desarrollar estrategias adecuadas en las que se puedan reducir los errores adoptados durante el desarrollo de un muestreo (Ort *et al.*, 2010a; Petrović, 2014). Por lo tanto, cuando se estudia la presencia y distribución de los PFs en el medio acuático, la selección de la estrategia de muestreo apropiada depende en gran medida de los objetivos de la investigación y la recolección de muestras homogéneas representativas es el requisito previo para la obtención de datos correctos. El origen del agua estudiada, especialmente su variabilidad espacial y temporal y las características fisicoquímicas de los contaminantes deben ser comprendidas en su totalidad para el diseño de muestreos adecuados (Petrović, 2014).

2.5.1. Muestreo

El objetivo de un muestreo es tomar una porción de muestra que sea representativa de todo el sistema, para ello se tomaron los lineamientos establecidos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 1982) . Sin embargo, durante un muestreo se presentan variaciones en el flujo del agua de acuerdo a la estación del año y por consecuencia el modo de muestreo seleccionado podría subestimar o sobrestimar cantidades de los PFs cuando el flujo varíe y esto puede llevarnos a adquirir datos e interpretaciones erróneas de los resultados. En cuanto al muestreo para PFs en sistemas de aguas residuales, Ort *et al.*, (2010a) llevaron a cabo una revisión de 87 publicaciones, y de acuerdo al análisis que realizaron pudieron proporcionar una guía de muestreo paso a paso con una serie de recomendaciones para tomar decisiones sobre el modo de muestreo, así como la frecuencia de muestreo apropiada en función de la variabilidad del flujo. Ellos concluyeron que las muestras compuestas de 24 horas son más confiables que las muestras simples debido a que durante el muestreo del agua, el flujo puede presentar variaciones en diferentes tiempos de escala

(día/noche, clima seco/lluvioso, etc.) alterando la concentración de los PFs en un tiempo dado.

No obstante, Baker y Kasprzyk-Hordern, (2011) encontraron que después de 12 horas de haberse colectado las muestras de agua residual, algunos compuestos ya presentaban degradaciones significativas (>15%) y, por lo tanto, concluyeron que para la selección de un protocolo de muestreo se debe de tener en cuenta los PFs que se desean analizar.

En una revisión realizada por Verlicchi *et al.*, (2012) se evalúan en detalle las campañas de muestreo llevadas a cabo en varios estudios (modo de muestreo, número de muestras, etc.), identificaron que los periodos de muestreo que mayormente se realizan son los de 24 horas correspondientes a muestras compuestas. Entretanto Hughes *et al.*, (2013) encontraron que el muestreo simple de 24 horas ha sido el más utilizado, para coleccionar muestras de agua superficial en 41 países para detectar la presencia de PFs en aguas superficiales. En algunos casos será necesario el uso de métodos de preservación físicos donde no se introducen compuestos químicos y/o biológicos en la muestra, basados en la adición de conservantes químicos a las muestras (Eljarrat, 2012; Sliwka-Kaszyńska *et al.*, 2003). Una forma de evaluar y corregir posibles pérdidas de los analitos en la muestra y/o durante del análisis es agregar un patrón interno (PIT) con una concentración conocida a la muestra justo después del muestreo o antes del análisis. Sin embargo, esta alternativa está limitada debido a que comercialmente no existen estándares internos (compuestos marcados isotópicamente) para todos los analitos de interés (Llorca *et al.*, 2014).

2.5.2. Preservación de la muestra

Inmediatamente después de la toma de muestras, éstas se transportan normalmente en el menor tiempo posible en hieleras, evitando todas las fuentes de exposición a la luz para minimizar la degradación de los PFs y la adsorción tanto como sea posible hasta que las muestras lleguen al laboratorio para pretratamientos, almacenamiento y análisis (Mompelat *et al.*, 2013). Pocos estudios evalúan de forma exhaustiva aspectos de la preparación de muestras, principalmente limitados a la estabilidad de los compuestos en matrices ambientales, mientras que para las pérdidas debidas a la adsorción no hay datos suficientes, Por lo tanto, es difícil dar una recomendación general de muestreo. Además, el efecto real de los pretratamientos sobre la recuperación de los analitos es muy variable y depende de la naturaleza de los analitos de interés y del tipo de matriz. Algunos procedimientos de pretratamiento y condiciones de preservación son más útiles que otros, pero en la última instancia, no existe un protocolo universal que pueda recomendarse para todos los casos (Petrović, 2014).

2.5.3. Almacenamiento de la muestra

El almacenamiento de las muestras de agua muchas veces representa un problema por la cantidad de espacio que necesita para almacenarlas. Por ello, el almacenamiento de los extractos de las muestras resulta ventajoso en muchos casos en términos de espacio, tiempo y manipulación de éstas durante las campañas de análisis. Los extractos tienen menor volumen (de 10 a 1,000 veces) que las muestras de agua originales. En este enfoque, la muestra de agua es extraída con un disolvente o cartucho adecuado, y el cartucho o el extracto en el que han resultado retenidos los compuestos de interés son almacenados (Carlson *et al.*, 2013; Nödler *et al.*, 2010).

2.5.4. Técnicas de extracción

Los analitos contenidos en las muestras deben de ser primero extraídos de la matriz, y luego son concentrados antes del análisis instrumental. Por lo tanto, la extracción de PFs en muestras ambientales líquidas ésta basada en el principio de retención en una fase sólida. Bajo este fundamento ha surgido la extracción en fase sólida (EFS), la cual puede ser acoplada en línea a técnicas cromatográficas (Farré *et al.*, 2012). En la EFS los analitos se aíslan en función de su retención relativa por la matriz de la muestra y el sorbente. Este factor hace que la elección del sorbente sea uno de los parámetros más importantes durante la optimización de la EFS.

La interacción sorbente-analito puede responder a diferentes mecanismos entre los que cabe destacar la adsorción, partición, intercambio iónico, exclusión molecular, afinidad o una combinación de ellos (Augusto *et al.*, 2013). Entre los sorbentes comerciales, el copolímero de divinilbenceno/n-vinilpirrolidona con interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas (patentado por Waters bajo el nombre Oasis HLB) es uno de los sorbentes más utilizados para la extracción/preconcentración de contaminantes en muestras ambientales líquidas. La elevada área específica del Oasis HLB (en torno a 800 m²/g) y la presencia en el polímero del grupo pirrolidona, que es un aceptor de hidrógeno, mejora notablemente la retención de compuestos polares, mientras que el polímero de divinilbenceno permite la retención eficaz de los compuestos hidrófobos, lo que lo hace un absorbente ideal para análisis multiresiduo con analitos de diferentes propiedades químicas (ácidas, básicas o neutras).

Usualmente, la extracción del analito de interés implica la desorción del compuesto de la matriz sólida y luego en disolución en un solvente apropiado o diferentes mezclas de disolventes. Con el objetivo de alcanzar suficiente sensibilidad y selectividad, el proceso de extracción generalmente requiere el tratamiento de una cantidad considerable de muestra, el desarrollo de

extracciones repetidas para asegurar el aislamiento completo del analito de interés, una etapa de limpieza del extracto y la evaporación del disolvente. Todos estos pasos son necesarios para incrementar la eficiencia de extracción, sensibilidad y minimizar o eliminar las interferencias que puedan afectar la determinación del compuesto o compuestos de interés (Arbeláez, 2015).

2.5.5. Técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas

La determinación analítica de los contaminantes de interés emergente en las muestras medioambientales, requiere el uso de técnicas que proporcionen sensibilidad, selectividad, precisión y exactitud. Por eso, después de la extracción, limpieza y concentración, los contaminantes de interés son determinados normalmente usando técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas. Entre las técnicas cromatográficas más ampliamente utilizadas para la separación de los contaminantes se encuentran la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía de líquidos (CL). Independientemente de la selectividad del sistema de detección, una buena separación y/o resolución de los compuestos objeto de estudio es necesaria, debido a la presencia potencial de sustancias que podrían interferir con la correcta identificación y cuantificación de los compuestos que son de interés en el análisis (Hernández *et al.*, 2014).

Las características físico-químicas de los PFs juegan un papel crucial en la técnica analítica a utilizar. La estructura química de los PFs determina su polaridad y volatilidad (según la ausencia o presencia de determinados grupos funcionales y del peso molecular), lo que permite seleccionar la técnica más adecuada para su separación cromatográfica. La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (CL-EM) o la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tandem (CL-EM/EM), para PFs polares medios-altos, mientras la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) o la cromatografía de gases acoplada a

espectrometría de masas en tandem (CG-EM/EM), para PFs no polares (Fatta *et al.*, 2007) (Figura 7).

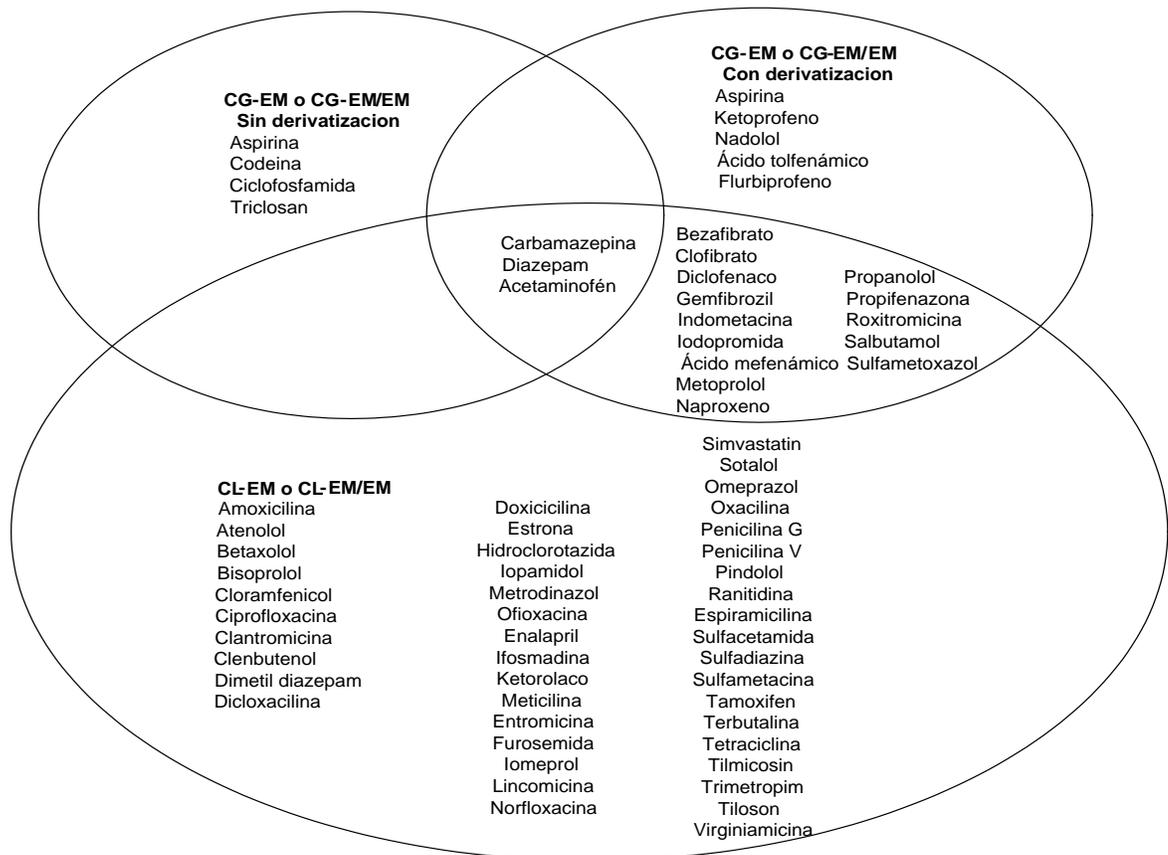


Figura 7. Técnicas analíticas aplicadas para la mayoría de los PFs en aguas superficiales y residuales (Fatta *et al.*, 2007).

2.5.5.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca,

sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar. Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, CG y EM da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. Por esta razón, la cromatografía de gases se emplea cuando los componentes de la mezcla problema son volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de hasta 350-400°C. En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas (Gutiérrez y Droguet, 2002).

2.5.5.2. Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (CL-EM)

En las últimas décadas, la CL-EM ha permitido elevar la selectividad y sensibilidad para el análisis de los PFs, sin tener que realizar muchos procesos de preparación de muestra. En la separación de estos contaminantes mediante cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido constituido, normalmente, por una mezcla de disolventes de distinta fuerza eluotrópica que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria.

El proceso cromatográfico consiste en una repetición de etapas de absorción/desorción, que tiene lugar durante el movimiento de los analitos a

través de la fase estacionaria en función de sus afinidades. Con el objeto de aumentar la eficacia en las separaciones, el tamaño de partícula de la fase estacionaria se ha ido disminuyendo hasta unas pocas micras, lo que ha obligado a utilizar sistemas capaces de soportar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil a través de la columna analítica. De esta manera, dependiendo del tamaño del particulado que componga la fase estacionaria, se puede considerar la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), con partículas de hasta 3.5 μm , o la cromatografía líquida de ultra presión (CLUP), con partículas < 2 μm (Marin, 2010).

2.5.5.2.1. Interfases

Los primeros esfuerzos reseñables con objeto de conseguir acoplar CL a detectores de EM se remontan a finales de los años 60's cuando el científico ruso Talrozone y sus colaboradores desarrollaron una interfase inspirada en las usadas en CG-EM, dotadas de ionización electrotrónica (IE). Esta interfase se basaba en la introducción directa del líquido procedente de LC a flujos muy bajos, de alrededor de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Sin embargo, esta interfase quedó limitada.

Para los años 80's las interfases a presión atmosférica (PAs) empezaron a destacar debido a su capacidad de determinar compuestos de elevado peso molecular y a su robustez al permitir ionizar un amplio abanico de analitos en matrices de diversa naturaleza. Estas interfases se caracterizan por la formación de los iones a presión atmosférica fuera de la zona de alto vacío, evitándo los problemas técnicos relacionados con la incompatibilidad líquido/alto vacío. Actualmente, las interfases de ionización por electrospray (IES) Y por ionización química (IQ) son las más utilizadas en los instrumentos CL-EM, habiendo contribuido determinante al rápido progreso tecnológico de la espectrometría de masas. Cuando el acoplamiento LC-MS se lleva a cabo mediante una interfase IES, y entre las moléculas del analito y las de la fase móvil tienen lugar reacciones de tranferencia protónica en fase vapor y como

resultado, se pueden obtener moléculas de analito protonadas, desprotonadas y también aductos con moléculas de solvente de la propia fase móvil, siendo muy comunes los aductos sodiados y amoniados. Los aductos formados con moléculas de solvente (H_3O^+ , CH_3OH_2^+ , CH_3CNH^+ ...) se suelen convertir en $[\text{M}+\text{H}]^+$ cuando aumenta el voltaje de cono, ya que la primera fragmentación que sufren (fragmentación de cono) es la pérdida de la molécula de solvente (Marin, 2010).

2.5.6. Estabilidad de los analitos en las muestras

El análisis inmediato de las muestras es la opción más recomendada. Esto es a menudo difícil o imposible de realizar, sobre todo en el caso de grandes campañas de monitoreo donde la toma de muestras puede llevar varios días. Por lo tanto, la estabilidad de los compuestos de interés en las muestras durante periodos relativamente cortos de tiempo durante el transporte y almacenamiento puede verse comprometida y llevar a cuestionar la confiabilidad de los resultados obtenidos (Petrović, 2014). Debido a esta situación, es común que la concentración de los analitos de interés en muestras ambientales sea sub-estimada asumiendo que las muestras permanecen sin cambios durante ese periodo.

Por otra parte, ya se ha comentado que los PFs presentan distinta estabilidad en agua y que ésta depende de diversos aspectos (naturaleza de las muestras, condiciones de almacenamiento, etc.). Por ejemplo, la cafeína, el ibuprofeno y el acetaminofén son compuestos fácilmente degradables en las PTARs y en el medio ambiente, mientras que la carbamazepina se sabe que es muy estable en el medio ambiente (Vanderford *et al.*, 2011).

Mompelat *et al.*, (2013) encontraron que el control de la temperatura era un buen método de preservación para la mayoría de los 58 PFs medidos en muestras de aguas naturales, sin embargo, no todos los PFs fueron estables utilizando este método de preservación. Compuestos como el diazepam,

sulfonamidas, fluoxetina, diclofenaco, triclosan, albuterol, fenofibrato, iodoareno, fluoroquinolonas, tetraciclinas, tilosin, nitrofurano, antibióticos y 17β -estradiol son fotosensibles. En otros casos, la adición de agentes químicos dentro de la muestra, tales como azida de sodio (NaN_3), formaldehído (CH_2O), metanol (CH_3OH), ácido sulfúrico (H_2SO_4) y ácido clorhídrico (HCl) pueden prolongar la estabilidad de algunos PFs durante el almacenamiento.

Mientras que Hillebrand *et al.*, (2013) y Vanderford *et al.*, (2011) evaluaron el efecto de distintos agentes conservantes sobre la estabilidad de los analitos en muestras de agua, recomendando el uso de NaN_3 a 4°C , condiciones con las que obtuvieron mayores recuperaciones de los analitos de interés. Además, la adición de Na_2EDTA (Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético deshidratada) a muestras en diferentes condiciones de almacenamiento ha mostrado un incremento drástico en la estabilidad de algunos antibióticos almacenados a -20°C (Llorca *et al.*, 2014). Por su parte, Baker y Kasprzyk-Hordern, (2011) encontraron que la acidificación a pH 1.8 mejora la estabilidad de la mayoría de los compuestos. Por su parte, Carlson *et al.*, (2013) mostraron que si los cartuchos EFS se mantenían en almacenamiento en el congelador a -20°C , se obtenían recuperaciones aceptables (pérdidas por debajo del 19% con una pérdida media del 9%) después de 20 meses.

2.5.7. Estabilidad de los analitos en las soluciones estándares

Además de la estabilidad de los analitos en las muestras, la estabilidad de las soluciones de patrones estándares (SPEs) es igualmente importante. Y a menudo, las bajas recuperaciones obtenidas en el análisis, la falta de linealidad y/o las desviaciones estándares relativas son debido a pérdidas en las soluciones estándares. Por esta razón, es una práctica muy común

preparar soluciones estándares patrón al comienzo de los estudios y almacenarlas refrigeradas o congeladas hasta su uso (Petrović, 2014).

Las SPEs suelen prepararse en disolventes orgánicos y almacenarse a -20°C . Sin embargo, se ha reportado que, por ejemplo; el tadalafil y la lamotrigina, tienden a precipitar cuando se almacenan a -20°C o incluso en el rango de $4-6^{\circ}\text{C}$, mientras que otros compuestos presentaron pérdidas en la concentración $>20\%$ durante el almacenamiento de las soluciones durante un año a temperatura ambiente (Karinen *et al.*, 2011), mientras que otros compuestos, como las tetraciclinas, presentan fotodegradación y deben ser almacenadas en la oscuridad (Gros *et al.*, 2009).

Asimismo, Gaugain *et al.*, (2013) evaluaron la estabilidad de las SPEs de 53 antibióticos, almacenadas a -20°C por un periodo de un mes a un año. Los resultados mostraron que la mayoría de las soluciones patrón de antibióticos se mantuvieron estables durante un máximo de 6 meses, pero algunos compuestos, tales como la gentamicina, antibióticos derivados de la penicilina, y las cefalosporinas, tenían una estabilidad limitada de 1 mes, incluso aunque estuvieran a -20°C . Por lo tanto, a pesar de aplicar distintos métodos de conservación, cabe esperar que algunas soluciones de PFs presenten problemas de estabilidad, por lo que lo mejor es preparar las SPEs cada vez que se van a utilizar.

2.5.8. Pérdidas debido a la adsorción de los analitos al contenedor

Los PFs pueden absorberse a la materia orgánica (materia en suspensión, coloides) en muestras naturales de agua, y lo mismo puede pasar en la superficie del recipiente donde se colecta la muestra. Esta tendencia a adsorberse de los PFs no sólo depende de las propiedades del material de la botella o de la materia en suspensión, sino que también depende de las características (estructura, pKa, solubilidad, etc.) y concentraciones de los PFs, la composición de la matriz (salinidad, pH, etc.), la temperatura, etc.

Los PFs de carácter hidrofóbico ($\log K_{ow} > 4$, ejemplo, hormonas esteroidales), pueden adherirse al material de muestreo y se puede subestimar la concentración real en la muestra (Mompelat *et al.*, 2013). Por otro lado, las botellas que se utilizan comúnmente para muestrear aguas deben estar limpias e inertes para evitar la pérdida de PFs y evitar alteraciones en la composición original de la muestra.

Se han descrito en la bibliografía diversos tipos de botellas utilizadas en el muestreo natural de agua: botellas de vidrio silanizadas y no silanizadas (ámbar), botellas de polietileno de alta densidad (-CH₂-CH₂-)_n, polietileno de baja densidad, polipropileno y botellas de vidrio no especificadas, etc. (Hebig *et al.*, 2014; Hildebrandt *et al.*, 2006; Suri *et al.*, 2012; Vanderford *et al.*, 2011). Los efectos de los diferentes materiales de los contenedores de muestra y el efecto de la silanización de los recipientes de vidrio sobre la reproducibilidad en el análisis de los estrógenos a niveles de trazas fueron estudiados por Suri *et al.*, (2012), y determinaron que la silanización del vidrio provee en el análisis una menor pérdida porcentual debido al contacto con los materiales del recipiente de muestra. Esto se debe a que la silanización desactiva los grupos polares (Si-OH) y disminuye su hidrofiliidad por la unión químicamente de la capa de silicona no absorbente sobre la superficie de vidrio (Petrović, 2014).

Por otro lado, Vanderford *et al.*, (2011) recomiendan utilizar botellas de vidrio ámbar como recipiente de muestro en lugar de utilizar (-CH₂-CH₂-)_n porque observaron que este material puede contener aditivos que pueden ser lixiviados de la botella y pueden causar interferencias (efecto matriz) durante el análisis de los PFs. Con respecto a los antibióticos, se demostró que utilizando recipientes de vidrio o (-CH₂-CH₂-)_n se obtuvieron buenos porcentajes de recuperación (86-93%), y la posible pérdida que se puede tener no se debe a los recipientes que se utilizan, sino a que las tetraciclinas en particular son estructuralmente muy inestables (Mompelat *et al.*, 2013). Por el

contrario Tso *et al.*, (2011), recomiendan usar recipientes de plástico en lugar de los de vidrio debido a las posibles pérdidas por la absorción de los compuestos de interés a las paredes del recipiente de vidrio.

2.6. Productos de transformación de los fármacos presentes en el medio ambiente acuático

Generalmente, los fármacos son absorbidos por el organismo después de la ingesta y están sujetos a reacciones metabólicas, tales como reacciones de fase I (funcionalización), que incluyen oxidación, reducción e hidrólisis, y reacciones de conjugación de fase II para formar metabolitos polares farmacológicamente inactivos, sucesivamente más polares que los compuestos originales, aumentando así la excreción en orina y heces fecales. Las reacciones de fase 2 se denominan a menudo reacciones de conjugación e implican la adición de un grupo funcional tal como acetilo, sulfato, ácido glucurónico, glutación o algún aminoácido que generalmente aumenta la polaridad (Daughton y Ternes, 1999; Nikolaou *et al.*, 2007; Rivera-Utrilla *et al.*, 2013).

Durante el tratamiento de las aguas residuales estos metabolitos pueden experimentar procesos bióticos y abióticos, tales como hidrólisis, fótólisis, oxidación y metabolismo microbiano (Kümmerer, 2009; Picó y Barceló, 2015), para formar nuevas entidades químicas con diferentes propiedades, conocidas como productos de transformación (PTs) como consecuencia de la no selectividad de los radicales hidroxilo (HO•) que pueden desencadenar vías de reacción complejas. La comprensión de la transformación de los PFs es esencial para determinar con precisión su destino final en el medio ambiente, realizar evaluaciones precisas del riesgo y mejorar su eliminación (Boxall *et al.*, 2004; Fatta-Kassinos *et al.*, 2011).

Desde el punto de vista ambiental, es de gran importancia la detección de los PTs, generados durante el tratamiento de las aguas residuales, debido a que

estos compuestos y sus metabolitos pueden ser potencialmente tóxicos, más recalcitrantes e incluso más bioacumulables que los compuestos originales (Kummerer, 2011; Richardson y Kimura, 2017). Los conjugados hidrolizables son tomados en cuenta debido a que existe evidencia que sugiere que algunos de ellos, como los glucorónidos y sulfatos, pueden ser parcialmente hidrolizados en el agua residual incrementando con ello la cantidad de fármaco inalterado liberado al ambiente. En la Tabla 4 se muestran algunos ejemplos de fármacos encontrados en el ambiente, así como las fracciones de compuesto inalterado y conjugados hidrolizables de la sustancia original excretados por orina y heces fecales, así como algunos de los metabolitos producidos (Durán, 2009).

Tabla 4. Ejemplos de PFs excretados en su forma inalterada y como conjugados hidrolizables (Durán, 2009).

Compuesto	Compuesto original	Conjugados hidrolizables	Metabolitos
Ibuprofeno	10%	5%	1-hidroxi-ibuprofeno
			2-hidroxi-ibuprofeno
			2-carboxi-ibuprofeno
			2-hidroximetil-ibuprofeno
			Acil glucurónido
Naproxeno	10%	60%	O-desmetil-naproxeno
			Acil glucurónido
Ácido acetilsalicílico	8%	85%	Ácido salicílico
			Ácido salicílico
			Ácido gentísico
			Acil glucurónido
Carbamazepina	31%	2%	2-hidroxi carbamazepina
			3-hidroxi carbamazepina
			10,11-dihidro carbamazepina
Trimetoprim	43%	2%	α -hidroxi-trimetoprim
Sulfametoxazol	30%	1%	N ₄ -acetil-sulfametoxazol
Acetaminofén	3%	93%	Acetofenitidina

La identificación de PTs en matrices ambientales complejas es un desafío, especialmente debido a sus concentraciones muy bajas en presencia de materia orgánica natural, proteínas y otras macromoléculas complejas que pueden interferir con el sistema de detección (Celiz *et al.*, 2009).

Sin embargo, en los últimos años, la espectrometría de masas de alta resolución (EMAR), proporcionada por analizadores de masas como tiempo de vuelo (QTOF) o Orbitrap se está convirtiendo en una alternativa muy poderosa para la determinación de los contaminantes de interés emergente en muestras medioambientales debido a que permiten la adquisición de espectros de iones de barrido completo, con la masa precisa de los iones del producto para las posibles incógnitas con un solo instrumento (Ibañez *et al.*, 2017; 2005; Bletsou *et al.*, 2015; Picó y Barceló, 2015; Pérez y Barceló, 2007).

EMAR ofrece la posibilidad de ejecutar un análisis de barrido completo con una alta resolución y exactitud de masa, así, se pueden identificar un número ilimitado de compuestos, sin requerir la preselección de los analitos o incluso sin tener estándares disponibles (Vazquez-Roig *et al.*, 2013). En EMAR, los iones se miden con un poder de resolución alto, es decir, los iones con relaciones m/z ligeramente diferentes pueden distinguirse entre sí. La característica más importante de la EMAR es la capacidad de determinar las fórmulas moleculares de los analitos a partir de mediciones de masa precisas (Figura 8).

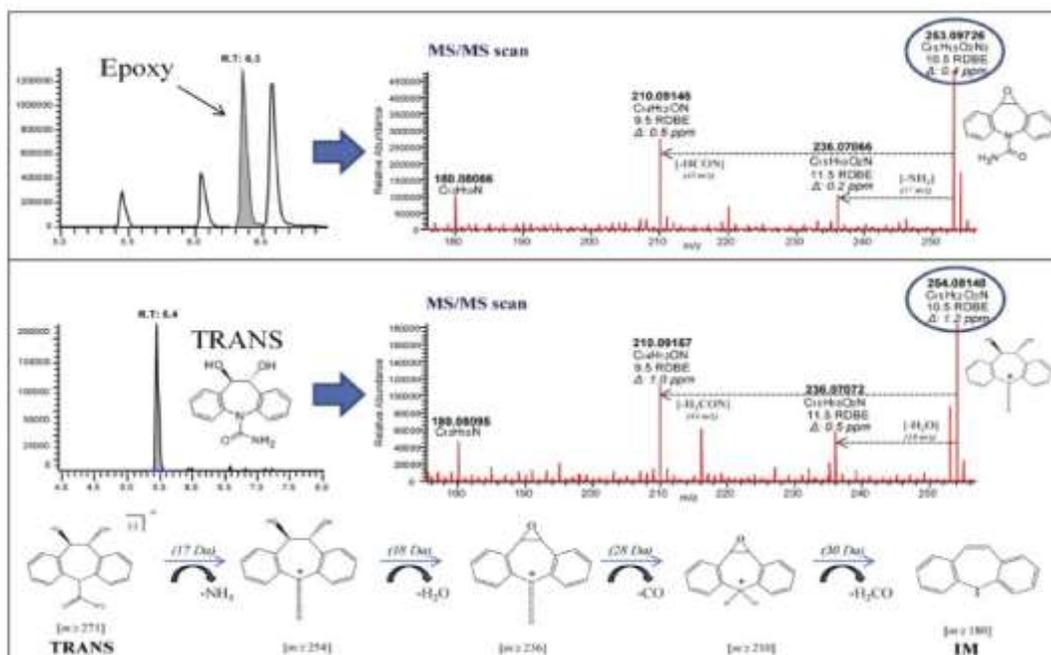


Figura 8. Espectros de masas de iones producto obtenidos para epoxicarbamazepina (epoxi) y trans-carbamazepina (TRANS) en un instrumento cuadrupolo-Orbitrap a 10 eV, y vía de fragmentación propuesta para la trans-carbamazepina (Picó y Barceló, 2015).

2.6.1. Clasificación de los productos de transformación

Los PTs que se forman en el medio ambiente se pueden clasificar en dos categorías: productos de biotransformación formados por procesos bióticos, y PTs formados por procesos abióticos como por ejemplo, degradación fotoquímica directa y una amplia gama de vías fotoquímicas indirectas, incluyendo la reacción con sólo oxígeno (O_2), radical hidroxilo ($^{\circ}OH$), radicales peróxido ($^{\circ}OOR$), materia orgánica fotoexcitada y otras especies reactivas (Farré *et al.*, 2008).

Las transformaciones estructurales también pueden ser el resultado de la aplicación de procesos tecnológicos, como el tratamiento de efluentes mediante procesos de oxidación avanzada (POAs). Estos procesos son métodos novedosos bastante eficaces para el tratamiento de aguas residuales (Michael *et al.*, 2014). Los productos de biotransformación incluyen

metabolitos humanos, animales y microbianos en sistemas modificados y naturales. Los PTs abióticos son el resultado de la hidrólisis, degradación fotolítica y fotocatalítica en el entorno natural y POAs (Bletsou *et al.*, 2015).

2.6.1.1. Productos de transformación formados por reacciones bióticas

Los productos de transformación se forman por actividades microbianas en compartimentos ambientales naturales y/o artificiales, tales como suelo, aguas superficiales o PTARs. Las reacciones enzimáticas que están implicadas en la transformación microbiana, pueden ser la hidroxilación, oxidación de nitrógeno, azufre y desalquilación y reducción, deshalogenación, reducción nitro e hidrólisis de amidas y ésteres carboxílicos. En los mamíferos, además de la oxidación y la reducción, también se producen reacciones de conjugación con moléculas endógenas, tales como hidratos de carbono, sulfato, glutatión y aminoácidos. Algunos contaminantes ambientales se acumulan significativamente y posteriormente se transforman en la vida silvestre. En particular, los organismos acuáticos se consideran los receptores primarios, y pueden mostrar cualitativamente y cuantitativamente diferentes vías metabólicas en comparación con los microbios y los seres humanos. Por lo tanto, los metabolitos formados en los organismos acuáticos y su toxicidad son de creciente preocupación ecotoxicológica (Bletsou *et al.*, 2015).

2.6.1.2. Productos de transformación formados por el metabolismo microbiano

Debido a la creciente presencia de CEs en las aguas residuales, la formación de PTs durante el tratamiento biológico, así como los mecanismos que tienen lugar, han sido investigados para varias clases de productos farmacéuticos.

La mayoría de los estudios se realizaron en sistemas discontinuos con lodo activado. En casi todos los estudios, las reacciones oxidativas, tales como hidroxilación, oxidación y desalquilación, se observaron como el principal mecanismos de biotransformación (Kormos *et al.*, 2010; Fenu *et al.*, 2010;

Prasse *et al.*, 2011). En algunos casos, la oxidación de grupos hidroxilo fue seguido por descarboxilación oxidativa, desacetilación, y desalquilación que tiene lugar en los restos de amida (Vogna *et al.*, 2004; Postigo y Richardson, 2014). Moléculas con grupos N, O- ó S-alquilo se transformaron probablemente en formas desalquiladas. Otras reacciones oxidativas incluyen apertura del anillo, desaminación oxidativa y descloración (Helbling *et al.*, 2010; Holčapek *et al.*, 2008). Además, las reacciones de conjugación, tales como fosforilación, succinilación y sustitución de glutatión, son también posibles mecanismos de biotransformación (Bletsou *et al.*, 2015).

Quintana *et al.*, (2005) investigaron la biodegradabilidad del ibuprofeno en los lodos de una PTAR, demostrando que se degradó cometabólicamente. La biodegradación del ibuprofeno comenzó después de un retraso de aproximadamente 5 días y se completó después de 22 días. Dos isómeros de hidroxi-ibuprofeno fueron tentativamente identificados como los principales productos de degradación por CLAR-EM-EM. Mientras, Pérez *et al.* (2005) informaron sobre el comportamiento del trimetoprim en un reactor de biodegradación de laboratorio lleno de lodo activado recolectado de diferentes etapas de una PTARM: tratamiento primario, lodo activado, lodos activados nitrificantes y, efluente final después de la desinfección. El trimetoprim mostró alta resistencia a la degradación microbiana en las aguas residuales del tratamiento primario y el tratamiento con lodos activados. Sin embargo, la degradación primaria de este compuesto se completó en 3 días en las aguas residuales del proceso de nitrificación.

Helbling *et al.* (2010) investigaron intensamente la transformación microbiana de 30 compuestos xenobióticos con grupos amida y observaron 53 PTs resultantes de la hidrólisis de amidas, N-dealquilación, hidroxilación, oxidación, dehalogenación, conjugación de glutatión y muchas más vías.

2.6.1.3. Productos de transformación (metabolitos) formados en el cuerpo humano

En el cuerpo humano, los fármacos pueden ser transformados en uno o más metabolitos y excretados como una mezcla del compuesto original y metabolitos, en los que el compuesto original es a menudo el componente menor. Sin embargo, algunos fármacos se metabolizan mal y se excretan sin cambios. El grado de metabolismo depende de una serie de parámetros, incluyendo la edad, el sexo, la etnia, la constitución del paciente y el momento de la administración. De acuerdo a Vieno y Sillanpää, (2014), del diclofenaco administrado por vía oral, entre el 65 y el 70% se excreta en la orina y el 20-30% en las heces como fármaco precursor o como metabolito. En la Figura 9 se presenta la vía metabólica del diclofenaco en el cuerpo humano, que muestra seis metabolitos de la Fase I del diclofenaco en plasma humano, orina y/o heces.

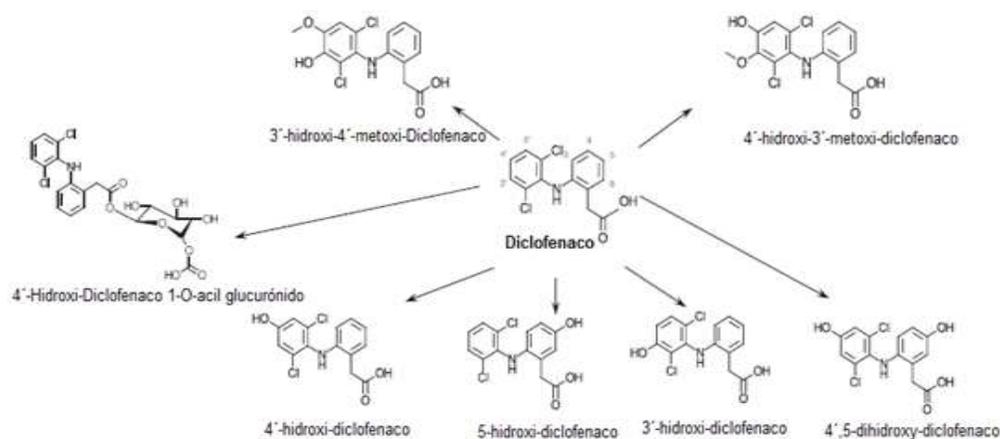


Figura 9. Principales metabolitos del diclofenaco formados en el cuerpo humano (Vieno y Sillanpää, 2014).

Asimismo, es importante considerar que las interacciones fármaco-fármaco causadas por la inducción o inhibición enzimática, así como el metabolismo mejorado debido a la exposición previa, también pueden influir en la farmacocinética de los fármacos (Pérez y Barceló, 2007). Sin embargo, los metabolismos humanos y microbianos presentan en parte las mismas

reacciones metabólicas y por lo tanto los mismos metabolitos, por lo que su discriminación en muestras ambientales es a veces difícil. Kern *et al.*, (2009) declararon que 6 PTs farmacéuticas encontradas en las muestras de agua superficial eran metabolitos humanos, 2 para metamizol, 1 para aminopirina, 2 para carbamazepina y 1 para verapamilo. Sin embargo, cuatro de estos seis metabolitos se formaron a través de epoxidación, dihidroxilación y O-desmetilación, que también pueden tener lugar en el metabolismo microbiano.

2.6.1.4. Productos de transformación formados en la vida silvestre

Los CEs son ubicuos en el ambiente debido a su baja degradabilidad, y probablemente se acumulan en la biota (bioacumulación) y sedimentos. La biotransformación en organismos, como proceso subsiguiente de bioacumulación, es de gran interés para aclarar el destino y la toxicidad de los PTs. Sin embargo, los estudios del metabolismo de los fármacos en peces son extremadamente limitados y la vía metabólica y las enzimas responsables del metabolismo de los fármacos en los peces son en gran parte desconocidos. Además, los metabolitos de los CEs se han medido en varios tejidos (por ejemplo, sangre, grasa y huevos de aves) y en organismos marinos (incluyendo peces), pero en muchos casos no se sabe si los compuestos formados son el resultado del metabolismo in vivo o si se bioacumulan desde el medio ambiente (Bletsou *et al.*, 2015).

En el estudio de Brozinski *et al.*, (2013) determinaron la presencia de 17 fármacos y seis metabolitos de fase I en la bilis de dos especies de peces silvestres: brema (*Abramis brama*) y cucaracha (*Rutilus rutilus*). En los estudios de Kallio *et al.*, (2010) se expuso la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) a diclofenaco por vía intraperitoneal y los principales metabolitos encontrados en la bilis de los peces fueron los acil glucurónidos de diclofenaco hidroxilados, así como un éter glucurónido de diclofenaco hidroxilado y diclofenaco no metabolizado.

Aceña, (2017) realizó un estudio similar para diclofenaco y carbamazepina en carpa (*Cyprinus carpio*) y barbus del Ebro (*Barbus graellsii*) encontrando 13 metabolitos del ibuprofeno y 11 de la carbamazepina en la bilis de los peces.

2.6.1.5. Productos de transformación formados por procesos abióticos en sistemas acuáticos

Los PTs abióticos se forman mediante procesos de tratamiento de agua y en el medio acuático por hidrólisis y fotólisis. Los mecanismos de reacción oxidativa a menudo dependen de la formación de intermedios reactivos de corta duración que contienen oxígeno, tales como radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$). Generalmente, los PTs formados se correlacionan con las condiciones del proceso, por ejemplo, las propiedades fisicoquímicas de la matriz, y las condiciones específicas del tratamiento (por ejemplo, tiempo y medio). El ozono es un oxidante fuerte que se puede utilizar como un agente más selectivo para la eliminación de CEs. La ozonización puede tener lugar por la reacción directa de la molécula de ozono con el compuesto de interés o por medio de radicales hidroxilos producidos a partir de la descomposición de ozono en medios acuosos. En la práctica, tanto las reacciones directas como las indirectas tienen lugar simultáneamente (Bletsou *et al.*, 2015).

El ozono se utilizó recientemente como una cuarta etapa de tratamiento a gran escala en el tratamiento de aguas residuales (Zimmermann *et al.*, 2011). Sin embargo, junto a los PTs de ozonización, se pueden formar subproductos generados por la oxidación de los componentes de la matriz, como la N-nitrosodimetilamina (NDMA), que es un compuesto cancerígeno (Postigo y Richardson, 2014). Asimismo, en la cloración se pueden producir PTs biológicamente activos, especialmente cuando el contenido inorgánico en la matriz de agua es muy alto, y por lo tanto, se producen algunas especies reactivas, tales como el radical cloro ($\bullet\text{Cl}$) que puede conducir a la formación

de compuestos orgánicos clorados, que se sabe son muy nocivos y, en algunos casos, capaces de generar sustancias persistentes.

En este proceso de desinfección, el ácido hipocloroso (HClO) es el reactivo principal responsable de la destrucción del patógeno, pero tanto HClO como ClO⁻ reaccionan con compuestos orgánicos, dando productos de adición, sustitución u oxidación. Una de las principales preocupaciones con respecto a los subproductos de desinfección de la cloración es que se sabe que NaClO produce PTs genotóxicos (Postigo y Richardson, 2014; Bletsou *et al.*, 2015). Los PTs generados en el agua durante los distintos procesos de oxidación avanzada se explican en más detalle en Postigo y Richardson, (2014) y Michael *et al.*, (2014).

2.7. Remoción de productos farmacéuticos durante el tratamiento de agua residual

La principal fuente de entrada de los PFs al medio ambiente, es a través de las PTARs. Éstas están diseñadas para eliminar eficazmente una amplia gama de sustancias, tales como partículas, sustancias carbonosas, nutrientes y patógenos (Luo *et al.*, 2014; Verlicchi *et al.*, 2012). Sin embargo, estas PTARs tienen una capacidad limitada para eliminar PFs de las aguas residuales, debido a que la mayoría de estos compuestos no pueden ser metabolizados por microorganismos como fuente de carbono e incluso pueden inhibir la actividad de los microorganismos o producir su bioacumulación en la cadena alimentaria (Rivera-Utrilla *et al.*, 2013). La eficacia de eliminación de las PTARs y en consecuencia la aparición de PFs en los efluentes depende principalmente de su biodegradabilidad y de sus propiedades fisicoquímicas tales como solubilidad en agua, tendencia o no a adsorberse en los lodos activados y tendencia a volatilizarse (Stamatis y Konstantinou, 2013).

Además, los procesos de tratamiento empleados en cada PTAR pueden afectar la eliminación de los PFs. Algunos de los factores que pueden influir

en la eliminación de PFs son (a) condiciones redox (diferentes eficacias de eliminación para condiciones anaerobias, anóxicas y aerobias), (b) diferentes condiciones de pH (Verlicchi *et al.*, 2012), (c) cinética de biodegradación (K_{biol}) (Ternes *et al.*, 2004), (d) tiempo de retención hidráulico (TRH) y tiempo de retención de lodos (TRL) (Bo *et al.*, 2015; Gros *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2014), (e) variaciones en el caudal (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009) y (f) condiciones climatológicas y época del año (época de lluvias, calor, verano, invierno, etc.) (Kosma *et al.*, 2014; Suárez *et al.*, 2008), que darían lugar a diferentes patrones de consumo de PFs durante el año, un incremento en el consumo de agua o un aumento de la lluvia (efectos de dilución), o diferente influencia de la temperatura ambiental en los procesos biológicos (la cinética de biodegradación en invierno es más lenta debido a la baja temperatura) (Ma *et al.*, 2013).

Con respecto a estos factores, Castiglioni *et al.*, (2006), reportaron eficiencias de remoción mayor en verano que en invierno e incluye amoxicilina (mediana de aproximadamente 75% en invierno y 100% en verano), atenolol (10% y 55%), bezafibrato (15% y 87%), enalapril (18% y 100%) , furosemida (8% y 54%), ibuprofeno (38% y 93%), ranitidina (39% y 84%) y sulfametoxazol (17% y 71%), similar remoción se obtuvo en verano e invierno para ciprofloxacina (60%), hidroclorotiazida (30%) y ofloxacina (50%), mientras que la carbamazepina, claritromicina, eritromicina, lincomicina, salbutamol y espiramicina, más estrona en ambas estaciones no hubo remoción. También de acuerdo a los factores mencionados anteriormente se pueden obtener eficiencias de remoción medias, bajas, o incluso negativas, con concentraciones mayores en los efluentes que en los influentes.

Este último fenómeno se puede deber principalmente a la conversión de sus glucurónidos y otros metabolitos conjugados en el compuesto original a través de procesos enzimáticos en las PTARs (Kosma *et al.*, 2014; Verlicchi *et al.*, 2012; Vieno *et al.*, 2007). En la Tabla 5 se presentan algunos porcentajes de

remoción de los PFs más representativos de diferentes grupos terapéuticos eliminados con diferentes tratamientos biológicos.

Tabla 5. Porcentajes de remoción (%) de PFs reportados en diferentes estudios

Compuestos	% remoción (promedio) Min.-Max.	Referencia
Acetaminofén	^a (99); ^b (84); ^c (99.9); ^e (100); ^g 86.4-100.	^a Gros <i>et al.</i> , 2010 ^b Papageorgiou <i>et al.</i> , 2016 ^c Pereira <i>et al.</i> , 2015 ^d Luo <i>et al.</i> , 2014 ^e Gracia-Lor <i>et al.</i> , 2012 ^f Yang <i>et al.</i> , 2017 ^g Verlicchi <i>et al.</i> , 2012 ^h Carmona <i>et al.</i> , 2014
Ácido salicílico	^a (96); ^b (87); ^e (100).	
Atenolol	^a (59); ^b (41); ^g <10-76.	
Bezafibrato	^a (69); ^c (79); ^{+d} 0-50; ^e (30); ^{***g} 36-99.9; ^h (70).	
Carbamazepina	^{*d} 6.3±15.9; ^{**d} 23-100; ^{+d} >23->99; ^f (52); ^{***g} -67-35.	
Diclofenaco	^a (58); ^c (46); ^{+d} 2.2-41; ^{**d} 96-99; ^{+d} >90-100; ^e 81; ^{***g} 7.1-65.1; ^h (-125).	
Gemfibrozil	^a (67); ^c (53); ^e (-150); ^h (-77); ^g 5-68.	
Ibuprofeno	^a (91); ^c (94); ^{*d} 7.2-16.8; ^{+d} 34-100; ^{e,f} (100); ^g -13-99.	
Indometacina	^b (81.85); ^h (98); ^g <10-23.	
Ketoprofeno	^a (69); ^b (67); ^d (4); ^e (38); ^{***g} 30-99.	
Naproxeno	^a (86); ^b (91); ^{*d} 21.6-42; ^e (80); ^f 84/>90; ^{***g} 35-96; ^h (97).	
Sulfametoxazol	^a (74); ^b (60); ^{*d} -3.5-15.5; ^{**d} 2-62; ^{+d} (98); ^e (80); ^{***g} 90-100.	
Trimetoprim	^b (60); ^{**d} (90); ^{+d} >90-51; ^g 4-45; ^{***g} -56-88.	

Tipo de tratamiento: ^{a,b,c,f,g,h}Lodos activados; *Floculación-coagulación; **proceso de adsorción por carbón activado; ***Reactor biológico de membrana; +procesos de oxidación avanzada y ozonización.

Los PFs que se encuentran en las aguas difieren ampliamente en sus propiedades físico-químicas y biológicas y las PTARs no están diseñadas para eliminar del todo estos contaminantes. Por lo tanto, para su completa eliminación es necesario adaptar las PTARs con las nuevas tecnologías ya

existentes. Varias tecnologías han sido evaluadas en los últimos años con el fin de aumentar estas eliminaciones. Éstas incluyen el uso de ozonización y POAs (De la Cruz *et al.*, 2012; Hernández-Leal *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2009), adsorción por carbón activado (CA) granular (CAG) o en polvo (CAP) (Hernández-Leal *et al.*, 2011; Kovalova *et al.*, 2013), membranas de filtración (microfiltración (MF) y ultrafiltración (UF) (Jermann *et al.*, 2009), y biorreactores de membrana (MBR) que combinan el tratamiento biológico con lodos activados y la filtración en membrana (MF y UF) (Trinh *et al.*, 2012). Las ventajas, desventajas y costos de usar estas tecnologías han sido discutidas ampliamente por (Luo *et al.*, 2014; Richardson y Kimura, 2017).

2.8. Evaluación de riesgo ambiental (ERA)

Los PFs, son sustancias químicas bioactivas potentes que están diseñadas para dirigirse a vías metabólicas y moleculares específicas en humanos y animales, pero también pueden tener efectos secundarios notables (Fent *et al.*, 2006). Los residuos de PFs pueden tener efectos sustanciales en el medio ambiente comparables o mayores que los de los productos químicos agrícolas (Cleuvers, 2003). Los modos de acción desconocidos de los PFs en los organismos inferiores (invertebrados y microorganismos) dificultan la predicción de la toxicidad y pueden potencialmente ser capaces de tener impactos negativos en estos organismos (Rivera-Utrilla *et al.*, 2013).

Por ejemplo, el uso inapropiado del diclofenaco y las prácticas culturales asociadas con respecto a la eliminación de cadáveres de animales, junto con la alta sensibilidad de los buitres al diclofenaco causaron la disminución significativa de las poblaciones de tres especies de buitres en Asia (Oaks *et al.*, 2004; Swan *et al.*, 2006; Taggart *et al.*, 2007). Además, con la aparición de los antibióticos en el medio ambiente acuático, ha llevado al desarrollo de bacterias resistentes a éstos (Bottoni *et al.*, 2010; Boxall *et al.*, 2012; Cooper *et al.*, 2008).

La exposición ambiental a los antibióticos puede acelerar la persistencia o aparición de los genes de resistencia a los antibióticos (GRAs), los cuales representan un grave potencial para el ecosistema y la salud humana (Zhang *et al.*, 2009b). Por ejemplo, en la Cuenca del Río Wenyu en Beijing se encontró que la bacteria *Escherichia coli* resultó ser resistente a los antibióticos, principalmente sulfonamidas, tetraciclinas y ampicilinas (Hu *et al.*, 2008). Mientras que en PTARs de Hong Kong y Shanghai estaban presentes GRAs que se encontraron en el medio ambiente acuático (Zhang *et al.*, 2009a). En la Tabla 6 se presentan otros efectos negativos que presentan algunos PFs a diferentes organismos acuáticos y terrestres. Mientras que en la Tabla 7 se muestran los efectos negativos que tienen los fármacos a los humanos.

Tabla 6. Datos toxicológicos crónicos para organismos acuáticos expuestos a fármacos humanos.

Fármacos	Concentración	Taxón Especie	Efectos Causas de la exposición	Referencia
Ethinilestradiol	0.01 µg/L	Insecto	Deformidades de las partes bucales	Watts <i>et al.</i> , 2003; Katsu <i>et al.</i> , 2007; Parrott y Blunt, 2005.
	<1 ng/L	Pez <i>Chironomus riparius</i>	Efectos estrogénicos (feminización)	
Diclofenaco	1 µg/L	Pez <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Cambios citológicos en el hígado, riñones, branquias, lesiones renales, bioacumulación.	Schwaiger <i>et al.</i> , 2004; Triebkorn <i>et al.</i> , 2004.
	5 µg/L		Inhibe el crecimiento.	
	25mg/L	Fitoplancton <i>Dunaliella tertiolecta</i>	Disminución de la población (enfermedades en las vías renales)	DeLorenzo y Fleming, 2008. Swan <i>et al.</i> , 2006; Taggart <i>et al.</i> , 2009, 2007.
	No específica	Ave Buitre Gyps		

Tabla 6. Continuación

Fármacos	Concentración	Taxón Especie	Efectos Causas de la exposición	Referencia
Atenolol Venlafaxina Gemfibrozil Carbamazepina	10 µg/L 10 µg/L 10 µg/L 5 µg/L	Pez Zebra (<i>Danio rerio</i>)	Disminución significativa de la fecundidad	Galus <i>et al.</i> , 2013.
Diclofenaco Ibuprofeno	68 000 µg/L 108 000 µg/L	Crustácea Daphnia magna Fitoplancton Algas	Alteraciones en la reproducción y crecimiento	Cleuvers, 2003
Ibuprofeno	1-100 µg/L	Pez Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Aumento del peso del hígado y mayor producción de huevos	Flippin <i>et al.</i> , 2007
Clofibrato Gemfibrozil	0.5-1 mg/L	Pez Zebra	alteración en sus características morfológicas	Raldúa <i>et al.</i> , 2008
Levofloxacina Claritromicina	340 µg/L 40 µg/L	Crustácea Daphnia magna	Alteraciones en la reproducción	Yamashita <i>et al.</i> , 2006.
Carbamazepina	43 µg/L	Crustácea Daphnia magna	Muerte	Santos <i>et al.</i> , 2010.

Tabla 7. Uso terapéutico y posibles impactos negativos a la salud de los PFs identificados en aguas residuales (IMTA, 2015).

Fármaco	Datos toxicológicos/impacto en la salud
Estrona y Progesterona	Reconocido carcinógeno
Furosemida	Sospecha tóxico gastrointestinal o hepática, riñón y neurotóxico
Carbamazepina	Reconocido desarrollo tóxico, sospecha de riesgo de toxicidad cardiovascular o sangre, gastrointestinal o hepática, respiratorio y neurotóxico
Naproxeno, Norfloxacin y Ciprofloxacina	Insuficiencia hepática y renal
Sulfametoxazol	Sospecha de riesgo de toxicidad endocrina

Con respecto a los PTs, La toxicidad de estos compuestos pueden diferir con respecto a la toxicidad del compuesto original de dos maneras: en su bioconcentración (toxicocinética) y/o su modo de acción tóxica (toxicodinámica). En algunos casos, la transformación puede crear nuevos tóxicóforos que pueden conducir a una mayor toxicidad por un modo de acción similar o diferente. Por ejemplo, la acridina, intermediario de la fotodegradación de la carbamazepina muestra propiedades mutagénicas y potencialmente carcinogénicas (Michael *et al.*, 2014). De acuerdo al experimento realizado por Schmitt-Jansen *et al.*, (2007), los productos de fototransformación del diclofenaco, mostraron ser altamente tóxicos para el alga *Scenedesmus vacuolatus*, aproximadamente 5 veces más tóxicos en comparación con el compuesto original. Schulze *et al.*, (2010) también identificaron el 2-[(2-clorofenil) amino] benzaldehído (CPAB) como producto de fototransformación del diclofenaco que tiene una toxicidad aguda mayor en *Scenedesmus vacuolatus* que el compuesto original, probablemente debido a su mayor lipofilicidad. Este compuesto parece ser al menos tan persistente como el diclofenaco.

Isidori *et al.*, (2005) informaron que los productos de fototransformación del naproxeno eran 7-16 veces más tóxicos que el naproxeno en bioensayos agudos y crónicos con *B. calyciflorus*, *T. platyurus* y *C. dubia*. Además, estudios de laboratorio han demostrado que los PTs formados durante los POAs pueden ser más tóxicos que sus compuestos originales. Por ejemplo, durante la cloración de aguas residuales que contenían acetaminofén, al menos dos de los productos de transformación formados, 1,4-benzoquinona y N-acetil-p-benzoquinona imina, así como el N-cloro-p-benzoquinona-imina, producto de transformación del sulfametoxazol presentan toxicidades mayores que las del fármaco original (Postigo y Richardson, 2014).

Por lo tanto, la probabilidad de que un compuesto cause efectos ambientales no deseados se puede estimar en una evaluación de riesgos ambientales (ERA). Mediante esta evaluación se determina si existe una amenaza potencial que comprometa la calidad del agua, aire o suelo, que afecte directa o indirectamente al ambiente y a su biodiversidad, en un lugar y tiempo determinado como consecuencia de la exposición de los contaminantes presentes en el ambiente. En la evaluación del riesgo ambiental se utilizan datos y observaciones sobre los efectos nocivos que pueden generar situaciones peligrosas hacia el medioambiente y la salud, y valorar el riesgo que implican. La evaluación consiste en obtener datos para determinar la dosis de exposición de un organismo a un contaminante y la respuesta que éste provocará. Los datos empíricos de dosis comparan con la exposición que reciben los humanos u otros organismos vivos, para tener una evaluación completa del riesgo generado en determinado ambiente contaminado (Arbeláez, 2015).

En la actualidad no existen concentraciones máximas legalmente autorizadas de PFs en el medio ambiente, a pesar de su desconocido impacto en el medio ambiente y la salud humana. Cuando no se tienen datos experimentales de toxicidad en ninguna especie se puede recurrir a herramientas basadas en modelos matemáticos (Guillén *et al.*, 2012; Ginebreda *et al.*, 2010). Estas herramientas predicen la actividad biológica o química de una sustancia en base a sus propiedades físico-químicas aplicando enfoques de relación estructura-actividad (REA). Uno de los programas REA actualmente disponibles para estimar la toxicidad de compuestos orgánicos en el medio ambiente acuático es ECOSAR (USEPA 2012). Este programa cuenta con un sistema computarizado que estima la toxicidad aguda o crónica una sustancia química para organismos acuáticos como peces, invertebrados y plantas acuáticas.

Aunque los PFs no están incluidos hasta ahora en la lista de sustancias prioritarias o prioritarias peligrosas, de acuerdo con la Directiva Marco del Agua (Directiva 2000/60/CE) que presenta una lista actualizada de sustancias prioritarias cada cuatro años y ha identificado a los PFs como contaminantes potenciales. De hecho la Directiva 2013/39/EU y la decisión 2015/495/EU reconoce la relevancia de los PFs para el medio ambiente acuático y propone la inclusión de 3 PFs, 17- α -etinilestradiol, 17- β -estradiol y diclofenaco en la primera lista de observación (Tabla 8), con el fin de recopilar datos de monitoreo que faciliten la toma de medidas apropiadas para abordar el riesgo ambiental planteado por estas sustancias. Hoy en día, Las directivas establecidas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos estipulan que una ERA debe ser parte del procedimiento de aprobación de nuevos fármacos si al someterse a pruebas estandares de toxicidad aguda (algas, dafnias y peces) (Cooper *et al.*, 2008).

Tabla 8. Lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión Europea.

Nombre de sustancia	N° CAS ⁽¹⁾	N° UE ⁽²⁾	Método analítico indicativo ⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾	Límite máximo aceptable de detección del método (mg/l)
17-alfa-Etinilestradiol (EE2)	57-63-6	200-342-2	EFS-CL-EM-EM en grandes volúmenes	0.035
17-beta-Estradiol (E2), estrona (E1)	50-28-2, 53-16-7	200-023-8	EFS-CL-EM-EM	0,4
Diclofenaco	15307-86-5	239-348-5	EFS-CL-EM-EM	10
2,6-di- <i>terc</i> -Butil-4-metilfenol	128-37-0	204-881-4	EFS-CG-EM	3 160
4-Metoxicinamato de 2-etilhexilo	5466-77-3	226-775-7	EFS-CL-EM-EM o CG-EM	6 000
Antibióticos macrólidos ⁽⁶⁾			EFS-CL-EM-EM	90
Metiocarb	2032-65-7	217-991-2	EFS-CL-EM-EM o CG-EM	10
Neonicotinoides ⁽⁷⁾			EFS-CL-EM-EM	9
Oxadiazón	19666-30-9	243-215-7	ELL/EFS-CG-EM	88
Trialato	2303-17-5	218-962-7	ELL/EFS-CG-EM o CL-EM-EM	670

⁽¹⁾ *Chemical Abstracts Service.*

⁽²⁾ Número de la unión europea

⁽³⁾ Para garantizar la comparabilidad de los resultados de los diferentes Estados miembros, todas las sustancias serán objeto de seguimiento en toda la muestra de agua.

⁽⁴⁾ Métodos de extracción: ELL: extracción líquido-líquido.

⁽⁵⁾ Para el seguimiento del 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo en las partículas en suspensión o los sedimentos (tamaño <63 µm), se impone el siguiente método analítico: ESL (extracción sólido-líquido). CG-EM, con un límite máximo de detección de 0,2 mg/kg.

⁽⁶⁾ Eritromicina, claritromicina, azitromicina.

⁽⁷⁾ Imidacloprid, tiacloprid, tiametoxam, clotianidina, acetamiprid.

Capítulo III. Desarrollo experimental

3.1. Estrategia experimental

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y en el Departamento de Química Ambiental que forma parte del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua ubicado en Barcelona, España.

La investigación se desarrolló en 4 etapas:

1. En la primera etapa se seleccionaron los PFs a estudiar y se desarrolló un protocolo de muestreo de acuerdo a los procedimientos establecidos en la NMX-AA-003-1980. Dentro de este protocolo se seleccionaron y ubicaron los puntos de muestreo, el tipo y la preservación de la muestra, así como la EFS.
2. En la segunda etapa se desarrolló y validó un método multi-residuo para la determinación de PFs presentes en aguas utilizando CLAR-EM-EM.
3. En la tercera etapa se determinaron cuantitativamente las concentraciones de los PFs en las aguas superficiales, residuales y tratadas.
4. En la cuarta etapa con las concentraciones de los PFs obtenidas se evaluó el riesgo ambiental mediante la obtención de los CRs.

Esta estrategia experimental se muestra resumida en la Figura 10

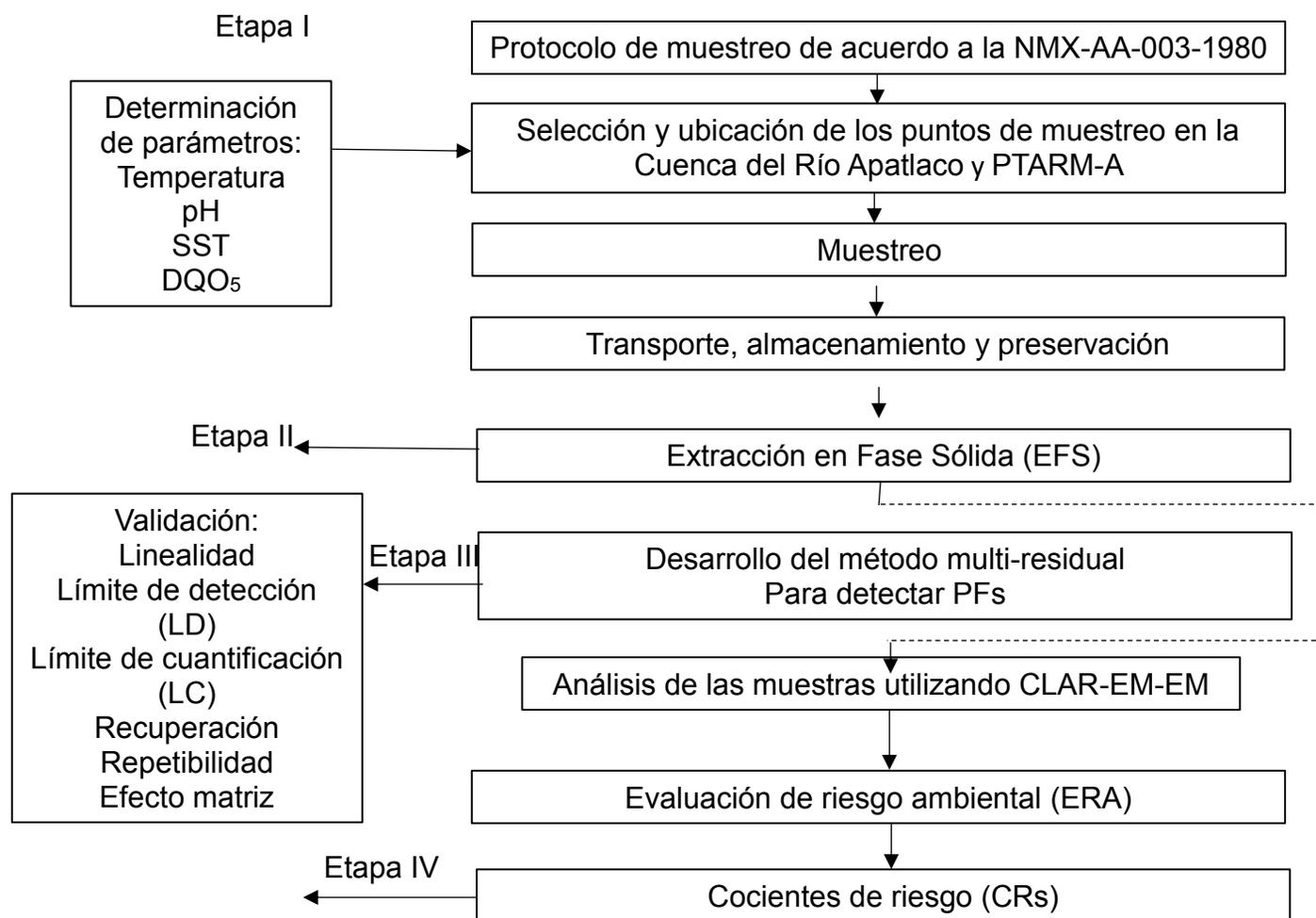


Figura 10. Esquema de la estrategia experimental para la determinación de PFs en las muestras de agua

3.2. Metodología primera etapa

3.2.1. Preselección de los PFs

Se realizó una revisión bibliográfica para conocer cuáles PFs son los de mayor consumo por parte de la población en Cuernavaca, Morelos para elegirlos como posibles candidatos a estar presentes en aguas residuales y superficiales de la zona de estudio. Sin embargo, debido a que no se cuenta con información acerca del consumo de PFs por parte de la población de Cuernavaca, Morelos. La preselección de los PFs se llevó a cabo con el uso de un equipo de cromatografía de líquidos de ultra rendimiento con detección de masa exacta de alta resolución (CLUR-MEAR) con una exactitud de masa superior a 1 ppm (Figura 11). En este equipo se inyectaron las muestras AS1, AS2, INF y EFL correspondientes a la 1er campaña de muestreo (13 y 14 de abril 2014) donde se preparó previamente la muestra. Debido a la alta resolución y masa exacta.

A continuación, con el equipo Q Exactive se realizó un análisis de barrido completo (espectro de masas continuo), tanto en modo IES⁺ como IES⁻ en un rango de (149-720 m/z). Este rango establecido comprende gran parte de las masas de los PFs más representativos de los diferentes grupos terapéuticos consultados en la literatura. Los picos de la relación m/z más abundantes se compararon con la base de datos con la que cuenta el equipo (biblioteca) para determinar posibles PFs presentes en las muestras de acuerdo a sus fórmulas moleculares.



Figura 11. Equipo Orbitrap-cuadrupolo híbrido conectado a un espectrómetro de masas de alta resolución Q Exactive.

3.2.2. Preparación de las disoluciones madres

A partir de los PFs preseleccionados en estado sólido grado analítico (PEs), se prepararon las denominadas soluciones madre. En la balanza analítica se pesaron 5 mg del patrón, que se disolvieron en 5 mL de metanol, así mismo se prepararon soluciones con los siguientes fármacos deuterados (PITs): acetaminofén-d₄, hidroclorotiazida-d₂, furosemida-d₅, ácido clofibrico-d₄, ketoprofeno-d₃, ibuprofeno-d₃, diclofenaco-d₄, indometacina-d₄, atenolol-d₇, cimetidina-d₃, enalapril-d₅, sulfametoxazol-d₄, carbamazepina-d₁₀ y diazepam-d₅. Todas las disoluciones se prepararon a una concentración de 1 mg/mL o 1000,000 ng/mL. Cada una de las diluciones fueron almacenadas a -20°C y protegida de la luz.

3.2.2.1. Preparación de las diluciones de trabajo

Las disoluciones de trabajo se realizaron a partir de las disoluciones madre de los PFs (DPEs). Se realizaron disoluciones separadas de los compuestos sin deutar, que serían utilizadas para la elaboración de las rectas de calibrado, y por otro lado de los deuterados, que serían utilizados como patrones internos (PITs). La dilución de trabajo fue una mezcla preparada de manera individual con todos los PEs y PITs a 1,000 ng/mL.

3.2.3. Protocolo de muestreo

El presente protocolo de muestreo se desarrolló como procedimiento para la toma de muestras de agua residual y superficial siguiendo los lineamientos establecidas en la norma NMX-AA-003-1980 y las recomendaciones sugeridas por Ort *et al.*, (2010b) con el fin de asegurar la calidad y fiabilidad de los resultados obtenidos.

3.2.3.1. Materiales y equipos

Para el muestreo:

- Botellas de polietileno de alta densidad color ámbar marca NELGENE®
- Hielera
- Hielo para preservar la muestra a 4°C durante el transporte al laboratorio.
- Potenciómetro (estándares de 4, 7 y 10)
- Termómetro rango (0 a 50°C)
- Muestreador de plástico
- Recipientes de vidrio (vasos de precipitado, matraces, etc.)

Para el análisis:

- Congelador que alcance la temperatura de (-20°)
- Equipo de filtración al vacío
- Equipo de EFS
- Cartuchos HLB
- CLAR-EM-EM
- Filtros de vidrio de diámetro de 1 μm y de membrana de nylon de diámetro de 0.45 μm

3.2.3.2. Zona de muestreo

Se seleccionó la PTARM que tiene por nombre “Acapantzingo” (PTARM-A), que se encuentra ubicada en el municipio de Cuernavaca, Morelos. La planta está diseñada para tratar 750 L/s de agua residual cruda. Se encuentra ubicada en la Cuenca del Río Apatlaco que es el cuerpo receptor de la descarga de la PTARM-A. En la Figura 12 se muestra la zona de muestreo.



Figura 12. PTARM-A y Cuenca del Río Apatlaco
(http://antares.inegi.org.mx/analisis/red_hidro/siatl/#).

3.2.3.3. Ubicación de los puntos de muestreo

Se consideraron 4 puntos de muestreo representativos del área de estudio, que son los siguientes:

1. Agua superficial 100 m arriba de la ubicación de la PTARM-A (AS1)



2. 100 metros después de la descarga de la PTARM (AS2)



3.

Influente de la PTARM-A (INF)



4. Efluente de la PTARM-A (EFL)



3.2.3.4. Muestreo

La frecuencia de la toma de las muestras se realizó de acuerdo a lo establecido en la NOM-001-SEMARNAT-1996 (Tabla 9). Considerando que la PTARM-A opera las 24 H. del día los 365 días del año. La muestra fue compuesta conformada por 6 muestras simples colectadas cada 4 H. El volumen de las muestras simples fue proporcional al caudal de la descarga en el momento de la toma de muestra. El muestreo se dividió en 3 campañas:

1. Del 13-14 abril de 2014, considerando muestras compuestas de 24 H.
 2. Del 22-25 abril de 2015, considerando muestras compuestas de 24 H.
 3. Del 22-26 abril de 2016, considerando muestras compuestas de 12 H.
- La diferencia entre el tiempo de muestreo entre la 2da y 3er campaña de muestreo fue debido a condiciones de inseguridad para los muestreadores en la zona de estudio, ya que existían conflictos entre los ejidatarios.

Tabla 9. Frecuencia de muestreo

Horas por día que opera el proceso generador de la descarga	Número de muestras simples	Intervalo entre toma de muestras simples (horas)	
		Mínimo N.E	Máximo N.E
Menor que 4	Mínimo 2	-	-
De 4 a 8	4	1	2
Mayor que 8 y hasta 12	4	2	3
Mayor que 12 y hasta 18	6	2	3
Mayor que 18 y hasta 24	6	3	4

N.E: no especificado

Los parámetros que se determinaron en cada muestra de los diferentes muestreos son mostrados en la Tabla 10. Algunos de estos parámetros están considerados dentro de la NOM-001-SEMARNAT-1996 como parámetros de para determinar la calidad del agua.

Tabla 10. Parámetros y métodos de análisis a utilizar para las muestras colectadas e

Parámetro	Unidad	Referencia	muestreo
SST	mg/L	NMX-AA034-SCFI-2001	1 ^{era} , 2 ^{da} y 3 ^{era}
DBO ₅	mg/L	NMX-AA028-SCFI-2001	1 ^{era} , 2 ^{da} y 3 ^{era}
pH	Unidades de pH	NMX-AA008-SCFI-2011	1 ^{era} , 2 ^{da} y 3 ^{era}
Temperatura	°C	NMX-AA007-SCFI-2013	1 ^{era} , 2 ^{da} y 3 ^{era}
Caudal	L/s	N/A	1 ^{era}

SST: Sólidos Suspendedos Totales; DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxígeno al 5to día a 20°C.
N/A: No aplica.

NOTA: Los parámetros SST, DBO₅ y caudal fueron medidos por ECCACIV.

II. Procedimiento toma de muestras

a. Etiquetar el recipiente como se muestra a continuación.




**FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA**

Tipo de muestra: _____

Clave de la muestra: _____

Punto de muestreo: _____

Fecha y hora del muestreo: _____

Muestreador: _____

Observaciones: _____

b. Enjuagar el recipiente repetidas veces con la muestra antes de efectuar el muestreo y posteriormente dejar fluir un volumen aproximadamente igual a 10

veces el volumen de la muestra y a continuación se llena el recipiente de muestreo con 500 mL con volumen.

c. Analizar pH y temperatura.

d. Cerrar el recipiente de tal forma que se evite el derrame de la muestra.

e. Preservar la muestra durante el transporte por medio de un baño de hielo y conservar las muestras a una temperatura de 4°C hasta el arribo al laboratorio.

f. En el laboratorio a todas las muestras se les agregó 100 µl de la disolución con PITs

g. Almacenar las muestras a -20 °C hasta la extracción y análisis.

3.2.4. Preparación de la muestra (pretratamiento)

3.2.4.1. Filtración

Debido a la a la presencia de partículas en suspensión en las muestras y al posible efecto matriz que estas partículas pueden ocasionar durante el análisis CL-MS-MS. Todas las muestras fueron filtradas a través de un sistema de filtración conectado a vacío (Figura 13) utilizando un filtro de vidrio de diámetro de 1 µm seguido de un filtro de membrana de nylon de diámetro de 0.45 µm.



Figura 13. Sistema de filtración a vacío

3.2.4.2. Extracción en Fase sólida (EFS)

La determinación de los fármacos se realizó en un equipo de extracción J.T. Baker® (Figura 14). Los cartuchos utilizados para la extracción de los PFs fueron los OASIS® HLB de la marca WATERS que contienen 200 mg de fase estacionaria (balance hidrofílico-lipofílico, de fase reversa). Dichos cartuchos fueron seleccionados sobre otros debido a que ha reportado que estos cartuchos tienen buenas recuperaciones para la mayoría de los fármacos (Gracia-Lor *et al.*, 2010; Castiglioni *et al.*, 2005).

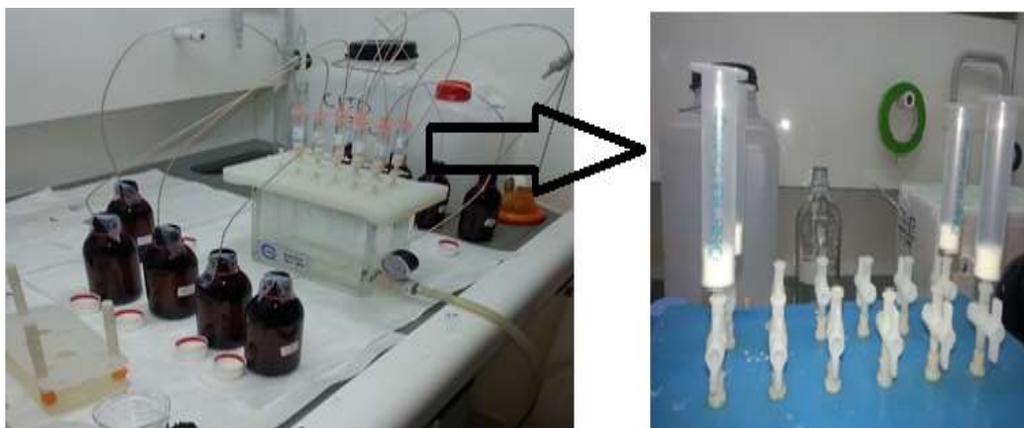


Figura 14. Sistema de extracción en fase sólida (EFS).

3.2.4.2.1. Extracción

Los cartuchos fueron acondicionados antes de la extracción lavándolos con 6 mL de metanol (MeOH) y 6 mL de agua grado cromatográfico (H₂O-CLAR). Posteriormente utilizando diferentes cartuchos se hicieron pasar por el sistema de EFS 500 mL de la muestra identificada como AS1 y AS2, 100 mL de la muestra INF y 200 mL de la muestra EFL empleando vacío a un caudal de 5 mL/min de forma que los analitos quedarán retenidos en el cartucho y pudieran ser eluidos con un disolvente apropiado. Enseguida cada cartucho fue lavado con 6 mL de H₂O y secado con vacío por un periodo de 30 min.

3.2.4.2.2. Elución

La elución de los analitos retenidos se llevó a cabo lavando los cartuchos con 6 mL de MeOH y los extractos se colectaron en viales color ámbar que se encontraban dentro del Baker® (Figura 15).



Figura 15. Elución de los PFs

3.2.4.2.3. Preconcentración de los PFs

Los extractos fueron evaporados en un equipo Turbo Vap® hasta aproximadamente llegar a un volumen de 1 mL con un flujo suave de nitrógeno (N_2) de ultra alta pureza (Figura 16). Este volumen fue transferido con pipetas Pasteur estelizadas a un vial color ámbar especial para CL. Finalmente, este volumen fue evaporado a sequedad con un flujo suave de N_2 utilizando un equipo Reacti-vap® y se reconstituyeron los extractos con 1 mL de una mezcla MeOH:H₂O (10:90) (Figura 16).



Figura 16. Equipo Turbo Vap® (izquierda) y Reacti-vap® (derecha)

3.3. Metodología segunda etapa

3.3.1. Análisis de las muestras de agua mediante CLAR-EM-EM

En la segunda etapa se validó un método analítico que permitiera detectar y cuantificar los PFs tanto en las muestras de agua residual como superficiales. La validación realizada fue en términos de linealidad, recuperación, precisión, sensibilidad como límites de detección (LDs) y límites de cuantificación (LCs), así como el efecto matriz. Para la correcta validación del método y la interpretación de los resultados se siguieron los criterios y requerimientos establecidos en la Decisión de la comisión de la Unión Europea 2000/60/EC.

3.3.1.2. Equipo

El equipo empleado fue un CLAR Symbiosis™ Pico (Spark Holland, Emmen, Países Bajos) conectado en serie a un espectrómetro de masas en tandém (EM-EM) modelo 4000QTRAP triple cuadrupolo equipado con una fuente de tipo turbo spray, Sciex, Framingham, MA, USA. (Figura 17). La separación cromatográfica se consiguió con una columna endurecida Purospher Star RP-18 de 125 x 2 mm con partículas de 5 µm, precedidas por una columna de protección de 4x4 mm del mismo material, ambas suministradas por Merck (Darmstadt, Alemania).



Figura 17. Equipo CLAR Symbiosis conectado a un 4000QTRAP

3.3.1.3. Condiciones de operación del equipo CLAR Symbiosis

Las condiciones cromatográficas utilizadas en el presente trabajo fueron las mismas que las sugeridas por Gros *et al.*, (2009). Dichas condiciones fueron adoptadas utilizando IES en modo positiva (IES⁺) y negativa (IES⁻). En la Tabla 11 y 12 se muestran las condiciones y los distintos gradientes que se utilizaron para ambos modos de ionización.

Tabla 11. Gradiente de elución en modo IES⁺

Tiempo	Flujo mL/min	Fases móviles	
		A	B
00:00:00	0.30	95	5
00:20:00	0.30	5	95
00:22:00	0.30	0	10
00:27:00	0.30	95	5
00:37:00	0.30	95	5

A: H₂O-CLAR con ácido fórmico (HCOOH) al 0.1%; B: acetonitrilo (ACN) con HCOOH al 0.1%

Tabla 12. Gradiente de elución en modo IES⁻

Tiempo	Flujo mL/min	Fases móviles	
		A	B
00:00:00	0.20	80	20
00:18:00	0.20	10	90
00:20:00	0.20	10	90
00:23:00	0.20	80	20
00:30:00	0.20	80	20

A: H₂O/acetato de amonio (C₂H₇NO₂) 10 Mm; B: ACN:MeOH (1:1, v/v)

3.3.1.4. Condiciones de operación del espectrómetro de masas 4000QTRAP

Se determinaron los parámetros óptimos del equipo EM-EM modelo 4000QTRAP. El modo de trabajo elegido del espectrómetro de masas ha sido MRS (monitoreo de la reacción seleccionada). Para cada uno de los PFs seleccionados se optimizó la molécula protonada [M+H]⁺ y desprotonada [M+H]⁻. La optimización se llevó a cabo inyectando 100 µl de una disolución pura de cada patrón interno (PIT) y patrón estándar (PE) a 1 PPM, directamente en el espectrometro de masas sin realizar separación

cromatográfica. Las condiciones generales de la fuente IES, la interfase y del analizador, fueron optimizadas para garantizar la correcta formación del spray, y la adecuada detección de las moléculas. Al tratarse de un MS-MS, mediante la utilización de un gas inerte y la aplicación de una determinada energía de colisión (EC) y utilizando el modo de trabajo MRS (monitorización de reacciones seleccionadas) se detectó y seleccionó en el primer cuadrupolo varios iones productos procedentes del ion original. A esta combinación de pares de, ion original-ion producto, se le denomina transición. En el segundo cuadrupolo se hizo un barrido de los iones producto aplicando una diferente EC, un diferente potencial de descomposición (PD) y potencial de salida de celda (PSD) hasta obtener 2 transiciones. Para cada una de las moléculas fueron seleccionadas dos transiciones, es decir dos iones producto procedentes del ion original. Para el caso de los PITs, solo se monitoreo una transición. Los parámetros óptimos fueron estudiados para todas las moléculas, eligiendo aquellos que implicaran una buena detección en todos los casos (Figura 18).



Figura 18. Optimización de las condiciones EM-EM en el equipo 4000QTRAP

3.3.1.5. Análisis de las muestras

Con las condiciones de operación del equipo ya establecidas y optimizadas se procedió a programar el método en el equipo y se estableció la secuencia de las muestras a analizar (correspondientes al 2do y 3er muestreo). Estas muestras se analizaron por cuadruplicado (n=4), tanto en modo de IES⁺ como en IES⁻.

3.3.2. Validación del método analítico

3.3.2.1. Linealidad (curva de calibración)

La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración en la cual se correlacionó la concentración de 11 soluciones preparadas en una mezcla MeOH:H₂O (10:20) que contenían la dilución de trabajo preparada anteriormente de manera individual con todos los PITs a una concentración de 1,000 ng/mL y de 10,000 ng/mL para PEs. El rango de trabajo que se utilizó fue de 0.1 a 5,000 ng/mL. El criterio de aceptación está dado por un valor del coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99. En la Tabla 13 se muestra como se prepararon estas soluciones.

Tabla 13. Preparación de los 11 puntos de la recta de calibración

Conc. PITs ng/mL	Conc. PEs (ng/mL)	Conc. final (ng/mL)
1,000	10,000	5,000
1,000	10,000	2,500
1,000	10,000	1,000
1,000	10,000	500
1,000	1,000	100
1,000	1,000	50
1,000	1,000	10
1,000	100	5
1,000	100	1
1,000	10	0.5
1,000	10	0.1

3.3.2.2. Recuperación

Para el estudio de recuperación, las muestras identificadas como AS1 y AS2 se mezclaron para formar una sola muestra identificada como AS3. Para la evaluación de la recuperación, antes de la etapa de extracción a todas las muestras se les agregaron 500 µl de la solución de PEs de 10000 ng/L, además de 250 µl de una solución PITs de 1000 ng/L. En el cálculo del rendimiento se utilizaron 4 replicados.

Para saber el nivel de recuperación del método se evaluó a una concentración de 5,000 ng/L.

El porcentaje de recuperación del método se calculó a partir de la ecuación 1:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{C_s - C}{C_a} \quad \text{EC. 1}$$

Donde:

C_s = Concentración de la muestra con la solución de PEs y PITs

C = Concentración en la misma muestra sin fortificar (blanco)

C_a = Concentración agregada

3.3.2.3. Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada únicamente intra-día (muestras obtenidas en el mismo proceso analítico), la cual fue expresada como la desviación estándar relativa (DER) de las recuperaciones relativas obtenidas de la muestra inyectada al CLAR-EM-EM, cuatro replicados (n=4) de la misma concentración y mismo día de análisis.

3.3.2.4. Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección instrumental (LDs) y cuantificación instrumental (LCs) son parámetros que determinan la capacidad de análisis del método analítico. Los cálculos de estos límites se hicieron considerando la señal/ruido (S/R), el cual es la señal de los componentes de la matriz de la muestra. Los LDs fueron definidos como tres veces la S/R, mientras que los LCs fueron definidos como 10 veces la S/R.

3.3.2.5. Efecto matriz

Un inconveniente importante en el análisis cuantitativo de CLAR-EM-EM es el efecto de matriz (EMZ). Ocurre porque la fuente de IES es muy susceptible a otros componentes presentes en la matriz, lo que puede provocar una supresión o mejora de la señal que conduce a resultados erróneos. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó el efectos matriz comparando las áreas de los picos obtenidas en las muestras fortificadas con las soluciones PIs y PEs a concentraciones conocidas entre las áreas obtenidas en las muestras (blancos) fortificadas a la misma concentración.

3.3.2.6. Análisis estadístico de las muestras

Para evaluar el comportamiento de los fármacos en cada una de las campañas de muestreo se realizó la comparación de las muestras entre días, sitios y años mediante el análisis de varianza de un factor (ANOVA). Se utilizó un nivel de confianza (μ) del 95% y el análisis estadístico se realizó utilizando hojas de cálculo del programa Excel.

3.4. Metodología tercera etapa

3.4.1. Evaluación del riesgo ambiental (ERA)

La presencia de los fármacos en el ecosistema acuático “Cuenca del Río Apatlaco” es un tema que se analizó para determinar cuál es el impacto por la presencia de éstos. Para este fin, se utilizaron los CRs para cada fármaco individual, calculados de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (European Commission, 2003) como se muestra en la ecuación 2:

$$CR = \frac{CAM}{CPSE} \quad \text{EC. 2}$$

Donde:

CR: Cociente de riesgo

CAM: Concentración ambiental medida en EFL, AS1 y AS2.

CPSE: Concentración prevista sin efecto

La concentración individual máxima cuantificada para cada PF en las diversas muestras de EFL, AS1 y AS2 se tomaron como CAM.

Sí los CRs está por debajo de 0.1, no se espera ningún efecto adverso y se clasifica como riesgo insignificante. Sí los valores del CR se encuentran entre 0.1 y 1, el riesgo es bajo, pero se deben considerar los posibles efectos adversos. Sí los valores del CRs se encuentran entre 1.0 y 10, es probable algún efecto adverso o riesgo moderado. Finalmente, sí los valores del CR calculados están por encima de 10, se anticipa un alto riesgo. Los valores de los CPSEs (Concentraciones previstas sin efectos) se obtuvieron a partir de datos de toxicidad acuática (CE50: concentración efectiva media; CL50: concentración letal media y CENO: concentración de efecto no observado) utilizando tres especies de diferentes niveles tróficos, que representan el ecosistema acuático (algas, dafnias y peces), aplicando el factor de seguridad (FS) pertinente (European Commission, 2003), aplicando la ecuación 3.

$$CPSE = \frac{CE50/CL50/CENO}{*FS}$$

EC. 3

Se aplicó una FS de 1000 cuando se disponía de al menos un CE50 y/o CL50 de corta duración de cada uno de los tres niveles tróficos evaluados, se aplicó un FS de 100 cuando se dispone de una CENO a largo plazo para los tres niveles tróficos; una FS de 50 cuando se tienen dos concentraciones de efectos no observados (CENOs) a largo plazo están disponibles para especies en dos niveles tróficos diferentes, y finalmente se utilizó una FS de 10 cuando estaban disponibles las tres CNOEs a largo plazo (European Commission, 2003). Cuando no se contó con datos experimentales sobre la toxicidad de un fármaco se recurrió a utilizar el software ECOSAR (v1.11) (USEPA,2012).

Capítulo IV. Resultados y discusión

4.1. Primera etapa

4.1.1. Muestreo

El muestreo llevado a cabo en el presente estudio se realizó en la Cuenca del Río Apatlaco en Cuernavaca, Morelos, en el sitio donde se ubica la PTARM-A. Se seleccionó un punto de muestreo arriba de la descarga y otro después de la descarga. En el caso de la PTARM-A se tomaron muestras a la entrada y salida de la planta para conocer el impacto de estas descargas sobre el Río Apatlaco. Todas las muestras colectadas fueron representativas del tipo de agua analizada:

Agua superficial antes de la descarga, agua del influente y efluente de la PTARM-A y agua superficial abajo de la descarga de la planta.

Se realizaron 3 muestreos de acuerdo a las recomendaciones de la norma NMX-AA-003-1980:

El 1er muestreo se llevó a cabo el 13 y 14 de abril de 2014, donde se colectaron 6 muestras simples del INF, EFL, AS1 y AS2 tomadas cada 4 H para complementar una muestra compuesta representativa de 24 H de cada uno de los puntos de muestreo. El 2do muestreo se llevó a cabo del 24-27 de abril de 2015 y también se tomaron 6 muestras simples obteniendo muestras compuestas de los sitios de muestreo. Durante la realización de estos 2 muestreos no se presentaron incidencias que pudieran afectar la trazabilidad de las muestras.

Finalmente, el 3er muestreo se llevó a cabo del 22-25 de abril de 2016 y realizando muestreo compuesto a partir de muestras simples para cada punto de muestreo.

Debido a condiciones de inseguridad de la zona de estudio se realizó el muestreo durante 12 H donde se colectaron las muestras cada 3 H.

Durante los muestreos se realizaron los parámetros de campo temperatura y pH, mientras que los parámetros, solidos suspendidos totales (SST) y demanda bioquímica de oxígeno al 5to día (DBO₅) se realizaron en el laboratorio. Los resultados de los parámetros analizados de los muestreos se presentan en las Figuras 19a, 19b, 20a y 20b.

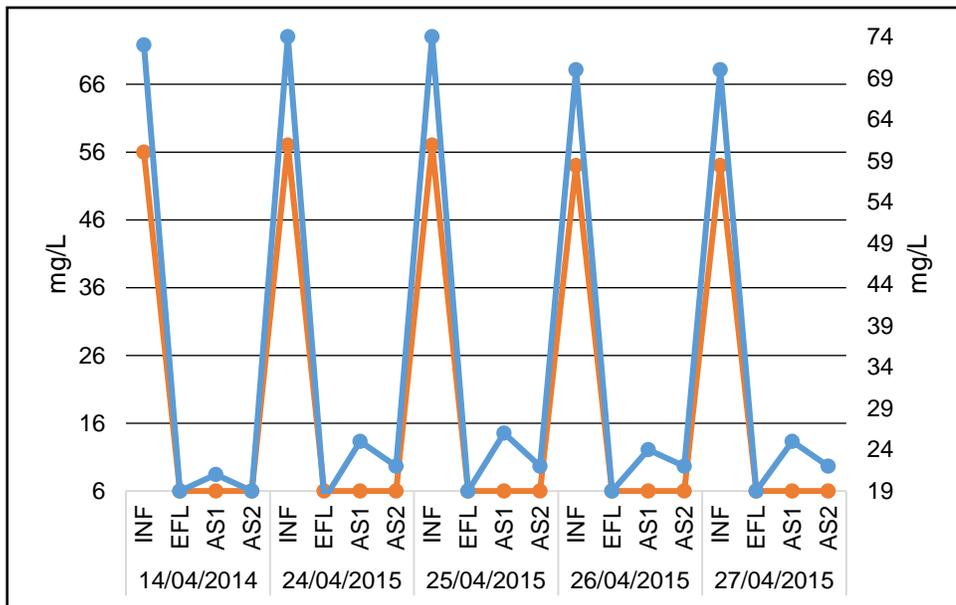


Figura 19a. Parámetros analizados en el 1ero y 2do muestreo

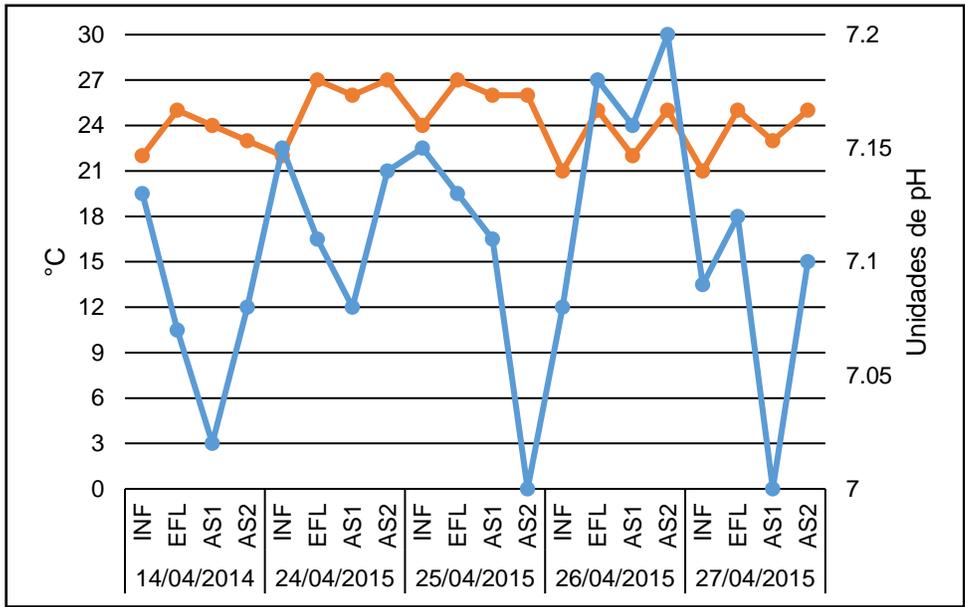


Figura 20b. Parámetros analizados en el 1ero y 2do muestreo

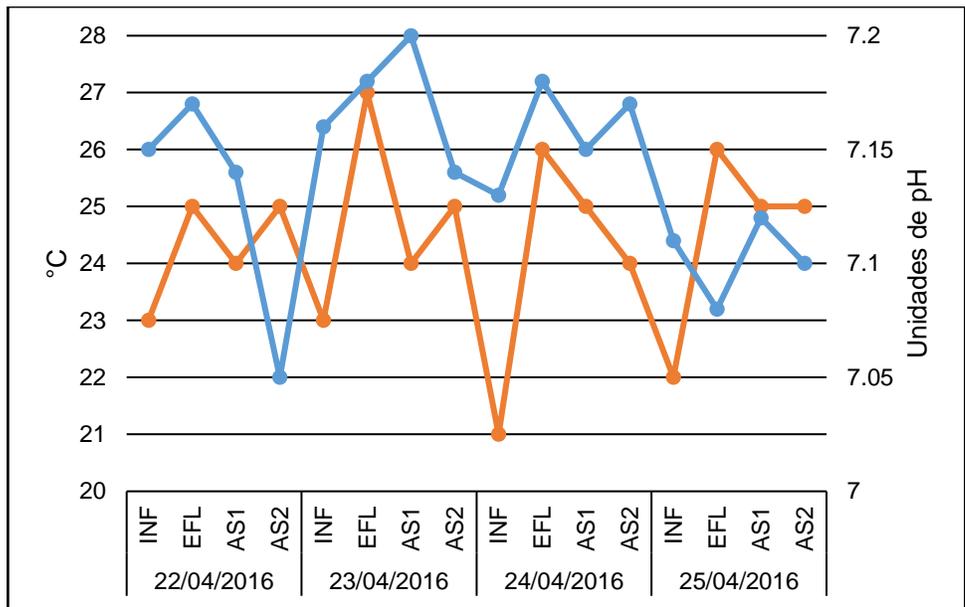


Figura 21a. Parámetros analizados durante el 3er muestreo

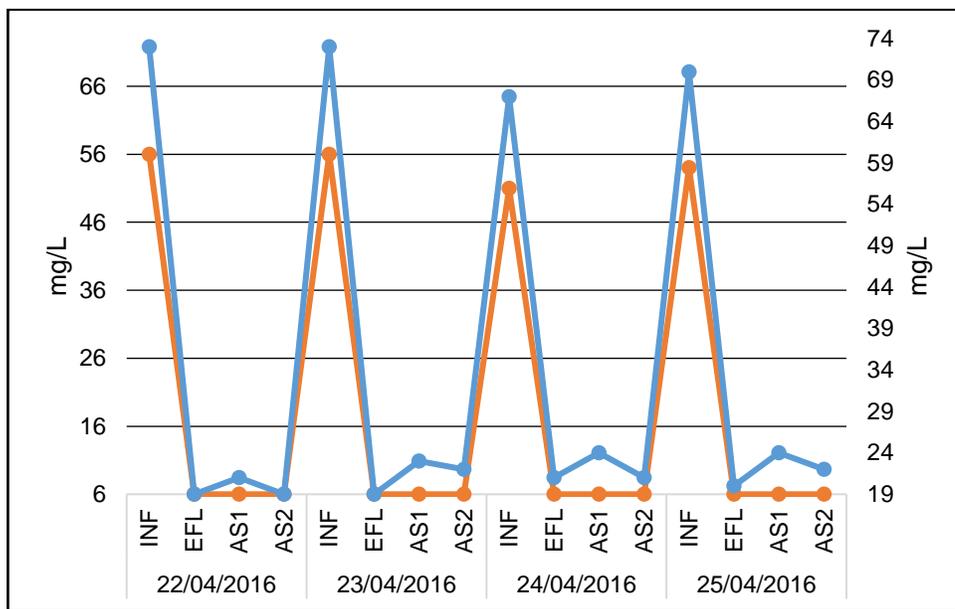


Figura 22b. Parámetros analizados durante el 3er muestreo

De acuerdo a los resultados obtenidos, los parámetros SST y DBO₅ determinados en las muestras analizadas, éstos se encuentran dentro del límite máximo permisible (200 mg/L) de acuerdo a la normatividad vigente en México (NOM-001-SEMARNAT-1996).

Mientras que los parámetros temperatura y pH no se encuentran regulados bajo normatividad. Sin embargo, Crites y Tchobanoglous 2000 recomiendan que el pH se encuentre entre 5 y 9 unidades y la temperatura entre 25 y 35°C. De acuerdo a este criterio, los resultados obtenidos se encuentran dentro de los rangos recomendables para estos parámetros.

4.1.2. Preselección de los productos farmacéuticos

De acuerdo al análisis de las muestras realizado en el equipo CLUR-MEAR se obtuvieron masas exactas de moléculas protonadas y desprotonadas donde se seleccionaron aquellas de mayor abundancia, las cuales se compararon con las masas de los PFs ya conocidos. Inicialmente, se preseleccionaron 50 posibles PFs. Pero reducir el número de falsos positivos, se inyectaron en el

equipo 2 soluciones de PITs a una concentración de 25 y 250 ng/L que contenían los 50 PFs y con un método analítico contenido en la biblioteca del equipo se obtuvieron varias transiciones, pero solo se seleccionaron las 2 de mayor abundancia para cada fármaco. Los PFs seleccionados y sus respectivas transiciones se presentan en las Figuras 21a, b, c, d, e, f, g y h.

Siguiendo el criterio de Gros *et al.*, (2009), el tiempo de retención del patrón estándar en la cromatografía líquida se comparó con los obtenidos en las muestras reales. De acuerdo a este criterio, el tiempo de retención del compuesto en la muestra debe ser de $\pm 2\%$ del tiempo de retención (TR) del compuesto en el estándar analítico. De acuerdo a este criterio se seleccionaron 35 PFs. Algunos de éstos coincidiendo con alto consumo por parte de la población en México, siendo comparables con el consumo registrado en países europeos (Siemens, *et al.*, 2009).

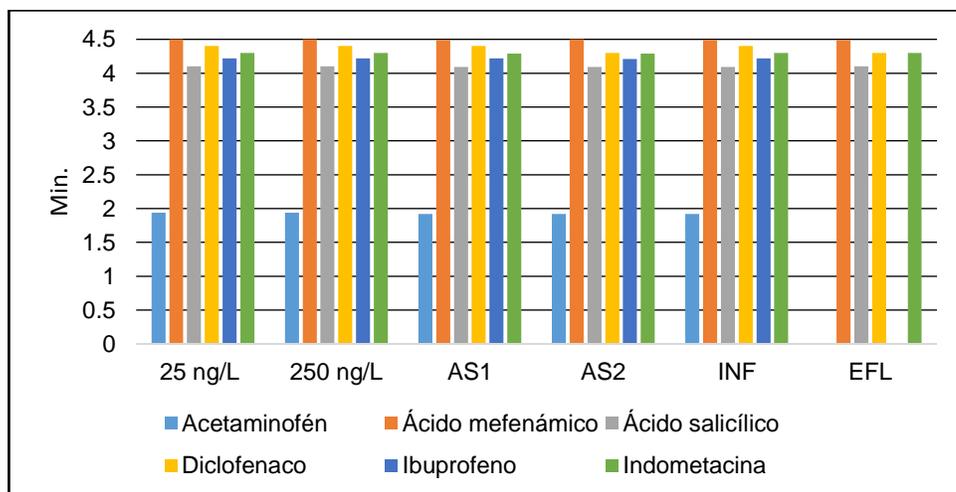


Figura 23a. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras

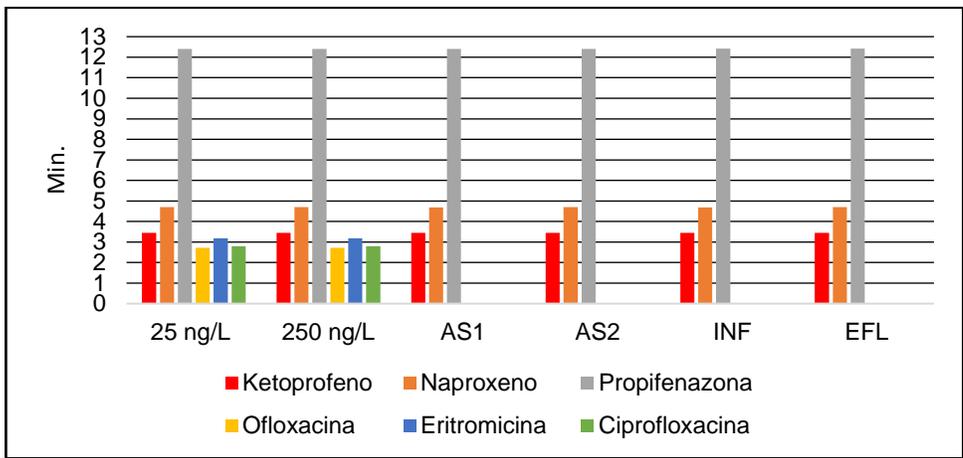


Figura 24b. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras

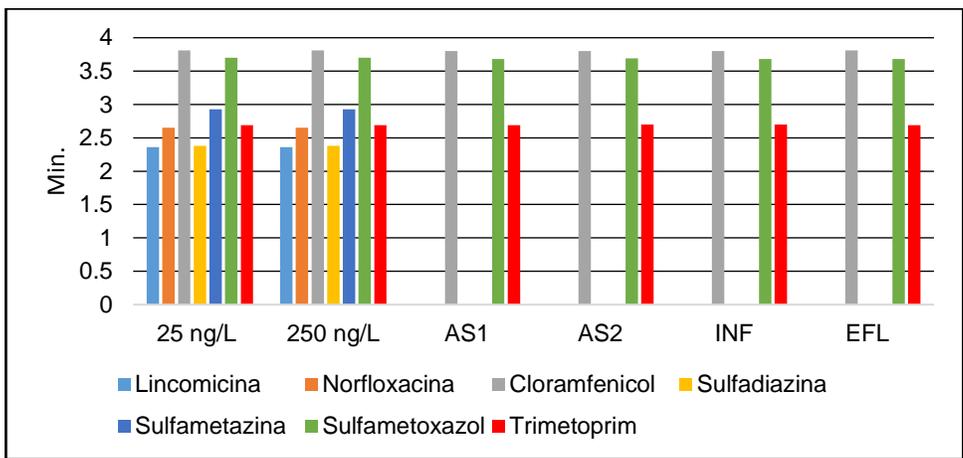


Figura 25c. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras

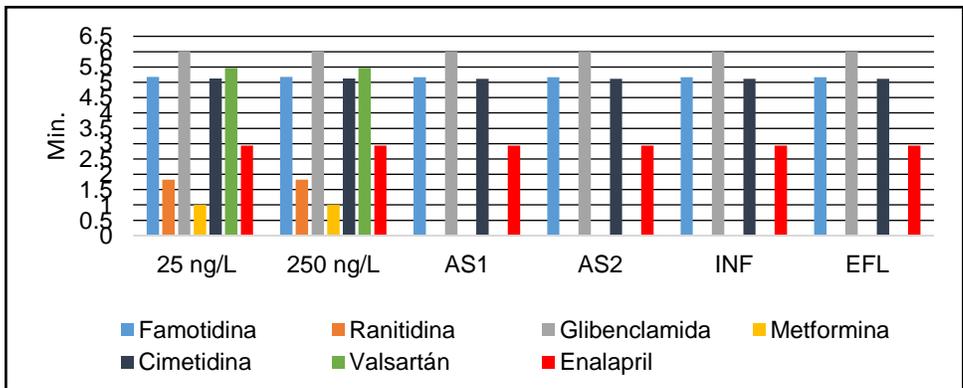


Figura 26d. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras

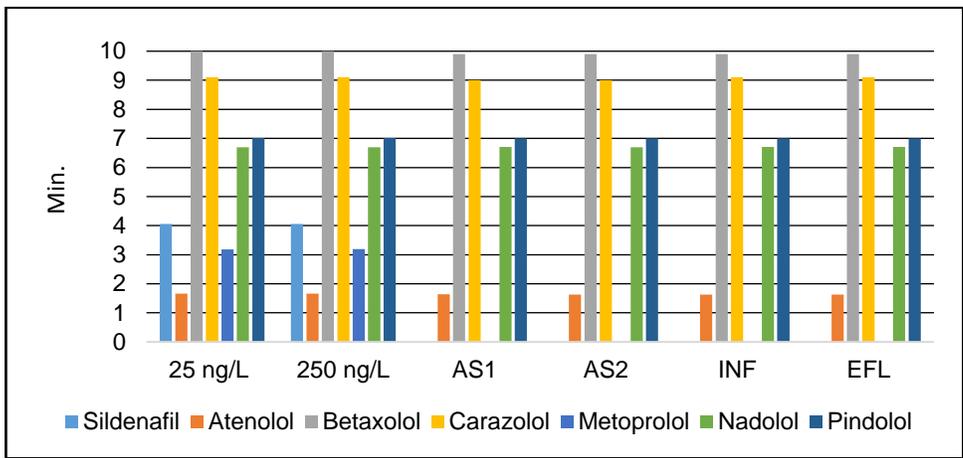


Figura 27e. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras

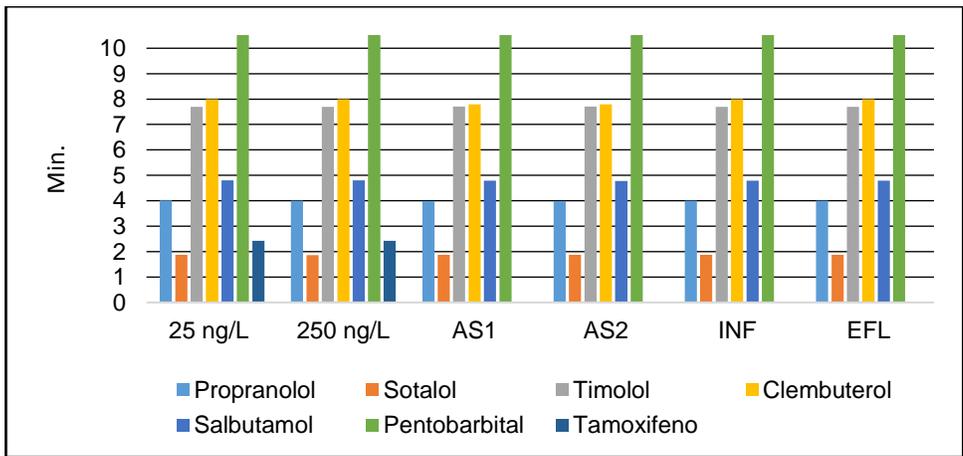


Figura 21f. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras

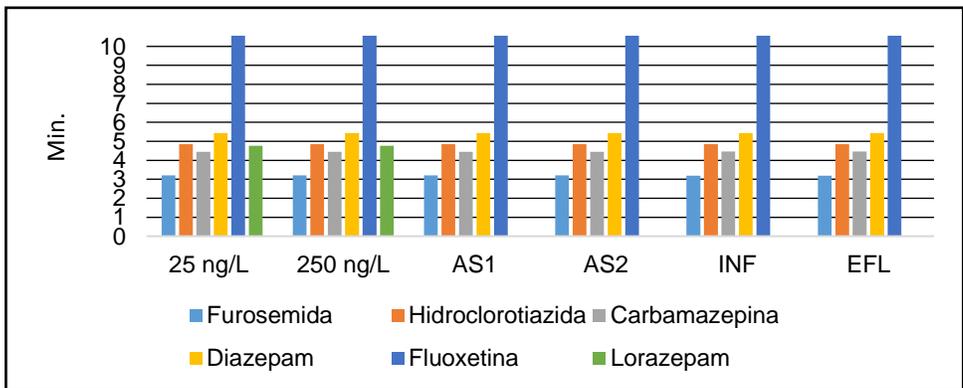


Figura 21g. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras

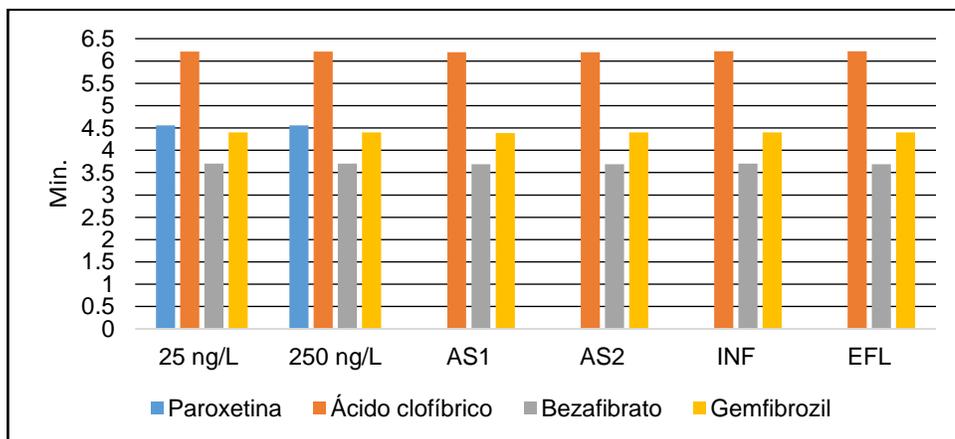


Figura 21h. Tiempo de retención (TR) de los PFs en los PITs y en las muestras

4.2. Segunda etapa

4.2.1. Validación del método analítico

4.2.1.1. Condiciones de operación del equipo 4000QTRAP

Las 2 transiciones seleccionadas para cada PFs y sus análogos deuterados, así como el resto de las condiciones experimentales de acuerdo al método multi-residuo desarrollado se muestran en las Tablas 14 y 15.

Tabla 14. Condiciones óptimas del CLAR-EM-EM para el análisis de los PFs seleccionados en modo de ionización negativa y para los correspondientes PITs.

Compuestos	Ion precursor (m/z)	Ion fragmento (m/z)	PD-EC-PSD	TR (min)	(MRS ¹ /MRS ²)
<i>Acetaminofén-d₄</i>	154 [M-H] ⁻	111	60-26-17	3.53	N/A
Acetaminofén ^a	150 [M-H] ⁻	107	55-22-7	3.60	N/A
Ácido salicílico ^a	137 [M-H] ⁻	93 ¹	50-20-1	4.11	8.6
		65 ²	50-38-7		
<i>Hidroclorotiazida-d₂</i>	298 [M-H] ⁻	270	90-46-1	4.93	N/A
Hidroclorotiazida ^b	296 [M-H] ⁻	78	90-46-1	4.86	N/A
<i>Furosemida-d₅</i>	334 [M-H] ⁻	210	65-32-11	8.00	N/A
Furosemida ^c	329 [M-H] ⁻	205 ¹	65-32-11	8.08	1.2
		285 ²	65-22-19		
<i>Ácido clofíbrico-d₄</i>	217 [M-H] ⁻	131	50-26-1	8.28	N/A
Ácido clofibrico ^d	213 [M-H] ⁻	127 ¹	50-26-1	8.35	3.4
		85 ²	50-14-5		
Naproxeno ^e	229 [M-H] ⁻	185 ¹	35-10-13	9.26	1.1
		169 ²	35-38-9		
<i>Ketoprofeno-d₃</i>	257 [M-H] ⁻	213	40-12-11	9.40	N/A
Cloramfenicol ^e	323 [M-H] ⁻	152 ¹	75-22-13	9.43	3.7
		194 ²	75-18-27		
Ketoprofeno ^f	253 [M-H] ⁻	209 ¹	40-12-11	9.49	24.3
		197 ²	40-6-9		
Bezafibrato ^e	360 [M-H] ⁻	274 ¹	70-26-1	10.40	2.1
		154 ²	70-38-5		
Pentobarbital ^e	225 [M-H] ⁻	182 ¹	60-18-13	11.90	10.5
		85 ²	60-18-15		
<i>Ibuprofeno-d₃</i>	208 [M-H] ⁻	164	25-10-5	12.50	N/A
Ibuprofeno ^e	205 [M-H] ⁻	161	45-10-7	12.50	N/A
Diclofenaco ^g	294 [M-H] ⁻	250 ¹	40-16-1	12.60	13.0
		214 ²	40-30-15		
<i>Diclofenaco-d₄</i>	298 [M-H] ⁻	254	35-16-13	12.60	N/A
<i>Indometacina-d₄</i>	360 [M-H] ⁻	316	50-12-3	12.90	N/A
Indometacina ^h	356 [M-H] ⁻	312 ¹	50-12-3	13.00	2.7
		297 ²	50-24-17		
Ácido mefenámico ^e	240 [M-H] ⁻	196 ¹	45-20-5	13.40	10.3
		180 ²	45-38-35		
Gemfibrozil ^e	249 [M-H] ⁻	121	85-20-7	16.30	20.0

¹ Transición MRS seleccionada para cuantificación.

² Transición MRS seleccionada para confirmación.

^a Compuesto cuantificado usando acetaminofén-d₄ como estándar interno (EI).

^b Compuesto cuantificado usando hidroclorotiazida-d₂ como EI.

^c Compuesto cuantificado usando furosemida-d₅ como EI.

^d Compuesto cuantificado usando ácido clofibrico-d₄ como EI.

^e Compuesto cuantificado usando ibuprofeno-d₃ como EI.

^f Compuesto cuantificado usando ketoprofeno-d₃ como EI.

^g Compuesto cuantificado usando diclofenaco-d₄ como EI.

^h Compuesto cuantificado usando indometacina-d₄ como EI.

N/A: no aplica; MRS: monitoreo de la reacción seleccionada; PD: potencial de descomposición; PSD: potencial de salida de celda; EC: energía colisión.

Tabla 15. Condiciones óptimas del CLAR-EM-EM para el análisis de los PFs seleccionados en modo de ionización positiva y para para los correspondientes PITs.

Compuestos	Ion precursor (<i>m/z</i>)	Ion fragmento (<i>m/z</i>)	PD-EC-PSD	TR (min)	(MRS ¹ /MRS ²)
Salbutamol ^a	240 [M+H] ⁺	148 ¹ 166 ²	61-25-12 61-20-12	4.84	1.83
Sotalol ^b	273 [M+H] ⁺	213 ¹ 255 ²	60-25-6 60-25-6	5.16	0.98
Atenolol ^b	267 [M+H] ⁺	145 ¹ 190 ²	60-35-8 60-35-14	5.14	3.43
Atenolol- <i>d</i> ₇	274 [M+H] ⁺	145	71-37-12	5.12	N/A
Cimetidina ^a	253 [M+H] ⁺	95 ¹ 159 ²	46-30-8 46-23-12	5.18	0.97
Cimetidina- <i>d</i> ₃	255 [M+H] ⁺	162	46-21-12	5.15	N/A
Famotidina ^a	338 [M+H] ⁺	189 ¹ 259 ²	56-27-4 56-20-8	5.22	1.62
Nadolol ^a	310 [M+H] ⁺	254 ¹ 201 ²	46-30-2 46-35-4	6.71	1.31
Trimetoprim ^a	291 [M+H] ⁺	230 ¹ 261 ²	76-33-0 76-31-20	6.97	1.09
Pindolol ^a	249 [M+H] ⁺	116 ¹ 98 ²	60-30-8 60-30-14	7.03	5.50
Timolol ^a	317 [M+H] ⁺	261 ¹ 244 ²	60-30-20 60-30-6	7.72	1.23
Clembuterol ^c	277 [M+H] ⁺	203 ¹ 132 ²	61-23-14 61-33-10	8.08	2.50
Carazolol ^c	299 [M+H] ⁺	116 ¹ 222 ²	60-35-10 60-35-2	9.21	4.01
Enalapril- <i>d</i> ₅	381 [M+H] ⁺	239	56-29-18	9.73	N/A
Propanolol ^b	260 [M+H] ⁺	116 ¹ 183 ²	60-35-8 60-30-10	9.74	0.98
Enalapril ^c	377 [M+H] ⁺	234 ¹ 303 ²	91-29-12 91-35-6	9.77	9.33
Betaxolol ^d	308 [M+H] ⁺	116 ¹ 121 ²	60-40-8 60-40-10	9.90	1.23
Sulfametoxazol- <i>d</i> ₄	258 [M+H] ⁺	96	71-41-6	10.02	N/A
Sulfamethoxazol ^e	254 [M+H] ⁺	156 ¹ 92 ²	71-25-2 71-41-6	10.06	2.21

¹ transición MRS seleccionada para cuantificación.

² transición MRS seleccionada para confirmación.

^a compuesto cuantificado usando cimetidina-*d*₃ como EI.

^b compuesto cuantificado usando atenolol-*d*₇ como EI.

^c compuesto cuantificado usando enalapril-*d*₅ como EI.

^d compuesto cuantificado usando diazepam-*d*₅ como EI.

^e compuesto cuantificado usando sulfametoxazol-*d*₄ como EI.

^f compuesto cuantificado usando carbamazepina-*d*₁₀ como EI.

N/A: no aplica; MRS: monitoreo de la reacción seleccionada; PD: potencial de descomposición; PSD: potencial de salida de celda; EC: energía de colisión

Tabla 15. Continuación

Compuestos	Ion precursor (m/z)	Ion fragmento (m/z)	PD-EC-PSD	TR (min)	(MRS ¹ /MRS ²)
Fluoxetina ^d	310 [M+H] ⁺	44 ¹ 148 ²	51-93-6 51-13-8	11.52	1.32
Carbamazepina ^f	237 [M+H] ⁺	194	76-29-19	11.82	N/A
Carbamazepina-d ₁₀	247 [M+H] ⁺	204	71-31-16	11.71	N/A
Propifenazona ^d	231 [M+H] ⁺	56 ¹ 189 ²	36-57-4 56-35-16	12.43	1
Diazepam-d ₅	290 [M+H] ⁺	198	86-43-16	13.97	N/A
Diazepam ^d	285 [M+H] ⁺	193 ¹ 154 ²	91-45-8 91-50-15	14.02	1.2
Glibenclamida ^d	494 [M+H] ⁺	369 ¹ 169 ²	81-23-6 81-55-12	15.6	3

¹ transición MRS seleccionada para cuantificación.

² transición MRS seleccionada para confirmación.

^d compuesto cuantificado usando diazepam-d₅ como EI.

^f compuesto cuantificado usando carbamazepina-d₁₀ como EI.

N/A: no aplica; TR: tiempo de retención; MRS: monitoreo de la reacción seleccionada; PD: potencial de descomposición; PSD: potencial de salida de celda; EC: Energía de colisión.

4.2.1.2. Linealidad

El rango de linealidad considerada sobre los intervalos de concentración especificados para cada fármaco dio buenas correlaciones $r^2 > 0.99$ en todos los casos. En la Tabla 18 se muestra el rango de linealidad de cada uno de los PFs, así como su coeficiente de correlación.

4.2.1.3. Recuperación

Las recuperaciones obtenidas de los PFs en todas las aguas estudiadas oscilaron entre el 53 y 132%, a excepción del ácido salicílico que fue el único fármaco que mostró recuperaciones <5% de las matrices de agua investigadas. Esto se puede atribuir al hecho de que las condiciones de extracción utilizadas no eran las más apropiadas para retener este compuesto en el cartucho HLB. Este resultado concuerda con Gros *et al.*, (2009), sin embargo, ellos realizaron distintos experimentos para optimizar un procedimiento de extracción y encontraron altas recuperaciones de ácido salicílico añadiendo Na₂EDTA (agente quelante) antes de la EFS en el

cartucho HLB. También obtuvieron altas recuperaciones acidificando el agua a un pH = 2.5-3 y haciendo la extracción con cartucho MCX. En general, en este trabajo las recuperaciones obtenidas fueron aceptables y reproducibles considerando que la mayoría de los compuestos presentaron desviaciones estándares relativas (DERs) por debajo del 10%. En la Tabla 16 se muestran los porcentajes de recuperación (%) de cada uno de los PFs.

Tabla 16. Eficiencia del método analítico utilizado para la determinación de los PFs estudiados en aguas superficiales y residuales.

Comp.	Linealidad		% Recuperación*			LD/LC	LD/LC	LD/LC
	r ²	Rango	Desviación estándar relativa (DER)			ng/L		
		(ng/mL)	INF	EFL	AS	INF	EFL	AS
AC	0.9998	5-5000	105 (±3)	90 (±3)	116 (±6)	67/262	21/172	2.6/28
AS	0.9996	5-1000	3 (±10)	2 (±6)	3 (±6)	41/136	8.4/28	4.7/16
ATN	0.9998	1-500	91 (±10)	54 (±10)	111 (±10)	6.4/22	1.4/4.6	1.0/3.2
BTX	0.9998	5-1000	100 (±11)	106 (±4)	110 (±3)	15/48	2.2/7.5	1.3/4.4
BZB	0.9998	5-1000	109 (±3)	88 (±1)	107 (±2)	4.9/16	0.2/0.8	0.3/1.0
CA	0.9999	10-1000	101 (±2)	99 (±3)	132 (±4)	3.1/11	1.3/4.2	0.5/1.7
CBZ	0.9989	1-100	108 (±2)	115 (±2)	132 (±5)	5.5/18	0.7/2.3	0.8/2.6
CHL	0.9886	0.5-1000	93 (±4)	74 (±2)	72 (±2)	1.1/3.7	0.7/2.3	0.2/0.8
CLT	0.9978	0.5-100	74 (±8)	73 (±8)	86 (±15)	6.6/22	0.5/1.6	0.2/0.8
CMT	0.9997	0.5-500	97 (±7)	98 (±4)	99 (±2)	6.9/23	1.0/3.4	0.5/1.7
CRZ	0.9988	0.5-100	55 (±10)	54 (±8)	63 (±14)	2.8/9.3	0.4/1.2	0.2/0.6
DCF	0.9951	50-1000	89 (±2)	53 (±2)	91 (±2)	5.5/18	1.5/4.9	1.2/4.1
DZP	0.9997	0.5-100	111 (±6)	104 (±3)	116 (±4)	7.7/25	1.2/3.9	1.0/3.2
ENA	0.9995	0.5-500	78 (±8)	75 (±8)	77 (±21)	7.8/26	0.5/1.8	0.6/2.0
FAM	0.9986	0.5-500	111 (±9)	116 (±2)	95 (±3)	9.9/33	1.5/5.1	0.5/1.6
FLU	0.9999	0.5-500	61 (±9)	74 (±7)	69 (±2)	13/44	0.8/2.7	0.7/2.3
FUR	0.9980	1-1000	89 (±10)	78 (±7)	89 (±3)	15/49	16/53	10/33
GFB	0.9965	0.5-500	108 (±7)	91 (±5)	123 (±1)	11/38	6.7/22	0.2/0.5
GLM	0.9996	0.5-500	128 (±11)	132 (±3)	119 (±4)	6.6/22	0.8/2.7	0.9/2.9
HDT	0.9996	1-500	111 (±4)	93 (±12)	87 (±5)	15/48	8.9/29	9.4/31

* Calculado a partir del análisis en n=4 de muestras de agua enriquecidas con los PEs a 5000 ng/L.

LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación; AC: acetaminofén; AS: ácido salicílico; ATN: atenolol; BTX: betaxolol; BZB: bezafibrato; CA: ácido clofibrato; CBZ: carbamazepina; CHL: cloramfenicol; CLT: clambuterol; CMT: cimetidina; CRZ: carazolol; DCF: diclofenaco; DZP: diazepam; ENA: enalapril; FAM: famotidina; FLU: fluoxetina; FUR: furosemda; GFB: gemfibrozil; GLM: glibenclamida; HDT: hidroclorotiazida.

Tabla 16. Continuación

Comp.	Linealidad		% Recuperaciones*			LD/LC	LD/LC	LD/LC
	r ²	Rango	Desviación estándar relativa (DES)			ng/L		
		(ng/mL)	INF	EFL	AS	INF	EFL	AS
IBU	0.9987	1-2500	102 (±2)	101 (±1)	107 (±3)	12/39	2.3/7.6	1.1/3.7
IND	0.9994	0.5-500	105 (±7)	94 (±4)	107 (±3)	11/35	6.6/22	0.7/2.5
KPF	0.9969	1-1000	97 (±6)	95 (±4)	103 (±6)	23/78	9.2/30	2.5/8.3
MA	0.9999	0.5-500	104 (±3)	93 (±3)	104 (±4)	5.3/18	0.7/2.3	0.6/2.1
NAD	0.9991	0.5-500	99 (±13)	100 (±8)	116 (±8)	3.6/12	0.3/1.1	0.3/0.8
PTB	0.9998	1-1000	88 (±2)	79 (±3)	101 (±1)	11/37	2.4/7.9	1.1/3.7
SA	0.9996	5-1000	3 (±10)	2 (±6)	3 (±6)	41/136	8.4/28	4.7/16
SAL	0.9931	0.5-500	106(±6)	85 (±7)	45 (±2)	2.8/9.3	0.4/1.4	0.2/0.6
SMZ	0.9991	1-2500	87 (±3)	97 (±10)	119 (±4)	33/109	13/44	6.4/21
SOT	0.9811	0.5-100	96 (±3)	77 (±7)	93 (±10)	3.3/11	3.9/13	0.6/1.9
TIM	0.9997	0.5-500	124 (±7)	109 (±9)	115 (±7)	4.4/15	0.6/2.2	0.4/1.4
TMP	0.9912	1-500	107 (±8)	99 (±8)	112 (±8)	7.8/26	1.3/4.5	0.7/2.4

* Calculado a partir del análisis en n=4 de muestras de agua enriquecidas con los PEs a 5000 ng/L.

LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación; IBU: ibuprofeno; IND: indometacina; KPF: ketoprofeno; MA: ácido mefenámico; NAD: nadolol; NPX: naproxeno; PIN: pindolol; PRO: propifenazona; PRP: propanolol; PTB: pentobarbital; SAL: salbutamol; SMZ: sulfametoxazol; SOT: sotalol; TIM: timolol; TMP: trimetoprim.

4.1.1.4. Repetibilidad

La repetibilidad del método analítico desarrollado presentó una desviación estándar relativa (DER) ≤ 15 en la mayoría de los PFs presentes en las diferentes matrices estudiadas. Estos valores muestran que la repetibilidad de los datos fue aceptable para validar el método multi-residuo desarrollado. Los valores de la DER de cada uno de los PFs estudiados se muestran en la Tabla 16.

4.1.1.5. Límites de detección y cuantificación instrumental

Los LDs y LCs determinados fueron diferentes para aguas residuales crudas, tratadas y superficiales. Los valores calculados para estos límites se presentan en la Tabla 16.

4.1.1.6. Efecto matriz

En el presente estudio se evaluó el efecto matriz en el INF, EFL y AS debido a las posibles interferencias que se pudieron presentar al momento del análisis de las muestras en el CLAR-EM-EM donde normalmente se presentan problemas de supresión o mejora de la señal. En este estudio todos los PFs estuvieron sujetos a la disminución de la señal (supresión iónica), porque de acuerdo a Osorio *et al.*, 2014, si el % de EMZ >100 tenemos una mejora en la señal y si se tiene un % <100 la señal se suprime. El porcentaje de supresión iónica varió del -99 al 13% para el influente, -99 al 25 % para el efluente y -100 a -4% para el agua superficial (Figuras 22 y 23). Estos resultados muestran que estos efectos de supresión influyeron considerablemente en las señales obtenidas. Sin embargo, con el uso de PITs se pudo corregir en cierta medida, los efectos de este fenómeno ya que van a estar afectados de igual manera por el mismo grado que sus análogos sin deuterar.

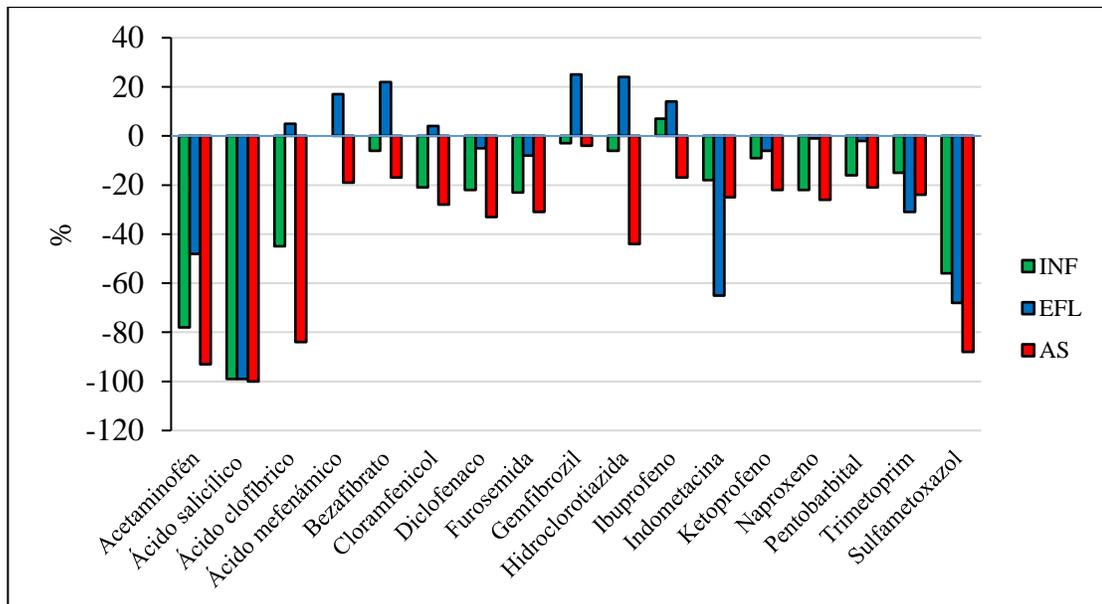


Figura 28. Efecto matriz (%) observado en el caso de los PFs analizados en modo de ionización negativa en las diferentes matrices de agua evaluadas.

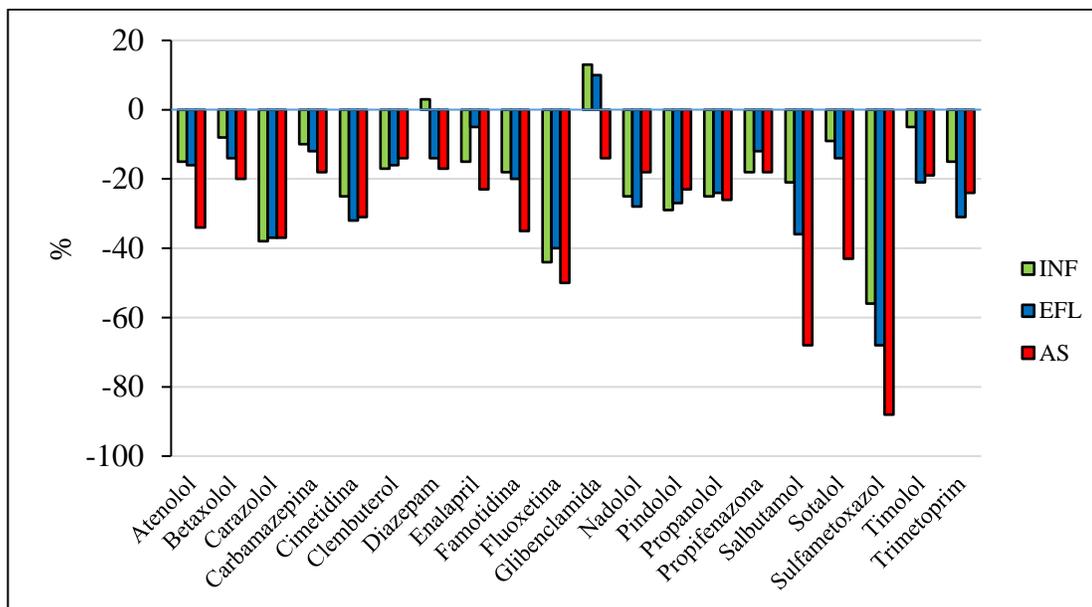


Figura 29. Efecto matriz (%) observado en el caso de los PFs analizados en modo de ionización positiva en las diferentes matrices de agua evaluadas.

4.3. Tercera etapa

4.3.1. Identificación, cuantificación y remoción de los PFs de la zona de estudio

Para la identificación y selección de los PFs se aplicaron los lineamientos establecidos en la decisión 2002/657/EC de la Comisión Europea (European Commission 2002), en la que se especifica el uso de puntos de identificación (PIs) (4 PIs, 1 para el ion original y 1.5 para cada producto de transición). Las 2 transiciones obtenidas para cada fármaco identificado, así como la respectiva transición del PITs utilizado para la cuantificación se muestran en la sección del apéndice A. Siguiendo los lineamientos y validando el método analítico desarrollado se identificaron y cuantificaron los siguientes fármacos en el área de estudio:

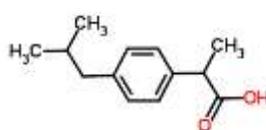
Acetaminofén



Diclofenaco



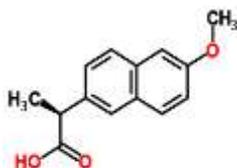
Ibuprofeno



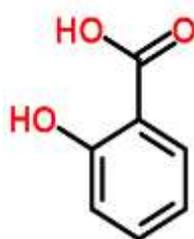
Indometacina



Naproxeno



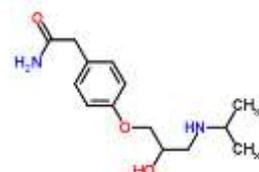
ácido salicílico



Trimetoprim



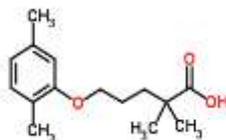
Atenolol



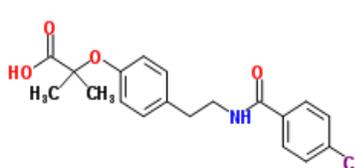
Sulfametoxazol



Gemfibrozil



Bezafibrato



Carbamazepina



En el presente trabajo las campañas de muestreo se realizaron durante la temporada de clima seco y de acuerdo a Kasprzyk-Hordern *et al.*, (2009), las concentraciones de PFs suelen ser más altas durante las condiciones de clima seco y muy bajas durante condiciones de clima húmedo debido a las diluciones significativas del agua del río con agua de lluvia. Las concentraciones promedio de los PFs detectados en AS1 y AS2 para el año 2015 y 2016 se muestran en la Figura 24.

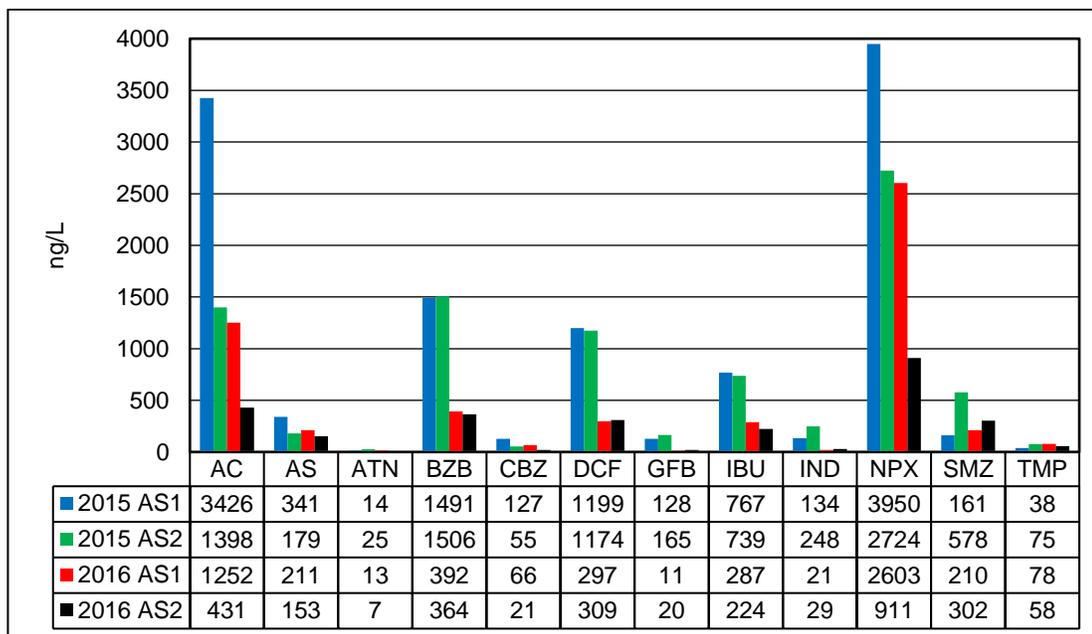


Figura 30. Concentraciones promedio de los PFs detectados en AS1 y AS2 para las campañas de muestreo 2015 y 2016.

AC: acetaminofén; ATN: atenolol; AS: Ácido salicílico; BZB: bezafibrato; CBZ: carbamazepina; DCF: diclofenaco; GFB: gemfibrozil; IBU: ibuprofeno; IND: indometacina; NPX: naproxeno; SMZ: sulfametoxazol; TMP: trimetoprim.

Los resultados de los muestreos 2015 y 2016 muestran que la cuenca del Río Apatlaco presenta concentraciones de PFs antes de la descarga del efluente de la PTARM-A (AS1), lo que sugiere la contaminación de la cuenca aguas arriba de la planta por AC, AS, CBZ, IBU, NPX, ATN, BZB, TMP y DCF. Los últimos 4 PFs se detectaron en mayores concentraciones aguas arriba sugiriendo que la concentración de estos fármacos es mayor que la concentración después de la descarga de la PTARM-A.

Por otra parte, en ambos muestreos, en las aguas que reciben la descarga de la PTARM-A (AS2) se encontraron los siguientes fármacos: ATN, BZB, GFB, IND, SMZ, TMP y DCF (sólo en el 2016) lo que indica que estos fármacos se encuentran en las aguas residuales que trata la PTARM-A. En el agua AS1 durante el muestreo 2016, las concentraciones promedio del AC, AS, ATN, BZB, CBZ, DCF, GFB, IBU, IND Y NPX disminuyeron 63, 38, 7, 74, 48, 75, 92, 63, 84 y 34%, respectivamente, respecto al año 2015.

Estos resultados indican que para el año 2015 hubo un mayor consumo de PFs por parte de la población Morelense. Sin embargo, la concentración del sulfametoxazol y trimetoprim aumento 23 y 53% respecto al 2015. Por lo tanto, para estos PFs hubo un mayor consumo en el 2016 que en el 2015. Para el caso del punto de muestreo AS2, la variabilidad de las concentraciones con respecto al punto AS1 se debe principalmente a que en el río la concentración de los PFs depende del caudal del cuerpo receptor, la absorción por biota, la volatilización, la degradación biológica, la fotodegradación y las reacciones de transformación a través de otros mecanismos abióticos dependen de la temperatura, la luz solar y otros factores ambientales (Lindholm-Lehto *et al.*, 2016).

La presencia de los PFs encontrados en la corriente del Río Apatlaco se confirmó debido a que de acuerdo al informe de la Comisión Estatal del Agua y Medio Ambiente del Estado de Morelos (CEAGUA) en el 2008 se detectaron más de 2 000 descargas de aguas residuales sin tratamiento en la cuenca, provenientes de las siguientes zonas significativas por su densidad de población: Par Vial, Satélite y Antonio Barona. En la cuenca se estimaba un caudal de aguas residuales que oscilaba entre 1 494 y 1 992 L/S (CONAGUA, 2008). En la Figura 25 se muestran las concentraciones promedio del influente y efluente de la PTARM-A para las campañas de muestreo 2015 y 2016. Así mismo se presenta el porcentaje de remoción que presenta cada fármaco durante el tratamiento del agua residual. La eficiencia de remoción para cada fármaco fue evaluada usando la ecuación 3 (Crites y Tchobanoglous, 2000).

$$\eta = \frac{C_{INF} - C_{EFL}}{C_{INF}} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

η = % de eficiencia de remoción

C_{INF} = Concentración del fármaco en el influente

C_{EFL} = Concentración del fármaco en el efluente

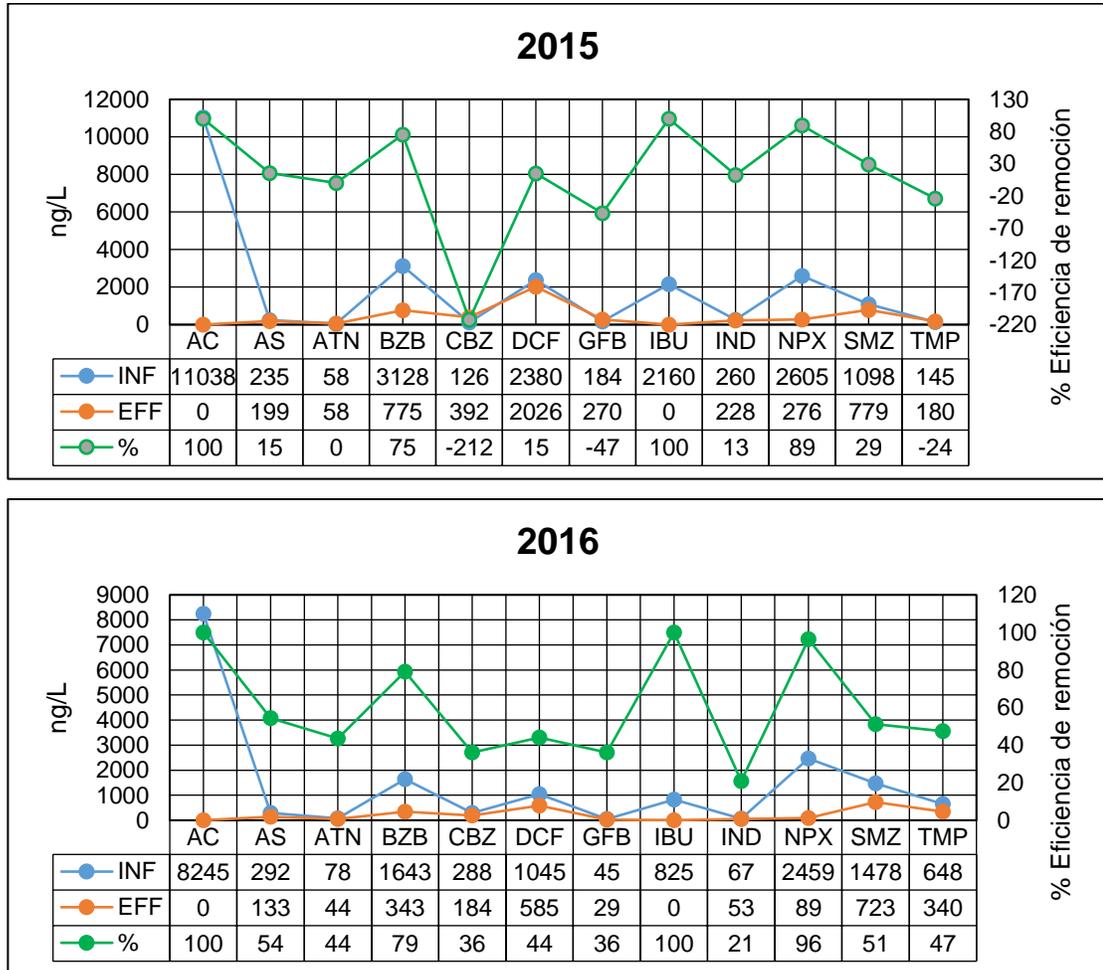


Figura 31. Concentración promedio de los PFs detectados en el INF y EFF en el año 2016. Así como su porcentaje de remoción de cada fármaco durante el tratamiento del agua residual. AC: acetaminofén; ATN: atenolol; AS: Ácido salicílico; BZB: bezafibrato; CBZ: carbamazepina; DCF: diclofenaco; GFB: gemfibrozil; IBU: ibuprofeno; IND: indometacina; NPX: naproxeno; SMZ: sulfametoxazol; TMP: trimetoprim.

En la Tabla 17 se muestran los resultados globales de las concentraciones determinadas durante los muestreos 2015 y 2016. Se presenta el intervalo del valor mínimo y del valor máximo, así como el valor de la mediana de las concentraciones de los PFs, en los 4 sitios de muestro.

Para el caso del influente las concentraciones promedio de los fármacos fueron las siguientes: AC (9641 ng/L), NPX (2532 ng/L), DCF (1713 ng/L), IBU (1493 ng/L), BZB (2385 ng/L), SMZ (1288 ng/L), AS (264 ng/L), ATN (68 ng/L), CBZ (207 ng/L), GFB (114 ng/L), IND (163 ng/L) y TMP (396 ng/L).

Tabla 17. Concentración de los PFs detectados en el área de estudio

Freq. (%) (n=32)	1era muestreo (2015)				2da muestreo (2016)				
	AS1 (n=4)	INF (n=4)	EFL (n=4)	AS2 (n=4)	AS1 (n=4)	INF (n=4)	EFL (n=4)	AS2 (n=4)	
	Intervalo^a (mediana)				Intervalo^a (mediana)				
Analgésicos/anti-inflamatorios									
Acetaminofén	91	2400-4,460 (3422)	8650-12,300 (11600)	n.d.	398-2320 (1437)	1050-1464 (1245)	2330-14900 (7875)	n.d.	354-508 (430)
Ácido salicílico	100	200-664 (250)	125-335 (240)	130-320 (173)	128-216 (186)	109-422 (157)	223-408 (269)	65-264 (102)	33-336 (121)
Diclofenaco	100	1100-1276 (1209)	2325-2470 (2363)	1,865-2180 (2030)	988-1398 (1155)	268-352 (283)	560-1440 (1090)	466-690 (593)	258-352 (313)
Ibuprofeno	78	502-1106 (730)	1840-2835 (1983)	n.d.	386-896 (836)	256-324 (283)	370-1310 (810)	n.d.	184-248 (231)
Indometacina	100	112-164 (129)	165-310 (283)	150-305 (228)	206-362 (212)	19-26 (20)	33-104 (66)	38-63 (56)	25-33 (30)
Naproxeno	100	3000-4820 (3990)	2420-2800 (2600)	194-392 (260)	1756-3840 (2650)	732-4880 (2600)	825-4210 (2400)	49-152 (77)	834-986 (911)
Antibióticos									
Sulfametoxazol	100	76-722 (173)	775-1330 (1143)	440-1215 (730)	306-722 (642)	118-348 (186)	940-2010 (1480)	565-935 (695)	108-502 (299)
Trimetoprim	100	34-44 (37)	125-165 (145)	135-300 (143)	64-90 (72)	58-120 (66)	440-790 (680)	290-395 (338)	34-74 (61)
Beta-bloqueantes									
Atenolol	100	12-16 (14)	55-60 (58)	35-95 (50)	14-32 (27)	10-16 (12)	60-90 (80)	35-50 (45)	4-10 (7)

Ketoprofeno, ácido mefenámico, propifenazona, sotalol, nadolol, pindolol, carazolol, propranolol, timolol, betaxolol, pentobarbital, salbutamol, clenbuterol, hidroclorotiazida, enalapril, furosemida, glibenclamida, ácido clofibrato, fluoxetina, diazepam, cimetidina, famotidina y cloramfenicol no fueron detectadas en ninguna muestra de agua. n.d.; no detectado; ^a; valores en ng/L.

Tabla 17. Continuación

	Freq. (%) (n=32)	1era muestreo (2015)				2da muestreo (2016)			
		AS1 (n=4)	INF (n=4)	EFL (n=4)	AS2 (n=4)	AS1 (n=4)	INF (n=4)	EFL (n=4)	AS2 (n=4)
		Intervalo ^a (mediana)				Intervalo ^a (mediana)			
Reguladores de lípidos									
Bezafibrato	100	1120-2100 (1371)	2855-3445 (3105)	655-950 (748)	1308-1690 (1513)	368-424 (388)	570-2840 (1580)	265-485 (310)	286-446 (362)
Gemfibrozil	100	46-368 (49)	155-225 (178)	190-380 (255)	116-264 (140)	8-12 (8)	20-70 (45)	20-50 (23)	14-24 (20)
Drogas psiquiátricas									
Carbamazepina	100	52-276 (90)	85-142 (138)	330-476 (381)	52-59 (54)	56-82 (62)	190-380 (290)	165-195 (188)	8-36 (19)

Ketoprofeno, ácido mefenámico, propifenazona, sotalol, nadolol, pindolol, carazolol, propanolol, timolol, betaxolol, pentobarbital, salbutamol, clenbuterol, hidroclorotiazida, enalapril, furosemida, glibenclamida, ácido clofibrico, fluoxetina, diazepam, cimetidina, famotidina y cloramfenicol no fueron detectadas en ninguna muestra de agua. n.d.; no detectado; ^a; valores en ng/L.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 18, se puede observar de manera general que la mayoría de los PFs presentaron mayores concentraciones en el 2015 que en el 2016. Con respecto a las concentraciones, se puede observar que el AC, NPX, DCF, IBU, BZB y SMZ presentaron las mayores concentraciones entre los 12 PFs detectados en el INF de la PTARM-A, mientras que el AC, DCF, NPX y BZB presentaron las mayores concentraciones en el agua superficial. Esto es razonable debido a que son consumidos en exceso por parte de la población. Los primeros 4 son adquiridos libremente, sin ningún tipo de prescripción médica, mientras que para comprar el BZB y SMZ se requiere prescripción médica.

En el EFL de la PTARM-A se observó que en el muestreo 2016 las concentraciones promedio del AS, ATN, BZB, CBZ, DCF, GFB, IND, NPX, SMZ y TMP disminuyeron 33, 2, 56, 53, 71, 89, 77, 68, 23 y 51%, respecto al año 2015. Se observó que en los dos periodos de muestreo se obtuvieron eficiencias de remoción desde 0 a 100%. La PTARM-A resulto ser eficiente para remover el AC, BZB, IBU y NPX utilizando lodos activados. Mientras que para el AS, ATN, CBZ, GFB, IND, SMZ y TMP resulto tener una eficiencia de remoción de bajas a medias. Para el muestreo 2016 no se observó remoción alguna de ATN, CBZ, GFB y TMP, sino acumulación de los fármacos lo que indica una resistencia de estos compuestos a la degradación biológica. En el caso de la CBZ y TMP se ha demostrado que tienen la característica de ser recalcitrantes y altamente persistentes en el medio ambiente (Siemens *et al.*, 2008; Paíga *et al.*, 2016). Este comportamiento de los fármacos hace necesaria la implementación de otras tecnologías de tratamiento para su remoción. En este sentido, de acuerdo a los estudios de Ternes *et al.*, (2004), los PFs recalcitrantes pueden ser removidos por tratamientos terciarios, tales como ozonización, absorción por carbón activado, o nanofiltración. A continuación, se describen los resultados de los PFs de acuerdo a cada familia terapéutica:

4.3.2 Analgésicos/anti-inflamatorios

De los 6 analgésicos/anti-inflamatorios detectados en las muestras de agua en los muestreos 2015 y 2016, el AC, DCF, IBU y NPX se encontraron en muy altas concentraciones con relación a la información documentada. La frecuencia de detección de estos PFs fue >78% en todas las muestras analizadas. Para las muestras AS1, las mayores concentraciones se obtuvieron en el 2015. Se obtuvieron las siguientes concentraciones promedios: 3422 ng/L para AC, 1209 ng/L para DCF, 730 ng/L para IBU y 3990 ng/L para NPX. Para AS2 fueron de 1437 ng/L para AC, 1155 ng/L para DCF, 836 ng/L para IBU y 2650 ng/L para NPX.

Las concentraciones promedio en las muestras del INF fueron de 11600 ng/L para AC, 2363 ng/L para DCF, 1983 ng/L para IBU y 2600 ng/L para NPX. Estos niveles altos pueden explicarse por el alto consumo y el fácil acceso de los medicamentos ya que son de venta libre, para los cuales no se requiere prescripción médica, siendo comúnmente utilizados por la población a través de la automedicación (Angeles-Chimal *et al.*, 1992).

De acuerdo a Yang *et al.*, (2017), el AC, DCF, IBU y NPX están comúnmente presentes en aguas superficiales y residuales en todo el mundo a concentraciones variables debido a que son consumidos en la mayoría de los países en grandes cantidades. En esta investigación las concentraciones de AS1 se encontraron por arriba de las encontradas en el Río Liz en Portugal, 34.4 ng/L para AC, 53.7 ng/L para IBU, 38 ng/L para DCF y 260 ng/L (Paíga *et al.*, 2017). En México se detectaron concentraciones menores que las obtenidas en el presente estudio con concentraciones de 15-45 ng/L para IBU, 52-186 ng/L para NPX y 28-32 ng/L para DCF (Félix-Cañedo *et al.*, 2013), así como en España (Gros *et al.*, 2009; Carmona *et al.*, 2014), Grecia (Stamatis y Konstantinou., 2013), Korea (Kim *et al.*, 2007), Reino Unido (UK) (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009) y Brasil (Quadra *et al.*, 2017) se detectaron menores

concentraciones que las obtenidas en el presente estudio. En Costa Rica se han detectado concentraciones mayores de AC e IBU, del orden de 13216 ng/L para el primero y 36788 ng/L para el segundo (Spongberg *et al.*, 2011).

Con respecto al influente, de acuerdo a la Tabla 18, la concentración del AC obtenida en el presente estudio fue menor que la reportada en Portugal, India y Reino Unido; y mayor a la reportada en España, Grecia y México. La concentración de DCF fue menor a la reportada en México y mayor a la reportada en Portugal, India, España, Grecia y Reino Unido. Mientras que la concentración de IBU fue menor que la reportada en Portugal, India, Reino Unido, España, Grecia y México. Finalmente, la concentración del NPX fue menor a la reportada en México y Reino Unido, menor a la reportada en Portugal, India y Grecia, y muy similar a la reportada en España. Como se puede observar en los resultados, las concentraciones reportadas de PFs en el influente de las PTARs muestran variaciones, que se deben a factores, incluyendo la tasa de producción, las ventas y prácticas específicas, el metabolismo (tasa de excreción) y el consumo por persona.

Tabla 18. Concentraciones de analgésicos/anti-inflamatorios reportados en el influente de PTARs reportadas en otros estudios

Fármaco	Concentración ng/L
Acetaminofén	^a 15,9225; ^b 86,800; ^c 10,899; ^e 1,996; ^f 178,116;
Diclofenaco	^a 972; ^b 360; ^c 726; ^d 90; ^e 833; ^f 260; ^g 1,607; ^h 3,424;
Naproxeno	^a 812; ^b 120; ^c 2,349; ^d 2,399; ^e 263; ^f 1,173; ^g 13,620; ^h 16,336;

^aPaíga *et al.*, 2016 (Portugal); ^bBalakrishna *et al.*, 2017 (India); ^cGros *et al.*, 2009; ^dCarmona *et al.*, 2014; (España) ^ePapageorgiou *et al.*, 2016 (Grecia); ^fKasprzyk-Hordern *et al.*, 2009 (Reino Unido) ^gSilva, 2008; ^hChávez *et al.*, 2011 (México).

* Concentración promedio máxima.

4.3.2.1. Remoción en PTARM-A

Los fármacos analgésicos/anti-inflamatorios AC, IBU y NPX fueron eficazmente removidos en la PTARM-A, presentando eficiencias de remoción en un rango de 89-100%, mientras que el AS, DCF e IND presentaron de bajas a medias eficiencias de remoción, 15 y 54% para el AS, 15 y 44% para el DCF, 13 y 21% para la IND. Con respecto a los 3 primeros fármacos, remociones similares se han reportado en otros estudios (Tabla 20). Mientras que para el AS, las mayores eficiencias de remoción se han presentado en otros estudios que en el presente. Esto se puede deber principalmente a que el aumento o disminución en la remoción se puede deber principalmente a la desconjugación de sus metabolitos glucorónidos durante el tratamiento biológico (Cruz-Morata *et al.*, 2013). Con respecto al DCF y la IND las remociones obtenidas en el presente estudio se encuentran dentro del rango reportadas en otros estudios (Tabla 19).

Tabla 19. Porcentajes de remoción reportados en otros estudios

Productos farmacéuticos	% remoción	Referencia
AC	^a 100; ^b 85; ^c 98.7-100; ^d 99; ^e 78; ^g 100/86.4; ^h 100; ^{*h} 95	^a Gracia Lor <i>et al.</i> ,2012 ^b Collado <i>et al.</i> ,2014 ^c Luo <i>et al.</i> ,2014 ^d Gros <i>et al.</i> , 2010 ^e Stamatis y Konstantinou <i>et al.</i> , 2013 ^f Yang <i>et al.</i> , 2017 ^g Verlicchi <i>et al.</i> , 2012 ^h Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2009
IBU	^{a,b} 100; ^c 72-100; ^d 91; ^e 90; ^f >80/ >99/72-56; ^g 82-99.8; ^h 90; ^{*h} 82	
NPX	^a 90; ^b 98; ^c 43.3-98.6; ^d 86; ^e 86; ^f 84/>90; ^g 35-95; ^{*h} 60; ^h 79	
AS	^a 100; ^b 99; ^c 89.6-100; ^d 96; ^e 86; ^{*h} 98; ^h 100	
DCF	^a 0; ^c 0-81.4; ^d 58; ^e 55; ^f 45/74; ^{*h,h0}	
IND	^g 23/<10	

Tipo de tratamiento biológico; ^{a,b,d,e,f,g,h} todos activados; ^c no se especifica; ^{*h} filtro percolador

Los analgésicos/anti-inflamatorios AC, IBU, NPX, DCF e IND removidos en la PTARM-A presentaron eficiencias de remoción similares o iguales a las reportadas en algunos países europeos donde utilizan la tecnología de lodos activados.

4.3.3. Antibióticos

En cuanto a los antibióticos detectados en el área investigada, el SMX y TMP tuvieron una frecuencia de detección del 100% en las muestras analizadas. Este patrón se puede explicar por el hecho de que éstos fármacos generalmente se combinan en productos farmacológicos comerciales o se coadministran para mejorar el tratamiento (Yan *et al.*, 2014). Así para las muestras AS1 se obtuvieron las mayores concentraciones en el muestreo 2016, obteniéndose las siguientes concentraciones promedio, 186 ng/L para SMX y 66 ng/L para TMP. Para AS2 se obtuvieron una concentración de 642 ng/L para SMX y 72 ng/L para TMP.

Las concentraciones promedio obtenidas en las muestras del INF fueron de 1480 ng/L para el SMX y 680 ng/L para el TMP. Con respecto al agua superficial, las concentraciones promedio encontradas en el presente estudio se encontraron por encima de las detectadas en otros estudios, por ejemplo; en Reino Unido, en el Río Ely fueron de 19 y 62 ng/L y en el Río Taff fueron de 1 y 89 ng/L para el TMP; para el SMX en ambos ríos fue de 0 a 2 ng/L (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009); mientras que en Barcelona, específicamente en el Río Ebro fueron de 11 ng/L para el SMX y 4 ng/L para el TMP (Gros *et al.*, 2009); en Costa Rica se reportaron de <11 ng/L para el SMX y <7 ng/L para el TMP (Spongberg *et al.*, 2011); en Korea, en los ríos Han, el Nakdong y el Youngsan se detectaron concentraciones promedio de 20 ng/L para el SMX y 4 ng/L para el TMP.

En México, en el Río Yautepec (Morelos) se reportó una concentración de 421-204450 ng/L (Avilés *et al.*, 2015) para el SMX, este rango de concentración se encuentra muy por encima a la reportada en el presente estudio.

Con respecto a las concentraciones promedio en el influente en el presente estudio, éstas son mayores a las reportadas en otros estudios; por ejemplo, en Grecia se reportaron concentraciones de 87.7 ng/L para SMX y 138 ng/L para TMP (Papageorgiou *et al.*, 2016); en España de 70 ng/L para SMX y 54 ng/L para TMP (Collado *et al.*, 2014); 354 ng/L para SMX y 50 ng/L para TMP (Gros *et al.*, 2009); 450 ng/L para SMX y 100 ng/L para TMP (Gracia-Lor *et al.*, 2012). Por otro lado, en 2 PTARs de Reino Unido se reportaron concentraciones de 29 ng/L y 115 ng/L para SMX y de 2192 y 2925 ng/L para TMP (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009). Kosma *et al.*, (2014), reportaron en 6 diferentes PTARs que operaban con diferentes TRH y TRL, reportando concentraciones de SMX en un rango de 16.4-227 ng/L y de 7.9-33.7 ng/L para el TMP fue de. En México, en el agua residual proveniente del Gran Canal se detectó el TMP en una concentración de 150 ng/L, mientras que en el Emisor Central se detectó a una concentración de 320 ng/L (Siemens *et al.*, 2008). En Morelos se detectó la presencia de SMX en el EFL de la PTARM Yautepec, con una concentración de 87 000-136 000 ng/L (Avilés *et al.*, 2015), mucho mayor a la concentración de la PTARM-A del presente estudio.

4.3.3.1. Remoción en PTAR-A

Los antibióticos SMX y TMP presentaron eficiencias de remoción promedio de 29% para el SMX y sin remoción para el TMP en el muestreo 2015, mientras que en 2016 se obtuvieron remociones de 51% para el SMX y 47% para el TMP, respectivamente. La posible variabilidad en la eficiencia de remoción de estos fármacos se puede deber a que en el caso del SMX, los metabolitos principales son productos acetilados-N4, son biológicamente inactivos al entrar en las PTARs y pueden biotransformarse en el compuesto original.

En el caso de TMP sucede la ruptura y oxidación de grupos funcionales por lo que orma una variedad de subproductos derivados de reacciones de biotransformación y fototransformación (Kosma *et al.*, 2014). Por su parte, Lindberg *et al.*, (2006) reportaron que el TMP puede ser recalcitrante para las bacterias en el tratamiento biológico utilizando lodos activados. Así mismo, Verlicchi *et al.*, (2012), reportaron que tanto el SMX como el TMP son resistentes a los procesos biológicos que tienen lugar en las PTARs. En la Tabla 20 se muestran los porcentajes de remoción obtenidos en otros estudios que utilizan la tecnología de lodos activados.

Tabla 20. Porcentajes de remoción en PTARS reportados en otros estudios

Productos farmacéuticos	% remoción	Referencia
SMX	^a 80; ^b 42; ^c 4-88.9; ^d 74; ^e 0-60 ^g 56/54/71/62/10/74 4.5-100; ^h 78; ^{*h} 0	^a Gracia Lor <i>et al.</i> ,2012 ^b Collado <i>et al.</i> ,2014 ^c Luo <i>et al.</i> ,2014 ^d Gros <i>et al.</i> , 2010 ^e Göbel <i>et al.</i> 2007 ^f Yang <i>et al.</i> , 2017 ^g Verlicchi <i>et al.</i> , 2012 ^h Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2009
TMP	^a 30; ^b 57; ^c 0.81.6; ^e 0-20; ^f 4/40/45 ^g ;0- 85 ^h 70; ^{*h} 40	

Tipo de tratamiento biológico; ^{a,b,d,e,f,g,h}lodos activados; ^cno se especifica; ^{*h}filtro percolador

Las eficiencias de remoción de los antibióticos SMX y TMP removidos en la PTARM-A son similares a las eficiencias de remoción de algunos países europeos donde utilizan la tecnología de lodos activados.

4.3.4. Beta-bloqueantes

En cuanto a los beta-bloqueantes detectados en el área investigada, el ATN tuvo una frecuencia de detección del 100% en todas las muestras analizadas. Para las muestras AS1 se obtuvieron las mayores concentraciones en el muestreo 2015, obteniendo una concentración promedio de 14 ng/L para la muestras AS1 y de 27 ng/L para AS2. Mientras que la concentración promedio obtenida en el INF fue de 58 ng/L para el muestreo 2015 y de 80 ng/L para el muestreo 2016. Las concentraciones promedio en el agua superficial del presente estudio, son similares a las que se han reportado en España, 9 ng/L (Gros *et al.*, 2009), Brasil, 0.9-16.4 ng/L (Quadra *et al.*, 2016). En Reino Unido se reportaron concentraciones más altas que las del presente estudio, para los Ríos Taff y Ely, 63 y 53 ng/L, respectivamente (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009); en Serbia se reportó una concentración máxima de 50.6 ng/L (Petrović *et al.*, 2014); en los ríos Beijing, Changzhou y Shenzhen de China se reportó una concentración promedio de 52.9 ng/L (Wang *et al.*, 2015). En el presente estudio, las concentraciones se encontraron por debajo a las reportadas en otros estudios; por ejemplo, en India se reportó una concentración promedio de 192 ng/L y una mayor de 41 400 ng/L (Balakrishna *et al.*, 2017); en España de 779 ng/L (Gros *et al.*, 2009) y 2 224 ng/L (Collado *et al.*, 2014); en Grecia de 1 720 ng/L (Papageorgiou *et al.*, 2016).

4.3.4.1. Remoción en PTARM-A

El beta-bloqueante ATN no fue removido en el muestreo 2015 y para 2016 fue removido con una eficiencia de 44%. En la Tabla 21 se muestran los porcentajes de remoción obtenidos en otros estudios que utilizan la tecnología de lodos activados. Los resultados de este estudio son similares a los reportados en España y Reino Unido.

Tabla 21. Porcentajes de remoción de PTARs reportados en otros estudios

Productos farmacéuticos	% remoción	Referencia
ATN	^a 82; ^b 0-85.1; ^c 59; ^d 0/71/76/61/73/44 4.5-100; ^e 68; ^{*h} 80	^a Collado <i>et al.</i> ,2014 ^b Luo <i>et al.</i> ,2014 ^c Gros <i>et al.</i> , 2010 ^d Verlicchi <i>et al.</i> , 2012 ^e Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2009

Tipo de tratamiento biológico; ^{a,c,d,e}odos activados; ^b no se especifica; ^{*}filtro percolador

4.3.5. Reguladores de lípidos

En cuanto a los reguladores de lípidos, el BZB y el GFB tuvieron una frecuencia de detección del 100% en todas las muestras analizadas. Siendo, el segundo grupo farmacéutico mas abundante en el influente y agua superficial. Para las muestras AS1 se obtuvieron las mayores concentraciones en el muestreo 2015. Se obtuvieron concentraciones promedio de 1371 ng/L para BZB y de 49 ng/L para GFB, mientras que para AS2 se obtuvieron concentraciones de 1513 ng/L para el BZB y de 140 ng/L para el GFB. En el INF se obtuvieron concentraciones promedio de 3105 ng/L para el BZB (muestreo 2015) y de 1580 ng/L (muestreo 2016); para el GFB fueron de 178 ng/L (muestreo 2015) y de 45 ng/L (muestreo 2016).

Con respecto al agua superficial, las concentraciones promedio de BZB y GFB reportadas en el presente estudio fueron mayores que las de otros estudios; en Brasil, se reportaron de 1.2-3.7 y 201.5 ng/L para BZB (Quadra *et al.*, 2016); en España, de 6 ng/L para BZB y 27 ng/L para GFB (Gros *et al.*, 2009), de 2.25 ng/L para BZB y de 16.2 ng/L para GFB (López-Serna *et al.*, 2012), en Reino Unido de 12 y 13 ng/L para BZB (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009), mientras que en Serbia, se reportó una concentración máxima de 1.6 ng/L para BZB (Petrović *et al.*,2014).

En México, en el sistema Cutzamala se reportó la presencia de GFB en concentración de 9-10 ng/L (Félix–Cañedo *et al.*, 2013). Sólo en Costa Rica se reportó una concentración máxima de 17 036 ng/L para el GFB (Spongberg *et al.*, 2011), la cual esta muy por arriba de los resultados mostrados anteriormente.

En el INF, las concentraciones determinadas son menores a las reportadas en España, 80 ng/L (Gracia-Lor *et al.*, 2012), 121 ng/L (Collado *et al.*, 2014), 350 ng/L (Gros *et al.*, 2009); Italia, 50 ng/L (Castiglioni *et al.*, 2006) y Grecia 60.8, 210.4 y 45.9 ng/L (Kosma *et al.*, 2014). Con respecto al GFB, mayores concentraciones se han reportado en España, 1009 ng/L (Collado *et al.*, 2014), 219 ng/L (Gros *et al.*, 2009) y Grecia 862 ng/L (Stamatis *et al.*, 2013), 312 y 215 ng/L (Kosma *et al.*, 2014). En Morelos se detectó la presencia de GFB en el EFL de la PTARM Yautepec, con una concentración de 380-480 ng/L que es mayor a la concentración de la PTARM-A del presente estudio. En la Cuenca del Río Apatlaco donde se descargan los efluentes de estas PTARs el GFB no fue detectado al límite de detección del método (Avilés *et al.*, 2015).

4.3.5.1. Remoción en PTARM-A

En los muestreos 2015 y 2016 el BZB presentó una eficiencia de remoción del 79%, mientras que el GFB no fue removido en el muestreo 2015 y en el muestreo 2016 hubo una remoción de 36%. En la Tabla 22 se muestran los porcentajes de remoción obtenidos en otros estudios.

Tabla 22. Porcentajes de remoción de PTARs reportados en otros estudios

Productos farmacéuticos	% remoción	Referencia
BZB	^a 40; ^c 36.8/48/36/81 /94/90/53.8/99.9/97; ^d 50; ^{*d} 65; ^e 69; ^f 98; ^g 9.10-70.5	^a Gracia-Lor <i>et al.</i> , 2012 ^b Stamatis y Konstantinou <i>et al.</i> , 2013 ^c Verlicchi <i>et al.</i> , 2012
GFB	^a 0; ^b 40; ^c 39/68/5; ^e 67; ^f 82; ^g 0-92.3	^d Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2009 ^e Gros <i>et al.</i> , 2010 ^f Collado <i>et al.</i> , 2014 ^g Luo <i>et al.</i> , 2014

Tipo de tratamiento biológico; ^{a,b,c,d,e,f} todos activados; ^g no se especifica; ^{*} filtro percolador

La baja remoción del GFB en la PTARM-A y en otras PTARs de otras partes del mundo, se puede explicar por la posible desconjugación de metabolitos y/o PTs de la hidrólisis y desorción del GFB durante el tratamiento de aguas residuales (Carmona *et al.*, 2014; Subedi *et al.*, 2015). La remoción del BZB en la PTARM-A es similar a la reportada en otras PTARs de otras partes del mundo.

4.3.6. Drogas psiquiátricas

En cuanto a las drogas psiquiátricas, la CBZ tuvo una frecuencia de detección del 100% en todas las muestras analizadas; esta alta frecuencia de detección se explica por sus características, ya que este antiepiléptico es un fármaco recalcitrante, altamente persistente en el medio ambiente y con una baja eficiencia de eliminación en las PTARs (Verlicchi *et al.*, 2012; Paíga *et al.*, 2016). Para el muestreo del 2015 en el punto AS1 la concentración media fue de 90 ng/L y para AS2 fue de 54 ng/L. En el muestreo 2016 la concentración fue de 62 ng/L y de 19 ng/L para AS2.

Mientras que en el INF la concentración promedio fue de 138 ng/L para el muestro 2015 y de 290 ng/L para el 2016.

Con respecto al agua superficial, las concentraciones promedio reportadas en el presente estudio fueron similares o en algunos casos menores a las reportadas en otros estudios; en Portugal, en el Río Lis se detectó una concentración promedio de 31.7 ng/L (Paiga *et al.*, 2016); en China, en los Ríos Shenzhen, Changzhou y Beijing fue de 6.7 ng/L (Wang *et al.*, 2015), en el Río Yangtze 1 090 ng/L (Zhou *et al.*, 2011); en Reino Unido, en los Ríos Ely y Taff fue de 11 y 137 ng/L (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009); en Korea, 25 ng/L (Kim *et al.*, 2007); en España, 19 ng/L (Gros *et al.*, 2009); en Grecia, 144 ng/L (Stamatis y Konstantinou, 2013); en Brazil, 309.8 ng/L (Quadra *et al.*, 2017); en Serbia se reportó una concentración máxima de 35.5 ng/L (Petrović *et al.*, 2014).

Con respecto a las concentraciones del INF, en el presente estudio se determinaron concentraciones de 138 ng/L y de 290 ng/L, mayores que en Grecia; 34.1 ng/L (Papageorgiou *et al.*, 2016), 59.7, 21.8, 95.4, 133.2, 83.8 y 38.9 ng/L (Kosma *et al.*, 2014); en España, de 27 ng/L (Collado *et al.*, 2014), 157 ng/L (Gros *et al.*, 2009); en Portugal, de 89.9 y 100 ng/L (Paíga *et al.*, 2016); en Italia, de 12 ng/L (Castiglioni *et al.*, 2006).

En México Chávez *et al.*, (2011) reportaron en el emisor central una concentración de 200 ng/L y en Morelos en el EFL de la PTARM Yautepec se reportó de 190 ng/L (Avilés *et al.*, 2015). Estos resultados son similares a los reportados en el presente estudio. Por otro lado, en Murcia, España Fernández-López *et al.*, (2016) reportaron concentraciones de 360-8 920 ng/L; 826 ng/L en la PTAR Coslech y de 2 499 ng/L en la PTAR Cilfynydd en Reino Unido. Estas concentraciones son mayores a las determinadas en el presente estudio. En la Cuenca del Río Apatlaco donde se descargan los efluentes de estas PTARs la CBZ no fue detectado al límite de detección del método (Avilés *et al.*, 2015).

4.3.6.1. Remoción de drogas psiquiátricas

En la PTARM-A la CBZ fue pobremente eliminada. En el muestreo 2015 no se presentó remoción, mientras que en el 2016 la eficiencia de remoción fue de 44%. La baja remoción y acumulación de la CBZ en la PTARM-A se puede atribuir a que la tasa de biodegradación (kbiol) y el valor del coeficiente de partición sólido-líquido (Kd) de la CBZ son muy bajos en lodos activados y no se adsorbe ni se biotransforma independientemente del TRH y el TRL. Por otra parte, puede atribuirse a la hidrólisis del glucurónido conjugado con la CBZ durante el proceso de tratamiento del agua residual (Verlicchi *et al.*, 2012; Papageorgiou *et al.*,2016).

En la Tabla 23 se muestran los porcentajes de remoción reportados en otros estudios que utilizan la tecnología de lodos activados.

Tabla 23. Porcentajes de remoción en PTARs reportados en otros estudios

Productos farmacéuticos	% remoción	Referencia
CBZ	^a 40; ^b 30; ^c 0-35; ^{d,*d} 0; ^{*d} 65; ^e 52; ^f 0; ^g 90-62.3	^a Gracia-Lor <i>et al.</i> , 2012 ^b Stamatis y Konstantinou <i>et al.</i> , 2013 ^c Verlicchi <i>et al.</i> , 2012 ^d Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2009 ^e Yang <i>et al.</i> , 2017 ^f Collado <i>et al.</i> ,2014 ^g Luo <i>et al.</i> ,2014

Tipo de tratamiento biológico; ^{a,b,c,d,e,f}lodos activados; ^gno se especifica; ^{*d}filtro percolador

4.5. Cuarta etapa

4.5.1. Evaluación de riesgo ambiental por la presencia de los PFs

Como ya se mencionó anteriormente, los PFs y sus metabolitos bioactivos son introducidos de forma continua en el medio ambiente acuático como mezclas complejas a través de varias rutas, pero principalmente mediante aguas residuales no tratadas y tratadas. Por lo tanto, cientos de PFs y metabolitos se han detectado en el medio acuático en diversos estudios realizados en todo el mundo (Luo *et al.*, 2014). Los PFs pueden ser resistentes a la degradación, persistentes en medio acuoso y potencialmente capaces de tener un impacto negativo en los organismos acuáticos y en la salud humana, que incluyen toxicidad a corto y largo plazo y efectos disruptivos endocrinos. Los antibióticos son de especial interés porque pueden promover la resistencia bacteriana en el ambiente debido a la exposición continua (Fent *et al.*, 2006; Rivera-Utrilla *et al.*, 2013). Por todas estas razones, la evaluación de riesgo ambiental es recomendada con el fin de evaluar si los contaminantes considerados pueden suponer un riesgo para los organismos acuáticos en el contexto estudiado.

A partir de las concentraciones de los fármacos detectados en la cuenca del Río Apatlaco y en el efluente de la PTARM-A, se determinó el riesgo ambiental, en términos de ecotoxicidad acuática, donde se evaluó la presencia de éstos compuestos en las aguas residuales tratadas y superficiales investigadas. Se calcularon las Concentraciones Previstas Sin Efecto (CPSE) y los cocientes de riesgos (CR), para cada fármaco, de acuerdo con las ecuaciones 2 y 3 descritas en el capítulo III:

$$CR = \frac{CAM}{CPSE}$$

EC. 2

$$CPSE = \frac{CE50/CL50/CENO}{*FS}$$

EC. 3

Donde:

CAM	Concentración Ambiental Medida
CE50	Concentración Efectiva 50%
CL50	Concentración Letal 50%
CENO	Concentración de Efecto no Observado
FS	Factor de Seguridad

La Tabla 25 resume los valores de ecotoxicidad obtenidos de la literatura y los calculados con ECOSAR para los PFs investigados en el presente trabajo para tres niveles tróficos (alga, dafnia y pez).

Tabla 17. Datos de ecotoxicidad (mg/L) reportados para alga, dafnia y pez.

Compuestos	Alga	Dafnia	Pez	Datos	FS
Acetaminofén	134	9.2	378	CE50 ^a	1000
Ácido clofíbrico	86	0.11	53	CE50 ^d	1000
Ácido mefenámico	2.09	1.72	<u>2.25</u>	CL50 ^c	1000
Ácido salicílico	48	59	1.29	CE50 ^d	1000
Atenolol	10	33.4	1	CNOE ^b	50
Betaxolol	1.17	<u>1.79</u>	<u>13.38</u>	CE50 ^c	1000
Bezafibrato	60	0.02	5.3	CNOE ^b	100
Carazolol	1.93	<u>2.72</u>	<u>21.14</u>	CE50 ^c	1000
Carbamazepina	6.4	0.02	25	CNOE ^b	10
Cimetidina	48.48	42.33	<u>419.15</u>	CL50 ^c	1000
Clembuterol	5.24	<u>6.35</u>	<u>53.28</u>	CE50 ^c	1000
Cloramfenicol	0.40	<u>72.08</u>	<u>38.82</u>	CE50 ^c	1000
Diazepam	16.5	4.2	<u>12.7</u>	CE50 ^b	1000
Diclofenaco	10	10	0.0005	CNOE ^b	10
Enalapril	34.45	<u>46.27</u>	<u>368.51</u>	CE50 ^c	1000
Famotidina	478.14	414.69	<u>3594.43</u>	CL50 ^c	1000
Furosemida	142	0.16	497	CNOE ^b	100
Fluoxetina	0.08	<u>0.17</u>	<u>1.08</u>	CE50 ^c	1000
Gemfibrozil	4	10.4	0.9	CE50 ^d	1000
Glibenclamida	0.09	<u>0.45</u>	<u>1.49</u>	CE50 ^c	1000
Hidroclorotiazida	34.35	477	2428.57	CE50 ^b	1000
Ibuprofeno	2	20	0.0001	CNOE ^b	10
Indometacina	2.9	16.14	44	CNOE ^b	100
Ketoprofeno	2	2.3	32	CE50 ^b	1000
Nadolol	22.58	<u>22.61</u>	<u>208.90</u>	CE50 ^c	1000
Naproxeno	3.7	0.33	52	CE50 ^b	1000
Pentobarbital	0.02	<u>7.64</u>	<u>27.56</u>	CE50 ^c	1000
Pindolol	10.87	<u>11.70</u>	<u>104.25</u>	CE50 ^c	1000
Propranolol	0.1	<u>0.001</u>	0.0005	CNOE ^b	10
Propifenazona	1	3.5	0.8	CE50 ^b	1000
Salbutamol	41.55	36.80	<u>361.77</u>	CL50 ^c	1000
Sotalol	26.39	>300	616.63	CL50 ^b	1000
Sulfametoxazol	0.02	25.2	562.5	CE50 ^d	1000
Timolol	8.97	<u>10.27</u>	<u>88.66</u>	CE50 ^c	1000
Trimetoprim	0.0016	3.12	25	CNOE ^b	10

Fuente: ^aGinebreda *et al.*,2010; ^bMendoza *et al.*, 2015; ^cECOSAR (EPA),(este estudio); ^dKosma *et al.*, 2014. Valores en negrita representan los valores más bajos reportados.

Una vez determinados los valores de toxicidad de los PFs se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 26, donde se muestran las concentraciones de toxicidad calculadas para las especies alga, dafnia y pez.

Tabla 18. Valores CPSEs ($\mu\text{g/L}$) calculados a partir de datos de ecotoxicidad reportados en la literatura para cada PF detectado en las muestras AS y EFL

Productos farmacéuticos	CPSE Alga	CPSE Dafnia	CPSE Pez
AC	134	9.2	378
AS	48	59	1.29
ATN	200	668	20
BZB	600	0.2	53
CBZ	640	2	2500
DCF	1000	1000	0.05
GFB	4	10.4	0.9
IBU	200	2000	0.01
IND	29	161.4	440
NPX	3.7	0.33	52
SMZ	0.02	25.2	562.5
TMP	0.16	312	2500

Valores en negrita representa la concentración mínima entre las 3 especies tróficas.

Enseguida se muestran las relaciones de toxicidad de cada especie trófica a los PFs:

Alga: SMZ>TMP>NPX>GFB>IND>AS> AC>IBU=ATN>BZB>CBZ>DCF

Dafnia: BZB>NPX>CBZ>AC>GFB>SMZ>AS>IND>TMP>ATN>DCF>IBU

Pez: IBU>DCF>GFB>AS>ATN>NPX>BZB>AC>IND>SMZ>TMP>CBZ

De acuerdo a los valores obtenidos de la tabla anterior, la dafnia resultó ser la especie más sensible al BZB y menos al IBU, mientras que el alga resultó ser más sensible al SMZ y menos al DCF. Finalmente, el pez resultó ser más sensible al IBU y menos a la CBZ. Una vez determinados los valores CPSE se procedió a calcular los CR para los PFs considerando las máximas CAM medidas tanto en el Río Apatlaco como el EFL de la PTARM-A de acuerdo a los muestreos realizados, utilizando la especie trófica más sensible para cada PF de acuerdo a la Tabla 25 y aplicando la EC.2. Los resultados obtenidos son mostrados en las Tablas 27 y 28.

Tabla 19. Cocientes de riesgo (CRs) de los PFs detectados en agua superficial antes (AS1) y después de la descarga de la PTARM-A (AS2).

Productos farmacéuticos	CAM (µg/L)	CR AS1	CAM (µg/L)	CR AS2
	AS1		AS2	
AC	4.46	0	2.32	0.25
AS	0.664	1	0.336	0.26
ATN	0.016	0	0.032	0
BZB	2.1	10.50	1.69	8.45
CBZ	0.276	0	0.276	0.14
DCF	1.276	0	1.398	27.96
GFB	0.368	0	0.264	0.07
IBU	1.06	0	0.896	89.60
IND	0.164	0	0.362	0.01
NPX	4.82	14.61	3.84	11.64
SMZ	0.722	36.10	0.722	36.10
TMP	0.12	0.75	0.09	0.56

Tabla 20. Cocientes de riesgo (CRs) de los PFs detectados en el efluente de la PTARM-A

Productos farmacéuticos	CAM (µg/L)	CR
AC	0	0
AS	0.32	0.25
ATN	0.095	0
BZB	0.95	4.75
CBZ	0.38	0.19
DCF	2.18	43.6
GFB	0.38	0.42
IBU	0	0
IND	0.305	0.01
NPX	0.392	1.19
SMZ	2.01	100.5
TMP	0.79	4.94

De acuerdo con la legislación ambiental europea, sí los valores CRs están por debajo de 0.1, no se esperan efectos adversos, siendo clasificado como riesgo insignificante. Sí los valores de CRs se encuentran entre 0.1 y 1, el riesgo es bajo y se deben considerar los posibles efectos adversos. Sí los valores CRs se encuentran entre 1.0 y 10, es probable algún efecto adverso o riesgo moderado. Por último, los valores de CR por arriba de 10 indican un alto riesgo ecológico (European Commission, 2003). Con respecto a los resultados obtenidos, los PFs que representan mayor riesgo para las especies tróficas estudiadas son el DCF, IBU, NPX y SMX. Mientras que los PFs que representan riesgo menor son el ATN, AC, CBZ, GFB e IND. En la Tabla 29 se resumen los cocientes de riesgo (CRs) para cada PF de acuerdo a los resultados obtenidos de la Tabla 26 y 27.

Tabla 21. CR de los PFs detectados en la Cuenca del Río Apatlaco y el EFL de la PTARM-A de acuerdo a 3 especies tróficas.

Fármaco	AS1			AS2			EFL		
	Alga	Dafnia	Pez	Alga	Dafnia	Pez	Alga	Dafnia	Pez
AC		■			■			■	
AS			■			■			■
ATN			■			■			■
BZB		■			■			■	
CBZ		■			■			■	
DCF			■			■			■
GFB			■			■			■
IBU						■			
IND	■			■			■		
NPX		■			■			■	
SMZ	■			■			■		
TMP	■			■			■		

Clasificación de riesgo:

No hay riesgo

Riesgo bajo

Riesgo moderado

Riesgo alto



Los resultados indican en general un mayor riesgo en el agua superficial que en el agua del efluente de la PTARM-A. Esto se puede deber principalmente a que se han detectado más de 2 000 descargas de aguas residuales sin tratamiento al Río Apatlaco (CEAGUA, 2008). Por lo tanto, la presencia de PFs en el río representan un riesgo para el medio ambiente acuático; siendo las algas, dafnias y peces las especies más sensibles a éstos ocasionando alteraciones morfológicas y/o embriológicas a estas especies de acuerdo a DeLorenzo y Fleming, (2008); Cleuvers, (2003); Galus *et.*, (2013).

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente, existe un riesgo alto en el agua superficial para las especies alga y dafnia por la presencia del SMZ, NPX y BZB. Y un riesgo bajo para las especies pez y alga por la presencia de AS y TMP.

Con relación al EFL de la PTARM-A se observa un riesgo alto a las especies alga y pez por la presencia de SMZ y DCF, riesgo moderado a dafnia por la presencia de BZB y NPX y a pez por la presencia del TMP, así como riesgo bajo al pez por la presencia del AS. Se esperaría que la dilución del EFL con las aguas del Río Apatlaco mitigarian la toxicidad y los riesgos ambientales, pero esto no fue así porque en el agua superficial (AS2) existe un alto riesgo para las tres especies tróficas por la presencia de SMZ (alga), NPX (dafnia), IBU y DCF (pez), un riesgo moderado para dafnia por la presencia de BZ y un riesgo bajo por la presencia de AC (dafnia) y AS (pez).

De acuerdo con los resultados se puede considerar que durante el trayecto del Río Apatlaco, éste se contaminó recibiendo descargas clandestinas de la población y al mezclarse con el EFL de la PTARM-A el riesgo para las especies tróficas aumentó. Tal fue el caso de la dafnia, que se incremento el riesgo de moderado a alto para la presencia de NPX, además después de la mezcla AS1-EFL, surgió un nuevo riesgo alto (AS2) para el pez por la presencia de IBU donde antes de dicha mezcla no existía ningún tipo de riesgo.

Para el caso del ATN, CBZ y GFB, las concentraciones obtenidas en la Cuenca del Río Apatlaco y EFL de la PTARM-A no representan riesgo alguno para las especies tróficas analizadas. En este trabajo a partir de los CRs estimados, el orden relativo de susceptibilidad fue **algas > dafnia > peces**, debido a que las algas son la base de la cadena alimentaria puede afectar indirectamente a todo el ecosistema. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Gros *et al.*, (2010) en estudios realizados en aguas del Río Llobregat y EFL de PTARs.

Por otro lado, Kosma *et al.*, (2014), determinaron los CRs en tres niveles tróficos y encontraron que tres de los compuestos (triclosan, trimetoprim y sulfametoxazol) presentan alto riesgo agudo y dos (diclofenaco y triclosan) alto riesgo crónico (CR>1), respectivamente. Las algas fueron las especies más sensibles, ya que los PFs plantean un alto riesgo ecotoxicológico agudo y crónico para ellas. El riesgo asociado por la presencia de los PFs en el medio ambiente tiene consecuencias ya sea a corto plazo (toxicidad aguda) o a largo plazo (toxicidad crónica) como se demostró en ensayos de toxicidad crónica realizados en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) que evidenciaron cambios citológicos en el hígado, los riñones y las branquias después de 28 días de exposición a un 1 µg/L de diclofenaco. Para una concentración de 5 µg/L, las lesiones renales fueron evidentes, así como la bioacumulación del fármaco en el hígado, riñones, branquias y músculo. La trucha marrón (*Salmo trutta fario*) mostró un daño citológico similar y una reducción de los valores del hematocrito después de 21 días de exposición a 0.5 µg/L de esta sustancia activa (Santos *et al.*, 2010).

4.5.2. Análisis estadístico de los datos

Para evaluar el comportamiento de los fármacos en cada uno de los muestreos se realizó la comparación entre días, sitios y años utilizando en ANOVA de una vía. De acuerdo al análisis estadístico realizado entre años días y sitios (Apéndice B) se demostró, que al menos una de las medias resulto ser diferente a las otras y por lo tanto, debido a que el valor del nivel crítico es menor que el valor de F , se rechazó la hipótesis nula (H_0).

Estadísticamente hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en las concentraciones entre días, sitios y años de muestreos.

Las Tablas del apéndice B se interpretaron de la siguiente manera: El estadístico F se determinó como el cociente entre dos estimadores diferentes de la varianza poblacional. Uno de estos estimadores se obtuvo a partir de la variación existente entre las medias de los grupos (variación *inter-grupos*). El otro estimador se obtuvo a partir de la variación existente entre las puntuaciones dentro de cada grupo (variación *intra-grupos*). Las Tablas muestran la siguiente información: una cuantificación de ambas fuentes de variación (*suma de cuadrados*), los grados de libertad asociados a cada suma de cuadrados y el valor concreto adoptado por cada estimador de la varianza poblacional (*promedios cuadráticos*). El cociente entre estos dos promedios cuadráticos proporcionó el valor del estadístico F , el cual aparece acompañado de su correspondiente nivel crítico o nivel de significancia observada, es decir, de la probabilidad de obtener valores como el obtenido o mayores bajo la hipótesis de igualdad de medias.

Capítulo V. Conclusiones

1. Se realizó la investigación y evaluación de la presencia de contaminantes emergentes (productos farmacéuticos) en la Cuenca del Río Apatlaco en el Estado de Morelos y se estimó el riesgo ambiental en tres especies tróficas.
2. La hipótesis planteada fue comprobada ya que se determinó a niveles de trazas la presencia de PFs en la Cuenca del Río Apatlaco utilizando CL-EM-EM.
3. Se desarrolló y válido un método multi-residuo utilizando CL-EM-EM para analizar la presencia de PFs en aguas superficiales, residuales y tratadas. La validación del método se llevó a cabo con muestras reales de aguas residuales correspondientes a la PTARM-A y superficiales correspondientes a la Cuenta del Río Apatlaco, obteniendo para la mayoría de los PFs recuperaciones >97%, desviaciones estándares <15% y una linealidad con buenas correlaciones $r^2 > 0.99$; estos parámetros se encuentran dentro de lo establecido por la Comisión Europea 2002/657/EC, debido a que en México no se cuenta con una legislación acerca del rendimiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.
4. Se identificaron y cuantificaron 12 fármacos en los muestreos 2015 y 2016 correspondientes a las siguientes familias terapéuticas:
 - analgésicos/anti-inflamatorios: acetaminofén, ácido salicílico, diclofenaco, ibuprofeno, indometacina y naproxeno;
 - antibióticos: sulfametoxazol y trimetoprim;
 - el beta-bloqueante: atenol;
 - los reguladores de lípidos: bezafibrato y gemfibrozil
 - droga psiquiátrica: carbamazepina.

5. los PFs presentaron las siguientes concentraciones en las muestras de agua superficial de la Cuenca del Río Apatlaco y en el agua residual de la PTARM-A:

Producto farmacéutico	Agua superficial ng/L	Agua residual ng/L
Acetaminofén	354-4,460	2,330-14,900
Ácido salicílico	33-664	125-408
Atenolol	4-32	55-90
Bezafibrato	286-2,100	570-3,445
Carbamazepina	8-276	85-380
Diclofenaco	258-1,398	560-2,470
Gemfibrozil	9-368	20-225
Ibuprofeno	184-1,106	370-2,835
Indometacina	19-362	33-310
Naproxeno	732-4,880	825-4210
Sulfametoxazol	76-722	775-2,010
Trimetroprim	34-120	125-790

6. Las concentraciones de fármacos determinadas en las muestras de agua superficial y residual muestran que existe un uso indiscriminado del consumo de fármacos por la población, principalmente de la familia de los analgésicos/anti-inflamatorios que además son medicamentos de venta libre al público.

7. Fue posible evaluar la eficiencia de remoción de la PTARM-A para los PFs determinados, resultando que la mayor eficiencia de remoción fue para la familia terapéutica analgésicos/anti-inflamatorios con un 98%. La carbamazepina (droga psiquiátrica), gemfibrozil (regulador de lípidos) y trimetroprim (antibióticos) presentaron acumulación debido a que estos PFs son considerados recalcitrantes durante el tratamiento del agua

8. Se determinó la ecotoxicidad para las especies tróficas alga, dafnia y pez. La especie más sensible fue el pez seguido de alga y dafnia, con valores de ecotoxicidad de 0.01 µg/L de IBU, 0.02 µg/L de SMZ y 0.2 µg/L BZB respectivamente.

9. La evaluación de riesgo ambiental se realizó a través de los cocientes de riesgo para las 3 especies tróficas, resultado la siguiente relación de riesgo: alga > dafnia > pez; Con los siguientes valores de CR:

Alga: SMZ (36.10); TMP (4.94)

Dafnia: BZB (10.50); NPX (14.61)

Pez: AS (1), DCF (43.6); IBU (89.60)

10. Los resultados derivados del enfoque de cocientes de riesgo en los tres niveles tróficos estudiados mostraron que existe un potencial riesgo a la Cuenca del Río Apatlaco por la presencia de fármacos. Por lo que es necesario que se implementen programas de monitoreo para detectar la presencia de este tipo de contaminantes a lo largo del cauce del Río y realizar propuestas de tratamiento para la recuperación del Río Apatlaco y el restablecimiento de las condiciones ecológicas que permitan el desarrollo de las especies acuáticas.

5.1. Recomendaciones

Para futuros trabajos de recomienda:

1. Implementar la metodología multi-residual desarrollada en este estudio para el monitoreo y análisis de contaminantes emergentes en otros cuerpos de agua.
2. Realizar programas con nuestros representativos de un ciclo estacional a lo largo de la Cuenca del Río Apatlaco
3. Realizar estudios que determinen el impacto ambiental de los contaminantes emergentes en las esferas de agua, suelo y aire, así como en las especies acuáticas presentes en el Río Apatlaco.
4. Determinar el impacto de las concentraciones de los fármacos detectados en las especies acuáticas para determinar posibles daños morfológicos y/o reproductivos.
5. Realizar recorridos por el Cauce del Río Apatlaco con las autoridades correspondientes para identificar descargas clandestinas de aguas residuales que son vertidas directamente al Río Apatlaco.
6. Buscar recursos financieros para la adquisición de la tecnología CL-EM-EM para su implementación en la UAEM

5.2. Perspectivas

1. Proponer tecnologías de tratamiento para remediación de las aguas del Río Apatlaco.
2. Divulgar los resultados obtenidos en el presente estudio a las instancias correspondientes sobre el riesgo que representan los contaminantes emergentes de tipo PFs al medio ambiente.
3. Gestionar la incorporación de contaminantes emergentes en la legislación ambiental mexicana.
4. Proponer proyectos para el sanamiento de la cuenta del Río Apatlaco, donde se involucre la participación de la sociedad civil, la academia y el gobierno para proponer programas de educación ambiental que consienten a la población del impacto negativo que se ocasiona a los cuerpos de agua al vertir aguas residuales causando el deterioro de la calidad del agua.

Referencias

Aceña J. 2017. Tesis doctoral: Transformación y metabolismo de fármacos al medio acuático mediante la espectrometría de masas de alta resolución. Universidad de Barcelona. España.

Augusto F., Hantao L.W., Mogollón N.G.S., Braga S.C.G.N. 2013. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 43, 14-23.

Angeles P., Medina M. L., Molina J. F. 1992. Automedicación en población urbana de Cuernavaca, Morelos. *Salud Publica Mex.* 34, 554–561.

Arbeláez S. P. A. 2015. Tesis doctoral: Contaminantes emergentes en aguas residuales y de río y fangos de depuradora. Universidad Rovira i virgili. Tarragona, Barcelona.

Avilés F. M., Sánchez Z. M., Ramírez S. N. 2015. Proyecto “métodos analíticos para determinación de compuestos emergentes en aguas”. Instituto Mexicano de Tecnología en Mexico (IMTA), 1-30.

Baker D.R., Kasprzyk-Hordern B. 2011. Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 8036–8059.

Balakrishna K., Rath A., Praveenkumarreddy, Y., Gurugec K. S., Subedi B. 2017. A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137, 113–120.

Barceló, D., 2003. Emerging pollutants in water analysis. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 22, 10, xiv-xvi.

- Bo L., Feng L., Fu J., Li X., Li P., Zhang Y. 2015. The fate of typical pharmaceuticals in wastewater treatment plants of Xi'an city in China. *J. Environ. Chem. Eng.* 3, 2203–2211.
- Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239, 229–246.
- Bottoni P., Caroli S., Caracciolo A.B. 2010. Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicol. Environ. Chem.* 92, 549–565.
- Boxall A. B.A., Sinclair C.J., Fenner K., Kolpin D., Maund S.J. 2004. Peer Reviewed: When Synthetic Chemicals Degrade in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 368A–375A.
- Boxall A. B.A, Rudd M. a, Brooks B.W., Caldwell D.J., Choi K., Hickmann S., Innes E., Ostapyk K., Staveley J.P., Verslycke T., Ankley G.T., Beazley K.F. 2012. Review Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment : What Are the Big Questions ? 120, 1221–1229.
- Bletsou A. A., Jeon J., Hollender J., Archontaki E., Thomaidis N. S. 2015. Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. *TrAC-Trends Anal. Chem.* 66, 32–44.
- Brozinski J. M., Lahti M., Meierjohann A., Oikari A., Kronberg L. 2013. The anti-inflammatory drugs diclofenac, naproxen and ibuprofen are found in the bile of wild fish caught downstream of a wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 47, 342–348.
- Carlson J.C., Challis J.K., Hanson M.L., Wong C.S. 2013. Stability of pharmaceuticals and other polar organic compounds stored on polar organic chemical integrative samplers and solid-phase extraction cartridges. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 337–344.

- Carmona E., Andreu V., Picó Y. 2014. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Sci. Total Environ.* 484, 53–63.
- Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R., Pomati F., Calamari D., Zuccato E. 2006. Removal of Pharmaceuticals in Sewage Treatment Plants in Italy. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 357-363.
- Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R., Calamari D., Zuccato E. 2005. Multiresidue analytical method using solid-phase extraction and HPLC-MS-MS to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban waste waters. *J Chromatogr. A.*, 1092, 2, 206-215.
- Castro S. V. 2008. Evaluación de contaminantes emergentes en fuentes de abastecimiento. Tesis maestría en ingeniería. Instituto de ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
- Collado N., Rodríguez-Mozaz S., Gros M., Rubirola A., Barceló D., Comas J., Rodríguez-Roda I., Buttiglieri G. 2014. Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system. *Environmental Pollution*, 185, 202-212.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2008. La Cuenca del Río Apatlaco. Recuperemos el patrimonio ambiental de los morelenses, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), 9-11.
- Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (notified under document C(2015) 1756) Text with EEA relevance. OJL 78, 24.3.2015, P. 40-42.
- Cooper E. R., Siewicki T. C., Phillips K. 2008. Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Sci. Total Environ.* 398, 26–33.

Celiz M. D., Tso J., Aga D. S. 2009. Pharmaceutica metabolites in the environment: Analytical challenges and ecological risk. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28,12, 2473–2484.

Cleuvers M. 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.*, 142, 185–194.

Chávez A., Maya C., Gibson R., Jiménez B. 2011. The removal of microorganisms and organic micropollutants from wastewater during infiltration to aquifers after irrigation of farmland in the Tula Valley, Mexico. *Environ. Pollut.* 159, 1354–1362.

Cruz-Morato C., Ferrando-Climent L., Rodriguez-Mozaz S., Barceló D., Marco-Urrea E., Vicent Sarra M. 2013. Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water Res.*47, 5200–10.

Crites R., Tchobanoglous G. 2000. Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones. Mc. Graw Hill. 46-49.

Daughton C. G., Ternes Thomas A. 1999. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change?. *Environmental Health Perspectives* 107, 6, 907-938.

De la Cruz N., Giménez J., Esplugas S., Grandjean D., de Alencastro L.F., Pulgarín C. 2012. Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. *Water Res.* 46, 1947–1957.

DeLorenzo M.E., Fleming J. 2008. Individual and Mixture Effects of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products on the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 203–210.

Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. OJL 327, 22.12.2000, P.1-72.

Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy Text with EEA relevance. OJL 226, 24.8.2013, P.1-17.

Durán Á. J. C. 2009. Tesis maestría: Cuantificación de doce contaminantes emergentes, provenientes del agua residual empleada para riego, en suelos del distrito de riego 03 “Tula”, Hidalgo. Instituto de Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Eljarrat E. 2012. Methodologies for Sample Preservation and Stabilization. Acad. Press. Oxford 31–49.

El Sol de México. 2016. Demandan a municipios por contaminar Río Apatlaco. [Consultado: 10-feb-2018]. Disponible en: <https://www.elsoldemexico.com.mx/republica/Demandan-a-municipios-por-contaminar-r%C3%ADo-Apatlaco-176391.html>

EPA USA. 1982. Handbook for sampling and sample preservation of water and wastewater. Cincinnati, & Ohio.

European Commission 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part II: Environmental Risk Assessment). Office for Official Publications of the European.

European Commission 2002. 2002/657/EC -implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities; L221: 8–36. Brussels, Belgium.

Farré M., Pérez S., Kantiani L., Barceló D. 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27, 991–1007.

Farré M., Kantiani L., Petrović M., Pérez S., Barceló D. 2012. Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques. Review. *Journal of Chromatography A* 1259, 86-99.

Fatta D., Achilleos, A., Nikolaou A., Meriç S., 2007. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *TrAC-Trends Anal. Chem.* 26, 515–533.

Fatta-Kassinou D., Vasquez M.I., Kümmerer K. 2011. Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes - Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere* 85, 693–709.

Félix-Cañedo T.E., Durán-Álvarez J.C., Jiménez-Cisneros B. 2013. The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Sci. Total Environ.* 454–455, 109–118.

Fent K., Weston A. A., Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159.

Fenu A., Guglielmi G., Jimenez J., Sperandio M., Saroj D., Lesjean B., Brepols C., Thoeye C., Nopens I. 2010. Activated sludge model (ASM) based modelling of membrane bioreactor (MBR) processes: A critical review with special regard to MBR specificities. *Water Research* 44, 4272-4294.

Fernández-López C., Guillén-Navarro J. M., Padilla J. J., Parsons J. R. 2016. Comparison of the removal efficiencies of selected pharmaceuticals in wastewater treatment plants in the region of Murcia, Spain. *Ecological Engineering*, 95, 811–816.

- Ferrer I., Zweigenbaum J. A., Thurman E. M., 2010 Analysis of 70 Environmental Protection Agency priority pharmaceuticals in water by EPA Method 1694. *J. Chromatogr., A* , 1217 (36), 5674–5686.
- Flippin J.L., Huggett D., Foran C.M., 2007. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* 81, 73–78.
- Galus M., Kirischian N., Higgins S., Purdy J., Chow J., Rangaranjan S., Li H., Metcalfe C., Wilson J.Y. 2013. Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 132–133, 200–211.
- Gaugain M., Chotard M. P., Verdon E. 2013. Stability study for 53 antibiotics in solution and in fortified biological matrixes by LC/MS/MS. *J. AOAC Int.* 96, 471–480.
- Gibson R., Becerril-Bravo E., Silva C. V., Jiménez C. B. 2007. Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1169, 31–39.
- Ginebreda A., Muñoz I., de Alda M.L., Brix R., López-Doval J., Barceló D., 2010. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environ. Int.* 36, 153–162.
- Göbel A., Mcardell CS., Joss A., Siegrist H., Giger W. 2007. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Sci Total Environ.*, 372, 361–71.
- Gracia-Lor E., Sancho J. V., Serrano R., Hernández F. 2012. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere* 87, 453–462.

Gracia-Lor E., Sancho J. V., Hernández, F. 2010. Simultaneous determination of acid, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1217, 622-632.

Gracia-Lor E., Sancho J. V., Hernández F. 2011. Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1218, 2264-2275.

Gros M., Petrović, M., Barceló D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70, 678-690.

Gros M., Petrović M., 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.* 81, 898–912.

Gros M., Petrović M., Ginebreda A., Barceló D. 2010. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ. Int.* 36, 15–26.

Grujić S., Vasiljević T., Laušević M., 2009. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 4989–5000.

Guillén D., Ginebreda A., Farré M., Darbra R.M., Petrovic M., Gros M., Barceló, D. 2012. Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment: Analytical, modeling and regulatory perspective. *Sci. Total Environ.* 440, 236–252.

Gutiérrez M. C., Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes del mal olor. 2002. Boletín Intexter (U.P.C.) No. 12.

Hebig K.H., Nödler K., Licha T., Scheytt T.J. 2014. Impact of materials used in lab and field experiments on the recovery of organic micropollutants. *Sci. Total Environ.* 473–474, 125–131.

Helbling D., Hollender J., Kohler H. P., Fenner K., 2010. Structure-based interpretation of biotransformation pathways of amide-containing compounds in sludge-seeded bioreactors, *Environ. Sci. Technol.* 44, 6628–6635.

Hernández-Leal L., Temmink H., Zeeman G., Buisman C.J.N. 2011. Removal of micropollutants from aerobically treated grey water via ozone and activated carbon. *Water Res.* 45, 2887–2896.

Hernández F., Ibáñez M., Bade R., Bijlsma L., Sancho J. V., 2014. Investigation of pharmaceuticals and illicit drugs in waters by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 63, 140-157.

Hildebrandt A., Lacorte S., Barceló D. 2006. Sampling of water, soil and sediment to trace organic pollutants at a river-basin scale. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 1075–1088.

Hillebrand O., Musallam S., Scherer L., Nödler K., Licha T. 2013. The challenge of sample-stabilisation in the era of multi-residue analytical methods: A practical guideline for the stabilisation of 46 organic micropollutants in aqueous samples. *Sci. Total Environ.* 454–455, 289–298.

Holčapek, M., Kolářová, L., Nobilis, M., 2008. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. Review. *Anal Bioanal Chem.*, 391, 59–78.

Hu J., Shi J., Chang H., Li D., Yang M., Kagamata Y. 2008. Phenotyping and Genotyping of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolated from a Natural River Basin. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3415–3420.

Hughes S.R., Kay P., Brown L.E. 2013. Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems. *Environ. Sci. Technol.* 47, 661–677.

Ibáñez M., Borova V., Boix C., Aalizadeh R., Bade R., Thomaidis N. S. 2017. UHPLC-QTOF MS screening of pharmaceuticals and metabolites in treated wastewater samples from Athenas. *J. Hazard. Mater.* 323, 1–25.

Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). 2015. Estrategia para potabilización de agua en las cuencas de los ríos Yautepec y Cuautla, Morelos, con un enfoque holístico. [Consultado: 26-sep-2017]. Disponible en: <http://repositorio.imta.mx/handle/20.500.12013/1783>.

Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Parrella A., Previtera L., Rubino M. 2005. Ecotoxicity of naproxen and its phototrans-formation products. *Sci. Total Environ.* 348 (1–3), 93–101.

Jermann D., Pronk W., Boller M., Schäfer A.I. 2009. The role of NOM fouling for the retention of estradiol and ibuprofen during ultrafiltration. *J. Memb. Sci.* 329, 75–84.

Jiménez B., Chavéz A., 2002. Low cost technology for reliable use of México City's wastewater for agricultural irrigation. *Technology* 9, 95-107.

Kallio J.M., Lahti M., Oikari A., Kronberg L. 2010. Metabolites of the aquatic pollutant diclofenac in fish bile. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7213–7219.

Karinen R., Øiestad E.L., Andresen W., Smith-Kielland A., Christophersen A., 2011. Comparison of the stability of stock solutions of drugs of abuse and other drugs stored in a freezer, refrigerator, and at ambient temperature for up to one year. *J. Anal. Toxicol.* 35, 583–590.

Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A.J. 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res.* 43, 363–380.

Katsu Y., Lange A., Urushitani H., Ichikawa R., Paull G.C., Cahill L.L., Jobling S., Tyler C.R., Iguchi T. 2007. Functional associations between two estrogen receptors, environmental estrogens, and sexual disruption in the roach (*Rutilus rutilus*). *Environ. Sci. Technol.* 41, 3368–3374.

Kern S., Fenner K., Singer H. P., Schwarzenbach R. P., Hollender J., 2009. Identification of transformation products of organic contaminants in natural waters by computer-aided prediction and high-resolution mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7039–7046.

Kim I., Yamashita N., Tanaka H. 2009. Performance of UV and UV/H₂O₂ processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. *J. Hazard. Mater.* 166, 1134–1140.

Kim S. D., Cho J., Kim In S., Vanderford B. J., Snyder S.A. 2007. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*, 2007, 1013-1021.

Kormos J. L. Schulz M., Kohler H. P. Ternes T. A. 2010. Biotransformation of selected iodinated X-ray contrastmedia and characterization of microbial transformation pathways, *Environ. Sci. Technol.* 44, 4998–5007.

Klavarioti M., Mantzavinos D., Kassinos D. 2009. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environ. Int.* 35, 402–417.

Kosma C.I., Lambropoulou D.A., Albanis T.A. 2014. Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 466–467, 421–438.

Kovalova L., Siegrist H., Gunten U., Eugster J., Hagenbuch M., Wittmer A., Moser R., McArdell C.S. 2013. Elimination of Micropollutants during Post-Treatment of Hospital Wastewater with Powdered Activated Carbon, Ozone, and UV. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7899–7908.

Kümmerer K. 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *J. Environ. Manage.* 90, 2354–2366.

Kümmerer, K., 2011. Emerging Contaminants. *Treatise Water Sci.*, 3, 69–87.

Li W.C. 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ. Pollut.* 187, 193–201.

Lindholm-Lehto P.C., Ahkola H.S.J., Knuutinen J.S., Herve S.H., 2016. Widespread occurrence and seasonal variation of pharmaceuticals in surface waters and municipal wastewater treatment plants in central Finland. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 7985–7997.

López-Serna R., Petrovic M., Barceló D. 2012. Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). *Science of the Total Environment*, 440,280–289.

Llorca M., Gros M., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D. 2014. Sample preservation for the analysis of antibiotics in water. *J. Chromatogr. A* 1369, 43–51.

Luo Y., Guo W., Ngo H.H., Nghiem L.D., Hai F.I., Zhang J., Liang S., Wang X.C. 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.

Ma C., Yu S., Shi W., Heijman S.G.J., Rietveld L.C. 2013. Effect of different temperatures on performance and membrane fouling in high concentration PAC-MBR system treating micro-polluted surface water. *Bioresour. Technol.* 141, 19–24.

Marín R. J. M. 2010. Tesis Doctoral: Desarrollo de metodología analítica para la determinación de residuos de contaminantes orgánicos en aguas y vegetales mediante LC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo. Universidad Jaume I, Castellón de la Plana, España.

Meffe R., de Bustamante I. 2014. Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy. *Sci. Total Environ.* 481, 280–295.

Mendoza A., Aceña J., Pérez S., López de Alda M., Barceló D., Gil A., Valcárcel Y. 2015. Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard. *Environ. Res.* 140, 225–241.

Michael I., Vasquez M.I., Hapeshi E., Haddad T., Baginska E., Kümmerer K., Fatta-Kassinos D., 2014. Chapter 14. Metabolites and Transformation Products of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment as Contaminants of Emerging Concern, in: *Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment: Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks.* pp. 413–458.

Mompelat S., Jaffrezic A., Jardé E., Le Bot B. 2013. Storage of natural water samples and preservation techniques for pharmaceutical quantification. *Talanta* 109, 31–45.

Nödler K., Licha T., Bester K., Sauter M. 2010. Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 1217, 6511–6521.

Norma Mexicana NMX-AA-003-1980. Aguas residuales. Muestreo.

Norma Oficial Mexicana. NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

Nikolaou A., Meric S., Fatta D. 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1225–1234.

Oaks J.L., Gilbert M., Virani M.Z., Watson R.T., Meteyer C.U., Rideout B.A., Shivaprasad H.L., Ahmed S., Chaudhry I., Muhammad J., Arshad M., Mahmood S., Ali A., Ahmed Khan A. 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427, 630–633.

Ort C; Michael G. Lawrence Julien R. Jochen F. M. 2010a. Sampling for Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) and Illicit Drugs in Wastewater Systems: Are Your Conclusions Valid? A Critical Review. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6024–6035.

Ort C., Lawrence M. G., Reungoat J., Mueller J. F., 2010b. Sampling for PPCPs in wastewater systems: comparison of different sampling modes and optimization strategies. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6289–6296.

Ortiz de García S., Pinto P. G., Encina G. P., Mata I. R. 2013. Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain. *Sci. Total Environ.* 444, 451–465.

Osorio V., Imbert-Bouchard M., Zonja B., Abad J.L., Pérez S., Barceló D. 2014. Simultaneous determination of diclofenac, its human metabolites and microbial nitration/nitrosation transformation products in wastewaters by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1347, 63–71.

Paíga P., Santos L. H. M. L. M., Ramos S., Jorge S., Silva J. G., Delerue-Matos C. 2016. Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Science of The Total Environment* 573, 164-177.

Papageorgiou M., Kosma C., Lambropoulou D. 2016. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Sci. Total Environ.* 543, 547–569.

Parrott J.L., Blunt B.R. 2005. Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environ. Toxicol.* 20, 131–141.

Pereira A.M.P.T., Silva L.J.G., Meisel L.M., Lino C.M., Pena A. 2015. Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: geographical and seasonal occurrence, removal and risk assessment. *Environ. Res.* 136, 108–119.

Petrović M. 2014. Methodological challenges of multi-residue analysis of pharmaceuticals in environmental samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* 1, e25–e33.

Petrović M., Gonzalez S., Barceló D. 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 22, 685–696.

Petrović M., Škrbić B., Živančev J., Ferrando-Climent L., Barceló D. 2014. Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triplequadrupole–linear ion trap in different types of water in Serbia. *Science of the Total Environment*, 468–469, 415-428.

- Pérez, S., Barceló, D., 2007. Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. *TrAC-Trends Anal. Chem.* 26, 494–514.
- Pérez S., Eichhorn P., Aga DS. 2005. Evaluating the biodegradability of sulphametazine, sulfa- methoxazole and trimethoprim at different stages of sewage treatment. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1361–7.
- Picó Y., Barceló D. 2015. Transformation products of emerging contaminants in the environment and high-resolution mass spectrometry: A new horizon. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 6257–6273.
- Postigo, C., Richardson, S.D., 2014. Transformation of pharmaceuticals during oxidation/disinfection processes in drinking water treatment. *J. Hazard. Mater.* 279, 461–475.
- Prasse C., Wagner M., Schulz R., Ternes T. A. 2011. Biotransformation of the antiviral drugs acyclovir and penciclovir in activated sludge treatment, *Environ. Sci. Technol.* 45, 2761–2769.
- Quadra G., R., Oliveira de Souza H., dos Santos C. R., dos Santos F. M. A. 2017. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. Review article. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24, 1200–1218.
- Quintana J.B., Weiss S., Reemtsma T. 2005. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Wat. Res.* 39, 2654-2664.
- Raldúa D., André M., Babin P.J. 2008. Clofibrate and gemfibrozil induce an embryonic malabsorption syndrome in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228, 301–314.

Richardson S.D. Kimura S.Y. 2017. Emerging environmental contaminants: Challenges facing our next generation and potential engineering solutions. *Environ. Technol. Innov.* 8, 40–56.

Rivera-Utrilla J., Sánchez-Polo M., Ferro-García M.Á., Prados-Joya G., Ocampo-Pérez R. 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* 93, 1268–1287.

Robledo Zacarías V. H., Velázquez Machuca M. A., Montañez Soto J. L., Pimentel Equihua J.L., Vallejo Cardona A. A., López Calvillo M. D., Venegas González J. 2017. Hidroquímica y contaminantes emergentes en aguas residuales urbano industriales de Morelia, Michoacán, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33, 2, 221-235.

Santos L.H.M.L.M., Araújo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M.C.B.S.M. 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95.

Schmitt-Jansen M., Bartels P., Adler N., Altenburger R. 2007. Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1389–1396.

Schulze T., Weiss S., Schymanski E., Von der Ohe PC., Schmitt-Jansen M., Altenburger R., Streck G., Brack W. 2010. Identification of a phytotoxic phototransformation product of diclofenac using effect-directed analysis. *Environmental Pollution*, 158, 1461–1466.

Schwaiger J., Ferling H., Mallow U., Wintermayr H., Negele R.D. 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Aquat. Toxicol.* 68, 141–150.

Siemens J., Huschek G., Siebe C., Kaupenjohann M. 2008. Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley. *Water Res.* 42, 2124–2134.

Silva C. V. 2008. Tesis Maestría. Evaluación de contaminantes emergentes en fuentes de abastecimiento del valle de Tula. Tesis maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

S'liwka-Kaszyńska M., Kot-Wasik A., Namieśnik J. 2003. Preservation and Storage of Water Samples. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 33, 31–44.

Spongberg A.L., Witter J.D., Acuña J., Vargas J., Murillo M., Umaña G., Gómez E., Perez G. 2011. Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters. *Water Res.* 45, 6709–6717.

Suárez S., Carballa M., Omil F., Lema J.M. 2008. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 125–138.

Subedi B., Balakrishna K., Sinha R., Yamashita N., Balasubramanian V., Kannan K. 2015. Mass loading and removal of pharmaceuticals and personal care products, including psychoactive and illicit drugs and artificial sweeteners, in five sewage treatment plants in India. *J. Environ. Chem. Eng.* 3, 2882-2891.

Suri R. P. S., Sarvinder T., Chimchirian R. F. 2012. Effect of process conditions on the analysis of free and conjugated estrogen hormones by solid-phase extraction–gas chromatography/mass spectrometry (SPE–GC/MS). *Environ. Monit. Assess.* 1657–1669.

Stamatis N. K, Konstantinou I. K., 2013. Occurrence and removal of emerging pharmaceutical, personal care compounds and caffeine tracer in municipal sewage treatment plant in Western Greece. *J. Environ Sci Health B*, 48, 800-13.

Swan G.E., Cuthbert R., Quevedo M., Green R.E., Pain D.J., Bartels P., Cunningham A.A., Duncan N., Meharg A.A., Lindsay O. J., Parry-Jones J., Shultz S., Taggart M.A., Verdoorn G., Wolter K. 2006. Toxicity of diclofenac to Gyps vultures. *Biol. Lett.* 2, 279–282.

Taggart M.A., Cuthbert R., Das D., Sashikumar C., Pain D.J., Green R.E., Feltrer Y., Shultz S., Cunningham A.A., Meharg, A.A. 2007. Diclofenac disposition in Indian cow and goat with reference to Gyps vulture population declines. *Environ. Pollut.* 147, 60–65.

Taggart M.A., Senacha K.R., Green R.E., Cuthbert R., Jhala Y. V., Meharg A.A., Mateo R., Pain D.J. 2009. Analysis of nine NSAIDs in ungulate tissues available to critically endangered vultures in India. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4561–4566.

Ternes T. A., Joss A., Siegrist H. 2004. Peer Reviewed: Scrutinizing Pharmaceuticals and Personal Care Products in Wastewater Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 392A–399A.

Triebkorn R., Casper H., Heyd A., Eikemper R., Köhler H.R., Schwaiger J. 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Aquat. Toxicol.* 68, 151–166.

Trinh T., van den Akker B., Stuetz R.M., Coleman H., Le-Clech M.P., Khan S. J. 2012. Removal of trace organic chemical contaminants by a membrane bioreactor. *Water Sci. Technol.* 66, 1856–1863.

Tso J., Dutta S., Inamdar S., Aga D.S. 2011. Simultaneous Analysis of Free and Conjugated Estrogens, Sulfonamides, and Tetracyclines in Runoff Water and Soils Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2213–2222.

USEPA-US. Agencia de Protección al Ambiente, 2012. relación estructura-actividad ecológica (ECOSAR). Modelo predictivo v1.11., [Consultado: 06-jun-2016]. Disponible en : <https://goo.gl/xBM2VN>.

Vanderford B.J., Mawhinney D.B., Trenholm R.A., Zeigler-Holady J.C., Snyder S.A. 2011. Assessment of sample preservation techniques for pharmaceuticals, personal care products, and steroids in surface and drinking water. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2227–2234.

- Vazquez-Roig P., Blasco C., Picó Y. 2013. Advances in the analysis of legal and illegal drugs in the aquatic environment. Review. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 50, 65-77.
- Verlicchi P., Al Aukidy M., 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, 123–155.
- Vieno N., Sillanpää M., 2014. Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant - A review. *Environ. Int.* 69, 28–39.
- Vieno N., Tuhkanen T., Kronberg L. 2007. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Res.* 41, 1001–1012.
- Villafaña M., S. L. 2010. Tesis maestría: Evaluación Socioeconómica para Proyectos de Recuperación Ambiental; Caso: Cuenca del Rio Apatlaco en el Estado de Morelos. Instituto Tecnológico de la Construcción.
- Vogna D., Marotta R., Andreozzi R., Napolitano A., D'Ischia M. 2004. Kinetic and chemical assessment of the UV/H₂O₂ treatment of antiepileptic drug carbamazepine. *Chemosphere* 54, 497–505.
- Wang Z., Zhang X-H., Huang Y., Wang H. 2015. Comprehensive evaluation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in typical highly urbanized regions across China. *Environmental Pollution*, 204, 223-232.
- Watts M. M., Pascoe D., Carroll K. 2003. Exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 207–215.
- Yan Q., Gao X., Chen Y.P., Peng X.Y., Zhang Y.X., Gan X.M. Zi C.F., Guo JS. 2014. Occurrence, fate and ecotoxicological assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants in Chongqing, the Three Gorges Reservoir area. *Sci. Total Environ.* 470–471, 618–630.

Yang Y., Ok, Y.S., Kim K.-H., Kwon E.E., Tsang Y.F. 2017. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Sci. Total Environ.* 596–597, 303–320.

Yamashita N., Yasojima M. Miyajima K., Suzuki Y., Tanaka H. 2006. Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. *Water Sci. Technol.* 53, 65–72.

Zimmermann, S.G., Wittenwiler, M., Hollender, J., Krauss, M., Ort, C., Siegrist, H., Gunten, U.V., 2011. Kinetic assessment and modeling of an ozonation step for full-scale municipal wastewater treatment: Micropollutant oxidation, by-product formation and disinfection. *Water Res.* 45, 605–617.

Zhang T., Zhang M., Zhang X., Fang H.H. 2009a. Tetracycline Resistance Genes and Tetracycline Resistant Lactose-Fermenting Enterobacteriaceae in Activated Sludge of Sewage Treatment Plants. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3455–3460.

Zhang X. X., Zhang T., Fang H. H. P. 2009b. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 397–414.

Zhou X. F., Dai C. M., Zhang Y. L., Surampalli R Y., Zhang T. C. 2011. A preliminary study on the occurrence and behavior of carbamazepine (CBZ) in aquatic environment of Yangtze River Delta, China. *Environ Monit Assess*, 173, 45–53.

Apéndice A

Cromatogramas de los PFs detectados en las
muestras de agua

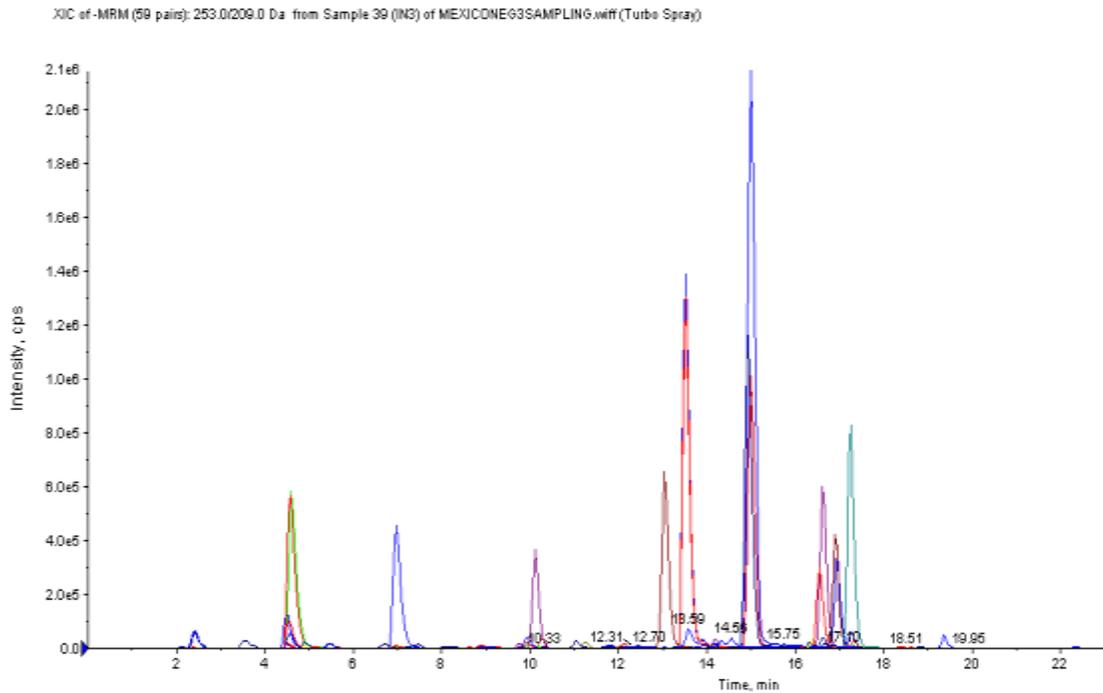


Figura A1. Superposición de los cromatograma de las transiciones monitorizadas (CTM) de los PFs detectados en las muestras en modo de ionización negativa.

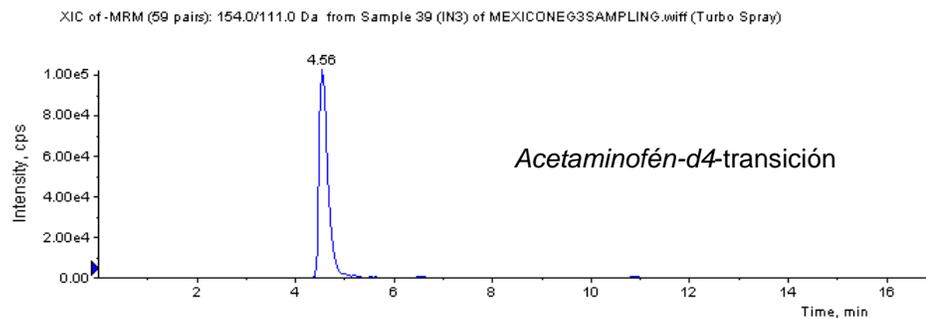
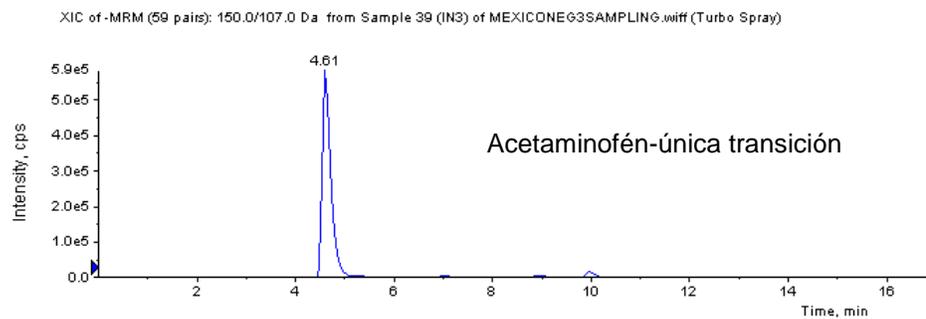
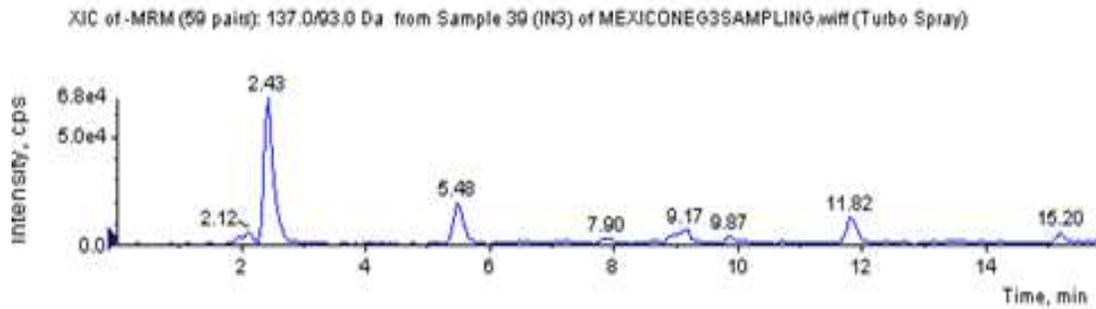
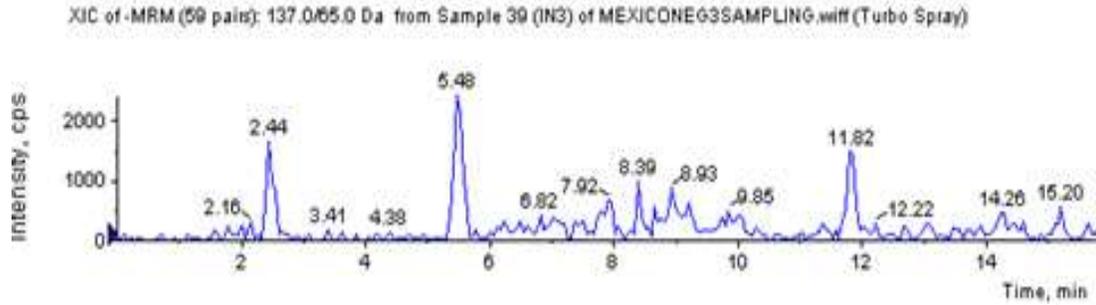
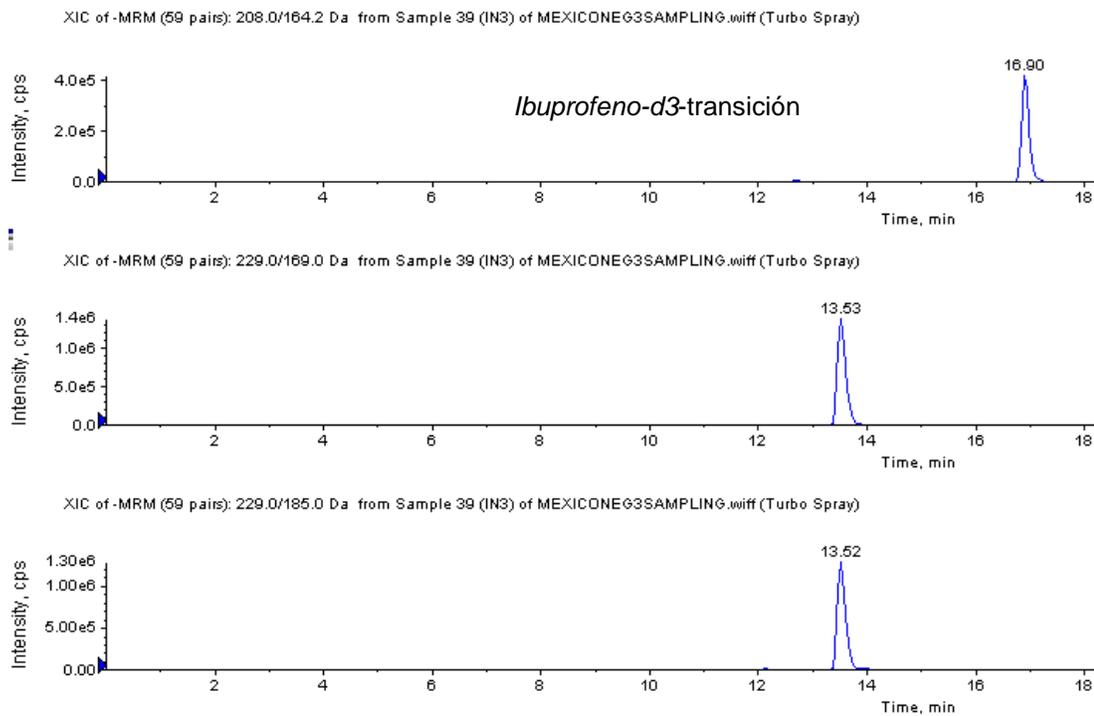


Figura A2. XIC individuales de los PFs detectados en las muestras de agua en modo de ionización negativa.



Ácido salicílico-1era transición

Ácido salicílico-2da transición



Naproxeno-1era transición

Naproxeno-2da transición

Figura A2. Continuación

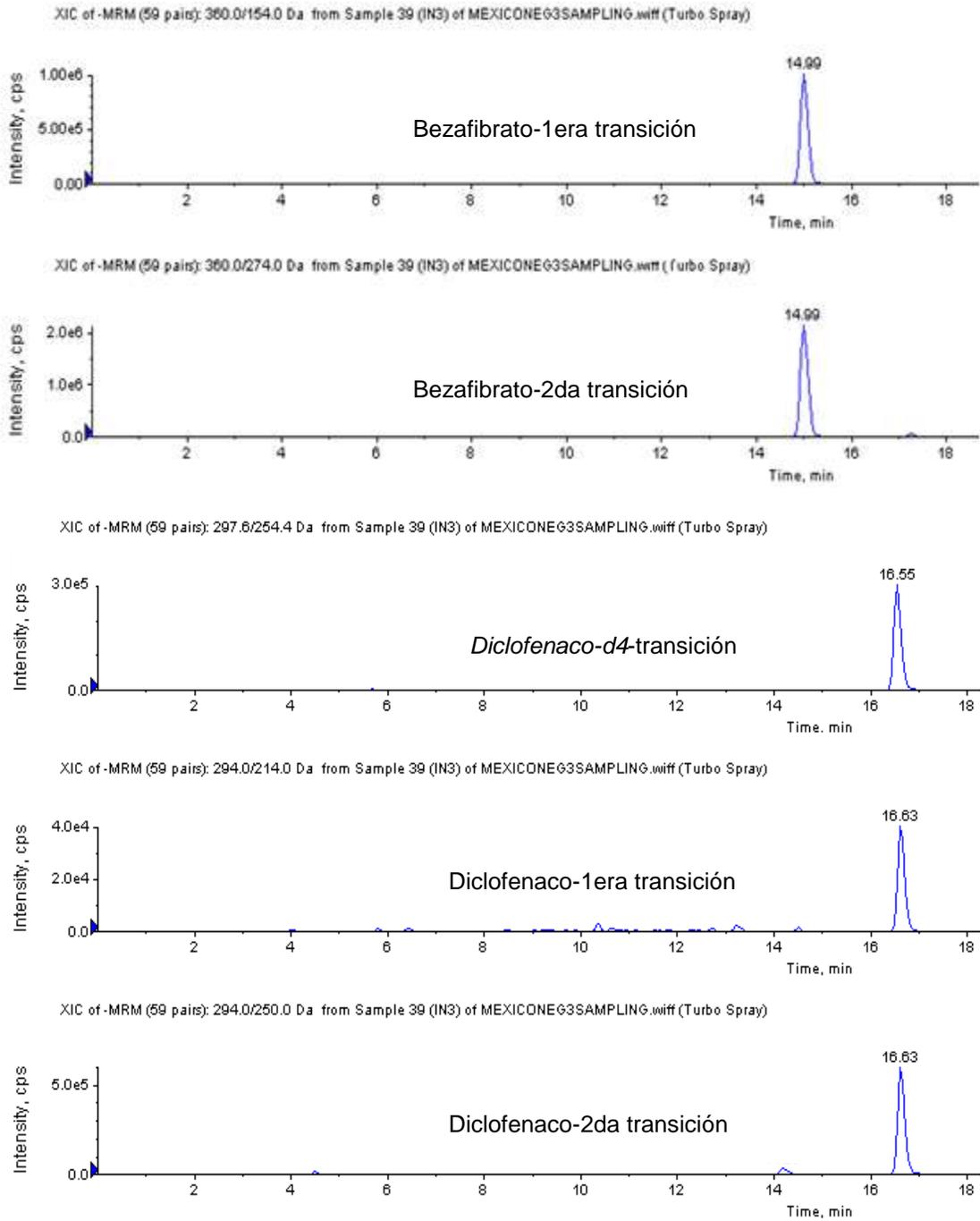
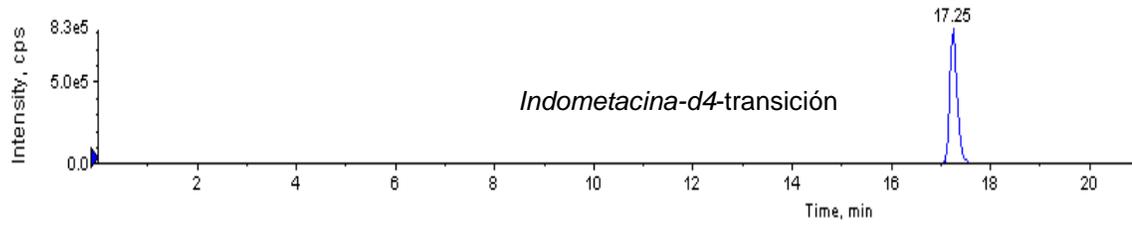
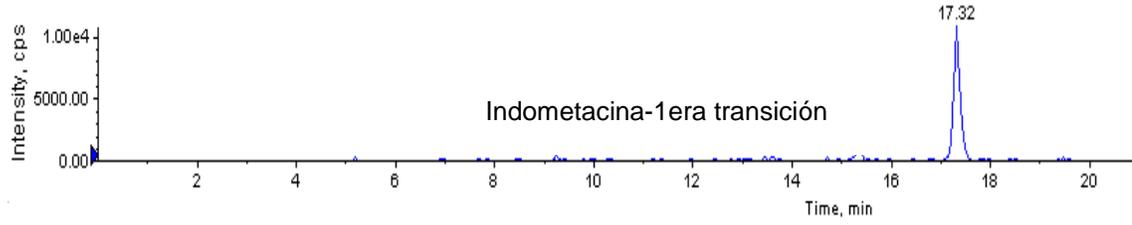


Figura A2. Continuación

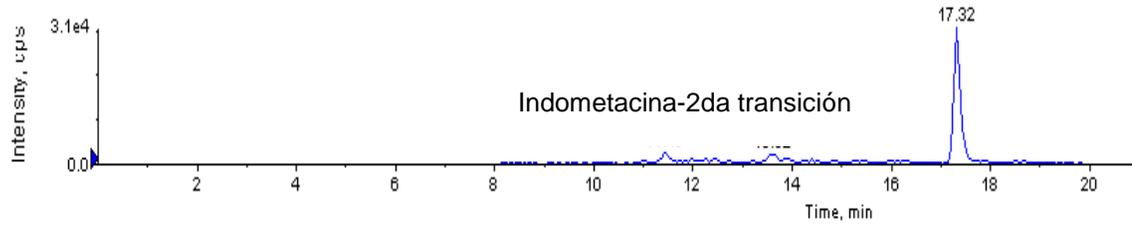
XIC of -MRM (59 pairs): 360.0/316.0 Da from Sample 39 (IN3) of MEXICONE63SAMPLING.wiff (Turbo Spray)



XIC of -MRM (59 pairs): 356.0/297.0 Da from Sample 39 (IN3) of MEXICONE63SAMPLING.wiff (Turbo Spray)



XIC of -MRM (59 pairs): 356.0/312.0 Da from Sample 39 (IN3) of MEXICONE63SAMPLING.wiff (Turbo Spray)



XIC of -MRM (59 pairs): 249.0/120.8 Da from Sample 39 (IN3) of MEXICONE63SAMPLING.wiff (Turbo Spray)

Max: 5.1e4 cps

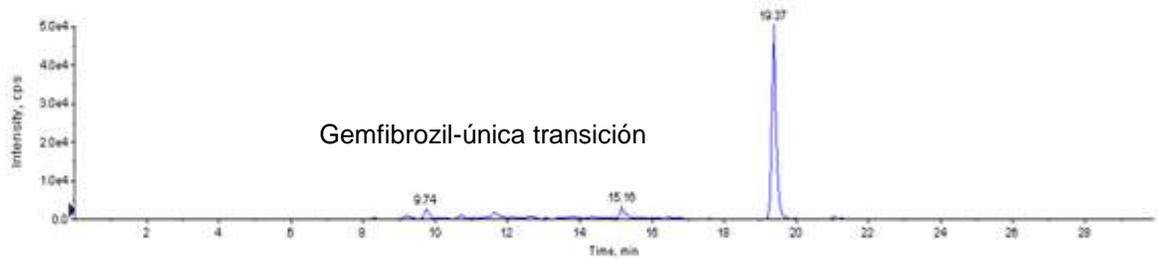


Figura A2. Continuación

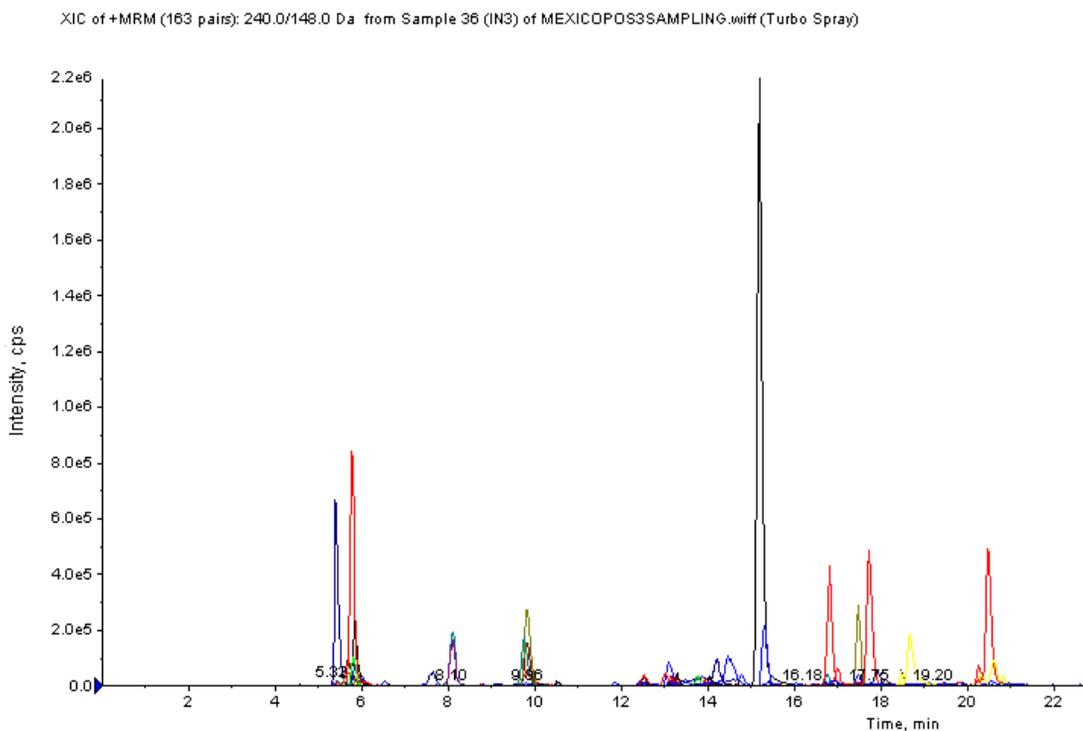


Figura A3. Superposición de los cromatograma de las transiciones monitorizadas (CTM) de los PFs detectados en las muestras en modo de ionización positiva.

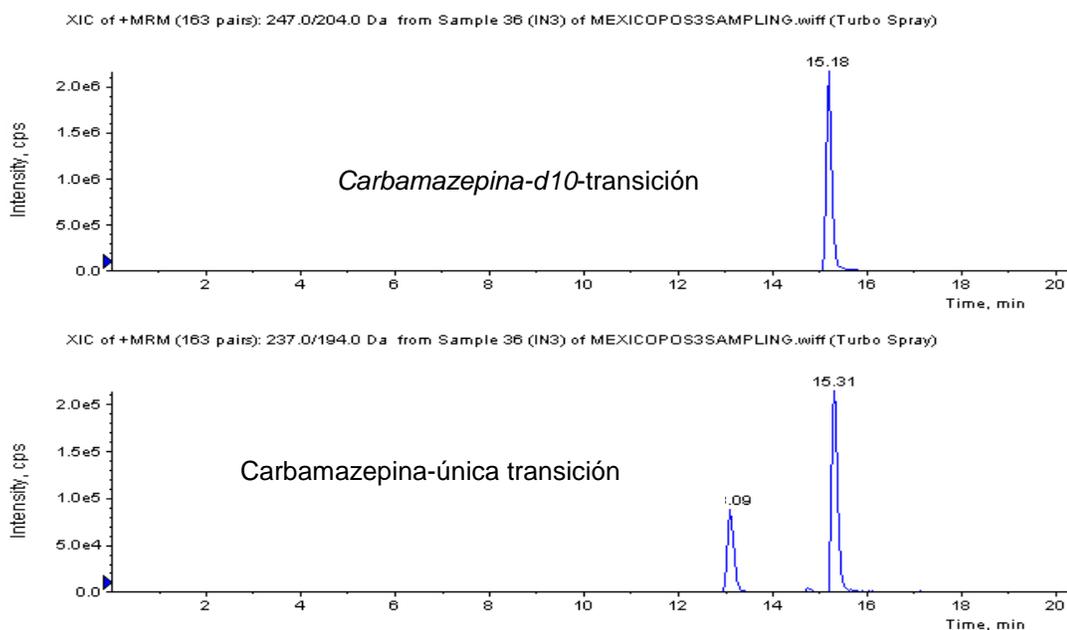
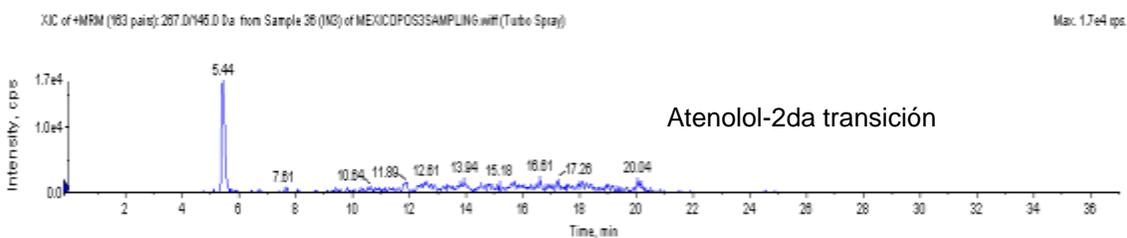
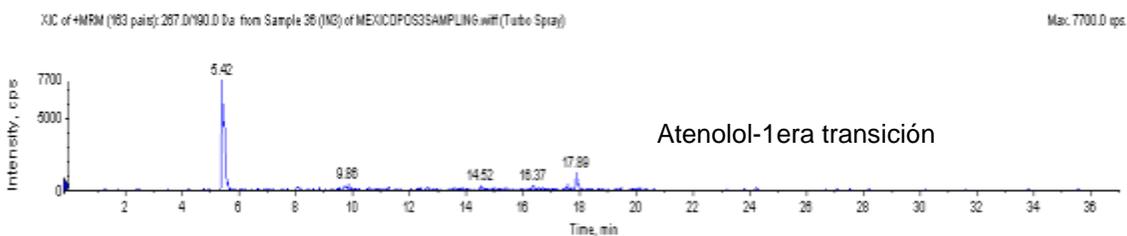
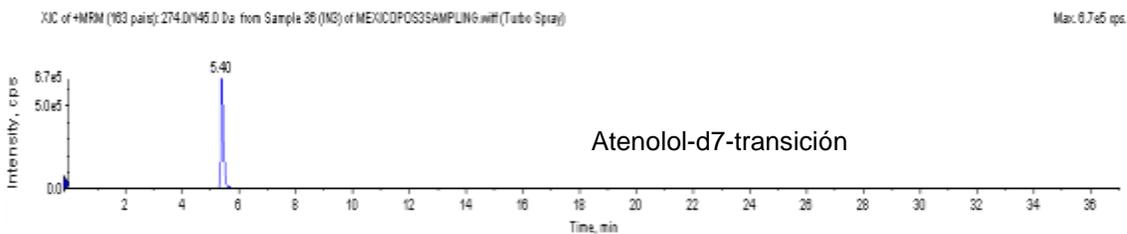
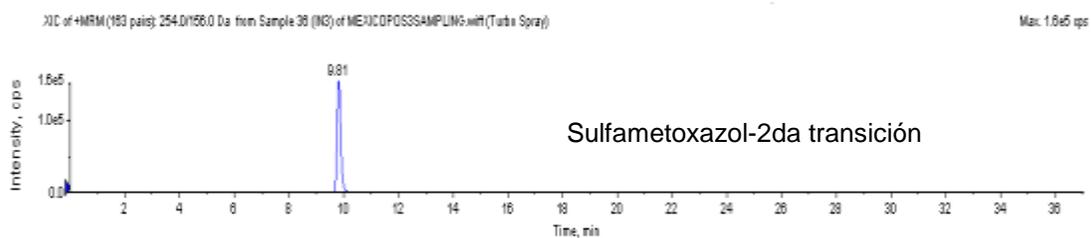
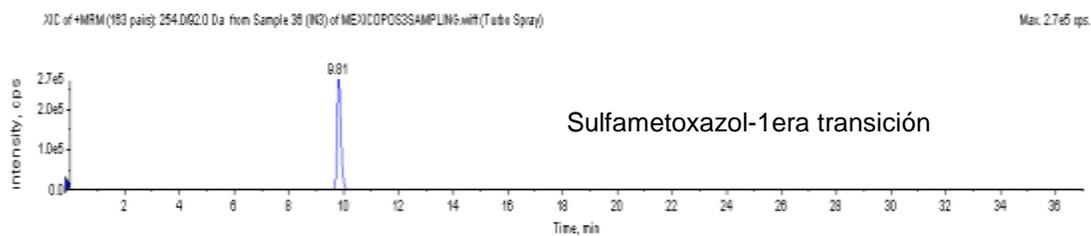
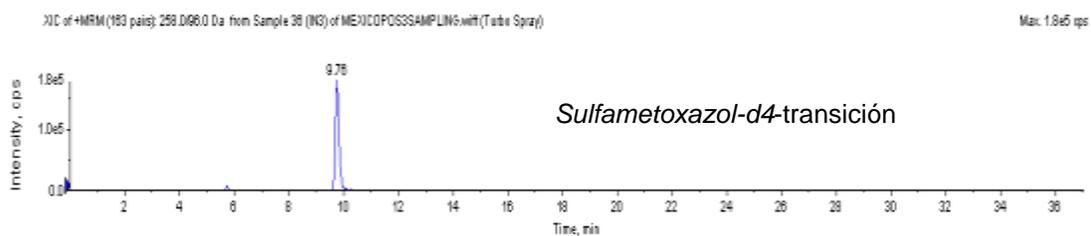
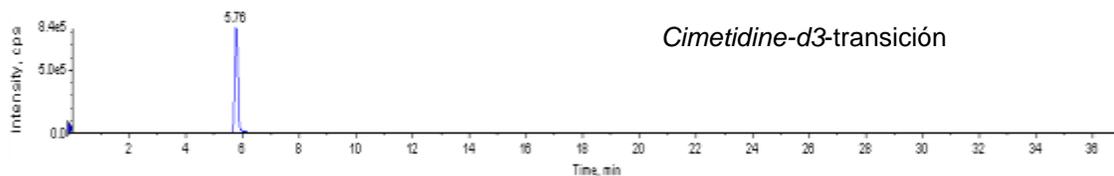


Figura A4. XIC individuales de los PFs detectados en las muestras de agua en modo de ionización positivo.



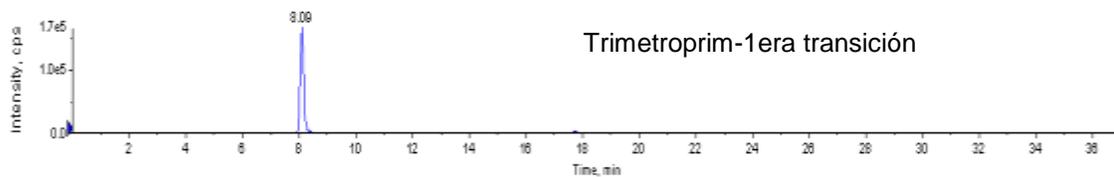
XIC of+MRM (183 pairs): 255.7/182.1 Da from Sample 36 (IN2) of MEXICOPOS3SAMPLING.wiff (Turbo Spray)

Max: 8.4e5 cps.



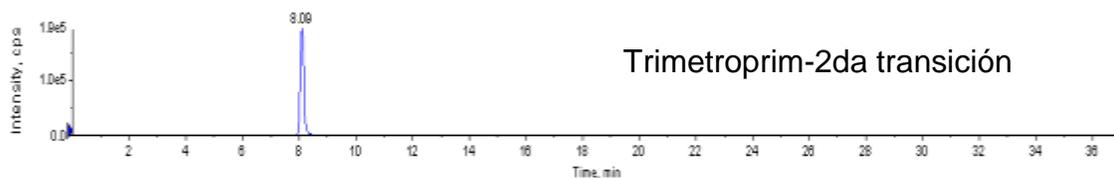
XIC of+MRM (183 pairs): 291.0/291.0 Da from Sample 36 (IN2) of MEXICOPOS3SAMPLING.wiff (Turbo Spray)

Max: 1.7e5 cps.



XIC of+MRM (183 pairs): 291.0/230.0 Da from Sample 36 (IN2) of MEXICOPOS3SAMPLING.wiff (Turbo Spray)

Max: 1.9e5 cps.



Apéndice B

Resultado del análisis estadístico entre años,
días y sitios para los muestreos 2015 y 2016

Análisis entre años (AS1)

ANÁLISIS DE VARIANZA							
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
					172389.	1.3174E	
AC	Entre grupos	1871145.13	1	1871145.13	57	-14	5.98737761
	Dentro de los grupos	65.125	6	10.8541667			
AS	Entre grupos	1378.125	1	1378.125	176.4	-05	5.98737761
	Dentro de los grupos	46.875	6	7.8125			
AT					45.3236	0.00253	
N	Entre grupos	472.59375	1	472.59375	763	615	7.70864742
	Dentro de los grupos	41.7083333	4	10.4270833			
BZ					754215.	1.5733E	
B	Entre grupos	2608328	1	2608328	325	-16	5.98737761
	Dentro de los grupos	20.75	6	3.45833333			
CB						1.7718E	
Z	Entre grupos	2329.03125	1	2329.03125	331.24	-06	5.98737761
	Dentro de los grupos	42.1875	6	7.03125			
DC					169010.	1.398E-	
F	Entre grupos	1496450	1	1496450	824	14	5.98737761
	Dentro de los grupos	53.125	6	8.85416667			
GF						5.1303E	
B	Entre grupos	42340.5	1	42340.5	5080.86	-10	5.98737761
	Dentro de los grupos	50	6	8.33333333			
IB					276.865	3.0064E	
U	Entre grupos	3120.5	1	3120.5	065	-06	5.98737761
	Dentro de los grupos	67.625	6	11.2708333			
IN					5158.12	4.9035E	
D	Entre grupos	97682	1	97682	541	-10	5.98737761
	Dentro de los grupos	113.625	6	18.9375			
NP					199751.	8.4684E	
X	Entre grupos	3628818	1	3628818	45	-15	5.98737761
	Dentro de los grupos	109	6	18.1666667			
S					2787.85	3.0977E	
MZ	Entre grupos	4704.5	1	4704.5	185	-09	5.98737761
	Dentro de los grupos	10.125	6	1.6875			
TM					651.234	2.3858E	
P	Entre grupos	3120.5	1	3120.5	783	-07	5.98737761
	Dentro de los grupos	28.75	6	4.79166667			

Análisis entre años (AS2)

ANÁLISIS DE VARIANZA							
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
					2263.80	5.7779E	
AC	Entre grupos	9759362	1	9759362	6	-09	5.98737761
	Dentro de los grupos	25866.25	6	4311.04167			
AS	Entre grupos	33670.125	1	33670.125	687.437	2.0309E	5.98737761
	Dentro de los grupos	293.875	6	48.9791667			
AT					10406.5	0.34702	
N	Entre grupos	8	1	8	041	739	5.98737761
	Dentro de los grupos	46.125	6	7.6875			
BZ					3921.04	1.1152E	
B	Entre grupos	2413404.5	1	2413404.5	712	-09	5.98737761
	Dentro de los grupos	3693	6	615.5			
CB						1.1183E	
Z	Entre grupos	7564.5	1	7564.5	1815.48	-08	5.98737761
	Dentro de los grupos	25	6	4.16666667			
DC					39507.3	1.0942E	
F	Entre grupos	1627208	1	1627208	263	-12	5.98737761
	Dentro de los grupos	247.125	6	41.1875			
GF					25488.4	4.0738E	
B	Entre grupos	27612.5	1	27612.5	615	-12	5.98737761
	Dentro de los grupos	6.5	6	1.08333333			
IB					63508.6	2.6345E	
U	Entre grupos	461760.5	1	461760.5	074	-13	5.98737761
	Dentro de los grupos	43.625	6	7.27083333			
IN					4427.29	7.7508E	
D	Entre grupos	25088	1	25088	412	-10	5.98737761
	Dentro de los grupos	34	6	5.66666667			
NP					199751.	8.4684E	
X	Entre grupos	3628818	1	3628818	45	-15	5.98737761
	Dentro de los grupos	109	6	18.1666667			
S					2787.85	3.0977E	
MZ	Entre grupos	4704.5	1	4704.5	185	-09	5.98737761
	Dentro de los grupos	10.125	6	1.6875			
TM					651.234	2.3858E	
P	Entre grupos	3120.5	1	3120.5	783	-07	5.98737761
	Dentro de los grupos	28.75	6	4.79166667			

Análisis entre años (INF)

ANÁLISIS DE VARIANZA							
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
					733934	1.7074E	
AC	Entre grupos	15596112.5	1	15596112.5	7.06	-19	5.98737761
	Dentro de los grupos	12.75	6	2.125			
AS	Entre grupos	800	1	800	467	-05	5.98737761
	Dentro de los grupos	42.25	6	7.04166667			
AT	Entre grupos	800	1	800	467	-05	5.98737761
N	Dentro de los grupos	42.25	6	7.04166667			
BZ	Entre grupos	4410450	1	4410450	351	-16	5.98737761
B	Dentro de los grupos	50.875	6	8.47916667			
CB	Entre grupos	52488	1	52488	805	-10	5.98737761
Z	Dentro de los grupos	38.5	6	6.41666667			
DC	Entre grupos	29403.125	1	29403.125	846	-11	5.98737761
F	Dentro de los grupos	12.5078125	6	2.08463542			
GF	Entre grupos	38503.125	1	38503.125	442	-11	5.98737761
B	Dentro de los grupos	16.125	6	2.6875			
IB	Entre grupos	3564450	1	3564450	927	-16	5.98737761
U	Dentro de los grupos	25.625	6	4.27083333			
IN	Entre grupos	146.632813	1	146.632813	479	643	5.98737761
D	Dentro de los grupos	18.8984375	6	3.14973958			
NP	Entre grupos	42778.125	1	42778.125	68445	-13	5.98737761
X	Dentro de los grupos	3.75	6	0.625			
S	Entre grupos	288800	1	288800	869	12	5.98737761
MZ	Dentro de los grupos	52.375	6	8.72916667			
TM	Entre grupos	505012.5	1	505012.5	834	-14	5.98737761
P	Dentro de los grupos	27.125	6	4.52083333			

Análisis entre años (EFL)

ANÁLISIS DE VARIANZA							
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
					900.277	9.0908E	
AS	Entre grupos	8515.125	1	8515.125	533	-08	5.98737761
	Dentro de los grupos	56.75	6	9.45833333			
AT					199.450	7.8704E	
N	Entre grupos	378.125	1	378.125	549	-06	5.98737761
	Dentro de los grupos	11.375	6	1.89583333			
BZ					73295.5	1.7139E	
B	Entre grupos	374112.5	1	374112.5	102	-13	5.98737761
	Dentro de los grupos	30.625	6	5.10416667			
CB					16732.1	1.4396E	
Z	Entre grupos	87179.2207	1	87179.2207	358	-11	5.98737761
	Dentro de los grupos	31.2617188	6	5.21028646			
DC					135606	2.7068E	
F	Entre grupos	4152962	1	4152962	9.22	-17	5.98737761
	Dentro de los grupos	18.375	6	3.0625			
GF					53724.5	4.3517E	
B	Entre grupos	116403.125	1	116403.125	192	-13	5.98737761
	Dentro de los grupos	13	6	2.16666667			
IN					72871.3	1.744E-	
D	Entre grupos	60726.125	1	60726.125	5	13	5.98737761
	Dentro de los grupos	5	6	0.83333333			
NP					17476.9	1.2633E	
X	Entre grupos	70293.7513	1	70293.7513	505	-11	5.98737761
	Dentro de los grupos	24.1325	6	4.02208333			
S					1015.88	6.3395E	
MZ	Entre grupos	6328.125	1	6328.125	629	-08	5.98737761
	Dentro de los grupos	37.375	6	6.22916667			

Análisis entre días para el muestreo 2015

ANÁLISIS DE VARIANZA							
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad ad	Valor crítico para F
AC	Entre grupos	18060208	3	6020069.33	390.3475	3.1801E-05	3.49029482
AS	Dentro de los grupos	185068	12	15422.3333			
AC	Entre grupos	32427500	3	10809166.7	286969.0	2.1506E-27	3.49029482
IN	Dentro de los grupos	452	12	37.6666667			
AC	Entre grupos	7598115	3	2532705	107774.6	7.6632E-81	3.49029482
AS	Dentro de los grupos	282	12	23.5			
AS	Entre grupos	445350	3	148450	686.2095	5.5174E-53	4.06618055
AS	Dentro de los grupos	1730.66667	8	216.333333			
AS	Entre grupos	81851	3	27283.6667	922.2647	1.6984E-89	4.06618055
IN	Dentro de los grupos	236.666667	8	29.5833333			
AS	Entre grupos	14056.25	3	4685.41667	248.7831	3.0997E-86	4.06618055
AS	Dentro de los grupos	150.666667	8	18.8333333			
AS	Entre grupos	64778.9167	3	21592.9722	890.4318	1.9537E-44	4.06618055
EF	Dentro de los grupos	194	8	24.25			
AT	Entre grupos	146.632813	1	146.632813	46.55394	0.000486	5.98737761
AS	Dentro de los grupos	18.8984375	6	3.14973958			
AT	Entre grupos	42778.125	1	42778.125	68445	2.1046E-13	5.98737761
IN	Dentro de los grupos	3.75	6	0.625			
AT	Entre grupos	288800	1	288800	33084.48	1.863E-69	5.98737761
AS	Dentro de los grupos	52.375	6	8.72916667			
AT	Entre grupos	505012.5	1	505012.5	111707.8	4.8416E-34	5.98737761
EF	Dentro de los grupos	27.125	6	4.52083333			
BZB	Entre grupos	2417196	3	805732	141.683772	1.2416E-09	3.49029482
AS1	Dentro de los grupos	68242	12	5686.83333			
BZB	Entre grupos	784847	3	261615.667	2596.68156	2.7248E-12	4.06618055
INF	Dentro de los grupos	806	8	100.75			
BZB	Entre grupos	153700.917	3	51233.6389	1921.26146	9.0778E-12	4.06618055
AS2	Dentro de los grupos	213.333333	8	26.6666667			
BZB	Entre grupos	289533.333	3	96511.1111	3498.89225	8.2756E-13	4.06618055
EFL	Dentro de los grupos	220.666667	8	27.5833333			

	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
CB					1466.53	1.1864E	
Z	Entre grupos	122456	3	40818.6667	892	-15	3.49029482
AS	Dentro de los grupos	334	12	27.8333333			
CB					128.229	4.2044E	
Z	Entre grupos	6892.33333	3	2297.44444	457	-07	4.06618055
IN	Dentro de los grupos	143.333333	8	17.9166667			
F	grupos						
CB					602.730	9.248E-	
Z	Entre grupos	44300.6667	3	14766.8889	159	10	4.06618055
AS	Dentro de los grupos	196	8	24.5			
2	grupos						
CB					10347.3	0.42770	
Z	Entre grupos	104.25	3	34.75	945	735	4.06618055
EF	Dentro de los grupos	268.666667	8	33.5833333			
L	grupos						
DC					101.510	8.564E-	
F	Entre grupos	65068	3	21689.3333	14	09	3.49029482
AS	Dentro de los grupos	2564	12	213.666667			
1	grupos						
DC					382.655	5.6296E	
F	Entre grupos	35586.9167	3	11862.3056	018	-09	4.06618055
IN	Dentro de los grupos	248	8	31			
F	grupos						
DC					2813.24	1.9785E	
F	Entre grupos	175124.667	3	58374.8889	766	-12	4.06618055
AS	Dentro de los grupos	166	8	20.75			
2	grupos						
DC					5583.15	1.278E-	
F	Entre grupos	301490.25	3	100496.75	278	13	4.06618055
EF	Dentro de los grupos	144	8	18			
L	grupos						
GFB	Entre grupos	307232	3	102410.667	16607.1351	5.7171E-22	3.49029482
AS1	Dentro de los grupos	74	12	6.16666667			
GFB	Entre grupos	7723.58333	3	2574.52778	120.211414	5.411E-07	4.06618055
INF	Dentro de los grupos	171.333333	8	21.4166667			
GFB	Entre grupos	56701.6667	3	18900.5556	706.562825	4.911E-10	4.06618055
AS2	Dentro de los grupos	214	8	26.75			
GFB	Entre grupos	41228.6667	3	13742.8889	354.655197	7.6109E-09	4.06618055
EFL	Dentro de los grupos	310	8	38.75			
IBU	Entre grupos	773168	3	257722.667	15619.5556	8.2583E-22	3.49029482
AS1	Dentro de los grupos	198	12	16.5			
IBU	Entre grupos	1972502.25	3	657500.75	35540.5811	7.7971E-17	4.06618055
INF	Dentro de los grupos	148	8	18.5			
IBU	Entre grupos	506550.917	3	168850.306	4626.03577	2.7104E-13	4.06618055
AS2	Dentro de los grupos	292	8	36.5			
IBU	Entre grupos	1972502.25	3	657500.75	35540.5811	7.7971E-17	4.06618055
EFL	Dentro de los grupos	148	8	18.5			

	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
IN						2.7974E	
D	Entre grupos	7084	3	2361.33333	123.2	-09	3.49029482
A	Dentro de los grupos						
S1		230	12	19.1666667			
IN					150.375	2.2526E	
D	Entre grupos	39661.5833	3	13220.5278	671	-07	4.06618055
IN	Dentro de los grupos						
F		703.333333	8	87.9166667			
IN					1072.84	9.2914E	
D	Entre grupos	37549.6667	3	12516.5556	762	-11	4.06618055
A	Dentro de los grupos						
S2		93.3333333	8	11.6666667			
IN					375.465	6.0698E	
D	Entre grupos	49843	3	16614.3333	16	-09	4.06618055
EF	Dentro de los grupos						
L		354	8	44.25			

NPX	Entre grupos	6715200	3	2238400	46311.7241	1.2168E-24	3.49029482
AS1	Dentro de los grupos	580	12	48.3333333			
NPX	Entre grupos	277491.583	3	92497.1944	2082.48843	6.5796E-12	4.06618055
INF	Dentro de los grupos	355.333333	8	44.4166667			
NPX	Entre grupos	67473	3	22491	1046.09302	1.0276E-10	4.06618055
AS2	Dentro de los grupos	172	8	21.5			
NPX	Entre grupos	6606344.67	3	2202114.89	63829.4171	7.4957E-18	4.06618055
EFL	Dentro de los grupos	276	8	34.5			
SMZ	Entre grupos	48464	3	16154.6667	807.733333	4.19E-14	3.49029482
AS1	Dentro de los grupos	240	12	20			
SMZ	Entre grupos	548851.583	3	182950.528	6326.8194	7.7523E-14	4.06618055
INF	Dentro de los grupos	231.333333	8	28.9166667			
SMZ	Entre grupos	1093929.67	3	364643.222	17860.0762	1.2222E-15	4.06618055
AS2	Dentro de los grupos	163.333333	8	20.4166667			
SMZ	Entre grupos	317681.667	3	105893.889	2331.60856	4.1896E-12	4.06618055
EFL	Dentro de los grupos	363.333333	8	45.4166667			
TMP	Entre grupos	288	3	96	5.93814433	0.01008338	3.49029482
AS1	Dentro de los grupos	194	12	16.1666667			
TMP	Entre grupos	3001.58333	3	1000.52778	73.2093496	3.7014E-06	4.06618055
INF	Dentro de los grupos	109.333333	8	13.6666667			
TMP	Entre grupos	57911	3	19303.6667	407.823944	4.3715E-09	4.06618055
AS2	Dentro de los grupos	378.666667	8	47.3333333			
TMP	Entre grupos	1362.66667	3	454.222222	12.0323767	0.00246436	4.06618055
EFL	Dentro de los grupos	302	8	37.75			

Análisis entre días para el muestreo 2016

ANÁLISIS DE VARIANZA							
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
AC	Entre grupos	560096	3	186698.667	9574.29	1.5553E-06	3.49029482
AS	Dentro de los grupos	234	12	19.5	102280	1.0492E-38	3.49029482
AC	Entre grupos	373325200	3	124441733	1139.77	5.3569E-07	3.49029482
IN	Dentro de los grupos	146	12	12.1666667	2279.00	4.5894E-04	3.49029482
AC	Entre grupos	61548	3	20516	964.024	1.4235E-04	3.49029482
AS	Dentro de los grupos	216	12	18	1678.12	1.5583E-06	3.49029482
AS	Entre grupos	188587.583	3	62862.5278	403	-12	4.06618055
AS	Dentro de los grupos	220.666667	8	27.5833333	964.024	1.4235E-04	4.06618055
AS	Entre grupos	65794.6667	3	21931.5556	42	-10	4.06618055
IN	Dentro de los grupos	182	8	22.75	1678.12	1.5583E-06	4.06618055
AS	Entre grupos	72998.25	3	24332.75	069	-11	4.06618055
AS	Dentro de los grupos	116	8	14.5	1444.44	2.8356E-04	4.06618055
AS	Entre grupos	152750	3	50916.6667	444	-11	4.06618055
EF	Dentro de los grupos	282	8	35.25	1767.44	0.20677	4.06618055
AT	Entre grupos	76	3	25.3333333	186	966	3.49029482
AS	Dentro de los grupos	172	12	14.3333333	31.7418	8.5982E-05	3.49029482
AT	Entre grupos	1936.25	3	645.416667	033	-05	4.06618055
IN	Dentro de los grupos	162.666667	8	20.3333333	21.7929	0.00033	4.06618055
AT	Entre grupos	517.583333	3	172.527778	825	215	4.06618055
AS	Dentro de los grupos	63.3333333	8	7.91666667	1477.43	0.29231	4.06618055
AT	Entre grupos	70.9166667	3	23.6388889	056	661	4.06618055
EF	Dentro de los grupos	128	8	16			4.06618055
BZB	Entre grupos	7040	3	2346.66667	102.773723	7.9752E-09	3.49029482
AS1	Dentro de los grupos	274	12	22.8333333			3.49029482
BZB	Entre grupos	8944499.33	3	2981499.78	116162.329	6.8339E-19	4.06618055
INF	Dentro de los grupos	205.333333	8	25.6666667			4.06618055
BZB	Entre grupos	86970.9167	3	28990.3056	1553.05208	2.123E-11	4.06618055
AS2	Dentro de los grupos	149.333333	8	18.6666667			4.06618055

	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
CB					22.5985	3.1658E	
Z	Entre grupos	1548	3	516	401	-05	3.49029482
AS	Dentro de los grupos	274	12	22.8333333			
CB					1187.61	6.1942E	
Z	Entre grupos	54630.25	3	18210.0833	413	-11	4.06618055
IN	Dentro de los grupos	122.666667	8	15.3333333			
CB					27.1977	0.00015	
Z	Entre grupos	1604.66667	3	534.888889	401	075	4.06618055
AS	Dentro de los grupos	157.333333	8	19.6666667			
CB					17.6777	0.00068	
Z	Entre grupos	1334.66667	3	444.888889	042	725	4.06618055
EF	Dentro de los grupos	201.333333	8	25.1666667			
DC					227.712	7.7034E	
F	Entre grupos	17420	3	5806.66667	418	-11	3.49029482
AS	Dentro de los grupos	306	12	25.5			
DC					24292.7	3.5715E	
F	Entre grupos	1220712.92	3	406904.306	944	-16	4.06618055
IN	Dentro de los grupos	134	8	16.75			
DC					2940.70	1.6574E	
F	Entre grupos	89691.5833	3	29897.1944	765	-12	4.06618055
AS	Dentro de los grupos	81.3333333	8	10.1666667			
DC					157.368	1.8845E	
F	Entre grupos	13179.5833	3	4393.19444	159	-07	4.06618055
EF	Dentro de los grupos	223.333333	8	27.9166667			
GFB	Entre grupos	108	3	36	30.8571429	0.06803979	3.49029482
AS1	Dentro de los grupos	140	12	11.6666667			
GFB	Entre grupos	3972.25	3	1324.08333	149.896226	2.281E-07	4.06618055
INF	Dentro de los grupos	70.6666667	8	8.83333333			
GFB	Entre grupos	1960.33333	3	653.444444	58.5174129	8.7239E-06	4.06618055
AS2	Dentro de los grupos	89.3333333	8	11.1666667			
GFB	Entre grupos	185.666667	3	61.8888889	30.6887052	0.09097483	4.06618055
EFL	Dentro de los grupos	161.333333	8	20.1666667			
IBU	Entre grupos	11244	3	3748	220.470588	9.3179E-11	3.49029482
AS1	Dentro de los grupos	204	12	17			
IBU	Entre grupos	1457347.33	3	485782.444	22420.7282	4.9221E-16	4.06618055
INF	Dentro de los grupos	173.333333	8	21.6666667			
IBU	Entre grupos	8042.91667	3	2680.97222	106.528698	8.6671E-07	4.06618055
AS2	Dentro de los grupos	201.333333	8	25.1666667			

	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
IN					313.513	0.06547	
D	Entre grupos	116	3	38.6666667	514	584	3.49029482
AS	Dentro de los grupos	148	12	12.3333333			
IN					202.690	6.9609E	
D	Entre grupos	8513	3	2837.66667	476	-08	4.06618055
IN	Dentro de los grupos	112	8	14			
F	grupos						
IN					36.7391	5.0193E	
D	Entre grupos	1056.25	3	352.083333	304	-05	4.06618055
AS	Dentro de los grupos	76.6666667	8	9.58333333			
IN					177.823	0.22895	
D	Entre grupos	107.583333	3	35.8611111	691	337	4.06618055
EF	Dentro de los grupos	161.333333	8	20.1666667			
L	grupos						
NP					566128.	3.6484E	
X	Entre grupos	35099952	3	11699984	258	-31	3.49029482
AS	Dentro de los grupos	248	12	20.6666667			
NP					308638.	1.3714E	
X	Entre grupos	19521384.3	3	6507128.08	486	-20	4.06618055
IN	Dentro de los grupos	168.666667	8	21.0833333			
F	grupos						
NP					298.738	1.5026E	
X	Entre grupos	18073.6667	3	6024.55556	292	-08	4.06618055
AS	Dentro de los grupos	161.333333	8	20.1666667			
NP					923.623	1.6884E	
X	Entre grupos	54724.6667	3	18241.5556	066	-10	4.06618055
EF	Dentro de los grupos	158	8	19.75			
L	grupos						
SMZ	Entre grupos	137964	3	45988	2485.83784	5.0384E-17	3.49029482
AS1	Dentro de los grupos	222	12	18.5			
SMZ	Entre grupos	1958490.25	3	652830.083	30601.4102	1.4185E-16	4.06618055
INF	Dentro de los grupos	170.666667	8	21.3333333			
SMZ	Entre grupos	293775	3	97925	5153.94737	1.7597E-13	4.06618055
AS2	Dentro de los grupos	152	8	19			
SMZ	Entre grupos	250608.333	3	83536.1111	3946.58793	5.1144E-13	4.06618055
EFL	Dentro de los grupos	169.333333	8	21.1666667			
TMP	Entre grupos	9932	3	3310.66667	287.884058	1.931E-11	3.49029482
AS1	Dentro de los grupos	138	12	11.5			
TMP	Entre grupos	225352.917	3	75117.6389	6259.80324	8.0894E-14	4.06618055
INF	Dentro de los grupos	96	8	12			
TMP	Entre grupos	20864.3333	3	6954.77778	458.556777	2.7436E-09	4.06618055
AS2	Dentro de los grupos	121.333333	8	15.1666667			
TMP	Entre grupos	3150.33333	3	1050.11111	46.3284314	2.112E-05	4.06618055
AS1	Dentro de los grupos	181.333333	8	22.6666667			

Análisis entre sitios para el muestreo 2015

ANÁLISIS DE VARIANZA							
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
AC	Entre grupos	206113511	2	103056755	63.8717	4.8141E	4.25649473
	Dentro de los grupos	14521455.8	9	1613495.08	504	-06	
AS	Entre grupos	62555.1875	3	20851.7292	126.496	0.33034	3.49029482
	Dentro de los grupos	197808.75	12	16484.0625	3	894	
AT	Entre grupos	3797.66667	3	1265.88889	20.9237	0.00038	4.06618055
	Dentro de los grupos	484	8	60.5	833	32	
BZ	Entre grupos	7747887.58	3	2582629.19	30.7025	9.7103E	4.06618055
	Dentro de los grupos	672941.333	8	84117.6667	777	-05	
CB	Entre grupos	266256.823	3	88752.2744	22.4218	3.2933E	3.49029482
	Dentro de los grupos	47499.5742	12	3958.29785	282	-05	
DC	Entre grupos	3047930.25	3	1015976.75	65.0138	5.8367E	4.06618055
	Dentro de los grupos	125016.667	8	15627.0833	435	-06	
GF	Entre grupos	43456.6875	3	14485.5625	155.220	0.25202	3.49029482
	Dentro de los grupos	111986.75	12	9332.22917	819	852	
IB	Entre grupos	5282564.67	2	2641282.33	23.2822	0.00027	4.25649473
	Dentro de los grupos	1021017	9	113446.333	186	702	
IN	Entre grupos	40202.75	3	13400.9167	3.64114	0.04473	3.49029482
	Dentro de los grupos	44165	12	3680.41667	118	577	
NP	Entre grupos	28233622.8	3	9411207.6	28.2564	1.0081E	3.49029482
	Dentro de los grupos	3996767.55	12	333063.963	572	-05	
S	Entre grupos	1844318.69	3	614772.896	11.0832	0.00089	3.49029482
	Dentro de los grupos	665621.75	12	55468.4792	838	649	
TM	Entre grupos	50270.75	3	16756.9167	9.68747	0.00158	3.49029482
	Dentro de los grupos	20757	12	1729.75	892	103	

Análisis entre sitios para el muestreo 2016

ANÁLISIS DE VARIANZA							
	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
AC	Entre grupos	147524429	2	73762214.3	7.10111	0.01409	4.25649473
	Dentro de los grupos	93486711	9	10387412.3	546	962	
AS	Entre grupos	60871.25	3	20290.4167	151.959	0.25979	3.49029482
	Dentro de los grupos	160230.5	12	13352.5417	209	974	
AT	Entre grupos	12691.6875	3	4230.5625	57.5097	2.1552E	3.49029482
	Dentro de los grupos	882.75	12	73.5625	706	-07	
BZ	Entre grupos	4892009	3	1630669.67	6.47254	0.00746	3.49029482
	Dentro de los grupos	3023238	12	251936.5	235	324	
CB	Entre grupos	173995.688	3	57998.5625	35.5097	3.0176E	3.49029482
	Dentro de los grupos	19599.75	12	1633.3125	769	-06	
DC	Entre grupos	1473165.19	3	491055.063	13.1900	0.00041	3.49029482
	Dentro de los grupos	446749.75	12	37229.1458	706	646	
GF	Entre grupos	2604.1875	3	868.0625	5.19603	0.01571	3.49029482
	Dentro de los grupos	2004.75	12	167.0625	442	529	
IB	Entre grupos	874338	2	437169	7.97698	0.01016	4.25649473
	Dentro de los grupos	493234	9	54803.7778	658	161	
IN	Entre grupos	5350.25	3	1783.41667	6.52568	0.00724	3.49029482
	Dentro de los grupos	3279.5	12	273.291667	989	893	
NP	Entre grupos	17893215.7	3	5964405.23	4.67467	0.02189	3.49029482
	Dentro de los grupos	15310771.8	12	1275897.65	375	923	
S	Entre grupos	4008194.75	3	1336064.92	18.4582	8.6168E	3.49029482
	Dentro de los grupos	868595	12	72382.9167	907	-05	
TM	Entre grupos	916579.793	3	305526.598	42.7001	1.1147E	3.49029482
	Dentro de los grupos	85861.9219	12	7155.16016	76	-06	

Anexo A

Estancias académicas, trabajos publicados y presentaciones en congresos en el marco del trabajo de esta tesis

Estancias académicas

- Se realizaron 3 estancias académicas en el Instituto de Diagnósticos ambientales y estudios del Agua (IDAEA) ubicado en Barcelona, España, donde se participó en el proyecto titulado “Estudio e impacto de contaminantes emergentes en aguas superficiales y residuales de México”.

Trabajos publicados

- Rivera-Jaimes, J. A., Postigo, C., Melgoza-Alemán, R. M., Aceña, J., Barceló, D., López de Alda, M. 2017. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 613–614, 1263–1274.

Presentaciones en congresos

- 4to congreso denominado “4th IWA México Young Water Professionals Conference 2015”. Determination of pharmaceuticals in waste and surface waters from Cuernavaca, Morelos, México. Guanajuato, Gto., 29 abril 2015. Cartel.
- 10th annual LC/MS/MS workshop on environmental applications and food safety. Barcelona, España, 3 julio de 2014. Cartel.