



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE FARMACIA – MAESTRÍA EN FARMACIA

“Cuantificación de AINES y su evaluación eco-toxicológica en muestras acuáticas de Jiutepec y Temixco”

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN FARMACIA

PRESENTA

L.F. Luis Antonio Luna Robles

Director

Dr. Julio César Rivera Leyva

Codirector

Dra. Adriana Valladares Méndez

Cuernavaca, Morelos / Junio 2026

Agradecimientos

El agradecimiento más profundo para mis padres, María del Carmen R. y Eduardo L., mi hermano Eduardo L. y mi hermana Mariana L., y a toda mi familia. Gracias por ser mi refugio, por su comprensión absoluta en los momentos de ausencia y por demostrarme su apoyo incondicional en todo momento. Este logro es, sin duda, tan suyo como mío.

Dedico este trabajo a la memoria de mi primo Said L., y de mis abuelos Carmen G. y Carlos L. Aunque su partida dejó un vacío profundo, su recuerdo, sus enseñanzas y el amor que me brindaron en vida permanecen intactos. Sé que, desde donde están, celebran este logro conmigo y su luz me sigue guiando en cada paso.

Asimismo, agradezco de corazón a Dulce S. y a su familia, Sra. María E. y Sr. Ojilvie S. por su calidez, su hospitalidad y por brindarme un espacio de tranquilidad y motivación constante. Su apoyo y compañía durante este proceso fueron un gran respaldo en los momentos de mayor esfuerzo.

A mi director Julio R. y codirectora de tesis Adriana V., por su guía, su paciencia y por compartir conmigo su valioso conocimiento. Sus observaciones y rigurosidad académica no solo dieron rumbo a este trabajo, sino que me transformaron como investigador. Asimismo, agradezco a mis revisores, los doctores Antonio M. y Leobardo G. y las doctoras Luisa C. y María Antonieta G., por el tiempo dedicado a la evaluación de este proyecto y por sus valiosas aportaciones que enriquecieron notablemente el resultado final.

Un agradecimiento especial a la Dra. Luz B. y a la Dra. Elsay A., por su invaluable apoyo, su paciencia y sus instrucciones para el manejo seguro y eficaz de las muestras ambientales y los cultivos para los ensayos *in vivo*. Su mentoría fue un pilar indispensable para la fase experimental de esta investigación.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Lizzy A., Fernanda R. y Francisco M., así como a todo el equipo de trabajo. Gracias por hacer del laboratorio un espacio de aprendizaje constante, colaboración y apoyo mutuo durante las largas jornadas de experimentación. De igual manera, a mis amigos de la facultad, con quienes tuve la fortuna de compartir no solo la misma pasión por la ciencia y la investigación, sino también esos momentos de desconexión, risas y buena música que aligeraron el camino.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por la confianza depositada en mi formación académica y profesional a través de la beca otorgada con el No. CVU 1351034, la cual fue fundamental para el desarrollo y culminación de este proyecto de investigación.

Índice General

Índice de figuras	7
Índice de tablas	8
Lista de Abreviaturas:.....	9
Resumen.....	11
Abstract	13
1. Introducción	15
2. Antecedentes	17
2.1. Contaminación ambiental por residuos de fármacos.....	17
2.1.1. Propiedades fisicoquímicas de fármacos y sus efectos ecotoxicológicos	17
2.1.2. Bioconcentración y biomagnificación de fármacos.....	20
2.2. Presencia de contaminantes emergentes a nivel mundial.....	21
2.2.1. Contexto nacional de la contaminación por AINEs	22
2.2.2. Hidrografía del estado de Morelos	24
2.2.3. Meteorología del Estado de Morelos.....	25
2.3. Métodos de evaluación y cuantificación de fármacos.	25
2.3.1. Métodos compendiales farmacopéicos	25
2.3.2. Métodos compendiales para la cuantificación de AINEs.	26
2.3.3. Desarrollo de métodos analíticos no compendiales para la cuantificación de AINEs.	27
3. Ensayos toxicológicos <i>in silico</i>	29
3.1. Biosimulación predictiva: Cuantificación <i>In silico</i>	30
4. Ensayos toxicológicos <i>in vivo</i>	31
4.1. <i>Daphnia magna</i> como modelo de ensayos ecotoxicológicos <i>in vivo</i>	31
5. Justificación	34
6. Objetivo general:.....	34
6.1. Objetivos específicos:	34
7. Hipótesis.....	35
8. Metodología	35
8.1. Materiales y reactivos.....	35
8.2. Preparación de soluciones	36
8.2.1. Preparación de soluciones stock de los cinco compuestos (1000 µg/mL):.....	36
8.2.2. Preparación de soluciones de trabajo (100 µg/ mL):	36

8.2.3.	Preparación de diluciones (10 µg/ mL):	36
8.2.4.	Preparación de soluciones de trabajo (200 µg/ mL):	36
8.2.5.	Preparación de solución de trabajo de mezcla de AINEs (50 µg/mL y 10 µg/mL): .	36
8.2.6.	Preparación de soluciones seriadas para la curva de calibración de la prueba de linealidad del sistema:.....	37
8.2.7.	Preparación de soluciones seriadas para la prueba de precisión y exactitud del sistema: 37	
8.3.	Encuesta sobre las prácticas de disposición final de medicamentos caducados.	38
8.3.1.	Diseño del estudio.....	38
8.3.2.	Estructura de la encuesta piloto	38
8.3.3.	Selección de la población de estudio	38
8.3.4.	Aplicación de cuestionario	39
8.3.5.	Seguridad de la Encuesta:	39
8.4.	Encuesta oficial con usuarios de SAPAC	39
8.4.1.	Cálculo del tamaño de muestra	39
8.5.	Desarrollo del método analítico de cuantificación	40
8.5.1.	Espectros de absorción UV.....	40
8.5.2.	Condiciones cromatográficas	40
8.6.	Validación del método analítico de cuantificación.....	40
8.6.1.	Linealidad del sistema:.....	40
8.6.1.1.	Regresión	40
8.6.2.	Límites de detección (LOD) y Cuantificación (LOQ):	41
8.6.3.	Intervalo de confianza de la pendiente (ICP β_1):.....	41
8.6.4.	Precisión y Exactitud:	41
8.7.	Plan de muestreo de aguas residuales	42
8.7.1.	Red de puntos de muestreo y procedimiento de campo:	43
8.8.	Desarrollo de ensayos <i>in silico</i>	45
8.8.1.	Plataforma de predicción admetSAR 3.0, preADMET y Software de predicción: VEGA <i>in silico</i> platform version 1.2.4	45
8.9.	Desarrollo de ensayo <i>in vivo</i>	45
8.9.1.	Evaluación de la toxicidad en <i>Daphnia magna</i>	45
8.9.1.1.	Reactivos y cultivos para la preparación de agua dura.....	45
8.9.1.2.	Evaluación de la toxicidad aguda en <i>Daphnia magna</i>	46
8.9.1.2.1.	Control Positivo (+): Dicromato de potasio	46

8.9.1.3.	Prueba exploratoria de toxicidad aguda en <i>Daphnia magna</i> .	47
8.9.1.4.	Prueba definitiva de toxicidad aguda en <i>Daphnia magna</i>	48
8.9.1.5.	Análisis Probit:	48
9.	Resultados y Discusión	50
9.1.	Aplicación de encuestas	50
9.1.1.	Encuesta piloto	50
9.1.2.	Encuesta oficial	53
9.2.	Desarrollo del método de cuantificación	57
9.2.1.	Selección de longitud de onda para cuantificación e identificación química	57
9.2.2.	Selección de la fase móvil	59
9.2.2.1.	Configuración por método isocrático	59
9.2.2.2.	Implementación de gradientes	61
9.2.2.2.1.	Configuración por método de gradiente manual	61
9.2.2.2.2.	Implementación de gradiente automatizado	62
9.2.3.	Condiciones finales del método de análisis	64
9.3.	Validación del método analítico	64
9.3.1.	Linealidad del método analítico para la cuantificación de AINEs	64
9.3.2.	Linealidad de Ácido Salicílico (AS)	65
9.3.3.	Linealidad de Ketorolaco (KET)	66
9.3.4.	Linealidad de Naproxeno (NAP)	67
9.3.5.	Linealidad de Diclofenaco (DIC)	68
9.3.6.	Linealidad de Ibuprofeno (IBU)	69
9.4.	Límites de detección, límites cuantificación e intervalo de confianza de la pendiente.	70
9.5.	Precisión y exactitud del método analítico.	71
9.6.	Detección y cuantificación de AINEs en aguas residuales	77
9.7.	Ensayos <i>in silico</i> de riesgo ecotoxicológico.	79
9.8.	Determinación de CL ₅₀ en el modelo <i>in vivo</i> de <i>Daphnia magna</i>	82
9.8.1.	Pruebas preliminares de toxicidad aguda	82
9.8.2.	Prueba definitiva de toxicidad aguda	82
9.9.	Cuantificación de la CL ₅₀ de AINEs en modelo de <i>Daphnia magna</i>	83
10.	Conclusiones	86
11.	Expectativas	86

12.	Anexos.....	87
	Anexo 1: Formato de encuestas aplicada a los usuarios del Sistema de Agua Potable y Alcantarillado de Cuernavaca (SAPAC).....	87
	Anexo 2: Procedimiento para la realización de los ensayos toxicológicos <i>in silico</i> a través de plataformas de predicción: admetSAR 3.0, PreADMET y VEGA 1.2.4.....	88
	admetSAR y PreADMET:	88
	Software de predicción: VEGA in silico platform version 1.2.4.....	89
	Anexo 3: Elaboración de agua dura como medio de cultivo de <i>D. magna</i> para pruebas de toxicidad aguda.	90
	Valoración de tiosulfato de sodio 0.1 N	95
	Valoración de dicromato de potasio 0.1 N.....	96
	Anexo 4: Condiciones ambientales para el cultivo y mantenimiento de organismos de <i>Daphnia magna</i>	97
	Anexo 5: Relación de alturas registradas en el análisis de fármacos para prueba de linealidad del método analítico.	98
	Referencias bibliográficas	100

Índice de figuras

Figura 1. Diferencia entre bioacumulación y bioconcentración.	20
Figura 2. Países que reportan concentraciones de fármacos AINEs en muestras acuáticas.	22
Figura 3. Resumen de las Regiones de México	23
Figura 4. Ciclo reproductivo de la Daphnia magna	32
Figura 5. Representación de la anatomía interna y externa de la pulga de agua	33
Figura 6. Ubicación de la PTAR “El Rayo” Municipio de Temixco, Morelos.	44
Figura 7. Ubicación de la ruta de puntos de muestreo en el Municipio de Jiutepec, Morelos.....	44
Figura 8. Datos demográficos representados en porcentajes correspondientes a la encuesta piloto	50
Figura 9. Porcentaje según el tipo de almacenamiento empleado por los encuestados en la prueba piloto.	51
Figura 10. Diagrama que muestra la incidencia con la que los usuarios de la encuesta piloto se deshacen de sus medicamentos.	52
Figura 11. Medicamentos más utilizados por los usuarios de la encuesta piloto.....	52
Figura 12. Datos demográficos representados en porcentajes correspondientes a la encuesta oficial	53
Figura 13. Porcentaje según el tipo de almacenamiento empleado por los encuestados en la prueba oficial.....	54
Figura 14. Medicamentos más utilizados por los usuarios de la encuesta oficial	55
Figura 15. Espectro de absorción Naproxeno.	58
Figura 16. Espectro de absorción de Ácido Salicílico	58
Figura 17. Espectro de absorción de Ibuprofeno.	58
Figura 18. Espectro de absorción de Ketorolaco.....	58
Figura 19. Espectro de absorción de Diclofenaco.	58
Figura 20. Cromatograma de mezcla de AINEs, 40:60 (1% de ácido fosfórico).	60
Figura 21. Cromatograma de mezcla de AINEs, 45:55 (1% de ácido fosfórico).	60
Figura 22. Cromatograma de mezcla de AINEs con implementación de gradiente manual.	62
Figura 23. Cromatograma de mezcla de AINEs con implementación de gradiente automático.	63
Figura 24. Linealidad del método de cuantificación para el compuesto Ácido Salicílico.....	65
Figura 25. Linealidad del método de cuantificación para el compuesto Ketorolaco.....	66
Figura 26. Linealidad del método de cuantificación para el compuesto Naproxeno.	67
Figura 27. Linealidad del método de cuantificación para el compuesto Diclofenaco	68
Figura 28. Linealidad del método de cuantificación para el compuesto Ibuprofeno.	69
Figura 29. Análisis eco toxicológico in silico de AINEs mediante la plataforma admetSAR 3.0.	80
Figura 30. Primer vire de titulación a amarillo ámbar a verde amarillento.	92
Figura 31. Muestra con indicador y modificación de color con la solución de tiosulfato de sodio..	93
Figura 32. Proceso de sedimentación de la muestra acuática y aspecto uniforme.....	94
Figura 33. Primer vire de titulación a amarillo claro.	94
Figura 34. Muestra de agua con indicador.....	94
Figura 35. Punto final de la titulación.	95

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de AINEs.....	18
Tabla 2. Log P, toxicidad y bioacumulación ambiental.	19
Tabla 3. Concentraciones máximas y mínimas reportadas en muestras acuáticas en distintas localidades a nivel mundial.	21
Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la valoración de AINEs según la USP 2014.	27
Tabla 5. Materiales y reactivos que se emplearon para la elaboración de soluciones para el desarrollo del método analítico de cuantificación.....	35
Tabla 6. Preparación de soluciones stock	36
Tabla 7. Preparación de la solución de trabajo de 200 µg/mL.....	36
Tabla 8. Preparación de la segunda solución de trabajo (50 µg/mL y 10 µg/mL).....	36
Tabla 9. Preparación de diluciones seriadas	37
Tabla 10. Metodología de preparación de soluciones para la para la prueba de precisión y exactitud del sistema.	37
Tabla 11. Contenido de los reactivos de la encuesta.	38
Tabla 12. Configuración de gradiente.	40
Tabla 13. Preparación de soluciones stock de los componentes del agua dura.....	45
Tabla 14. Concentraciones de dicromato de potasio como control positivo de mortalidad para la realización de pruebas de toxicidad aguda.	46
Tabla 15. Rangos de concentración establecida para la prueba de toxicidad de fármacos	47
Tabla 16. Condiciones de la prueba de toxicidad aguda de fármacos con el modelo in vivo de <i>Daphnia magna</i>	48
Tabla 17. Transformación de porcentaje de mortalidad a unidades Probit.	49
Tabla 18. Tabla de distribución que muestra los porcentajes de métodos de desecho.....	51
Tabla 19. Tabla de distribución que muestra los porcentajes de métodos de desecho por parte de los usuarios encuestados de la prueba oficial.....	54
Tabla 20. Fases móviles y tiempos de retención obtenidos bajo distintas condiciones isocráticas.	59
Tabla 21. Fases móviles y tiempos de retención obtenidos bajo distintas condiciones isocráticas utilizando metanol y solución ácida.....	61
Tabla 22. Tiempos de retención obtenidos a través de un gradiente manual.	61
Tabla 23. Tiempos de retención obtenidos a través de un gradiente automatizado.	62
Tabla 24. Parámetros para la prueba de adecuabilidad del sistema de cuantificación de AINEs por medio de HPLC.	63
Tabla 25. Condiciones finales de trabajo para el método analítico	64
Tabla 26. Tabla de linealidad del método para Ácido Salicílico	65
Tabla 27. Tabla de linealidad del método para Ketorolaco	66
Tabla 28. Tabla de linealidad del método para Naproxeno	67
Tabla 29. Tabla de linealidad del método para Diclofenaco.....	68
Tabla 30. Tabla de linealidad del método para Ibuprofeno.....	69
Tabla 31. Resumen límites de detección, límites de cuantificación e intervalos de confianza.	70
Tabla 32. Repetibilidad de AS.....	72
Tabla 33. Reproducibilidad de AS.....	72
Tabla 34. Exactitud de AS	72
Tabla 35. Repetibilidad de KET.....	73

Tabla 36. Reproducibilidad de KET	73
Tabla 37. Exactitud de KET	73
Tabla 38. Repetibilidad de NAP	74
Tabla 39. Reproducibilidad de NAP	74
Tabla 40. Exactitud de NAP	74
Tabla 41. Repetibilidad de DIC	75
Tabla 42. Reproducibilidad de DIC	75
Tabla 43. Exactitud de DIC.....	75
Tabla 44. Repetibilidad de IBU	76
Tabla 45. Reproducibilidad de IBU	76
Tabla 46. Exactitud de IBU	76
Tabla 47. Reporte de análisis de muestras: PTAR “El Rayo” Temixco.....	77
Tabla 48. Reporte de análisis de muestras de Jiutepec: Periodo A - 14 de julio 2025.....	77
Tabla 49. Reporte de análisis de muestras de Jiutepec: Periodo B - 24 de noviembre	78
Tabla 50. Reporte de análisis de muestras de Jiutepec: Periodo B - 25 de noviembre 2025	78
Tabla 51. Reporte de análisis de muestras de Jiutepec: Periodo C - 2 de diciembre 2025	79
Tabla 52. Ensayo de toxicidad aguda: Daphnia magna.	81
Tabla 53. Ensayo de toxicidad aguda en Peces: Oncorhynchus mykiss, Tanichthys albonubes y Pimephales promelas.	81
Tabla 54. Ensayo de toxicidad aguda Algas: Selenastrum capricornutum.....	82
Tabla 55. Rangos de concentraciones y porcentaje de mortalidad de pruebas preliminares de toxicidad de AINEs evaluados.	82
Tabla 56. Pruebas definitivas de la toxicidad aguda AINEs sobre Daphnia magna.....	83
Tabla 57. Concentraciones de las soluciones de stock y medios de exposición de AINEs para la realización de la prueba de toxicidad.	84
Tabla 58. Concentraciones nominales (CL ₅₀) vs concentración recuperada de los medios donde se realizaron las pruebas de toxicidad.....	85
Tabla 59. Lineamientos para la calidad de agua según la OMS.	91
Tabla 60. Materiales, reactivos y equipos:.....	91
Tabla 61. Cálculos para determinar la cantidad de oxígeno presente.....	95
Tabla 62. Relación de alturas de Ácido Salicílico.....	98
Tabla 63. Relación de alturas de Ketorolaco	98
Tabla 64. Relación de alturas de Naproxeno	98
Tabla 65. Relación de alturas de Diclofenaco	99
Tabla 66. Relación de alturas de Ibuprofeno	99

Lista de Abreviaturas:

ACN: Acetonitrilo.

ADMET: Absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad.

AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos.

AS: Ácido Salicílico.

BCF: Factor de bioconcentración - Bioconcentration factor.

CG: Cromatografía de gases.

CIVAC: Ciudad Industrial del Valle de Cuernavaca.

CE₅₀: Concentración efectiva media.

CLAR: Cromatografía líquida de alta resolución.

C8: Octilsilano.

C18: Octadecilsilano.

DE: Desviación estándar.

DIC: Diclofenaco.

EMA: Agencia Europea de Medicamentos - European Medicines Agency.

ECCACIV: Empresa para el Control de la Contaminación del Agua de la Ciudad Industrial. del Valle de Cuernavaca.

ERA: Evaluación del Riesgo Ambiental - Environmental Risk Assessment.

EP: Farmacopea Europea - European Pharmacopoeia.

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos – Food and Drugs Agency.

FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

IBU: Ibuprofeno.

ICP: Intervalo de confianza de la pendiente.

IFAS: Ingredientes Farmacéuticos Activos.

IMSS: Instituto Mexicano de Seguro Social.

k: Factor de capacidad.

K_a: Constante de disociación ácida.

KET: Ketorolaco.

Koc: Coeficiente de adsorción.

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a un espectro de masas en tándem.

LOD: Límite de detección.

LOQ: Límite de cuantificación.

Log P: Coeficiente de Partición *n*-octanol/agua.

MQ: Agua de grado Milli Q.

NAP: Naproxeno.

NOM: Norma oficial mexicana

OD: Oxígeno disuelto.

pK_a: Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida.

PTAR: Planta Tratadora de Aguas Residuales.

QSAR: relación cuantitativa estructura-actividad.

R: resolución.

SI: Solución Indicadora

SINGREM: Sistema Nacional de Gestión de Residuos de Envases y Medicamentos

T: factor de coleo.

TM: Tiempo muerto.

USP: Farmacopea de los Estados Unidos - United States Pharmacopeia.

Resumen

En los últimos años, los fármacos han sido catalogados como contaminantes emergentes debido a su persistencia en el ambiente y a los efectos adversos que han generado a los ecosistemas y a la salud de los humanos. Entre estos compuestos destacan los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) debido a su amplio consumo y su frecuente detección en mantos acuíferos, lo que los convierte en un grupo prioritario de estudio en el ámbito de la toxicología.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la presencia y concentración de AINEs en compartimentos acuáticos de los municipios de Jiutepec y Temixco en el estado de Morelos, así como analizar el posible impacto ambiental mediante un enfoque integral. Con este propósito y con la finalidad de conocer qué grupo de fármacos tenía mayor probabilidad de ser detectado en estas zonas, se desarrollaron y aplicaron encuestas de consumo a los usuarios del Sistema de Agua Potable y Alcantarillado de Cuernavaca (SAPAC), así como identificar las prácticas de disposición final de los medicamentos por parte de la población.

Se diseñó y validó un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la cuantificación de ácido salicílico (AS), ketorolaco (KET), naproxeno (NAP), diclofenaco (DIC) e ibuprofeno (IBU) en muestras ambientales. El método analítico se llevó a cabo empleando una longitud de onda de 220 nm y una columna cromatográfica C18. Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo y agua acidulada con 1% de ácido fosfórico, operando bajo un sistema de elución por gradiente.

Se estableció un plan de muestreo en distintas zonas de Jiutepec y Temixco, donde se incluyeron aguas residuales y efluentes de plantas de tratamiento con la finalidad de establecer una recolección sistemática de muestras para su posterior análisis. Además, se hizo un análisis predictivo *in silico* mediante plataformas especializadas como admetSAR, VEGA Hub y preADMET, con el propósito de estimar propiedades toxicológicas y ambientales de los compuestos estudiados. Finalmente, se desarrolló un modelo *in vivo* utilizando *Daphnia magna* para la evaluación de toxicidad aguda, determinando la concentración letal media (CL₅₀) mediante análisis Probit.

Los resultados que se obtuvieron indicaron que el 81.25 % de la población encuestada carece de conocimiento sobre las prácticas adecuadas de disposición final de medicamentos, lo que pudiera favorecer que los residuos de éstos puedan ser detectados en el ambiente. Al igual que otros reportes a nivel mundial, en este estudio se identificó que los AINEs constituyen uno de los grupos de fármacos con mayor presencia en los hogares.

El método analítico desarrollado demostró ser selectivo, lineal ($r > 0.99$), preciso (nivel bajo CV = 2 %, intermedio CV = 2 % y alto CV = 2 %) y exacto (recobro entre 80 % y 110 % para niveles bajos y medios y recobro entre 70 % y 120 % para niveles cercanos al límite de detección), siendo adecuado para la detección y cuantificación de los compuestos de interés, permitiendo confirmar la presencia de los residuos de AINEs, principalmente de AS, KET y NAP en barrancas y canales a concentraciones de 0.0045, 0.072 y 0.0046 µg/mL, respectivamente, en el municipio de Jiutepec. La presencia de DIC e IBU en todos los puntos de muestreo monitoreados no fue detectada bajo las condiciones analíticas empleadas. Por otro lado, los estudios *in silico* con admetSAR 3.0 mostraron a diclofenaco como uno de los fármacos potencialmente tóxicos para las cuatro especies analizadas (*Daphnia*

magna, *Tetrahymena pyriformis*, *Lepomis macrochirus* y *Oncorhynchus mykiss*) con un 72.9, 99.7, 83.1 y 88. 5 % de toxicidad predicha, respectivamente; y el ácido salicílico como el menos tóxico para tres de estas especies. VEGA y preADMET identifican a diclofenaco como el compuesto más toxico con concentraciones de 480 µg/mL y 30 µg/mL, respectivamente. Las pruebas definitivas de los estudios *in vivo* mostraron a ibuprofeno como uno de los AINEs con mayor potencial toxicológico de los fármacos evaluados, destacando la sensibilidad de *Daphnia magna* frente a las pruebas de exposición.

En conjunto, estos hallazgos muestran la presencia de algunos AINEs y evidencian potencial ecotoxicológico bajo condiciones experimentales sobre un eslabón de organismos acuáticos; se resalta la necesidad de fortalecer las estrategias de monitoreo, regulación y educación ambiental orientada a la correcta disposición de medicamento y así como buscar estrategias para la mitigación del impacto de AINEs en los ecosistemas acuáticos.

Abstract

In recent years, pharmaceuticals have been classified as emerging contaminants due to their persistence in the environment and the adverse effects they have caused to ecosystems and human health. Among these compounds, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) stand out due to their high consumption and frequent detection in aquifers, making them a priority group of study in the field of toxicology.

The objective of this work was to evaluate the presence and concentration of NSAIDs in aquatic compartments within the municipalities of Jiutepec and Temixco in the state of Morelos, as well as to analyze the potential environmental impact through an integrated approach. To this end, and with the purpose of determining which group of pharmaceuticals was most likely to be detected in these areas, consumption surveys were developed and administered to users of the Water Supply and Sewage System of Cuernavaca (SAPAC). Additionally, the final disposal practices of medications by the population were identified.

An analytical method was designed and validated using high-performance liquid chromatography (HPLC) for the quantification of salicylic acid (SA), ketorolac (KET), naproxen (NAP), diclofenac (DIC), and ibuprofen (IBU) in environmental samples. The analytical method was carried out using a wavelength of 220 nm and a C18 chromatographic column. A mixture of acetonitrile and water acidified with 1 % phosphoric acid was used as the mobile phase, operating under a gradient elution system.

A sampling plan was established in different areas of Jiutepec and Temixco, which included wastewater and effluents from treatment plants in order to establish a systematic collection of samples for subsequent analysis. In addition, an *in silico* predictive analysis was performed using specialized platforms such as admetSAR, VEGA Hub, and preADMET, with the purpose of estimating the toxicological and environmental properties of the studied compounds. Finally, an *in vivo* model was developed using *Daphnia magna* for acute toxicity assessment, determining the median lethal concentration (LC50) through Probit analysis.

The results obtained indicated that 81.25 % of the surveyed population lacks knowledge regarding proper medication disposal practices, which could favor the detection of these residues in the environment. Consistent with other global reports, this study identified that NSAIDs constitute one of the pharmaceutical groups with the highest presence in households.

The developed analytical method proved to be selective, linear ($r > 0.99$), precise (low level CV = 2 %, intermediate CV = 2 %, and high CV = 2 %), and accurate (recovery between 80 % and 110 % for low and medium levels, and recovery between 70 % and 120 % for levels close to the limit of detection). It was found suitable for the detection and quantification of the compounds of interest, allowing the confirmation of NSAID residues (mainly SA, KET, and NAP) in ravines and canals at concentrations of 0.0045 µg/mL, 0.072 µg/mL, and 0.0046 µg/mL, respectively, in the municipality of Jiutepec. The presence of DIC and IBU was not detected under the employed analytical conditions at any of the monitored sampling points. On the other hand, *in silico* studies with admetSAR 3.0 showed diclofenac to be one of the potentially toxic drugs for the four analyzed species (*Daphnia magna*, *Tetrahymena pyriformis*, bluegill sunfish, and rainbow trout) with 72.9 %, 99.7 %, 83.1 %, and 100 %, respectively.

and 88.5 % of predicted toxicity, respectively; meanwhile, salicylic acid was the least toxic for three of these species. VEGA and preADMET identified diclofenac as the most toxic compound, with concentrations of 480 µg/mL and 30 µg/mL, respectively. Definitive tests from the *in vivo* studies showed ibuprofen as one of the NSAIDs with the highest toxicological potential among the evaluated drugs, highlighting the sensitivity of *Daphnia magna* to the exposure tests.

Altogether, these findings demonstrate the presence of certain NSAIDs and provide evidence of ecotoxicological potential under experimental conditions on a specific link in the aquatic organism chain. This highlights the need to strengthen monitoring, regulatory, and environmental education strategies focused on proper medication disposal, as well as to seek strategies for mitigating the impact of NSAIDs on aquatic ecosystems.

1. Introducción

La presencia de compuestos farmacéuticos en el ambiente se ha convertido en un tema de importante relevancia científica en las últimas décadas, particularmente por ser considerados como contaminantes emergentes. Dicho término hace referencia a sustancias que, si bien no se caracterizan por ser nuevas, han sido recientemente detectadas en diferentes matrices ambientales; estos reportes han surgido gracias a los avances de las técnicas analíticas. También el término hace referencia a sustancias cuya presencia en el ambiente y sus efectos no habían sido considerados como un riesgo significativo. Entre estos compuestos se incluyen antibióticos, hormonas, analgésicos, tranquilizantes y fármacos utilizados en tratamientos oncológicos, los cuales han sido detectados en diversos ecosistemas, especialmente en compartimentos acuáticos.

En la actualidad existen múltiples estudios que han evidenciado que los medicamentos se constituyen como una nueva clase de contaminantes ambientales, esto debido a su continua incidencia en el entorno y su persistencia en diferentes medios. La presencia de los medicamentos en el ambiente tiene diferentes fuentes. Una fracción considerable de los fármacos administrados a humanos y animales es excretada sin cambios o como metabolitos activos, confiriendo cierta facilidad para ingresar a los sistemas de alcantarillado. Existen otras vías de contaminación, como la descarga de los residuos provenientes de la industria farmacéutica y la disposición inadecuada de los medicamentos caducos o en desuso. Una vez que estos contaminantes se liberan, pueden infiltrarse en los cuerpos de agua de la superficie o de manera subterránea, alcanzando fuentes destinadas al abastecimiento de agua potable.

La presencia de fármacos en el ambiente plantea riesgos tanto para los ecosistemas como para la salud humana. Se ha reportado efectos adversos en organismo acuáticos los cuales incluyen alteraciones fisiológicas, bioacumulación y toxicidad crónica, incluso en concentraciones traza. Del mismo modo, la continua exposición a estos compuestos puede generar impactos indirectos en la salud de los humanos, derivados de la contaminación de los recursos hídricos. En el contexto actual, resulta fundamental estudiar la distribución, persistencia y efectos de estos contaminantes, específicamente en las matrices acuáticas, las cuales actúan como principales receptores y vías de transporte.

Dentro de los distintos grupos de medicamentos existentes actualmente, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) destacan como uno de los grupos de mayor relevancia desde el punto de vista ambiental. Esto es debido a su amplio consumo a nivel mundial, su constante incidencia en la liberación al ambiente y sus propiedades fisicoquímicas, que favorecen estabilidad y movilidad en sistemas acuáticos. Diversos estudios han logrado comprobar la presencia de AINEs como ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno en agua residuales, ríos y plantas de tratamiento donde en muchos de los casos los procesos convencionales no logran su completa remoción. Adicionalmente, estos compuestos han sido asociados a efectos toxicológicos significativos, lo que los posiciona como uno de los grupos farmacológicos de mayor interés en la evaluación de los riesgos ambientales.

Frente a la problemática que suscita en la actualidad, han surgido estrategias orientadas a reducir el impacto de los fármacos en el ambiente, entre estas se encuentra la ecofarmacovigilancia, esta disciplina evalúa el impacto de la presencia de productos farmacéuticos y sus residuos en el ambiente, protegiendo tanto a los seres humanos como a la fauna de la contaminación de agua y suelo. Sin embargo, la regulación en torno a la presencia de estos contaminantes en el ambiente sigue teniendo limitantes en la mayoría de los países, lo que ha dificultado la implementación de medidas efectivas de control y remediación ante esta problemática. En este sentido, la generación de información científica sólida sobre la presencia y comportamiento de estos compuestos resulta imprescindible para sustentar futuras políticas ambientales.

El estudio de los fármacos como contaminantes emergentes requiere el desarrollo e integración de estrategias y metodologías. Entre estas se encuentran las herramientas de predicción *in silico*, las cuales permiten evaluar los potenciales efectos toxicológicos en organismos; modelos *in vivo*, orientados a la respuesta de los organismos expuestos; y técnicas analíticas avanzadas, como la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), que posibilitan la detección y cuantificación de estos compuestos en matrices ambientales.

En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivos evaluar la presencia y concentración de antiinflamatorios no esteroideos en distintos compartimentos ambientales acuáticos de los municipios de Jiutepec y Temixco, incluyendo aguas residuales y plantas de tratamiento de aguas residuales. A través de este estudio se busca generar información relevante sobre la presencia de estos compuestos en el ambiente, contribuyendo al entendimiento de su distribución y potencial impacto ecotoxicológico, así como al fortalecimiento de las bases científicas necesarias para el desarrollo de estrategias de monitoreo y control de calidad del agua.

2. Antecedentes

2.1. Contaminación ambiental por residuos de fármacos

A la ecofarmacovigilancia se le ha descrito como una disciplina científica y como al conjunto de actividades destinadas a detectar, evaluar, comprender y prevenir los efectos negativos y otros problemas relacionados con la presencia de productos farmacéuticos en el entorno ambiental; que tienen impacto en seres humanos y otras especies animales. A pesar de contar con una definición sólida, la ecofarmacovigilancia aún no ha sido plenamente desarrollada y se encuentra escasamente regulada en la mayoría de los países del mundo (1).

Existen registros que datan de la década de los años 70; no obstante, se sugiere que existen estudios en años anteriores a dicha época. Dichos registros mencionan la existencia de fármacos de prescripción de origen sintético en los entornos terrestres y acuáticos, aunque no suscitó un gran interés en la comunidad científica. No obstante, con el avance en la tecnología analítica, científicos de todo el mundo han remarcado la importancia de la detección de residuos de medicamentos en el ambiente (2).

En la actualidad, esta problemática ha sido abordada por la Unión Europea, los Estados Unidos de América y China, ya que en su marco regulatorio llevan a cabo acciones de monitoreo y evaluación de los efectos de los productos farmacéuticos sobre el ambiente y la salud pública. Los fármacos ya han sido clasificados como contaminantes emergentes debido a su potencial capacidad para causar daños a muy bajas concentraciones (1).

La ausencia de normativas para sustancias con el potencial de ser perjudiciales para el entorno es un problema que afecta a nivel mundial; adicionalmente, de las más de 100 millones de sustancias químicas actualmente catalogadas en bases de datos a nivel global, solo un 0.03 % está sujeta a regulación. En los últimos 15 años, diferentes reportes demuestran que los fármacos representan una nueva clase de contaminantes del ambiente. Estos productos incluyen antibióticos, hormonas, analgésicos, tranquilizantes y los productos de la quimioterapia que son aplicados a los pacientes con cáncer (1 y 3)

La contaminación proviene no solo de las excreciones, con las que una parte importante del fármaco es eliminado del cuerpo sin metabolizarse, sino que proviene también de la fabricación y disposición inadecuada de los residuos de estos productos. Una vez que los medicamentos y sus metabolitos llegan al ambiente se infiltran a varios efluentes acuíferos alcanzando las fuentes de agua potable (3).

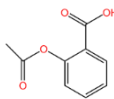
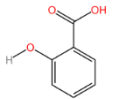
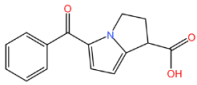
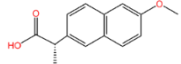
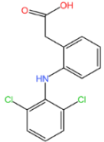
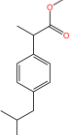
2.1.1. Propiedades fisicoquímicas de fármacos y sus efectos ecotoxicológicos

Para determinar el peligro de una sustancia química en el ambiente se emplean un conjunto de parámetros que evalúan la afinidad que una sustancia tiene para interactuar con los distintos compartimentos, tales como el agua, suelo, aire y los organismos. Dentro de las condiciones que se toman en cuenta a la hora de llevar a cabo el estudio de las sustancias contaminantes se encuentran: las propiedades fisicoquímicas, la partición ambiental, degradación química y biótica, su potencial de acumulación y su toxicidad; este conjunto de características forma parte fundamental de los

estudios de movilidad ambiental de una sustancia. Una mayor movilidad implica un mayor riesgo de que la sustancia se disperse y contamine más áreas en el ambiente (1).

Las propiedades fisicoquímicas de mayor importancia en el ámbito de contaminación ambiental por fármacos son la solubilidad en agua, el coeficiente de partición *n*-octanol/agua (Log P), la presión de vapor y el coeficiente de adsorción (Koc); se ha comprobado que estas propiedades influyen en la capacidad de distribución y desplazamiento del fármaco a través de los distintos compartimentos, a este fenómeno se le conoce como partición o movilidad ambiental de la sustancia. En la tabla 1, se muestran las propiedades fisicoquímicas de algunos AINEs. (1)

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de AINEs.

Nombre del fármaco y estructura química	Fórmula Química	pK _s	Coeficiente de Partición <i>n</i> -octanol / Agua (log P)	Solubilidad en Agua (25°C)	Punto de Fusión	Referencia
Ácido Acetilsalicílico 	C ₉ H ₈ O ₄	3.46	1.19	4.6 mg/mL	135 – 136 °C	4
Ácido Salicílico 	C ₇ H ₆ O ₃	2.97	2.26	2.24 mg/mL	158 °C	5
Ketorolaco 	C ₁₅ H ₁₃ NO ₃	3.84	2.66	0.513 mg/mL	162-165 °C	6
Naproxeno 	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	4.15	3.18	0.0159 mg/mL	152 – 155 °C	7
Diclofenaco 	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	4.15	4.51	0.00237 mg/mL	283 - 285 °C	8
Ibuprofeno 	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	4.91	3.97	21 mg/L	75-77.5 °C	9

La solubilidad en agua es un factor clave en los procesos de degradación por hidrólisis química; en términos químicos, esta propiedad define la capacidad de una sustancia para disolverse en un solvente, formando una solución homogénea, se expresa como la cantidad máxima de soluto que puede disolverse en un solvente específico a una temperatura y presión determinadas. Esta propiedad en los fármacos puede resultar en que aquellos con alta solubilidad en agua tiendan a tener una baja capacidad de acumulación en suelos y organismos vivos. Otro de los factores que influye en la movilidad ambiental es el pK_a , el cual define el grado de ionización de una sustancia a determinado pH. Aplicado al concepto de movilidad ambiental, éste se relaciona con su grado de ionización en diferentes condiciones de pH. Las sustancias ionizadas tienden a ser más solubles en agua y, por lo tanto, más móviles en ambientes acuosos, como ríos o suelos húmedos. En cambio, las formas no ionizadas suelen ser menos solubles en agua, pero pueden ser más solubles en grasas, lo que facilita su adsorción en suelos o su acumulación en organismos.

En general, los compuestos con alto valor de Log P (> 5) tienden a mostrar mayor afinidad por componentes orgánicos. Aplicado al área ambiental, los fármacos con valores elevados suelen adsorberse en los suelos y presentan una mayor probabilidad de acumularse en los seres vivos. En las ciencias ambientales, la tendencia de un compuesto orgánico a ser adsorbido (retenido) por los suelos o sedimentos, es el coeficiente de adsorción (Koc). Una sustancia con un Koc elevado tiende a adsorberse en el suelo, lo que posteriormente implica un alto riesgo de contaminar las aguas superficiales. Tanto el Log P como el Koc muestran la afinidad por componentes orgánicos inertes. Aunado a esta terminología, surgen conceptos como la bioacumulación, la cual se define como la acumulación de sustancias químicas en un organismo a medida que transcurre el tiempo; ocurre cuando un ser vivo ingiere más contaminantes de los que normalmente consume, trayendo consigo un aumento en la concentración en los tejidos. La tabla 2 muestra distintos rangos de Log P y su relación con la bioacumulación y toxicidad ambiental (1).

Tabla 2. Log P, toxicidad y bioacumulación ambiental.

Rango de Log P	Descripción
< 1	Mayor solubilidad en agua que en la fase orgánica, se consideran sustancias menos lipofílicas, por lo tanto, menos propensas a acumularse en tejidos grasos y su toxicidad por bioacumulación se interpreta como baja.
1 – 3	Sustancias con solubilidad moderada, pueden atravesar membranas biológicas y cuentan con baja acumulación en tejidos grasos, se consideran poco letales.
3 – 5	Sustancias lipofílicas que se acumulan en tejidos grasos y atraviesan membranas celulares. Su potencial de bioacumulación es mayor, por lo que deben ser monitoreados.
> 5	Son compuestos lipofílicos lo que les confiere cierta facilidad para acumularse en tejidos grasos lo que los vuelve altamente tóxicos, especialmente si se tiene una exposición prolongada.

2.1.2. Bioconcentración y biomagnificación de fármacos

El factor de bioconcentración (BCF) está relacionado al K_{oc}, este factor está influenciado por varios aspectos, como el tipo de organismo, el nivel de contaminación en su entorno, los órganos y tejidos del organismo (con una mayor concentración en el tejido lipídico) y el tiempo de exposición o la edad del organismo. La bioconcentración se determina al evaluar la acumulación de un fármaco en organismos en comparación con su acumulación en compartimentos no biológicos, como cuerpos de agua, sedimentos y suelo. Los compuestos con altos valores de BCF tienden a bioacumularse en los organismos y pueden amplificarse a lo largo de las cadenas alimenticias, lo que aumenta significativamente su potencial para provocar daño ecológico (1 y 4).

Otro concepto relevante es la biomagnificación, éste se relaciona directamente con el aumento de la concentración de una sustancia a medida que avanza por los distintos niveles tróficos que conforman una cadena alimenticia; cuando un depredador ingiere organismos contaminados con la sustancia química, en este caso los fármacos, se acumulan en su cuerpo y este proceso continúa repitiéndose a niveles más altos. La figura 1, muestra la diferencia entre la bioacumulación y biomagnificación.

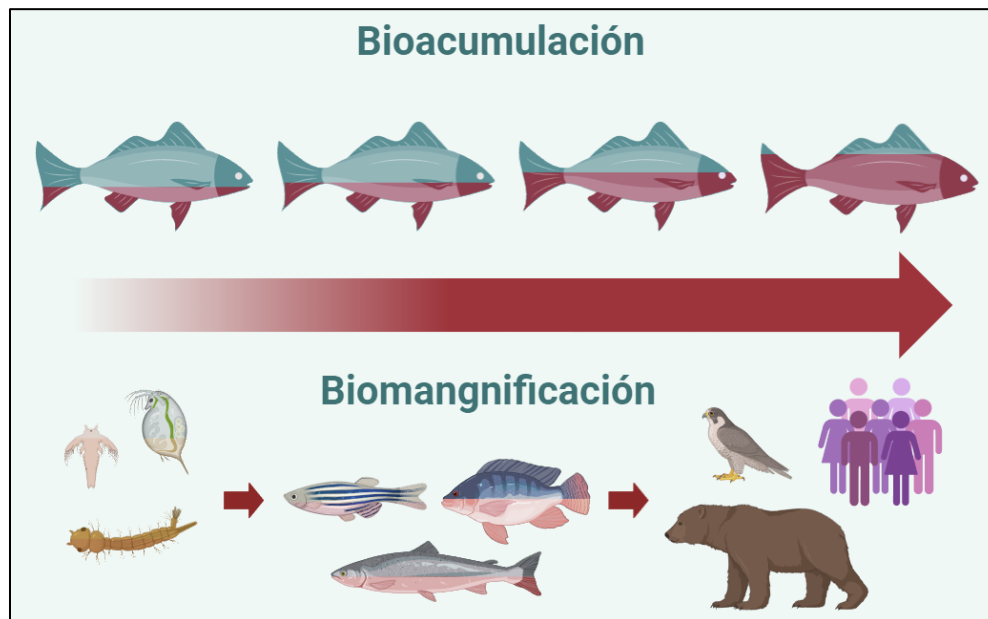


Figura 1. Diferencia entre bioacumulación y bioconcentración, imagen modificada de: Thanapandiyan y Parameswari (10).

2.2. Presencia de contaminantes emergentes a nivel mundial.

La perspectiva global de la problemática de la contaminación por AINEs se encuentra descrita en la tabla 3, se muestran las concentraciones máximas y mínimas reportadas por distintos autores y corresponden a distintos países en donde se tomaron como objeto de estudio muestras acuáticas de ríos, plantas de tratamiento de aguas residuales, plantas de producción de medicamentos, así como hospitales.

Tabla 3. Concentraciones máximas y mínimas reportadas en muestras acuáticas en distintas locaciones a nivel mundial.

Fármaco	Concentración Máxima µg/L	Concentración Mínima µg/L	Ref.
Ácido Acetilsalicílico	1510	1.5	1
	0.66	0.00006	11
Ácido Salicílico	0.664	0.2	12
	3.239	0.0242	13
Diclofenaco	2.4	0.0003	1
	0.0189	0.00583	2 y 14
	2.47	0.258	12
	0.302	0.022	15
	15.033	0.011	16 y 17
	N/D	0.8741	18
	0.114	0.0083	13
Ketorolaco	0.00033	0.00012	19
	0.103	0.00009	11
Naproxeno	31	0.008	1
	4.88	0.049	12
	0.21	0.04	15
	0.5477	0.3201	18
	0.0198	0.0013	13
	0.028	0.00009	11
Paracetamol	78.2	4.3	1
	14.9	0.354	12
Ibuprofeno	2.383	0.002	1
	0.174	0.0575	2 y 14
	2.835	0.184	12
	0.069	0.005	8
	0.063	0.003	16 y 17
	0.063	0.005	16 y 17
	0.00041	0.00015	19
	0.7887	0.3809	18
	0.113	0.0007	13
	0.2	0.00007	11

De los países que forman parte de este compendio, se encuentra Chile, cuya investigación se centró en distintas locaciones del área metropolitana del río Maipo. En Shanghái, China, se reportó la presencia de partículas coloidales de fármacos en muestras de sedimentos presentes en el caudal que ingresa a una planta tratadora de aguas residuales. Los estudios de Brozinski et al. 2013. reportan la presencia de AINEs como diclofenaco, naproxeno ketoprofeno e ibuprofeno en las aguas del lago Haapajärvi ubicado al sureste de Finlandia. Países como Alemania e India también ha sido objeto de estudios de ecotoxicología donde evalúan la exposición humana a productos farmacéuticos a través del agua potable. En la figura 2, se encuentra ubicados los países en donde se realizaron los estudios de detección y cuantificación de AINEs. Por estas razones, el estudio de los efectos a largo plazo debe ser analizado a profundidad para lograr una evaluación objetiva del riesgo al ambiente que produce la disposición inadecuada de un fármaco; esto se logra a partir de ensayos de cuantificación que determinan la toxicidad por medio de la concentración en el medio donde se han acumulado con el paso del tiempo. (11,13,15,17,18)



Figura 2. Países que reportan concentraciones de AINEs en muestras acuáticas.

2.2.1. Contexto nacional de la contaminación por AINEs

Una vez conocida la perspectiva global de la problemática, es importante abordar los problemas que acontecen en territorio nacional, ya que en México los medicamentos se encuentran categorizados como contaminantes de potencial importancia en función de sus volúmenes de uso, interés toxicológico, sus mecanismos de acción y su relevancia para la salud pública; la figura 3, resume los estudios realizados en territorio nacional. (1)

En un estudio realizado en 2013 por Moreno-Ortiz y colaboradores se menciona a los medicamentos de receta de origen sintético como uno de los principales contaminantes de mantos acuíferos, esta información enfatiza en el desarrollo y optimización de métodos analíticos empleados para la detección y evaluación del riesgo en el ambiente tanto de medicamentos como de sus productos de

degradación (metabolitos), además menciona la importancia de tomar acciones que enriquezcan las prácticas de ecofarmacovigilancia en México. (2)

Para determinar la magnitud de la problemática se toma en cuenta la información sobre la incidencia de fármacos en el ambiente. Los reportes que existen en la actualidad proporcionan una perspectiva orientada a los efectos tóxicos, especialmente en aquellos que inducen una toxicidad aguda, los cuales han sido estudiados a través de métodos estandarizados aplicados a organismos acuáticos. Esto se debe a que el compartimento ambiental acuífero es el más estudiado en términos de exposición ambiental y potencial tóxico. (1)

Entre los reportes sobre la contaminación por fármacos en México se destaca el trabajo realizado por J. Siemens y colaboradores, esta investigación determinó la presencia de 11 productos farmacéuticos en la Ciudad de México, específicamente en el Valle de Mezquital, destacando a naproxeno, ibuprofeno y diclofenaco en concentraciones mayores a 1 µg/L, las cuales se consideran de riesgo ambiental según la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA)(20).

Un estudio realizado en las aguas superficiales y subterráneas de la Ciudad de México evaluó la incidencia y distribución de micro contaminantes orgánicos. En las aguas subterráneas, los rangos de concentración de los compuestos más comunes, como el ácido salicílico, 4-nonilfenol (4-NP) y di-2-etilhexilftalato (DEHP), oscilaron entre 1-464, 1-47 y 19-232 ng/L, respectivamente. Por otro lado, en las aguas superficiales, estos rangos fueron de 29-309, 89-655 y 75-2282 ng/L, respectivamente. En este mismo estudio también se destaca la presencia de AINEs como diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, ketoprofeno, fármacos que también contribuyen a la contaminación de pozos presas y estanques (21).

En el estado de Hidalgo, se encuentra un estudio realizado específicamente en el Valle de Tula, donde se utiliza agua residual sin tratar para riego, se han identificado en el suelo diversos fármacos, incluidos el ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y carbamazepina. Esta última destaca por su alta persistencia y movilidad, características que incrementan significativamente su capacidad de contaminar aguas subterráneas a través del suelo (22).

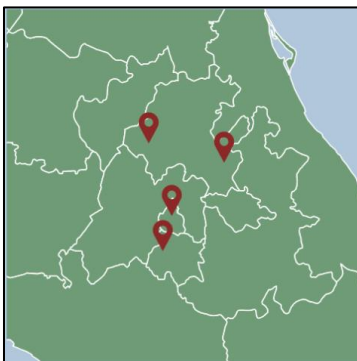


Figura 3. Regiones de México donde se ha reportado la presencia de fármacos en mantos acuíferos.

Por último, se encuentra el estudio que realizó Rivera-Jaimes et al. 2018. El cual describe el primer estudio conocido sobre la presencia de fármacos en aguas superficiales y residuales de Cuernavaca, la capital del estado de Morelos en México. Este estudio tuvo como objetivos principales, implementar un método preciso de extracción en fase sólida (SPE) y detección por cromatografía líquida acoplada a un espectro de masas en tándem (LC-MS/MS) para analizar 35 fármacos en aguas superficiales y residuales; y la comparación entre las concentraciones detectadas con los datos de estudios previos realizados en México y a nivel global, y por último, evaluar el riesgo ecotoxicológico que estos fármacos podrían representar para los ecosistemas acuáticos locales (12).

A nivel local, el estado de Morelos presenta escenarios críticos que ejemplifican la problemática suscitada a nivel global, particularmente en los municipios de Jiutepec y Temixco. Por un lado, Jiutepec forma parte de la Ciudad Industrial del Valle de Cuernavaca (CIVAC), uno de los asentamientos de desarrollo industrial farmacéutico más importantes de la región, lo que incrementa el riesgo de descargas de efluentes con residuos farmacéuticos. Por otra parte, Temixco ha experimentado una creciente urbanización en los últimos años, lo que se traduce en una mayor densidad poblacional que trae consigo un incremento sustancial en el consumo y desecho de medicamentos a nivel doméstico. Ambos escenarios, combinados con la infraestructura de tratamiento de aguas existente, justifican la selección de estas zonas como un modelo de estudio para evaluar la transferencia de contaminantes emergentes desde fuentes industriales y urbanas hacia cuerpos de agua.

2.2.2. Hidrografía del estado de Morelos

Desde el punto de vista hidrológico el Estado de Morelos pertenece en su mayoría a la Región Hidrológica del Balsas, cuyos ríos principales son Apatlaco, Yautepec, Cuautla, Tembembe-Amacuzac y Chalma/Coatlán. Dentro de esta región se localiza la subcuenca del río Apatlaco, esta nace como cauce en el Manantial Chapultepec dentro de la ciudad de Cuernavaca desembocando en el río Yautepec; su longitud en Morelos es de aproximadamente 63 km. Dentro de la red de barrancas urbanas se encuentran las barrancas de Amanalco, Analco, Chapultepec y Tetela-San Pedro, entre otras; estas funcionan como conductos naturales de escurrimiento que conectan manantiales y afluentes con el río Apatlaco (23).

El municipio de Jiutepec se asienta en el tramo medio del río Apatlaco. En esta zona confluyen arroyos, barrancas urbanas y descargas pluviales hacia el cauce; con el paso de los años la subcuenca ha sufrido un proceso de urbanización asociado a la instalación de la Ciudad Industrial del Valle de Cuernavaca (CIVAC). Dentro de esta zona se encuentran canales, plantas de tratamiento de aguas residuales y colectores pluviales que drenan hacia el río Apatlaco.

La elección de los municipios de Jiutepec y Temixco como zonas de estudio, responde a la estrecha relación que existe entre su configuración hidrológica natural y las presiones antropogénicas que experimentan. Ambos municipios se encuentran vinculados a la subcuenca del río Apatlaco, un cuerpo de agua que funciona como receptor crítico que atraviesa áreas de alta densidad poblacional e industrial. La convergencia de aportes industriales y urbanos en el tramo medio de la subcuenca, sumada a la marcada estacionalidad de la región, donde la época de secas reduce el caudal y maximiza la concentración de contaminantes, convierte a esta región en un modelo de estudio

idóneo y prioritario para evaluar la dinámica, persistencia e impacto ambiental de los fármacos en ecosistemas acuáticos vulnerables.

2.2.3. Meteorología del Estado de Morelos

El Estado de Morelos presenta principalmente un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano, aunque por su relieve (Sierra del Chichinautzin, Altiplano de Cuernavaca, Valle de Yautepec y zona sur) también existen climas templados y semisecos. La temperatura media anual oscila entre 20 y 28 °C, con máximos de hasta 35 °C en el sur (principalmente en la zona de Jojutla, Puente de Ixtla) y valores menores a 18 °C en las zonas altas (como Huitzilac, y las lagunas de Zempoala). El periodo de lluvias se presenta durante el verano, comprendiendo los meses de junio a septiembre, llegando a alcanzar una precipitación media anual de aproximadamente 1.045 mm. La meteorología y la marcada estacionalidad en Morelos influyen de manera directa en la calidad y cantidad del agua disponible, generando variaciones significativas a lo largo del año. Durante la temporada de lluvias, los ríos y barrancas, como el Apatlaco, presentan un notable incremento en su caudal, lo que favorece la dilución de contaminantes y el arrastre de sólidos suspendidos; sin embargo, en la época de secas el caudal disminuye y con ello se incrementa la concentración de contaminantes en el agua. A esta dinámica natural se suman las descargas urbanas e industriales. En periodos de tormentas, especialmente en zonas como Cuernavaca y CIVAC, los colectores pluviales pueden generar descargas combinadas de aguas residuales y pluviales, alterando los parámetros de calidad del agua, mientras que en la temporada seca se visibiliza con mayor claridad el efecto de las descargas puntuales, tanto domésticas como industriales (23).

2.3. Métodos de evaluación y cuantificación de fármacos.

La determinación de la concentración de distintos residuos de fármacos y sus metabolitos presentes en distintos compartimentos ambientales requiere el desarrollo de métodos analíticos capaces de lograr la cuantificación simultánea de diferentes grupos terapéuticos, así como lograr su extracción y análisis a partir de matrices complejas como las aguas residuales.

Dentro del ambiente farmacéutico, se han desarrollado distintos métodos analíticos para la cuantificación de fármacos contenidos en distintas formulaciones con una amplia variedad de vehículos y excipientes. Su cuantificación en este tipo de matrices se encuentra descrita en los métodos compendiales farmacopéicos, los cuales se mencionan a continuación.

2.3.1. Métodos compendiales farmacopéicos

Los métodos compendiales farmacopéicos son procedimientos oficiales y estandarizados que se describen en farmacopeas reconocidas internacionalmente, como la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la Farmacopea Europea (EP) o la Farmacopea Mexicana (FEUM). Estos métodos son fundamentales para el análisis y control de calidad de productos farmacéuticos, materias primas y medicamentos. Su función es asegurar que los productos cumplan con los estándares de identidad, pureza, potencia y calidad necesarios para su seguridad y eficacia en su administración. Estos métodos son la base del control de calidad en la industria farmacéutica, brindando una evaluación estandarizada y confiable de los productos. Además, la inclusión en farmacopeas oficiales implica que son metodologías validadas y aprobadas por organismos regulatorios, lo cual asegura su robustez y su aplicación universal en la industria.

Algunos de los métodos compendiales más relevantes incluyen:

1. **Ensayos de Identificación:** Estos ensayos permiten verificar que el compuesto activo en un producto farmacéutico es el correcto, asegurando la identidad del ingrediente activo. Comúnmente emplean técnicas como espectroscopia, cromatografía o reacciones químicas específicas (Tabla 4).
2. **Ensayos de Pureza:** Su objetivo es determinar la presencia de impurezas o contaminantes en el producto final o en las materias primas. Para ello, se utilizan técnicas analíticas avanzadas como la cromatografía de gases (CG), la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y la espectrometría de masas, que permiten cuantificar y caracterizar posibles impurezas.
3. **Ensayos de Potencia:** Son pruebas cuantitativas que miden la concentración del ingrediente activo en el producto, con el fin de asegurar que se encuentra dentro de los límites establecidos en la farmacopea y cumple con la dosis terapéutica adecuada.
4. **Pruebas de Disolución y Liberación:** Evalúan la forma en que el ingrediente activo se disuelve o libera en el organismo tras la administración, lo cual es esencial para asegurar su biodisponibilidad y, en consecuencia, su eficacia clínica.
5. **Pruebas de Esterilidad:** Son especialmente críticas en productos parenterales, oftálmicos y en aquellos que requieren ser administrados en ambientes donde la presencia de microorganismos es inaceptable. Estas pruebas garantizan la ausencia de microorganismos viables, asegurando la esterilidad del producto.
6. **Pruebas de Características Fisicoquímicas:** Evalúan parámetros como el pH, la viscosidad y la densidad, los cuales influyen directamente en la estabilidad, eficacia y seguridad del producto farmacéutico.

2.3.2. Métodos compendiales para la cuantificación de AINEs.

La tabla 4 muestra un resumen de las condiciones cromatográficas indicadas para la cuantificación de AINEs (ácido acetil salicílico, ácido salicílico, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y ketorolaco) por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) de acuerdo con las especificaciones de la farmacopea de los Estados Unidos.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la valoración de AINEs según la USP 2014.

Nombre del fármaco	Fase Móvil		Diluyente	Columna Cromatográfica y Dimensiones	Volumen de Inyección (μL)	Longitud de onda (λ)
	F. Orgánica	F. Acuosa				
Ácido Acetil Salicílico	Acetonitrilo (85)	Agua (15)	Acetonitrilo + Ácido Fórmico (99:1)	4.0 mm x 30 cm, (C18)	10	280 nm
	pH ajustado a 3.4 + AAG					
Ácido Salicílico	Metanol (25)	Agua (75) + AAG	Metanol + Agua + ACG (70:30:4)	4.6 mm x 10 cm, (C18)	5	270 nm
Ibuprofeno	Acetonitrilo (60)	Agua + Ácido cloro acético (40)	Acetonitrilo	4.6 mm x 25 cm, (C18)	5	254 nm
	pH de 3.0 ajustado con hidróxido de amonio.					
Naproxeno	Acetonitrilo (50)	Agua y AAG (49:1)	Agua	4.6 mm x 15 cm, (C18)	20	254 nm
Diclofenaco Sódico Liberación Prolongada	Metanol (70)	Solución amortiguadora de Ácido Fosfórico 0.01 ajustada a pH 2.5 (30)	Metanol y agua (70:30)	4.6 mm x 25 cm, (C8)	10	254 nm
Ketorolaco	Acetonitrilo (30)	Solución Buffer de fosfato de sodio o ácido fosfórico (70)	Acetonitrilo + Agua	150 mm x 4.6 cm, (C18)	20	113 nm

(n): Proporción correspondiente al compuesto en disolución en porcentaje.

AAG: Ácido Acético Glacial.

C8: Octilsilano.

C18: Octadecilsilano.

2.3.3. Desarrollo de métodos analíticos no compendiales para la cuantificación de AINEs.

La validación de métodos no compendiales en el análisis de cuantificación de medicamentos se considera un proceso imprescindible para el aseguramiento de la confiabilidad, precisión y exactitud de los métodos desarrollados fuera del estándar y normativas que establecen las farmacopeas. Dentro de este proceso se lleva a cabo la evaluación de parámetros como la especificidad, linealidad exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, robustez y estabilidad.

La validación es un proceso esencial el cual garantiza que los resultados obtenidos sean reproducibles y adecuados para la toma de decisiones regulatorias, industriales o de investigación. Esto es especialmente importante en casos donde no existen métodos compendiales para determinados compuestos o formulaciones presentes en matrices analíticas complejas.

Innumerables investigaciones se han caracterizado por el desarrollo y validación de sus propios métodos cuyos medios para el análisis se basan en el uso del CLAR o CG. Un estudio realizado para identificar la prevalencia de fármacos en aguas superficiales y residuales de Pakistán implementó un proceso de validación para detectar diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol. Se emplearon estándares de referencia de cada sustancia y se prepararon curvas de calibración a diferentes concentraciones, logrando coeficientes de determinación (R^2) de 0.99 para garantizar precisión en

los resultados. Las muestras fueron procesadas mediante extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos de equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) y filtración con fibra de vidrio, asegurando una adecuada concentración y purificación de los compuestos antes de su análisis (24).

Para la detección y cuantificación de los fármacos, se utilizó cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), con un sistema Agilent 1200 y un espectrómetro Agilent 6460, empleando ionización por electrospray (ESI). El análisis incluyó una columna C18 y un método de elución en gradiente con fases móviles que combinaban agua desionizada y acetonitrilo, ambas con 0.1 % de ácido fórmico. Este enfoque altamente sensible y específico permitió identificar los compuestos seleccionados a niveles de traza en las muestras de agua (24).

El método desarrollado por Ascar et al. 2013, se estructuró con la finalidad de detectar AINEs en muestras de agua por CLAR acoplada a un detector con arreglo de diodos (DAD). Las muestras se procesaron mediante extracción en fase sólida con cartuchos Oasis HLB, utilizando una columna Atlantis C18 y detección UV-Vis a 220 nm. La fase móvil fue una mezcla isocrática de acetonitrilo y fosfato de potasio (50 mmol L⁻¹, pH 4.2) en proporción 50:50, con un flujo de 1 mL/min. Los límites de detección oscilaron entre 5.8 y 35.4 µg/L, con porcentajes de recobro del 84% al 100% y alta repetibilidad (recobro > 81% y desviaciones estándar <14%). Las muestras, recolectadas del río Maipo y una planta de tratamiento en la Región Metropolitana de Chile, permitieron la detección eficaz de compuestos como naproxeno e ibuprofeno. Este método comprobó ser sensible y confiable para evaluar la contaminación en el ambiente (18).

Por último, un estudio realizado para determinar la presencia de AINEs en ríos de la India, desarrollado por Shanmugam et al. 2014, el cual se caracterizó por la incorporación de un sistema de enriquecimiento de muestras de aguas a través de estándares de fármacos seguido de una extracción en fase sólida, esto con la finalidad de concentrar y purificar los analitos. Se evaluaron parámetros como recobro, precisión y límite de detección, con porcentajes de recobro que se encontraban en un rango de entre 70.4 % y 120 % en matrices de agua. El método analítico utilizado fue la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). (15). Las muestras fueron recolectadas de diversos puntos de cuerpos de agua, como ríos y plantas de tratamiento de aguas residuales. En el caso de los ríos Kaveri, Vellar y Tamiraparani en India, se seleccionaron 27 sitios estratégicos. Los resultados revelaron concentraciones significativas, especialmente de ácido acetilsalicílico de 151 hasta 515 ng/l, lo que resalta la repercusión de las descargas directas de residuos no tratados (11).

El desarrollo de métodos no compendiales para la detección y cuantificación de fármacos en aguas residuales mediante CLAR representa un avance fundamental para identificar la presencia de contaminantes emergentes y evaluar su posible impacto en los ecosistemas acuáticos. Estos procedimientos permiten obtener datos precisos sobre la concentración de compuestos farmacéuticos en matrices ambientales complejas, lo que constituye la base para realizar una valoración más confiable del riesgo ecotoxicológico.

3. Ensayos toxicológicos *in silico*

En complemento, los ensayos de predicción *in silico* se posicionan como herramientas clave para anticipar efectos tóxicos y ambientales de las moléculas, reduciendo tiempos y costos en comparación con estudios tradicionales. La integración de estas estrategias, tanto analíticas como computacionales, resulta esencial no solo para la vigilancia ambiental, sino también para considerarse en fases tempranas del desarrollo de un medicamento, fomentando prácticas de diseño más sostenibles y responsables con el entorno. Los estudios *in silico* forman parte de la disciplina conocida como biología computacional; este término se les atribuye a los descubrimientos científicos enfocados a procesos biológicos que se realizan mediante la simulación a través del uso de un software asistido por computadora. A medida que se han incrementado los avances en la tecnología informática y la capacidad de procesamiento en los últimos años, la escala de aplicación de estos proyectos se ha expandido de manera significativa (25,26).

La toxicología *in silico* tiene como objetivo predecir riesgos, como la mutagenicidad y toxicidad orgánica. La aplicabilidad de estos modelos se extiende desde las fases iniciales del desarrollo de fármacos hasta la evaluación de riesgos en situaciones críticas en las que los ensayos *in vitro* o *in vivo* no son viables. De este modo, la toxicología *in silico* facilita la toma de decisiones oportunas en escenarios donde los tiempos y recursos son limitados, proporcionando un enfoque eficiente y alternativo para la evaluación de riesgos (27).

La aplicación de esta tecnología dentro del ámbito farmacéutico ha desarrollado diferentes vertientes como la predicción de la eficacia de posibles moléculas con efecto terapéutico y el desarrollo de perfiles de comportamiento farmacocinético los cuales evalúan cada paso, partiendo desde su absorción, distribución, metabolismo y eliminación (25).

En el contexto de la evaluación ambiental, los métodos *in silico* han ganado popularidad como herramientas complementarias a los ensayos tradicionales. Estos enfoques emplean modelos computacionales y simulaciones para predecir los efectos de un compuesto químico sobre el ambiente, reduciendo así la necesidad de pruebas en organismos vivos.

La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) establece que los estudios toxicológicos son imprescindibles para evaluar el impacto ambiental de los productos farmacéuticos, estos forman parte del enfoque de "Evaluación del Riesgo Ambiental" (Environmental Risk Assessment, ERA). Si bien los métodos *in silico* pueden no estar mencionados de manera directa, podrían formar parte de la estrategia de evaluación general si proporcionan datos confiables y relevantes para la evaluación de riesgo ambiental (28).

La implementación de estos ensayos está considerada en la etapa inicial de evaluación, también conocida como fase 1; en esta, los modelos *in silico* ayudan a determinar la exposición ambiental potencial del compuesto, permitiendo la identificación temprana de riesgos sin recurrir a pruebas extensivas en el laboratorio o el campo. De esta manera, las evaluaciones *in silico* no solo apoyan el cumplimiento regulatorio, sino también el principio de las 3 Rs (reduction, refinement, and

replacement) el cual se traduce como reducción, perfeccionamiento y sustitución de estudios seguros en animales (27).

3.1. Biosimulación predictiva: Cuantificación *In silico*

La biosimulación predictiva es una disciplina relativamente nueva, que utiliza métodos avanzados de la investigación para describir y analizar sistemas biológicos mediante modelos químicos y computacionales. Los programas para ensayos de predicción de toxicidad *in silico* son herramientas que evalúan el riesgo tóxico de compuestos químicos sin necesidad de pruebas directas en organismos. Para calcular variables como la toxicidad aguda, la mutagenicidad, los efectos ecotoxicológicos y la carcinogenicidad, emplean modelos matemáticos, algoritmos de inteligencia artificial y datos experimentales de ensayos anteriores; además, facilitan el análisis de diversos compuestos en menos tiempo y a un costo reducido. Asimismo, colaboran con regulaciones que fomentan la disminución el uso de animales en la investigación. Estas plataformas ofrecen predicciones preliminares y un mejor manejo del riesgo químico, lo que las complementa con los métodos analíticos y biológicos. Algunos ejemplos utilizados para este proyecto se mencionan a continuación. (29).

VEGA HUB es una plataforma *in silico* que utiliza modelos QSAR (relación cuantitativa estructura-actividad) para predecir propiedades toxicológicas, ecotoxicológicas y fisicoquímicas de sustancias químicas a partir de su estructura molecular. Integra modelos validados científicamente y proporciona indicadores de confiabilidad como el dominio de aplicabilidad, lo que permite interpretar los resultados con mayor certeza. Es una herramienta útil para la investigación ambiental y la evaluación preliminar del riesgo químico en el desarrollo de nuevos fármacos (30).

preADMET es una plataforma *in silico* que utiliza modelos QSAR para predecir propiedades ADME/Tox y riesgos biológicos de compuestos químicos a partir de su estructura molecular. Permite estimar toxicidad aguda, mutagenicidad, carcinogenicidad y toxicidad acuática antes de realizar ensayos experimentales, reduciendo tiempos, costos y el uso de organismos de prueba. Es una herramienta útil para apoyar la selección temprana de fármacos y la evaluación de riesgos ambientales y sanitarios (31).

La plataforma admetSAR 3.0 es una herramienta de predicción *in silico* que estudia las propiedades ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) en compuestos químicos, fue diseñada para brindar apoyo en el desarrollo de fármacos y la evaluación de riesgos ambientales y toxicológicos. Fue desarrollada por el Laboratorio de Modelado Molecular y Diseño de la Universidad de Ciencia y Tecnología del Este de China, incorpora más de 370,000 datos de más de 100,000 compuestos relacionados con propiedades ADMET. Para realizar predicciones, admetSAR 3.0 utiliza un sistema multitarea llamado CLMGraph, lo cual le permite analizar perfiles químicos a través de datos estructurales y propiedades fisicoquímicas de los compuestos. En términos de evaluación de riesgo ambiental, la herramienta cuenta con puntos específicos que permiten estimar el potencial impacto ambiental los fármacos, utilizando bases de datos y modelos predictivos validados para realizar estas evaluaciones de manera consistente y precisa. En la actualidad es considerado un recurso imprescindible para investigaciones que buscan minimizar el uso de pruebas en animales, en línea con el desarrollo de métodos de toxicología computacional y el avance hacia la reducción de experimentación *in vivo* en etapas tempranas del desarrollo de fármacos (31,32).

4. Ensayos toxicológicos *in vivo*

Dentro del área de la toxicología se han desarrollado modelos que permiten evaluar el potencial tóxico de distintos compuestos químicos. Las metodologías empleadas consideran su evaluación en especies de tres niveles tróficos, por ejemplo: *Chlorella vulgaris* (Productores primarios), *Daphnia magna* (Invertebrados) y *Oryzias latipes* (Depredadores).

4.1. *Daphnia magna* como modelo de ensayos ecotoxicológicos *in vivo*

Se ha comprobado que los medicamentos tienen la capacidad de llegar al entorno acuático a través de diferentes vías, como los desechos de hospitales y domésticos donde permanecen biológicamente activos dentro del espacio ambiental y cuya presencia afecta a organismos no objetivo. La creciente amenaza ecológica que representa la contaminación por fármacos a incentivado el desarrollo de modelos *in vivo* que permitan el análisis detallado de los efectos sobre las especies nativas (33).

La implementación de *Daphnia magna* como modelo biológico en estudios ecotoxicológicos resulta de gran relevancia debido a su alta sensibilidad a contaminantes y a su papel ecológico como organismo clave en la cadena trófica acuática. Es un crustáceo del suborden Cladóceras que mide alrededor de 1 a 1.5 mm de longitud los neonatos, y de 4 mm a 6 mm los adultos (ambos, visibles a simple vista). Es un representante importante de las comunidades dulceacuícolas con gran sensibilidad a una amplia gama de compuestos tóxicos, siendo ésta una de las características principales para que sea usado internacionalmente en pruebas de toxicidad. Asimismo, su ciclo de vida corto y fácil cultivo en laboratorio, permite realizar pruebas rápidas y económicas (34).

Daphnia se caracteriza por su modo de reproducción sexual o asexual (figura 4). En condiciones favorables, experimenta partenogénesis cíclica. Las hembras producen nidadas de huevos partenogenéticos tras cada muda adulta, en condiciones favorables. Los huevos se desarrollan en la cámara de cría situada bajo el caparazón, donde permanecen unos 3 días antes de que la madre libere a las crías. A 20 °C, los embriones eclosionan en aproximadamente 1 día y las juveniles pasan por 4 a 6 estadios antes de producir su primera nidada, lo que ocurre entre los 5 y 10 días. Una hembra adulta puede generar nidadas cada 3 a 4 días hasta su muerte, con una longevidad de más de 2 meses en condiciones de laboratorio. El número de huevos por nidada varía entre especies, desde 1 hasta más de 100 en *D. magna* (35).

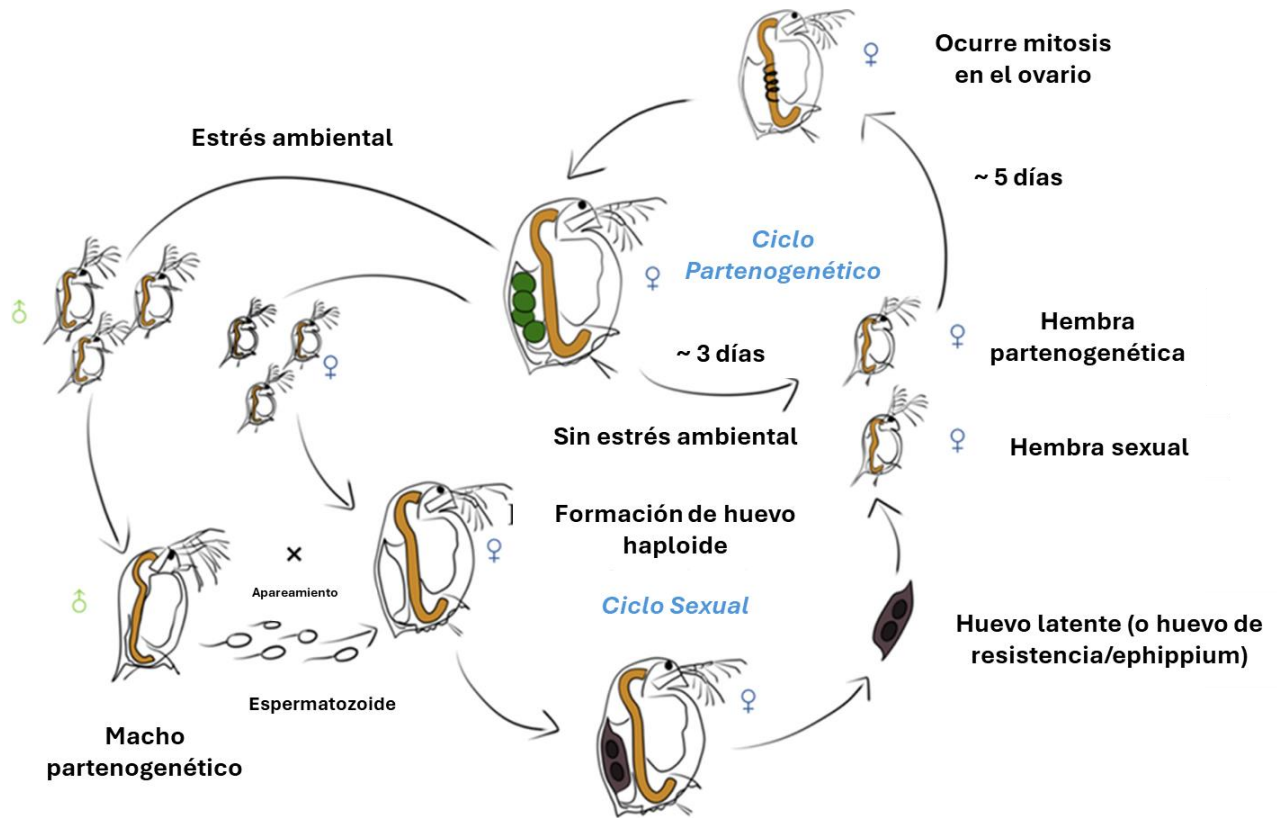


Figura 4. Ciclo reproductivo de la *Daphnia magna*

(tomada de: Guo J et al. 2023)(36)

Daphnia presenta 10 pares de apéndices, 5 extremidades torácicas y un par de garras abdominales. Su cuerpo está recubierto por un caparazón quitinoso transparente que puede tornarse rojizo por hemoglobina. A través de este caparazón se observan extremidades con setas que facilitan la alimentación y la respiración, generando corrientes de agua que dirigen partículas hacia la boca. Las mandíbulas procesan mecánicamente el alimento. Su rasgo más característico es un gran ojo compuesto y dos pares de antenas ramificadas usadas en la locomoción (Figura 5) (37).

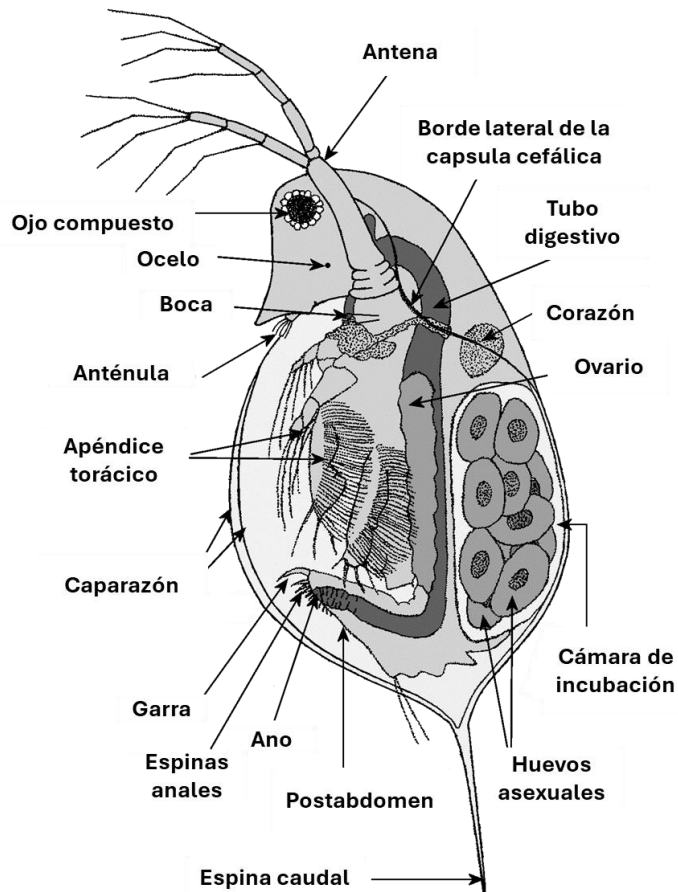


Figura 5. Representación de la anatomía interna y externa de la pulga de agua.

(tomada de Antunes SC et al 2017)(38)

Este microcrustáceo permite evaluar los efectos tóxicos agudos y crónicos de diversos fármacos presentes en cuerpos de agua, aportando datos fundamentales sobre la concentración letal y los posibles impactos en poblaciones acuáticas. Además, está estandarizado en guías internacionales, un ejemplo de ello es la NMX-AA-087-SCFI-2010 que establece el método para la medición de toxicidad aguda, utilizando al organismo dulceacuícola *Daphnia magna*, Straus 1820 (Crustacea – Cladóceras).

Este método se basa en la medición de la toxicidad aguda, mediante la definición de la concentración letal media (CL_{50}), donde la respuesta que se evalúa es la ausencia de movilidad o muerte, bajo condiciones de exposición controlada de *D. magna* durante 48 h, la prueba se realiza en neonatos con menos de 24 horas de edad. lo que facilita la comparación de resultados entre estudios y refuerza su valor como herramienta para la vigilancia ambiental y la estimación del riesgo ecotoxicológico asociado a contaminantes farmacéuticos.

5. Justificación

A nivel mundial se ha reportado la presencia de residuos de Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFAS) en aguas, mostrando efectos negativos sobre ecosistemas; incluso a concentraciones bajas. En México, hay una incipiente preocupación por el tema y escasa investigación sobre sus efectos toxicológicos. Este proyecto plantea cuantificar IFAS de administración común, como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), que por el uso y manejo residual a nivel doméstico e industrial pudieran estar presentes en los compartimentos ambientales de aguas; incluyendo aguas residuales, ríos y plantas de tratamiento de aguas residuales. Este estudio se suma al esfuerzo de brindar información sobre la evaluación de la presencia de residuos de AINEs que alcanzan los distintos compartimentos ambientales y a qué concentraciones en el municipio de Jiutepec y Temixco. El desarrollo de un método analítico por CLAR para la cuantificación de estos compuestos en aguas residuales resulta esencial para conocer sus concentraciones reales en el ambiente y establecer las fuentes principales de exposición. Este mismo método analítico, a su vez, puede ser empleado en la cuantificación de este tipo de fármacos y sus efectos en modelos de evaluación de ecotoxicidad aguda y crónica. Uno de los modelos biológicos empleados es *Daphnia magna* ya que permite evaluar de manera directa la toxicidad aguda en un organismo sensible y representativo de los ecosistemas acuáticos, aportando evidencia experimental sobre los posibles riesgos. Finalmente, la incorporación de ensayos *in silico* de toxicidad amplía la capacidad de predicción toxicológica, al estimar efectos en distintos niveles tróficos. La estrategia experimental aplicada proporciona de una visión integral de la problemática la cual sustenta la evaluación del impacto ambiental de los AINEs y contribuye al fortalecimiento de la vigilancia ambiental y la gestión de riesgos ecológicos.

6. Objetivo general:

Evaluar la presencia y concentración de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), en distintos compartimentos ambientales de agua en el municipio de Jiutepec y Temixco, incluyendo aguas residuales y plantas de tratamiento de aguas residuales, mediante un enfoque integrado que comprenda el monitoreo ambiental, análisis predictivos *in silico* y ensayos de toxicidad aguda *in vivo*.

6.1. Objetivos específicos:

1. Evaluar los principales grupos de medicamentos con potencial probabilidad de persistir como contaminantes emergentes del ambiente, aplicando una encuesta sobre las prácticas de disposición final de medicamentos caducos en Cuernavaca.
2. Calcular el valor predictivo del riesgo de impacto ambiental de los AINEs *in silico* sobre especies acuáticas de tres niveles tróficos: algas, invertebrados y peces.
3. Desarrollar y validar métodos analíticos (CLAR – UV/Vis) para la cuantificación de AINEs.
4. Cuantificar AINEs en muestras acuáticas de distintos puntos de muestreo de la zona industrial del municipio de Jiutepec y el municipio de Temixco.
5. Implementar un modelo *in vivo* a partir de *Daphnia magna* para la evaluación de toxicidad aguda de AINEs y determinar las CL₅₀ mediante análisis probit.

7. Hipótesis

El presente estudio aborda dos niveles de análisis, la presencia y posible origen de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en cuerpos de agua y, por otro lado, su efecto eco-toxicológico sobre organismos bioindicadores. Se plantean dos hipótesis de investigación independientes, cada una alineada con sus respectivas variables y estrategias metodológicas.

Hipótesis 1: Debido a las deficiencias en las prácticas de disposición final y alto consumo reportado por la población, se espera encontrar una presencia cuantificable de AINEs en las muestras acuáticas ambientales recolectadas en los municipios de Jiutepec y Temixco, caracterizando un escenario de contaminación emergente a nivel local.

Hipótesis 2: El incremento en la concentración de los AINEs en los medios de exposición preparados en laboratorio produce un aumento significativo en la mortalidad de *Daphnia magna*, estableciendo una relación entre la concentración y la respuesta la cual que permite la determinación de la concentración letal media (CL₅₀).

8. Metodología

8.1. Materiales y reactivos

La siguiente tabla muestra los materiales y reactivos que se emplearon para la elaboración de soluciones para el desarrollo del método analítico de cuantificación.

Tabla 5. Materiales y reactivos empleados en el desarrollo del método analítico de cuantificación.

Materiales	Reactivos
• Matraz aforado 10 mL • Frascos SCOTCH 500 mL • Espátula • Vasos de precipitado 250 mL • Vasos de precipitado 100 mL • Vasos de precipitado 50 mL • Tubos Falcon 10 mL • Gradilla para tubos de ensayo • Papel Parafilm • Vortex • Micropipeta de 100 a 1000 µL	• Acetonitrilo grado CLAR • Metanol grado CLAR • Ácido Fosfórico pureza del 95 % • Agua destilada Estándares internos de fármacos: a) Ácido salicílico b) Ketorolaco c) Naproxeno sódico d) Diclofenaco ácido e) Ibuprofeno

8.2. Preparación de soluciones

8.2.1. Preparación de soluciones stock de los cinco compuestos (1000 µg/mL):

Se pesaron 10 mg de cada compuesto en una balanza analítica y se disolvieron en un volumen de 10 mL de metanol, empleado agitación a través de un vortex para su completa disolución (Tabla 6).

Tabla 6. Preparación de soluciones stock

Stock	Peso (mg)	Vol. Aforo (mL)	Concentración (µg/ml)
Ibuprofeno	10	10	1000
Diclofenaco			
Naproxeno			
Ácido Salicílico			
Ketorolaco			

8.2.2. Preparación de soluciones de trabajo (100 µg/ mL): Se tomó 1 mL de la solución stock y se diluyó con metanol en un matraz aforado de un volumen de 10 mL.

8.2.3. Preparación de diluciones (10 µg/ mL): De la solución de trabajo se tomó 1 mL y se diluyó con metanol en un matraz aforado de un volumen de 10 mL.

8.2.4. Preparación de soluciones de trabajo (200 µg/ mL): Se tomaron 2 mL de la solución stock de naproxeno, ácido salicílico y ketorolaco, respectivamente, y se diluyeron con metanol en un matraz aforado de un volumen de 10 mL (tabla 7).

Tabla 7. Preparación de la solución de trabajo de 200 µg/mL

Primera solución de trabajo	Vol. De la solución Stock (mL)	Vol. Aforo (mL)	Concentración (µg/ml)
Naproxeno	2	10	200
Ácido Salicílico			
Ketorolaco			

8.2.5. Preparación de solución de trabajo de mezcla de AINEs (50 µg/mL y 10 µg/mL): Se tomaron 0.5 mL del stock (1000 µg/mL) de ibuprofeno y diclofenaco; a esta solución se le adicionaron 0.5 mL de la solución de trabajo (200 µg/mL) de naproxeno, ketorolaco y ácido salicílico, respectivamente, y finalmente se aforó con metanol a un volumen de 10 mL (tabla 8).

Tabla 8. Preparación de la segunda solución de trabajo (50 µg/mL y 10 µg/mL)

Segunda solución de trabajo	Ibuprofeno / Diclofenaco		Naproxeno / Ácido Salicílico / Ketorolaco		Volumen final de Aforo (mL)
	Vol. De la solución Stock (mL)	Concentración (µg/ml)	Vol. De la solución de trabajo (mL)	Concentración (µg/ml)	
	0.5	50	0.5	10	

- 8.2.6. Preparación de soluciones seriadas para la curva de calibración de la prueba de linealidad del sistema: Se prepararon diluciones seriadas a partir de 1 mL de la segunda solución de trabajo la cual contiene 50 y 10 µg/mL que contenía una mezcla de los 5 fármacos y se aforó con metanol a un volumen de 2 mL (Tabla 9).

Tabla 9. Preparación de diluciones seriadas

	Vol. De la solución de trabajo 50 µL/mL (mL)	Vol. Aforo (mL)	Concentración (µg/ml)	Vol. De la solución de trabajo 10 µg/mL	Vol. Aforo (mL)	Concentración (µg/ml)
Diluciones seriadas	1	2	25	1	2	5
			12.5			2.5
			6.25			1.25
			3.125			0.625
			1.5625			0.3125
			0.78125			0.15625
			0.390625			0.078125

- 8.2.7. Preparación de soluciones seriadas para la prueba de precisión y exactitud del sistema: Se Preparó cada nivel en triplicado, es decir, 3 repeticiones por nivel (Tabla 10).

Tabla 10. preparación de soluciones para la para la prueba de precisión y exactitud del sistema.

Niveles para evaluar	Ibuprofeno / Diclofenaco		Naproxeno / Ácido Salicílico / Ketorolaco		Volumen final de Aforo (mL)
	Vol. De la solución de trabajo (mL)	Concentración (µg/ml)	Vol. De la solución de trabajo (µL)	Concentración (µg/ml)	
Alto	0.300	23	0.300	3	1
Medio	0.100	6	0.100	1	
Bajo	0.50	3	0.50	0.5	

8.3. Encuesta sobre las prácticas de disposición final de medicamentos caducados.

Con la finalidad de recabar información detallada sobre el uso y desecho de medicamentos y su probable presencia en el ambiente se aplicó una encuesta piloto y posteriormente una encuesta oficial a usuarios del sistema de alcantarillado y agua potable del municipio de Cuernavaca. Las características de ambas encuestas se describen a continuación.

8.3.1. Diseño del estudio

Para la elaboración del cuestionario se recurrió a la asesoría de un especialista del área de bioestadística del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), así como profesionales con conocimientos sobre ecotoxicología.

8.3.2. Estructura de la encuesta piloto

Inicialmente se diseñó una encuesta piloto con la finalidad de identificar si la encuesta aportaba la suficiente información y si estaba dirigida a identificar los medicamentos con más posibilidad de estar presente en los compartimentos ambientales; así como explorar las diferentes maneras en que la población desecha sus medicamentos caducados y si pudiera existir un sesgo por las formas de disposición por parte de la población encuestada.

En la tabla 11 se muestra el cuestionario de 10 reactivos, en el que se incluyeron 3 preguntas dicotómicas cerradas y 7 de opción múltiple, por su relevancia al objetivo de la encuesta; dado que algunas respuestas excluían factores de baja relevancia, el usuario encuestado podía proporcionar su respuesta de manera abierta, seleccionando la opción “otra” obteniendo así mayor especificidad en datos demográficos de interés sanitario.

Tabla 11. Contenido de los reactivos de la encuesta.

Reactivos
1.- Indique su sexo.
2.- Indique su edad.
3.- Indique su grado de escolaridad.
4.- Indique el número de personas que viven en su hogar.
5.- ¿Es usted un profesional sanitario apto para prescribir o dispensar medicamentos?
6.- ¿Cuál es el sitio donde almacena los medicamentos en su hogar?
7.- ¿Qué tipo de medicamentos suele almacenar en su hogar?
8.- ¿Qué método utiliza usted para deshacerse de medicamentos?
9.- ¿Con qué frecuencia desecha los medicamentos en su hogar?
10.- ¿Conoce usted los sitios aprobados para deshacerse de los medicamentos caducos?

8.3.3. Selección de la población de estudio

Para la realización de la encuesta piloto, se solicitó el apoyo de un grupo de alumnos seleccionados de la facultad de farmacia quienes fueron como aplicadores, proporcionando un máximo de diez encuestas por alumno. Los cuestionarios se realizaron de manera individual seleccionando a un representante mayor de edad por cada familia y asegurando que no tuviese un vínculo directo con los representantes de la comunidad farmacéutica.

8.3.4. Aplicación de cuestionario

El periodo de evaluación fue del 12 al 19 de abril del 2024, la encuesta se realizó vía electrónica y se le dio difusión mediante un enlace el cual pasó por los aplicadores y se redistribuyó a los encuestados; para recabar la información se utilizó la plataforma de formularios de Google con la finalidad de ofrecer una experiencia intuitiva y amable con el usuario no familiarizado con el formato digital de la encuesta.

8.3.5. Seguridad de la Encuesta:

Para comprobar la veracidad de los datos, se aplicaron medidas de seguridad en la configuración del formulario, como el acceso solo a direcciones de correo electrónico verificadas, donde los encuestados debían iniciar sesión con una cuenta de Google, además de la asignación de respuestas obligatorias que impedían el envío de las respuestas si alguna de estas se encontraba sin responder.

La interpretación de los resultados se realizó a través de la plataforma de formularios de Google; la cual proporcionó una herramienta que generó un resumen de los datos, representados a través de gráficos detallados, donde fue posible observar que cada reactivo expresaba su respuesta en valores de porcentaje.

8.4. Encuesta oficial con usuarios de SAPAC

El proceso final para la aplicación de encuestas se realizó en conjunto con sistema de agua potable y alcantarillado de Cuernavaca Morelos (SAPAC) quienes brindaron las instalaciones para la realización de encuestas a los usuarios de este servicio. En anexo 1 se muestra el cuestionario aplicado, que consistió en 12 preguntas dicotómicas y de opción múltiple, así como de dos preguntas abiertas.

8.4.1. Cálculo del tamaño de muestra

Según los registros del INEGI (2020), el municipio de Morelos tiene una población de 1,971,520. El número de encuestas a aplicar se calculó a partir de la siguiente ecuación (Ec. 1) considerando un nivel de confianza del 95 %, margen de error de 5 % y una proporción poblacional del 11 %; el tamaño de muestra corregido se estimó en 151 encuestas a aplicar. (39,40)

$$\text{Ec. 1: } n = \frac{N Z^2 p (1-p)}{(N-1) E^2 + Z^2 p (1-p)}$$

Donde N es población total, un nivel de confianza (Z) del 95 %, margen de error (E) de 5 % y una proporción poblacional (p) del 11 %.

8.5. Desarrollo del método analítico de cuantificación

8.5.1. Espectros de absorción UV

Se evaluó el espectro de absorción de los cinco compuestos (ketorolaco, ácido salicílico, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno) en un rango de 200 a 800 nm. Para lo cual, se preparó una solución stock (1000 µg/mL), y a partir de ésta se preparó una solución de trabajo (10 µg/mL) del compuesto y se transfirió a una cubeta de cuarzo limpia de 2 mL, posteriormente se insertó la celda en el espectrofotómetro y se registró el espectro de absorción. Este procedimiento se repitió para cada uno de los compuestos por triplicado.

8.5.2. Condiciones cromatográficas

Con base en los antecedentes de los métodos compendiales y no compendiales se establecieron las condiciones cromatográficas que permitieron la evaluación de los 5 compuestos de manera simultánea. Se asignó una longitud de onda: 220 nm, una columna cromatográfica: C18 de la marca GRACE con dimensiones de longitud de 4.6 mm x 250 mm y tamaño de partícula 5 µm. La Fase Móvil estaba compuesta por acetonitrilo (ACN) y agua. Para mejorar la retención de compuestos ácidos, la fase acuosa se acidificó con ácido fosfórico en una proporción del 1 % del volumen total del agua. Para la mejora de los parámetros como resolución y retención se estableció una elución por gradiente con un flujo de 1.0 mL/ m. Para la disolución de muestras de estándares de fármaco se utilizó metanol grado CLAR. La Muestra Blanco asignada fue metanol grado CLAR y para las muestras control se estableció una mezcla de AINEs 3.125 y 0.625 µg/mL.

Tabla 12. Configuración de gradiente.

Tiempo (min)	% ACN	% H ₂ O + 1% ácido fosfórico
0	30	70
3	45	55
6	45	65
7	50	70
9	50	50
10	40	60
11	30	70

8.6. Validación del método analítico de cuantificación

8.6.1. Linealidad del sistema:

Se preparó un duplicado de siete niveles de concentración de los cinco compuestos de referencia (ácido salicílico, ketorolaco, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno). Se midió la respuesta analítica reportando la relación entre la concentración vs. respuesta analítica a través del software de procesamiento de datos cromatográficos N2000, una vez obtenido el reporte de los datos, se procedió a la determinación de la regresión.

8.6.1.1. Regresión

Se calculó el valor de la pendiente (m), intercepto (b) y coeficiente de correlación lineal (r), mediante el software de procesamiento de datos de Microsoft Excel y OriginLab para la generación de los gráficos correspondientes a cada compuesto evaluado.

8.6.2. Límites de detección (LOD) y Cuantificación (LOQ):

Método basado en la desviación estándar (DE) y la pendiente de la curva de calibración.

1. **Curva de calibración:** Se realizó una curva de calibración basada en 7 puntos (tabla 9) y se obtuvieron los datos de regresión.
2. **Análisis de varianza:** Función utilizada en el programa de procesamiento de excel para determinar la desviación estándar del intercepto de la recta (σ).
3. **Cálculo de LOD y LOQ** se determinó mediante el uso de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ec. 2: LOD} = \frac{3.3\sigma}{S} \quad \text{Ec. 3: LOQ} = \frac{10\sigma}{S}$$

Donde σ es la desviación estándar de la respuesta en bajas concentraciones y S es la pendiente de la curva de calibración (sensibilidad del método).

8.6.3. Intervalo de confianza de la pendiente (ICP β_1):

Procedimiento para Calcular el Intervalo de confianza de la Pendiente

1. **Ajuste de la Regresión Lineal:** Se realizó una regresión lineal por mínimos cuadrados para obtener:
 - Pendiente (b)
 - Error estándar de la pendiente SE(b)
 - Grados de libertad (gl = n - 2), donde *n* = número total de puntos.
2. **Cálculo del Intervalo de Confianza (95%)**

$$\text{Ec. 4: } b \pm t * SE(b)$$

- **b:** Pendiente estimada.
- **t:** Valor crítico de la distribución *t* de Student ($\alpha = 0.05$ para 95 % de confianza).
- **SE(b):** Error estándar de la pendiente.

8.6.4. Precisión y Exactitud:

1. Selección de tres niveles de concentración para ácido salicílico, ketorolaco y naproxeno:

- Alto: 3 $\mu\text{g/mL}$
- Medio: 1 $\mu\text{g/mL}$
- Bajo: 0.5 $\mu\text{g/mL}$

2. Selección de tres niveles de concentración para diclofenaco e ibuprofeno:

- Alto: 23 $\mu\text{g/mL}$
- Medio: 6 $\mu\text{g/mL}$
- Bajo: 3 $\mu\text{g/mL}$

8.7. Plan de muestreo de aguas residuales

El muestreo se realizó siguiendo algunas recomendaciones de la normatividad mexicana para la cuantificación de contaminantes básicos; aunque estas no están enfocadas específicamente a límites de contaminantes de medicamentos, se consultaron para conocer los tipos de muestreo, procedimientos y frecuencia de muestreo. La norma NMX-AA-003-1980 da a conocer los lineamientos generales y recomendaciones para tomar muestras a partir de las descargas de aguas residuales, con la finalidad de determinar sus características físicas y químicas, debiéndose observar las modalidades indicadas en las normas de métodos de prueba correspondientes. Por su parte la NOM-001-ECOL-1996 establece los límites máximos permisibles de contaminantes básicos presentes en descargas de aguas residuales, en aguas y bienes nacionales, con el objeto de proteger su calidad y posibilitar sus usos, siendo de observancia obligatoria para los responsables de dichas descargas. Esta norma no se aplica a las descargas provenientes de drenajes separados de aguas pluviales.(41,42)

El muestreo no se realizó en época de lluvias porque aumenta la posibilidad de que el caudal provoque la dilución de residuos de medicamentos, arrastre de sólidos y considerar la variabilidad por descargas pluviales ya que esto distorsiona las concentraciones reales y complica la comparabilidad entre puntos de muestreo o fechas. Es de condición obligatoria que existan más de 72 horas sin lluvia antes de cada muestreo. Si hubiera lluvia en las 72 h previas a la fecha prevista, reprogramar la toma de muestras hasta que se cumpla la condición. Asimismo, se tomaron dos tipos de muestras:

La muestra simple: La que se toma en día normal de operación durante el tiempo necesario para completar un volumen suficiente para que se lleven a cabo los análisis para conocer su composición, aforando el caudal descargado en el sitio y en el momento del muestreo. Así como la muestra compuesta: La que resulta de mezclar el número de muestras simples. Para conformarla, el volumen de cada una de las muestras simples deberá ser proporcional al caudal de la descarga en el momento de su toma.

El muestreo se realizó en las siguientes locaciones:

a) Municipio de Jiutepec:

Se establecieron dos días para la realización de tomas de muestras simples en la zona industrial del municipio de Jiutepec, permitiendo una réplica temporal temprana dentro de la quincena con un horario de muestreo: 08:00–12:00 h con condiciones hidrológicas y temperatura más estables.

Periodo A: 14 de Julio 2025 (Prueba exploratoria)

Periodo B: 24 al 25 de noviembre 2025 (lunes–martes)

Periodo C: 2 de diciembre 2025 (Prueba final).

Puntos de Muestreo en el Municipio de Jiutepec:

1. **Primer punto (control):** Antes de influencias industriales, ubicado en el canal de CIVAC, Eje Nte. Sur, Colonia Otilio Montaña, Jiutepec Morelos.
2. **Segundo punto (primera descarga):** Cercano a la primera descarga relevante a cuerpo de agua, ubicado en la Barranca de Analco, Tarianes 1000, Colonia Los Tarianes, Jiutepec Morelos.
3. **Tercer punto (sección media):** Zona de mezcla de aguas, ubicado en el canal de CIVAC, 19 P. de la Fuentes, Colonia Pedregal de las Fuentes, Jiutepec Morelos.
4. **Cuarto punto (segunda descarga / zona industrial):** Punto de potencial aporte adicional de contaminantes e influente de la PTAR ECCACIV, ubicado en la Barranca de Analco, Camino Viejo a San Gaspar, Colonia Centro, Jiutepec Morelos.
5. **Quinto punto (aguas abajo):** Sección final representativa de la carga integrada y efluente de la PTAR, ubicado en la Barranca de Analco, 534 Cam. Ejidal Artículo 27, Colonia La Esmeralda, Jiutepec Morelos.

b) Municipio de Temixco:

El muestreo se realizó en La Planta de Tratamiento de Aguas Residuales "El Rayo". Se designaron los martes para toma de muestras simples y los miércoles para la recolección de una muestra compuesta, el proceso generador de la descarga se monitoreó durante 12 horas. Se estableció en periodo de recolección en distintas temporadas llevándose a cabo en las siguientes fechas:

- **Periodo A:** 15 de julio 2025
- **Periodo B:** 19 de noviembre 2025
- **Periodo C:** 16 de diciembre 2025
- **Periodo D:** 17 de diciembre 2025

8.7.1. Red de puntos de muestreo y procedimiento de campo:

Las figuras 6 y 7 muestran la ubicación exacta de la toma de muestras en los municipios. Por un lado, se encuentra la PTAR "El Rayo" en Temixco, único punto de muestreo localizado en la entrada de la planta. En Jiutepec (Figura 7) se muestra trazada la ruta que une los puntos de muestreo entre sí, desde el punto control hasta el último punto con la sección representativa de la carga integrada de la zona urbana e industrial del municipio.

Para el procedimiento en campo se utilizaron frascos ámbar de vidrio de 100 mL con tapa teflón, guantes, hielera con geles y rotulador indeleble. Así mismo, en cada punto se midió el pH, temperatura, conductividad estado del clima, fecha y hora. La toma de muestra fue en contracorriente, aproximadamente a unos 10 - 20 cm bajo superficie, evitando márgenes y remanso y llenando el frasco sin burbujas. Las muestras fueron conservadas a 4 ± 2 °C en oscuridad y se filtraron a través de un acrodisco de nylon 0.22 una vez que se llevaron al laboratorio. Finalmente se refrigeraron a temperatura de 4° C hasta su uso.

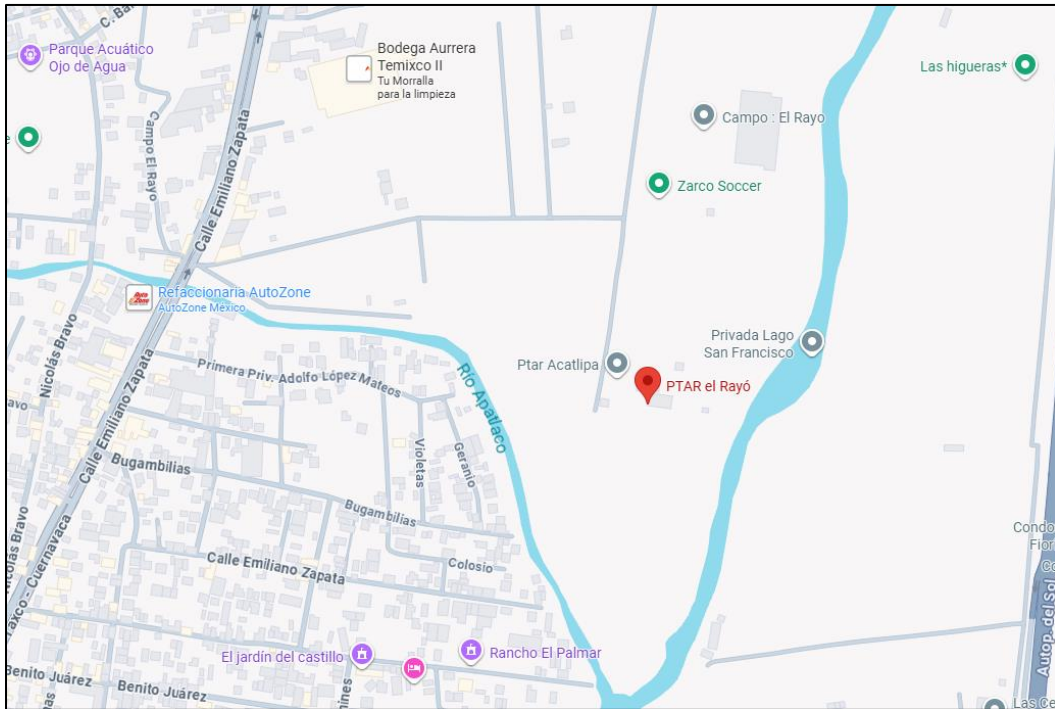


Figura 6. Ubicación de la PTAR “El Rayo” Municipio de Temixco, Morelos.

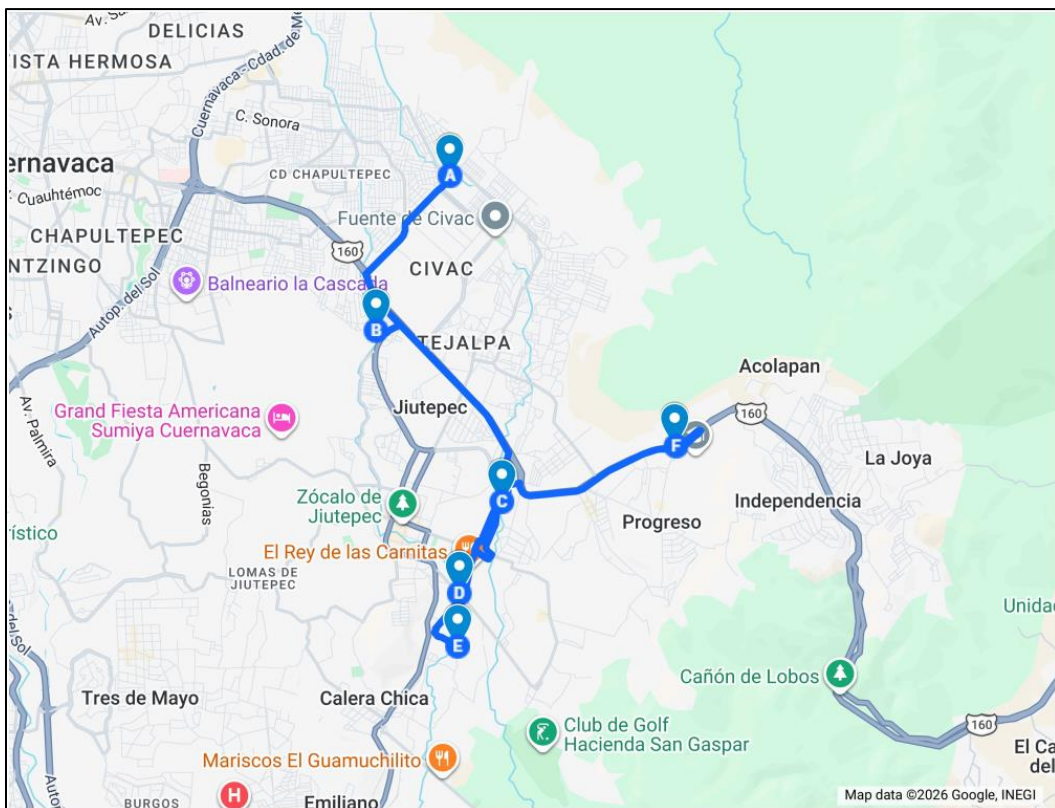


Figura 7. Ubicación de la ruta de puntos de muestreo en el Municipio de Jiutepec, Morelos.

8.8. Desarrollo de ensayos *in silico*

8.8.1. Plataforma de predicción admetSAR 3.0, preADMET y Software de predicción: VEGA *in silico* platform version 1.2.4

Con base en el cuadro básico de medicamentos del Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS) se seleccionaron algunos AINEs y para evaluar su potencial efecto eco toxicológico, para lo cual se obtuvo código SMILES correspondiente a cada sustancia a partir de las bases de datos de Pubchem. Este se tomó y se colocó directamente en el sistema de captura de SMILES de la plataforma de admetSAR.3.0 y preADMET, posteriormente se colectaron los datos arrojados por cada software, estos mismos fueron agrupados en especies acuáticas y se hizo un concentrado de los resultados obtenidos. El anexo número 2 se muestra el desarrollo ilustrado de un análisis *in silico* utilizado herramientas de biosimulación predictiva.

8.9. Desarrollo de ensayo *in vivo*

8.9.1. Evaluación de la toxicidad en *Daphnia magna*.

A continuación, se describen los procedimientos para preparación de reactivos, medios de cultivo y evaluación de la toxicidad aguda de AINEs en un modelo de *Daphnia magna* mediante pruebas de exposición a sustancias, siguiendo algunas indicaciones de la NMX-AA-087-SCFI-2010 que lleva por nombre: Análisis de agua-Evaluación de toxicidad con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea - Cladóceras) Método de prueba. Su desarrollo requiere realizar un par de pruebas complementarias, como:

- Evaluar la toxicidad del compuesto de referencia (dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)) en un modelo de *Daphnia magna*.
- Valorar y analizar el agua de acuerdo con la NMX-AA-072-SCFI-2001 para la determinación de dureza total.
- Evaluar la ecotoxicidad aguda mediante pruebas de mortalidad sobre *Daphnia magna*.

8.9.1.1. Reactivos y cultivos para la preparación de agua dura

La tabla 13 muestra el modo de preparación de las soluciones que componen el medio de prueba, el agua dura la masa pesada de cada sustancia se disuelve en un litro de agua destilada. El anexo 3 describe detalladamente los componentes y pruebas de calidad para la preparación de soluciones que componen el medio de cultivo.

Tabla 13. Preparación de soluciones stock de los componentes del agua dura.

Sustancia	Concentración (g/L)
Cloruro de calcio di hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.29
Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.123
Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)	0.065
Cloruro de potasio (KCl)	0.0058

Una vez elaborada el agua dura, se mantiene en aireación hasta que se alcanza la saturación del oxígeno disuelto. Después, conservarse a temperatura ambiente o en refrigeración, cuidando que para el momento de las pruebas se encuentre a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Así mismo, se realizaron pruebas fisicoquímicas para la evaluación de la calidad de agua dura, en el anexo 3 se describe la metodología que se siguió para la evaluación de la calidad del agua dura. Se determinó la temperatura, pH, conductividad, determinación de dureza y determinación de oxígeno disuelto.

Para cultivos de *D. magna* se utiliza agua reconstituida cuya dureza sea de $250 \pm 25\text{ mg/L}$ y el pH de 8.0 ± 0.2 . Su preparación debe efectuarse al menos con 24 h de anticipación, cuidando que se efectúe tal y como se indica en el punto siguiente, ya que de ello depende en gran parte tanto el cultivo óptimo de los organismos como la culminación exitosa de la prueba. Los organismos se cultivaron bajo un fotoperiodo de luz y oscuridad de 16 h:8 h, respectivamente, con temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El anexo 3 se describen las condiciones ambientales para el cultivo y mantenimiento de organismos de *Daphnia magna*.

8.9.1.2. Evaluación de la toxicidad aguda en *Daphnia magna*

8.9.1.2.1. Control Positivo (+): Dicromato de potasio

Esta prueba se realizó con diluciones de dicromato de potasio, preparadas a partir de una solución stock como se muestra en la tabla 14. Esta prueba da evidencia de que los organismos de prueba cuentan con la sensibilidad necesaria. El control positivo es una solución de dicromato de potasio, cuya concentración corresponderá al valor promedio de la CL_{50} histórica que caracteriza la respuesta de los cladóceros al compuesto tóxico.

El tóxico de referencia utilizado en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 es el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), que se prepara pesando 50 mg de $K_2Cr_2O_7$ aforados a 100 mL con agua desionizada (0.5 mg/mL). Una vez preparada esta disolución madre, deberá valorarse el contenido de cromo hexavalente para determinar la concentración real del tóxico de referencia. A partir de esta disolución madre, se elabora tanto la serie de concentraciones o diluciones necesarias para el cálculo de la CL_{50} del tóxico de referencia para un tiempo de exposición de 24 h. Una vez establecidas las concentraciones se realiza una prueba exploratoria.

Tabla 14. Concentraciones de dicromato de potasio (control positivo) aguda.

Solución de control + Dicromato de potasio	Concentración mg/L
1	0.2400
2	0.2540
3	0.2680
4	0.2840
5	0.3000

8.9.1.3. Prueba exploratoria de toxicidad aguda en *Daphnia magna*.

Esta prueba es de utilidad tanto para discriminar entre concentraciones no tóxicas; así como para determinar el intervalo de concentraciones o diluciones que se deben aplicar para la determinación de la CL₅₀ en una prueba definitiva. En general, se siguen los siguientes pasos para su desarrollo. Se separan 10 organismos en vasos de precipitado de 100 mL, se agrega el volumen necesario para obtener diferentes concentraciones del compuesto a evaluar, con un volumen de 30 mL y aforando con agua dura y se realiza esta prueba por triplicado de cada concentración.

También se realizó la prueba exploratoria de los cinco AINEs evaluados, para los cual cabe señalar que antes de efectuar las pruebas se realizó una investigación bibliográfica sobre la CL₅₀ de los fármacos de interés. A partir de la CL₅₀ de cada fármaco se establecieron rangos a concentración alta, media y baja alrededor de la CL₅₀ a las que se sometería el modelo biológico. Alta, por encima de la CL₅₀, Media, que corresponde a la CL₅₀ y Baja, por debajo de la CL₅₀ (tabla 15).

Tabla 15. Rangos de concentración establecida para la prueba de toxicidad de AINEs

Fármaco	Concentraciones (µg/mL)					CL ₅₀ (µg/mL) reportada
AS	50	40	32.22	16.01	6.01	16.01
KET	25	18.93	14.32	7.16	3.58	18.93
NAP	130	120	100	85.34	21.35	85.34
DIC	20	18.5	17.5	15	4.38	17.5
IBU	20	18	16.8	13.6	4	13.6

- Para las pruebas exploratorias con fármacos es importante trabajar un rango de concentraciones con un mínimo de cinco concentraciones.
- Preparar las soluciones madres de cada compuesto a evaluar tomando en cuenta la concentración más alta.
- En esta prueba exploratoria también incluir un control positivo (K₂Cr₂O₇) y un control negativo (utilizando únicamente el medio de cultivo, agua dura).
- La exposición de los organismos es de 24 h. Trascurrido este tiempo, realizar el conteo de organismos muertos por concentración.
- Sacar el porcentaje de mortalidad por concentración contemplando las tres réplicas de cada concentración con la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 5: \% mortalidad} = \frac{\text{n de organismos expuestos por concentración}}{\text{n de organismos muertos por concentración}} \times 100$$

8.9.1.4. Prueba definitiva de toxicidad aguda en *Daphnia magna*

La tabla 16 muestra las condiciones finales utilizadas para las pruebas de toxicidad aguda donde se evaluó mortalidad de los organismos en un rango de mayor a menor concentración de fármaco en un periodo de 24 horas.

Tabla 16. Condiciones de la prueba de toxicidad aguda de fármacos con el modelo *in vivo* de *Daphnia magna*.

Parámetro	Condición
Calidad de luz	Fluorescente, blanca y fría
Luminosidad	600 lx - 1000 lx
Fotoperiodo	16 h luz / 8 h oscuridad
Volumen de los recipientes de prueba	40 mL como mínimo
Edad de los organismos	Menos de 24 h de nacidos
Numero de réplicas por dilución	2 para la prueba exploratoria
Numero de réplicas en el control positivo	3
Numero de réplicas en el control negativo	3
Numero de organismos por recipiente	10
Agua de dilución	Reconstituida dura de 250 mg/L $\pm$ 25 mg/L
Temperatura	20 °C a 22°C
Alimentación	No
Volumen total (agua reconstituida más muestra)	Mínimo 30 mL
Control Negativo	Sobrevivencia $\geq$ 90 %
Control Positivo	Con una concentración de dicromato de potasio cercana a la CL ₅₀ y con un efecto del 33% al 57% de mortandad, leído a las 48 de exposición.

8.9.1.5. Análisis Probit:

Una vez realizado el conteo de organismos muertos por concentración, se procede al tratamiento de los datos obtenidos. En Excel se tabularon las concentraciones de la prueba, número de organismos expuestos, número de organismos muertos, el promedio de organismos muertos por cada concentración y el Log₁₀ de cada concentración. Con los datos obtenidos de cada concentración, se calculó el porcentaje de mortalidad como se menciona en la tabla 17. Posteriormente, se calculó la regresión lineal con los datos de log₁₀ de las concentraciones y los números probit. El valor probit se calculó mediante la ecuación 7 (Ec. 7). Finalmente se calculó el antilogaritmo del resultado de la formula probit para obtener la CL₅₀.

$$\text{Ec. 7: Probit} = ((5 - b)/m))$$

Donde:

- y = Ordenada al origen.
- m = Pendiente.

Tabla 17. Transformación de porcentaje de mortalidad a unidades Probit.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.5	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.8	4.82	4.85	4.87	4.9	4.92	4.95	4.97
50	5	5.03	5.05	5.08	5.1	5.13	5.15	5.18	5.2	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.5
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

9. Resultados y Discusión

9.1. Aplicación de encuestas

9.1.1. Encuesta piloto

A continuación, se presentarán los resultados correspondientes a la encuesta piloto. Se registró la participación de 730 encuestados, donde los datos de carácter demográfico registraron un índice de femineidad del 56.03 % y masculinidad del 43.56 %; para la información relacionada con el grado de escolaridad se encontró que el nivel licenciatura corresponde al 58.22 % del total de los encuestados; se observó que las familias de 2 a 3 y de 4 a 6 miembros fueron más prevalentes con respecto a las otras opciones, representando un 36.7 % y 55.62 % respectivamente. En el caso de los rangos de edad de 25 a 34 y más de 54 años fueron los de mayor participación en la encuesta. La figura 8 se resumen las características demográficas de la muestra analizada.

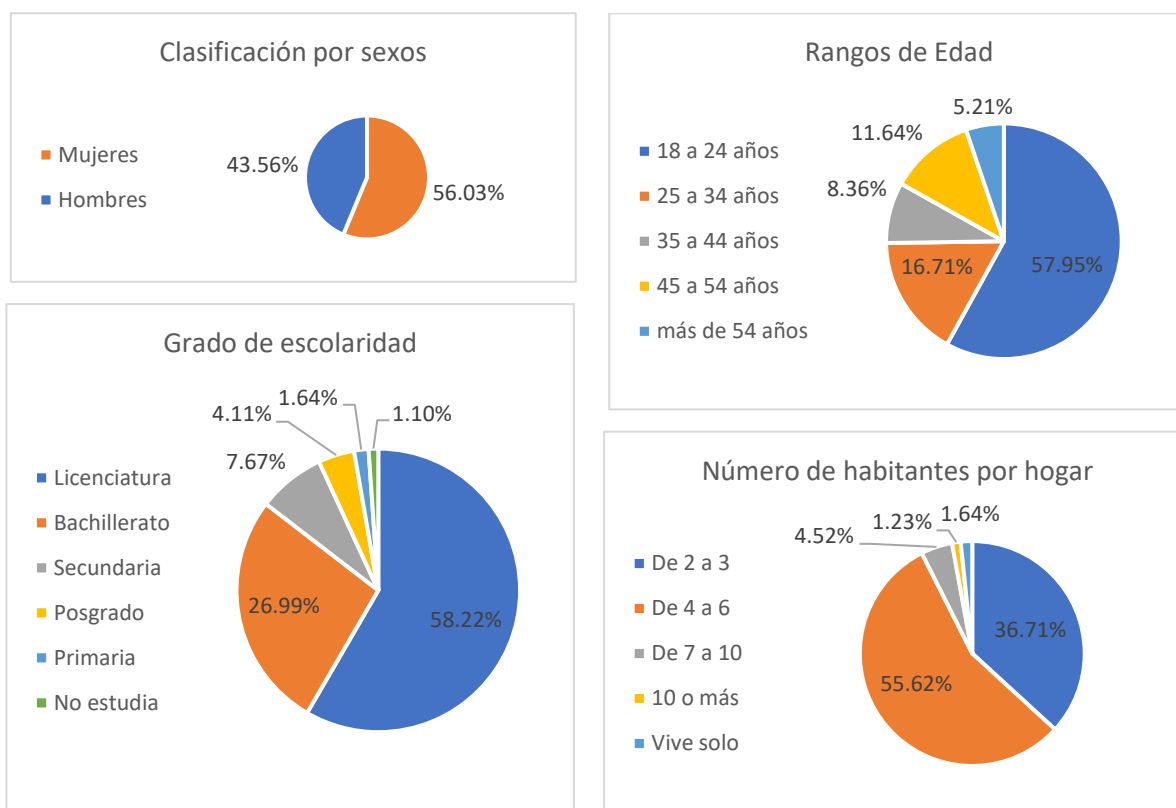


Figura 8. Datos demográficos representados correspondientes a la encuesta piloto

La encuesta prioriza las respuestas del público no especializado, aquel cuya profesión u oficio no lo involucre directamente con las ciencias farmacéuticas; el 91.3 % de la población resultó ser ajena a las prácticas de prescripción y dispensación de medicamentos. Para obtener resultados libres de sesgo, se implementó la pregunta “¿Es usted un profesional sanitario apto para prescribir o dispensar medicamentos?” permitiendo la clasificación de las respuestas en dos grupos (especializados y no especializados) abordando la problemática desde una perspectiva social en donde los conocimientos propios del gremio no interfirieran con los resultados.

El 37.3 % de la población almacena sus medicamentos en un botiquín; sin embargo, la suma total de lugares no adecuados como el baño/tocador, armario/caja y el recuento de otros, equivale al 68.3 % (figura 9).

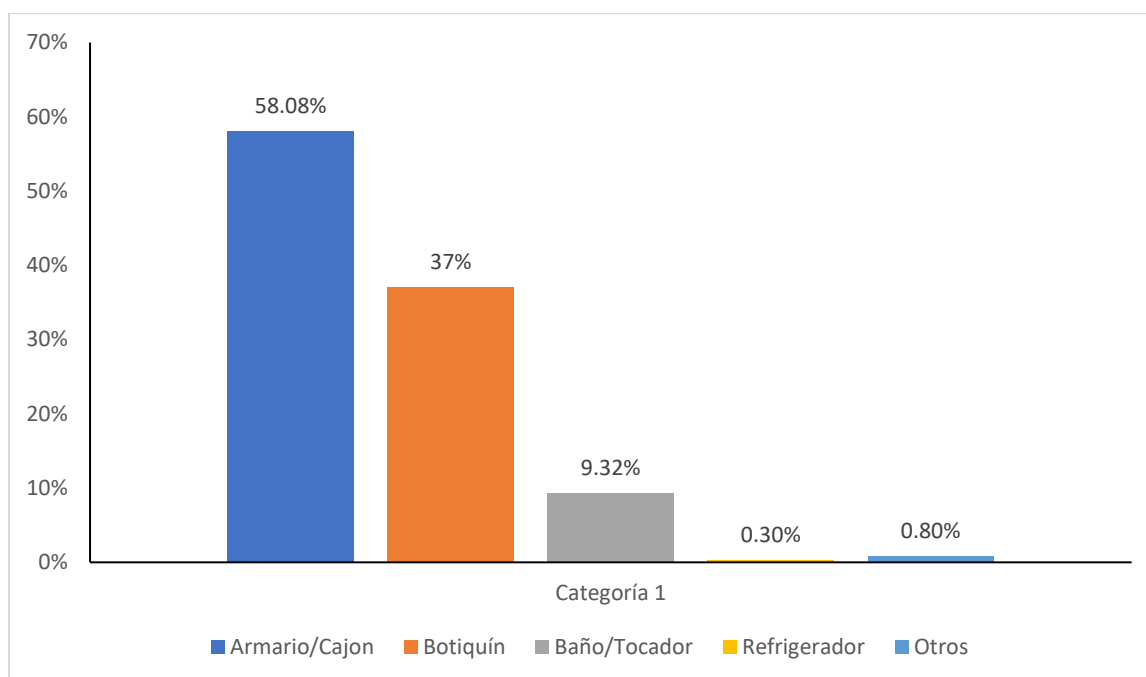


Figura 9. Porcentaje según el tipo de almacenamiento empleado por los encuestados en la prueba piloto.

Entre los métodos para deshacerse de los medicamentos, se encontró que las opciones más recurrentes pertenecen a opciones no adecuadas, entre estas, la basura común con un 59.70 %, regalar los medicamentos con 8.4 %, tirarlos en retrete o lavadero con 7.4 %, la utilización de medicamentos como fertilizantes con 2.80 % e incineración en casa con 1.2 %. Las opciones consideradas como correctas muestran menor incidencia; el 5.7 % de la población los devuelve al hospital o farmacia, el 14.2 % los deposita en un contenedor adecuado. El recuento de la opción “otros” corresponde al 0.6 % donde el 0.2 % pertenece a métodos adecuados (tabla 18).

Tabla 18. distribución que muestra los porcentajes de métodos de desecho.

Medio de Desecho	Frecuencia	Porcentaje (%)
Basura	436	59.70
Contenedor designado	104	14.20
Regala	61	8.40
Retrete o lavadero	54	7.40
Devuelve a Farmacia	41	5.70
Fertilizantes	21	2.80
Quema	9	1.20
Otros	4	0.60

La población encuestada desecha sus medicamentos caducados principalmente cada año (48.90 %) (figura 10). Los datos finales expresan que solo un 23.9 % de la población encuestada, reconoce los lugares adecuados para deshacerse de los medicamentos que se encuentran en desuso. Los encuestados dieron a conocer los tipos de medicamentos que suelen almacenar y desechar constantemente, de los cuales destacan con mayor frecuencia el grupo de los analgésicos y antiinflamatorios (figura 11), seguido de los medicamentos antitusígenos, antibióticos, antiulcerosos, antihipertensivos, antidiabéticos y los medicamentos anticonceptivos.

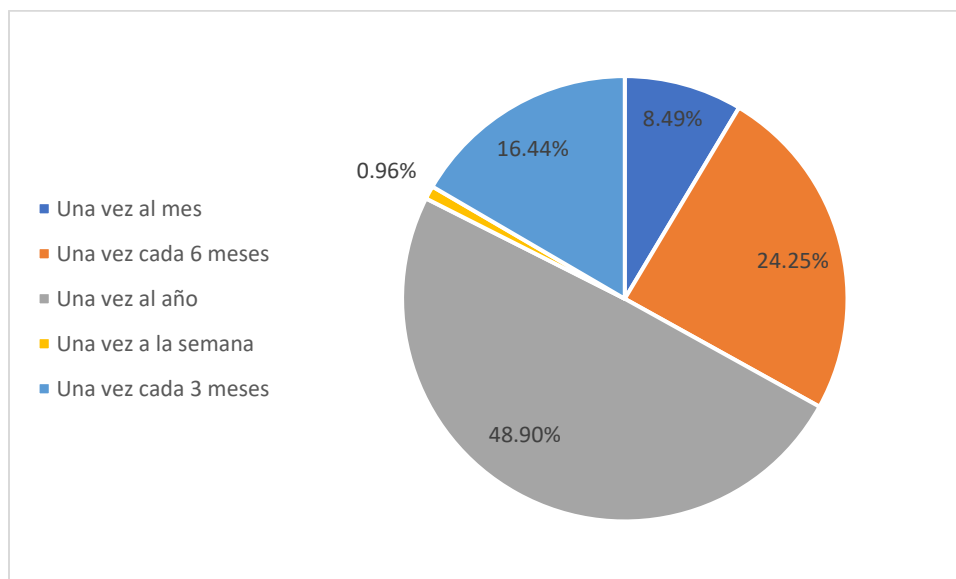


Figura 10. incidencia con la que los usuarios de la encuesta piloto se deshacen de sus medicamentos.

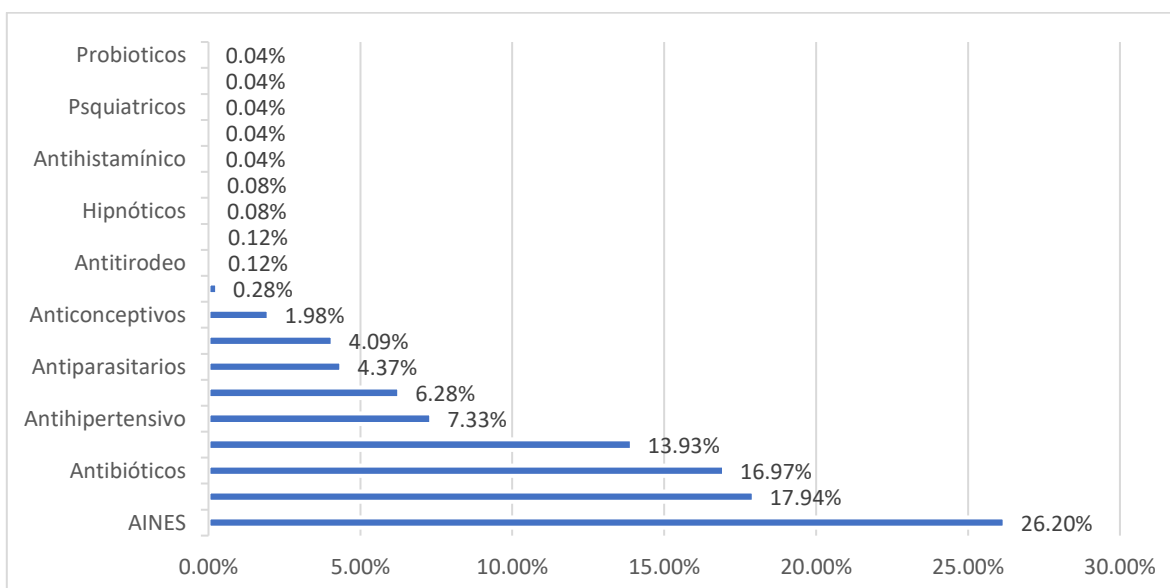


Figura 11. Medicamentos más utilizados por los usuarios de la encuesta piloto.

9.1.2. Encuesta oficial

Se aplicaron 151 encuestas a los usuarios del sistema de agua potable y alcantarillado de Cuernavaca Morelos (SAPAC). Los datos sociodemográficos se muestran en la figura 12. Las personas con más de 54 años representaron el 26.39 % que respondieron la encuesta. Las mujeres tuvieron mayor participación (56 %) que los hombres (44 %). El 36.81 % de la población encuestada tiene un nivel de escolaridad de licenciatura y el 45.83 % vive con 4 o 6 personas.

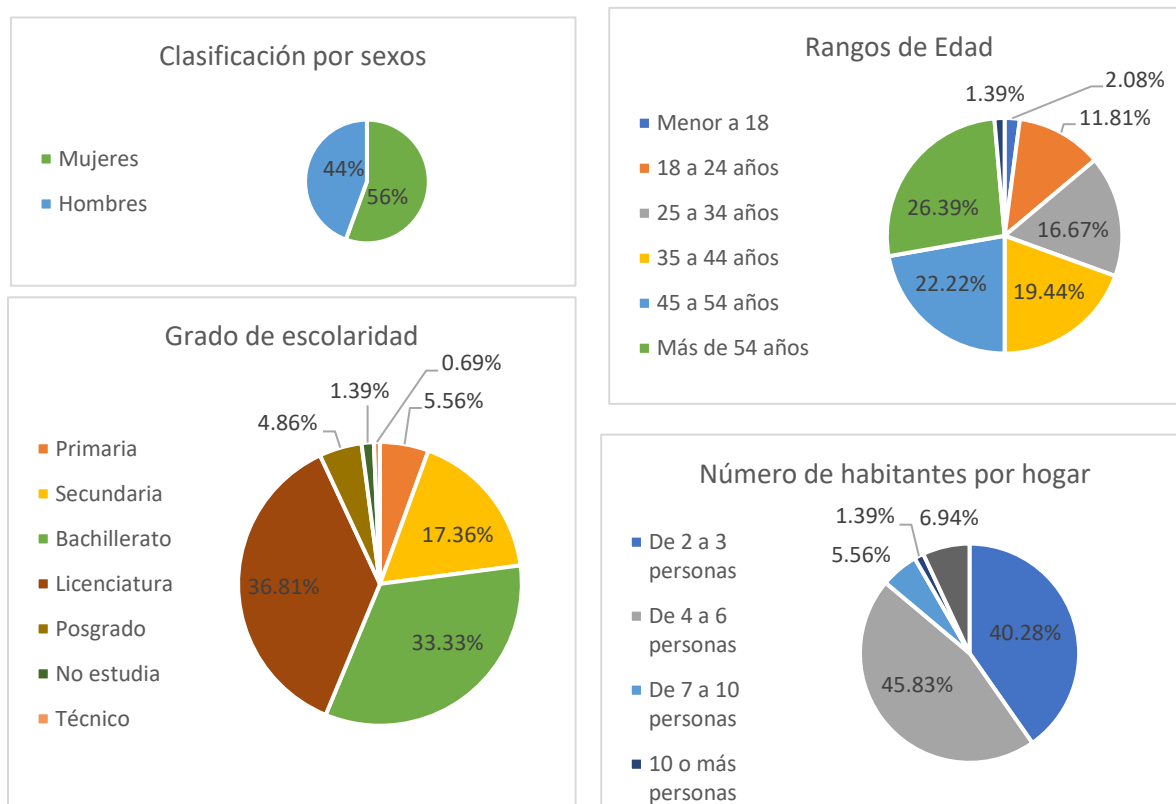


Figura 12. Datos demográficos correspondientes a la encuesta oficial

Cabe mencionar que el 50 % de los encuestados eliminan los medicamentos directamente a la basura municipal; aunque 11.11 % lo deposita en los contenedores asignados del SINGREM y 7.64 % los devuelve a la farmacia, actividades que se consideran como una buena práctica de disposición de medicamentos (Tabla 19). Un bajo porcentaje declaró que lo desecha por vía de los efluentes (2.78 %) como la tarja, sanitario o lavadero.

Tabla 19. métodos de desecho por parte de los usuarios encuestados de la prueba oficial.

Medio de Desecho	Frecuencia	Porcentaje (%)
Basura	76	50.00
Dos o más medios de desecho	30	20.14
Contenedor designado (SINGREM)	17	11.11
Devuelve a la farmacia o al hospital	12	7.64
Regala	10	6.94
Sanitario o lavadero	4	2.78
Sin respuesta	2	1.39
Quema	0	0.00
Los utiliza como fertilizante para las plantas	0	0.00

La encuesta oficial coincide con la encuesta piloto en que desecha sus medicamentos directamente en la basura municipal (50 %). Sin embargo, se observa una diferencia cuando se les pregunta si los medicamentos los desechan a través de los efluentes, los porcentajes para la eliminación por esta vía son de 2.78 % en la encuesta oficial y 7.40 % en la encuesta piloto. La diferencia podría ser explicada por el sesgo generado al aplicarse la encuesta en una oficina gubernamental de la cual los encuestados pudieran ser acreedores a una multa por prácticas de disposición inadecuadas. En la figura 13 se muestra que el 39.58 % de las personas encuestadas almacena sus medicamentos caducados en el armario o cajón y el 26.39 % en el botiquín.

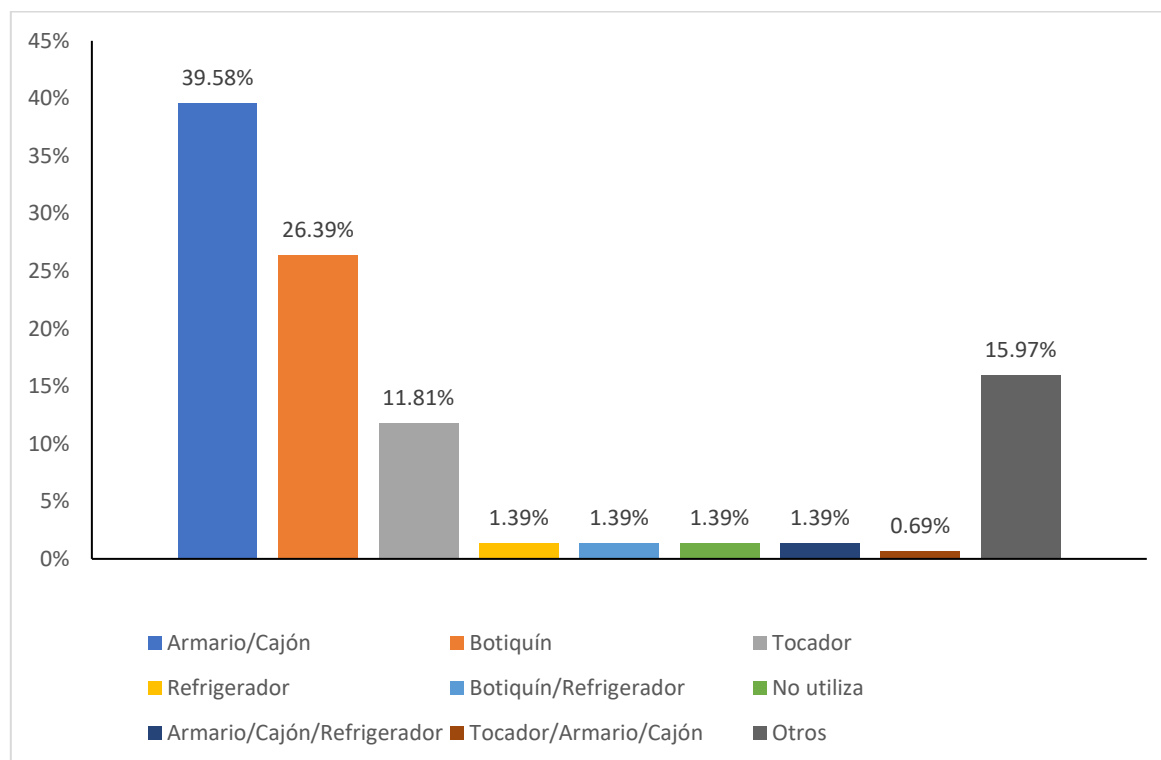


Figura 13. Porcentaje según el tipo de almacenamiento empleado por los encuestados en la prueba oficial.

Los resultados de la encuesta oficial (figura 14) mostraron que los principales medicamentos que almacenan son los AINES (31.99 %), antibióticos (14.71 %) y antiulcerosos (12.13 %). Siendo coincidentes con los dos primeros de la encuesta piloto.

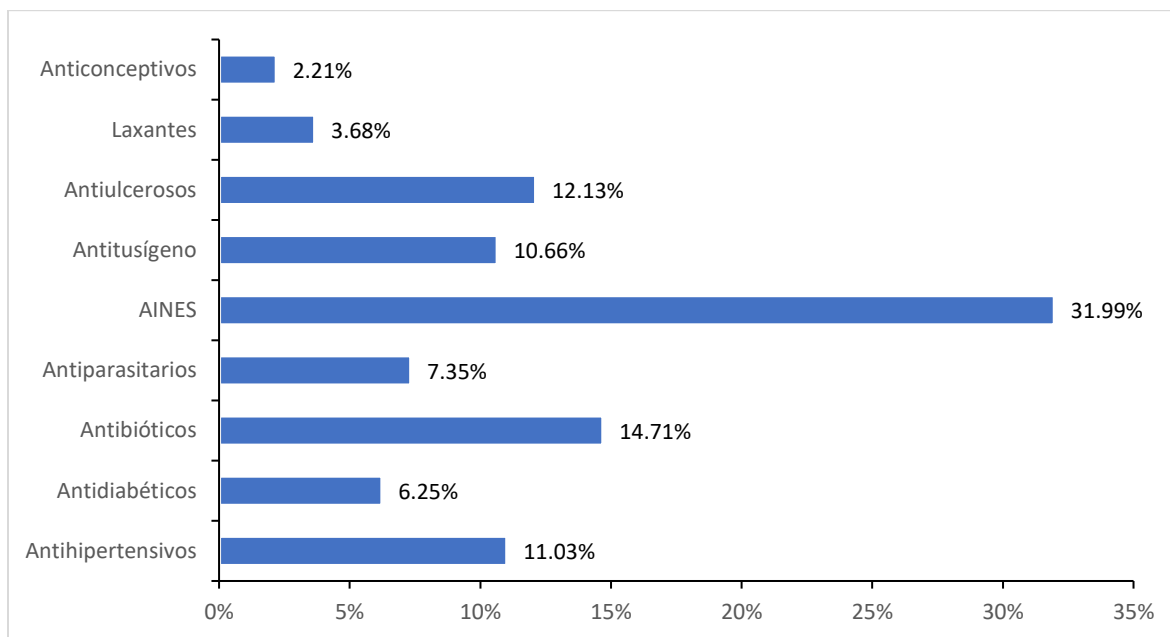


Figura 14. Medicamentos más utilizados por los usuarios de la encuesta oficial

Cabe señalar que los resultados muestran que un alto porcentaje de la población encuestada mostró buenas prácticas de almacenamiento de sus medicamentos; actividades que con respecto al ambiente ambiental resulta en que el adecuado almacenamiento y disposición final de medicamentos en el hogar es fundamental para garantizar su eficacia y seguridad; mantenerlos en condiciones óptimas ayuda a preservar su calidad y a evitar posibles deterioros que podrían comprometer su efectividad. Por el contrario, un inadecuado almacenamiento y desecho, puede tener consecuencias significativas para el ambiente.

Además de que la aplicación de esta encuesta permitió dar a conocer los porcentajes de la población que siguen tanto las adecuadas e inadecuadas prácticas de disposición de medicamentos caducados, se observó la necesidad de dar a conocer a la población en general que, si los medicamentos se desechan incorrectamente, al tirarlos por el desagüe o al contenedor de basura, pueden contaminar los suelos y el agua. Los productos químicos presentes en los residuos medicamentosos pueden afectar a los ecosistemas acuáticos y terrestres, causando daños a la vida silvestre y a los organismos que dependen de estos entornos. Además de que los envases de medicamentos mal desechados pueden acumularse en vertederos, contribuyendo a la contaminación del suelo y la liberación de sustancias químicas tóxicas a medida que se descomponen y que puede tener efectos adversos en la calidad del suelo y en la salud de las personas que viven cerca de estos vertederos.

La encuesta aplicada muestra que los medicamentos que encabezan la lista de los mayormente utilizados corresponden a analgésicos y antiinflamatorios, esta clasificación comprende a todos aquellos que en la encuesta se designaron como medicamentos para el tratamiento de fiebre, reducción de la inflamación y dolor con la finalidad de que las personas encuestadas comprendieran completamente la pregunta; dentro de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), los ejemplos más comunes son el ácido acetil salicílico, naproxeno, ibuprofeno y diclofenaco.

Estudios previos han reportado la presencia de este tipo de fármacos en aguas residuales en diferentes concentraciones debido a su incompleta remoción en las plantas tratadoras y el vertido directo de los residuos no tratados en corrientes de agua. Un estudio realizado en el 2018, en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, menciona que los productos farmacéuticos más abundantes en el agua de la región fueron; naproxeno (732 a 4880 ng/L), acetaminofén (354 a 4460 ng/L) y diclofenaco (258 a 1398 ng/L), cuyas concentraciones corresponden a muestras tomadas posterior al tratamiento; estos resultados denotan ineficiencia en la captura de aguas residuales de las vertientes que existen en el municipio además de que se ha reportado en diferentes estudios que la presencia de los AINEs en el ambiente ha llegado a inducir toxicidad en diferentes especies alrededor del mundo. Científicos descubrieron que los peces de las especies *Abramis sp.* y *Rutilus sp.* contenían niveles de tres medicamentos (diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno) en rangos que iban desde 6 hasta 95 ng/mL, 1.6 hasta 32 ng/mL y de 16 a 30 ng/mL respectivamente, demostrando que los productos farmacéuticos originarios de los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales pueden ser capturadas por las especies acuáticas que habitan en la zona (12).

El segundo grupo de medicamentos más utilizado según los resultados de encuesta, fueron los antibióticos. El uso está indicado para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias, este grupo forma parte de los principales medicamentos reportados en otras encuestas. La presencia de este tipo de compuestos en el ambiente se podría considerar alarmante debido al proceso de movilización de los metabolitos por el medio acuático posterior a su consumo, induciendo así la aparición de organismos con tolerancia al tratamiento y la generación de resistencia por parte de los microorganismos infecciosos. En el 2018, en Cuernavaca se reportó la presencia de sulfametoxazol (108–502 ng/L) y trimetoprima (440–790 ng/L) en muestras acuáticas, estos compuestos se encuentran ocupando el segundo lugar de los más detectados en efluentes y el tercer lugar en influentes y aguas superficiales. Al igual que los AINEs, los niveles de antibióticos en las aguas superficiales ubicadas en la salida de las plantas tratadoras eran superiores a los del agua captada, lo que sugiere una eliminación deficiente de estos compuestos. Esta afirmación sugiere que los compuestos pasan por el proceso de tratamiento con baja o nula modificación en sus concentraciones lo que ha traído consecuencias, un estudio afirma que la presencia de antibióticos en el agua provee un ambiente ideal para fomentar la resistencia de los microorganismos debido a la baja concentración en la que se encuentran y a la presencia constante lo cual fomenta y favorece las mutaciones en estos convirtiéndose en una problemática sanitaria de alto riesgo (12).

La presencia de AINEs en el ambiente está estrechamente ligada a la mala disposición a nivel doméstico, al ser el grupo de medicamentos que encabeza la lista de los más utilizados y cuyas investigaciones previas sostienen que tienen un potencial toxicológico mayor, por lo tanto, la presente investigación prioriza el enfoque de las pruebas, estudios y análisis en los medicamentos clasificados como antiinflamatorios no esteroideos en medios acuáticos.

9.2. Desarrollo del método de cuantificación

9.2.1. Selección de longitud de onda para cuantificación e identificación química

En las figuras 15 a 19 se muestran los espectros de absorción emitida por cada uno de los fármacos. Los máximos de absorción fueron de 270, 254, 254, 254 y 113 nm para ácido salicílico, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y ketorolaco, respectivamente. Cabe señalar que la finalidad del presente estudio es desarrollar un método analítico que puede cuantificar de forma simultánea los cinco fármacos antiinflamatorios en un equipo cromatográfico equipado con un detector UV-Vis de longitud de onda fija. De tal forma que se seleccionó una longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) que permitiese la visualización de los cinco compuestos, por lo tanto, se seleccionó una longitud de onda para la lectura a 220 nm, la cual permitió hacer lecturas con la suficiente intensidad para la detección incluso a bajas concentraciones de manera simultánea.

Espectros de absorción de los AINEs

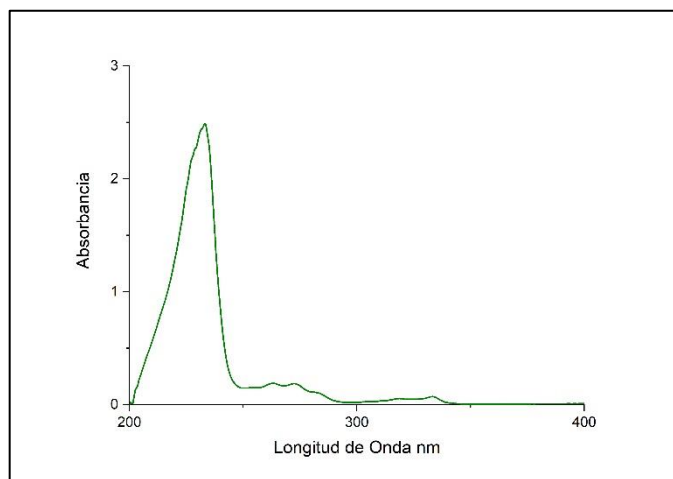


Figura 15. Espectro de absorción Naproxeno.

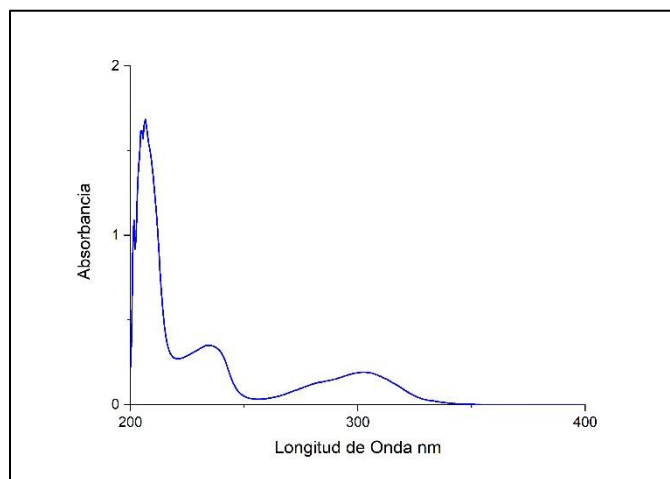


Figura 16. Espectro de absorción de Ácido Salicílico

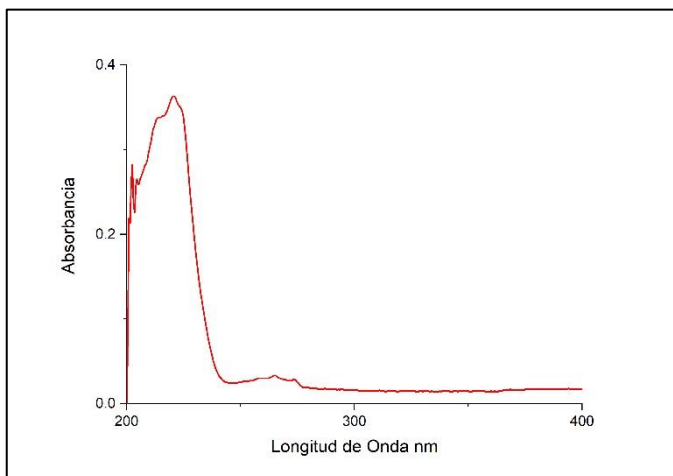


Figura 17. Espectro de absorción de Ibuprofeno.

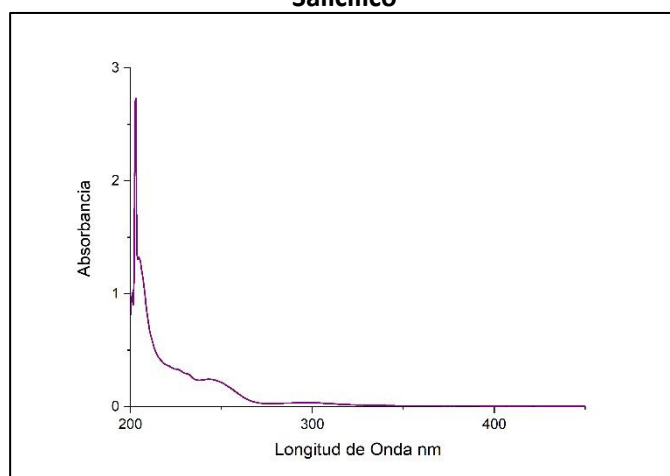


Figura 18. Espectro de absorción de Ketorolaco

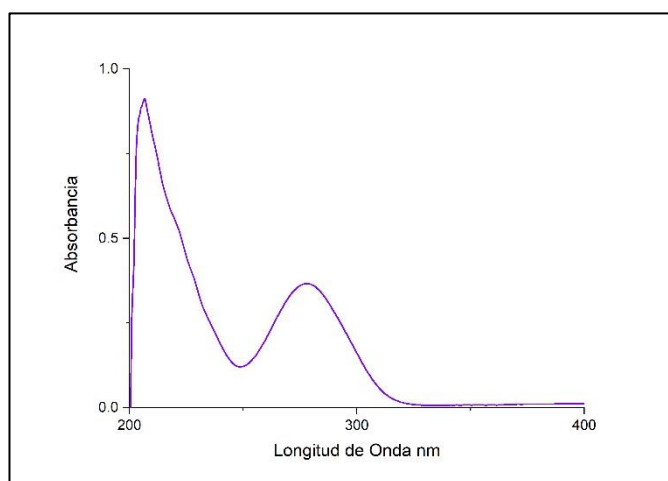


Figura 19. Espectro de absorción de Diclofenaco.

9.2.2. Selección de la fase móvil

9.2.2.1. Configuración por método isocrático

Este modelo se caracterizó por mantener una composición constante entre la proporción de disolvente orgánico y la proporción de fase acuosa durante todo el tiempo de análisis. En este estudio, se probó un total de cinco condiciones (Tabla 20), de las cuales solo dos lograron la optimización del método de análisis, las cuales llevaban la siguiente composición, 40 % ACN y 60 % de fase acuosa (Figura 20), de la cual el 1% del volumen se encontraba acidulada con ácido fosfórico; la otra fase consistía en 45 % ACN y 55 % de fase acuosa con las condiciones de acidez (Figura 21).

Tabla 20. Fases móviles y tiempos de retención obtenidos bajo distintas condiciones isocráticas.

Fármaco	Tiempo de retención (minutos)				
	60:40 (0.2 % de ácido fórmico)	40:60 (0.2 % de ácido fórmico)	50:50 (0.2 % de ácido fórmico + ácido acético)	40:60 (1 % de ácido acético)	40:60 (1% de ácido fosfórico)
Ketorolaco	3.190	5.165	3.648	5.832	3.540
Paracetamol	3.196	3.232	2.456	3.290	3.307
Ácido Salicílico	3.373	1.156	1.538	4.223	4.615
Naproxeno	3.940	7.965	4.998	7.898	8.115
Diclofenaco	4.965	16.848	7.615	16.615	17.165
Ibuprofeno	5.290	17.652	8.182	17.982	18.293

La figura 20 muestra un cromatograma de elución isocrática utilizando metanol (40 %) y una solución de ácido fosfórico al 1 % (60 %) como fase móvil, se puede observar que no existe la suficiente separación y resolución entre diclofenaco e ibuprofeno, además de que la señal correspondiente a paracetamol genera una interferencia con el tiempo muerto (TM) y ketorolaco. Este empalme de señales comprometió el análisis impidiendo la correcta cuantificación de los compuestos. Durante la realización de las pruebas, el ácido acético se reconoció como el generador de interferencia; por lo que se sustituyó por ácido fosfórico, el cual mejoró significativamente la resolución (Figura 21).

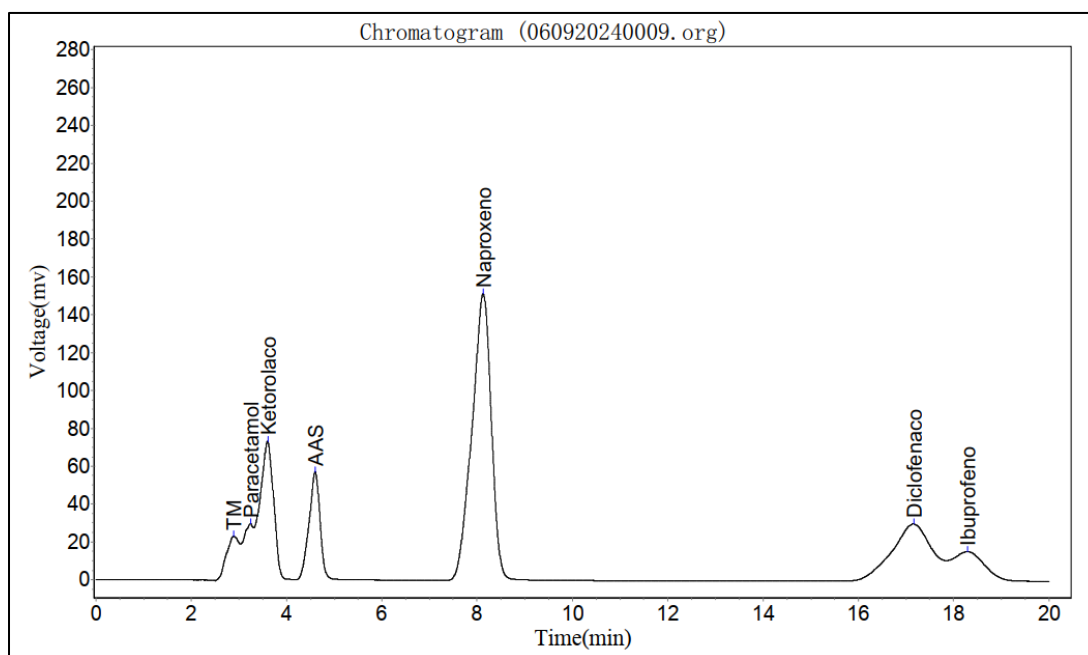


Figura 20. Cromatograma de mezcla de AINEs, 40:60 (1% de ácido fosfórico).

La figura 21 muestra el cromatograma con las señales que corresponden a los 5 compuestos que se seleccionaron finalmente para su estudio en muestras ambientales. Ketorolaco (KET), ácido salicílico (AS), naproxeno (NAP), diclofenaco (DIC) e ibuprofeno (IBU). Nuevamente se observa una baja retención por parte del compuesto KET creando una interferencia con el tiempo muerto (TM), esta condición sugirió realizar cambios en el método de elución utilizado.

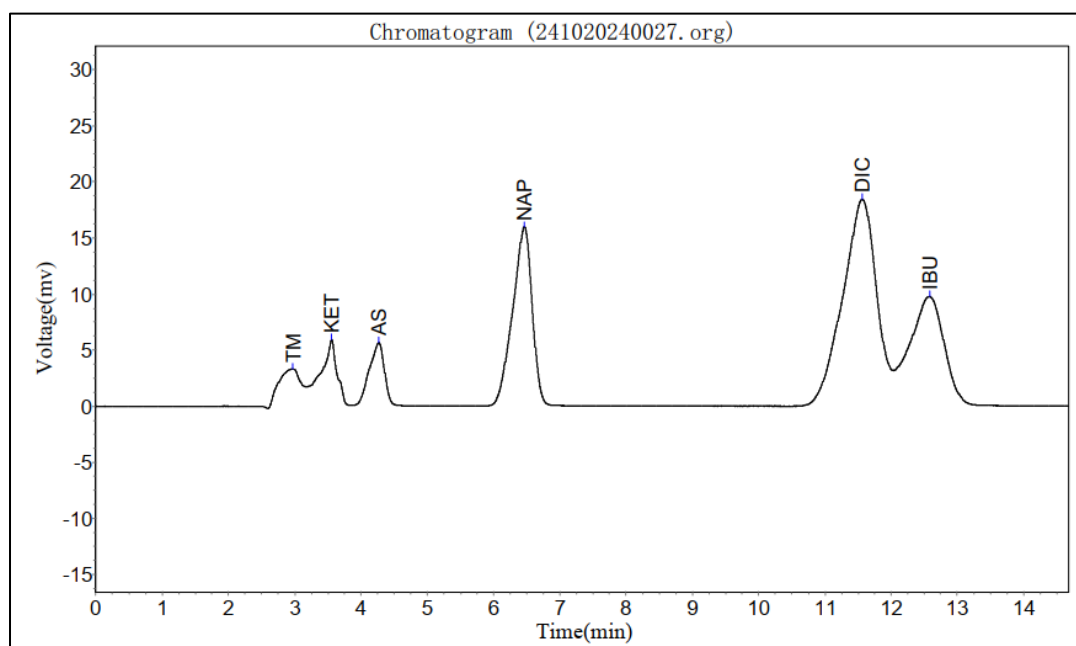


Figura 21. Cromatograma de mezcla de AINEs, 45 (ACN) :55 (1% de ácido fosfórico).

La condición de trabajo en mezcla de AINEs se llevó a cabo con la finalidad de simular las condiciones reales en las cuales se llegan a encontrar en una muestra acuática, la Tabla 21 muestra las distintas fases móviles empleadas para la optimización de los tiempos de retención y tiempo de análisis. Para esta prueba se empleó una concentración de 100 µg/mL para cada compuesto. Es importante mencionar que estas pruebas corresponden a ensayos preliminares cuyas condiciones se descartaron dados los inconvenientes que presentaban, tales como alta y baja retención de compuestos y distorsión de señales por empalme de compuestos.

Tabla 21. Fases móviles y tiempos de retención obtenidos bajo distintas condiciones ácida.

Fármaco	Tiempo de retención (minutos)		
	40:60 (1 % de ácido acético)	40:60 (1% de ácido fosfórico)	45:55 (1% de ácido fosfórico)
Ketorolaco	5.832	3.540	3.557
Paracetamol	3.290	3.307	3.584
Ácido Salicílico	4.223	4.615	4.270
Naproxeno	7.898	8.115	6.463
Diclofenaco	16.615	17.165	11.567
Ibuprofeno	17.982	18.293	12.580

9.2.2.2. Implementación de gradientes

9.2.2.2.1. Configuración por método de gradiente manual

Para este estudio se empleó el sistema que inició con 30 % de acetonitrilo y 70 % de agua, esta proporción inicial dio como resultado la separación de ketorolaco con el tiempo muerto, aumentando considerablemente su resolución, esto se vio reflejado en el cromatograma donde se distingue una separación de aproximadamente 1.8 min con respecto a la señal correspondiente al tiempo muerto (Figura 22). La tabla 22 muestra los tiempos de retención de los cinco compuestos utilizando gradiente manual.

Tabla 22. Tiempos de retención obtenidos a través de un gradiente manual.

Fármaco	Tiempo de Retención (minutos)
Ketorolaco	5.388
Ácido Salicílico	6.238
Naproxeno	11.617
Diclofenaco	16.787
Ibuprofeno	18.522

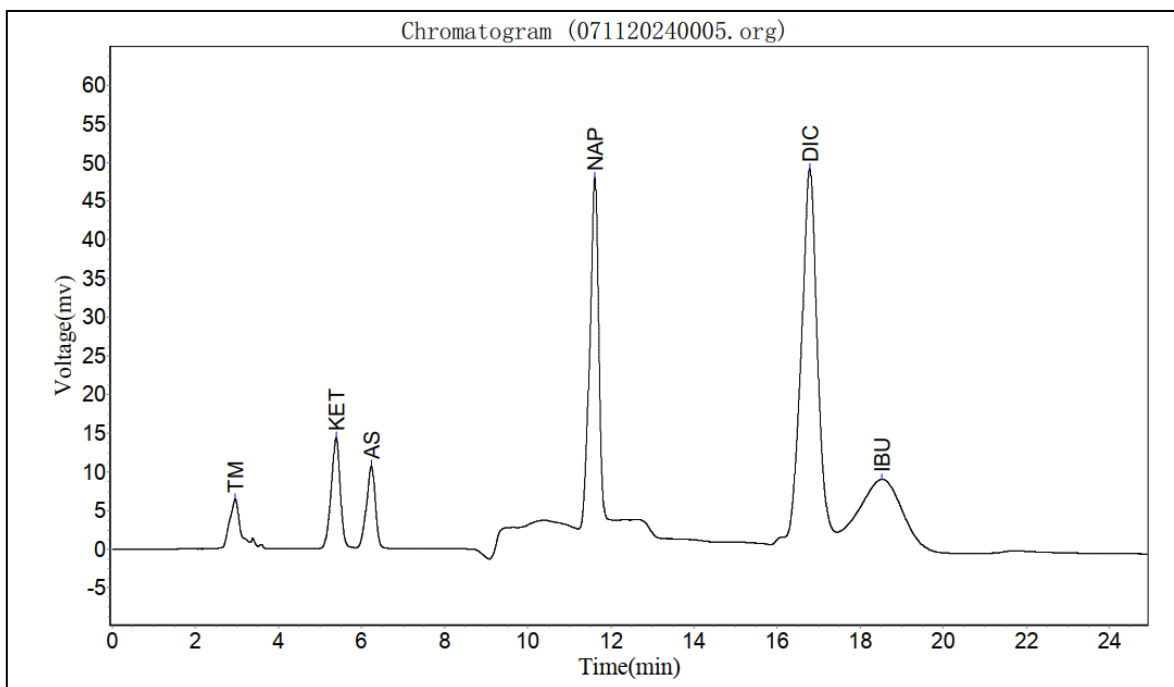


Figura 22. Cromatograma de mezcla de AINEs con implementación de gradiente manual.

9.2.2.2.2. Implementación de gradiente automatizado

Con la finalidad de reducir los tiempos de retención y mejorar la separación de los picos cromatográficos, se probaron distintos gradientes de elución. La última configuración de gradiente segmentado (ver la tabla 12 de la sección del apartado de condiciones cromatográficas), permitió la reducción del tiempo de análisis, el cual pasó de 25 a 16 minutos, este se debe a la implementación de segmentos de proporción constante en donde la fase orgánica se encontraba en porcentajes de 45 % y 50 % del minuto 3 al 9, esta modificación se vio reflejada en los fármacos mayormente retenidos (Tablas 21 y 23) como diclofenaco e ibuprofeno, cuyos tiempos de retención pasaron de 16.787 a 14.742 y de 18.522 a 15.245 minutos, respectivamente.

Tabla 23. Tiempos de retención obtenidos a través de un gradiente automatizado.

Fármaco	Tiempo de retención (minutos)
Ácido Salicílico	6.683
Ketorolaco	8.270
Naproxeno	10.667
Diclofenaco	14.742
Ibuprofeno	15.245

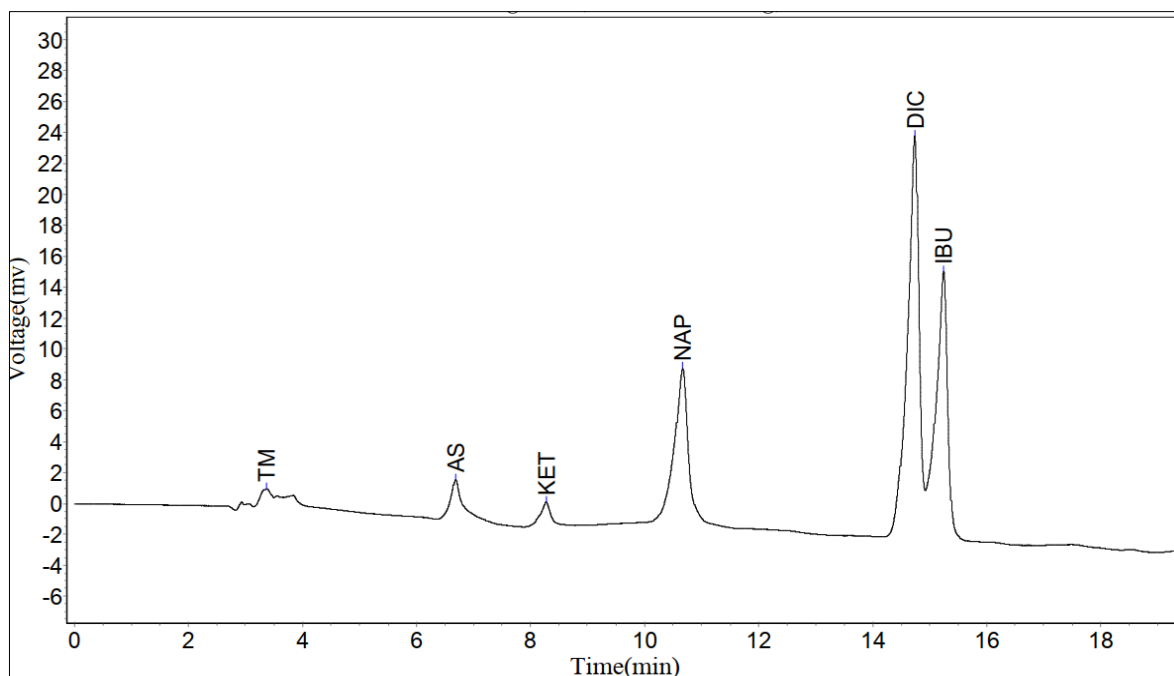


Figura 23. Cromatograma de mezcla de AINEs con implementación de gradiente automático.

La tabla 24 presenta tres parámetros cromatográficos clave para evaluar la calidad de la separación de cinco AINEs: resolución (R), factor de coleo o tailing (T) y factor de capacidad (k). Los valores obtenidos se comparan con criterios de referencia comúnmente aceptados para validar un método de CLAR. La resolución indica qué tan bien se separan dos picos adyacentes. Valores bajos implican solapamiento y pobre separación. La interpretación de este parámetro en la prueba realizada indica que existe una correcta resolución para los cinco compuestos analizados. Para el caso del factor de coleo, los valores obtenidos son favorables para la mayoría de los compuestos a excepción del ácido salicílico cuya señal presenta un valor de 1.418, sin embargo, este valor no comprometió la linealidad del método analítico. Finalmente, el factor de capacidad, la mayoría de los compuestos están en el rango ideal de retención, excepto el Naproxeno. Sin embargo, dada su resolución (4.601), esta condición no significa un problema en la práctica para la separación.

Tabla 24. Parámetros para la prueba de adecuabilidad del sistema de cuantificación de AINEs.

Parámetros	Diclofenaco	Naproxeno	Ibuprofeno	Ácido Salicílico	Ketorolaco	Valor de referencia
Resolución (R)	8.578	4.601	1.306	4.800	4.601	> 1.5 o más entre dos picos. > 1.25 >1
Factor de coleo (T) Tailing Factor	0.925	0.853	0.858	1.418	0.900	T = 1 Para un pico simétrico típico
Factor de capacidad (k)	0.925	0.743	1.057	1.315	0.824	0.8-1.5

9.2.3. Condiciones finales del método de análisis

Las condiciones finales del desarrollo del método se encuentran en la Tabla 25, una vez establecidas las condiciones, se inició la validación del método analítico para la detección y cuantificación de los 5 AINEs. La evaluación de los parámetros de validación para cada compuesto se hizo por separado, sin embargo, el método desarrollado permitió realizar el análisis de todos los compuestos de manera simultánea.

Tabla 25. Condiciones finales de trabajo para el método analítico

Longitud de Onda: 220 nm	Columna: C18	Fase Móvil: Acetonitrilo: Agua Acidulada 1% Ac. Fosfórico
Blanco: Metanol	Medio de disolución de AINEs: Metanol	Elución: Gradiente automático

9.3. Validación del método analítico

El proceso de validación del método analítico por CLAR para la determinación de AINEs en cuerpos de agua se llevó a cabo de manera independiente (análisis por separado) para cada uno de los cinco fármacos evaluados: ácido salicílico, ketorolaco, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno. El método se desarrolló con el objetivo de analizar muestras de aguas residuales y determinar la presencia de contaminación por AINEs en dichas muestras.

9.3.1. Linealidad del método analítico para la cuantificación de AINEs

La linealidad se determinó mediante el análisis de regresión lineal de las curvas de calibración, evaluando el coeficiente de correlación (r) a partir de la ecuación de la recta. En todos los casos, las regresiones obtenidas cumplieron satisfactoriamente con el criterio de aceptación establecido ($r > 0.99$) lo que confirma una relación lineal adecuada entre la concentración del analito y la respuesta del detector en el rango de trabajo evaluado.

En las figuras 24 a 28 se muestran las curvas de cuantificación de cada compuesto evaluado, así como las respectivas tablas de regresión de cada fármaco analizado (tablas 26 a 30); se observa una relación proporcional directa entre la concentración y la respuesta. En el anexo 5 se adjuntan las tablas con los datos de alturas correspondientes a cada concentración.

9.3.2. Linealidad de Ácido Salicílico (AS).

Tabla 26. Tabla de linealidad del método para Ácido Salicílico

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Altura Promedio
5	2340.3695
2.5	1186.90425
1.25	615.683
0.625	378.79775
0.3125	202.4645
0.15625	142.784
0.078125	82.9695
m	454.1941
b	66.7696
r	0.9998

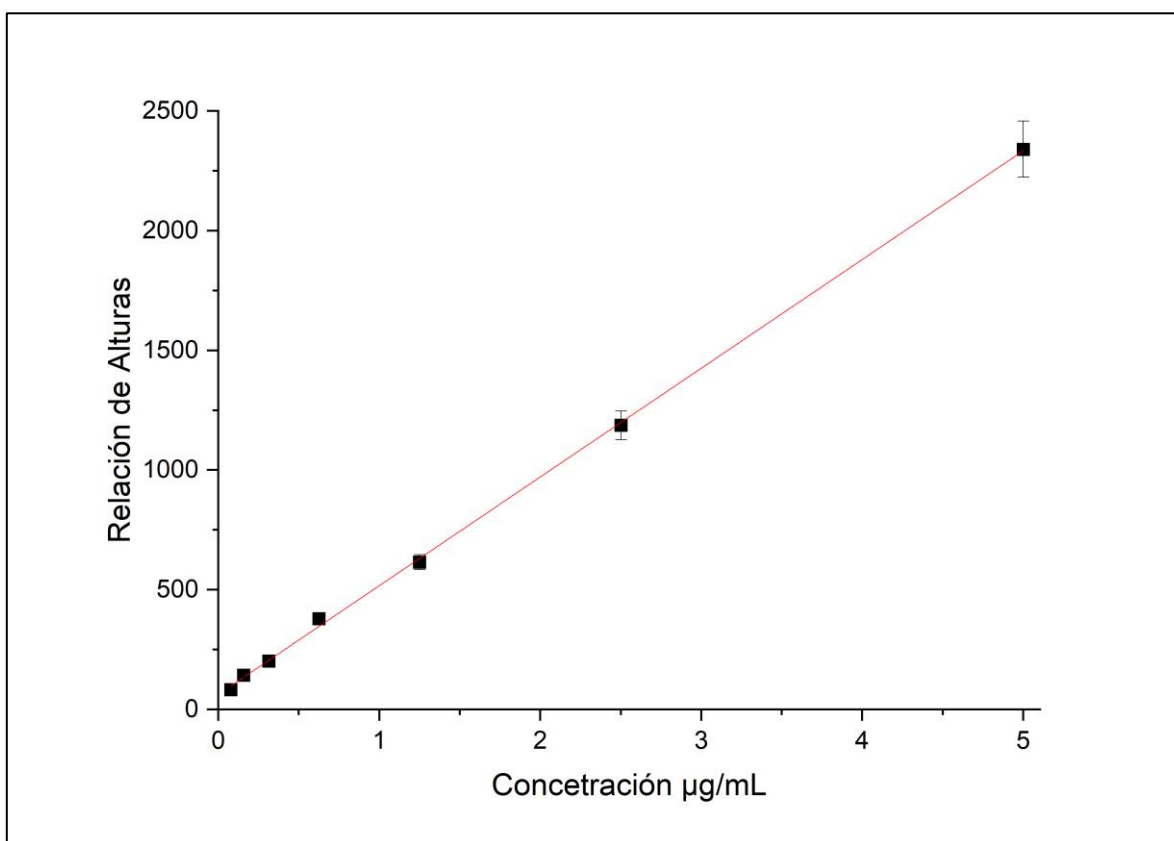


Figura 24. Linealidad del método de cuantificación para Ácido Salicílico.

9.3.3. Linealidad de Ketorolaco (KET).

Tabla 27. Tabla de linealidad del método para Ketorolaco

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Altura Promedio
5	1375.00375
2.5	653.0905
1.25	306.7
0.625	126.84675
0.3125	57.815
0.15625	16.91925
0.078125	6.866
m	279.5749
b	-32.9523
r	0.9997

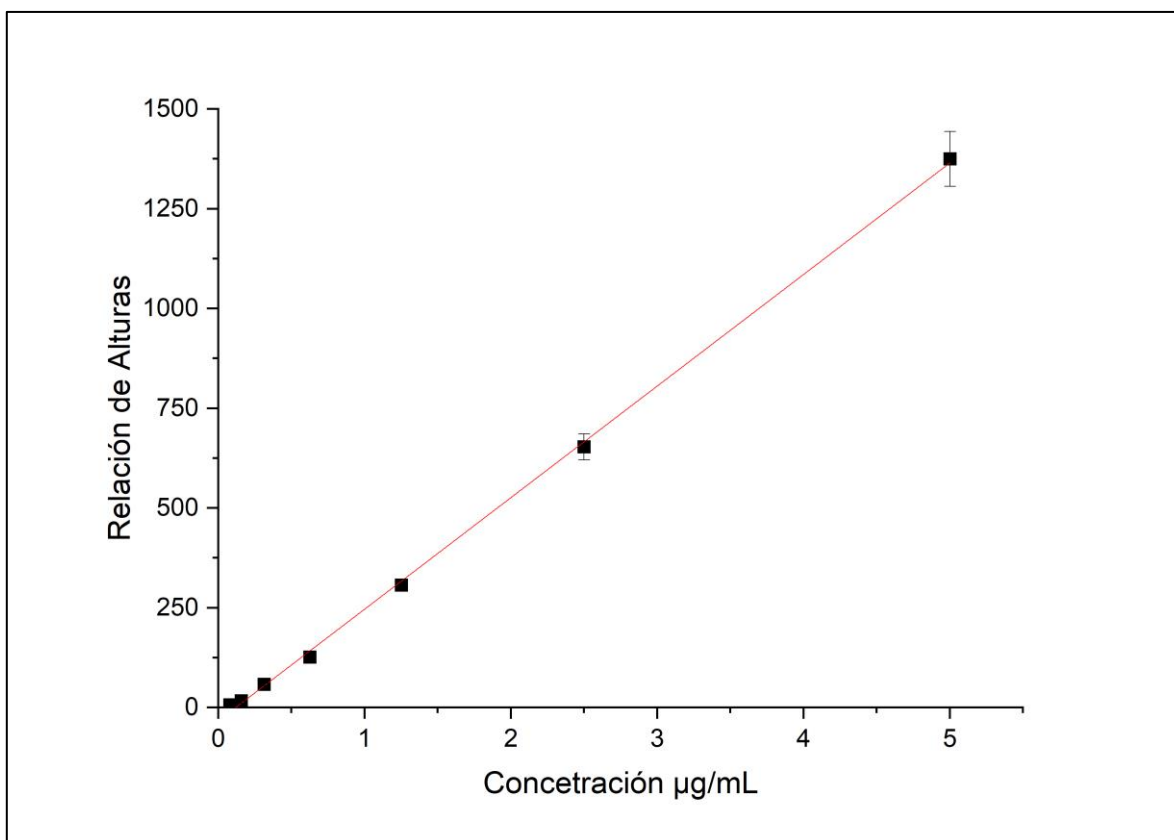


Figura 25. Linealidad del método de cuantificación para Ketorolaco

9.3.4. Linealidad de Naproxeno (NAP).

Tabla 28. Tabla de linealidad del método para Naproxeno

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Altura Promedio
5	8850.94625
2.5	4384.71625
1.25	2206.3085
0.625	1132.0385
0.3125	603.3905
0.15625	347.10225
0.078125	273.19
m	1750.0289
b	62.0177
r	0.9999

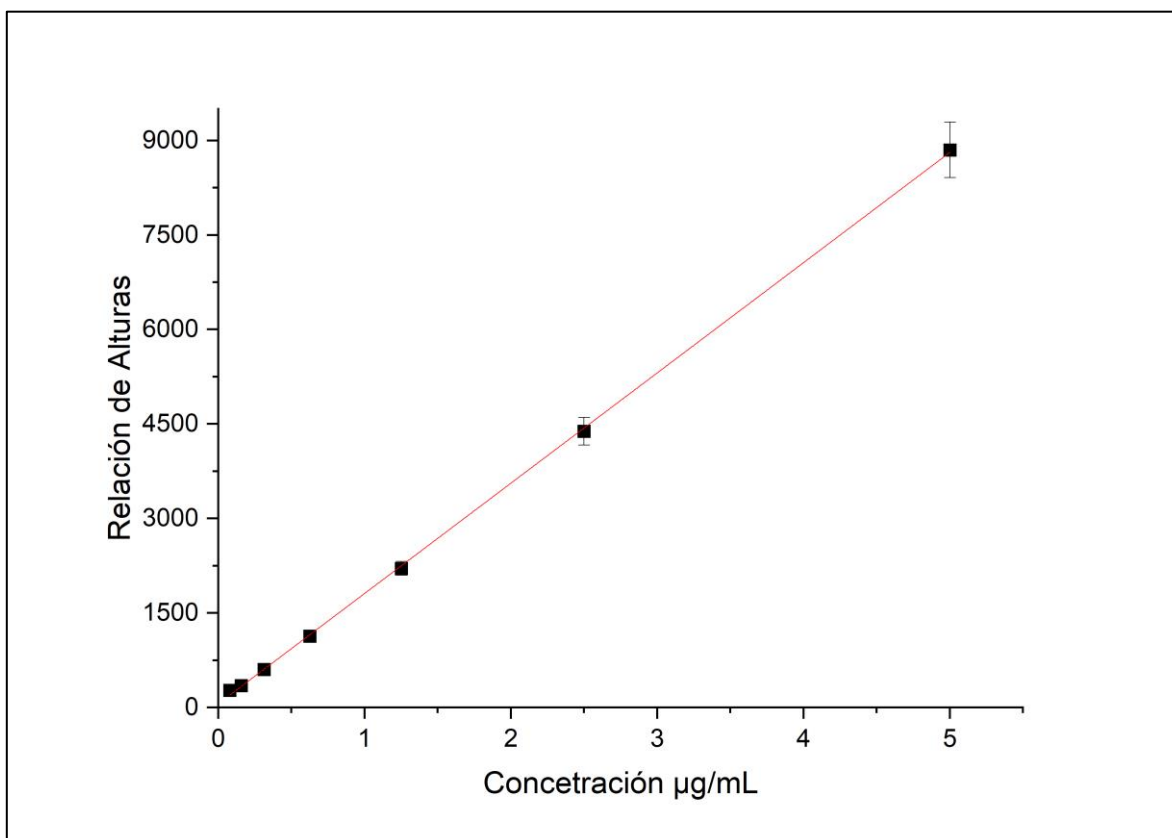


Figura 26. Linealidad del método de cuantificación para Naproxeno.

9.3.5. Linealidad de Diclofenaco (DIC).

Tabla 29. Tabla de linealidad del método para Diclofenaco.

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Altura Promedio
25	22536.8745
12.5	10776.82475
6.25	5162.7795
3.125	2414.47
1.5625	1160.9755
0.78125	497.2425
0.390625	255.38125
m	906.9764
b	-312.8552
r	0.9997

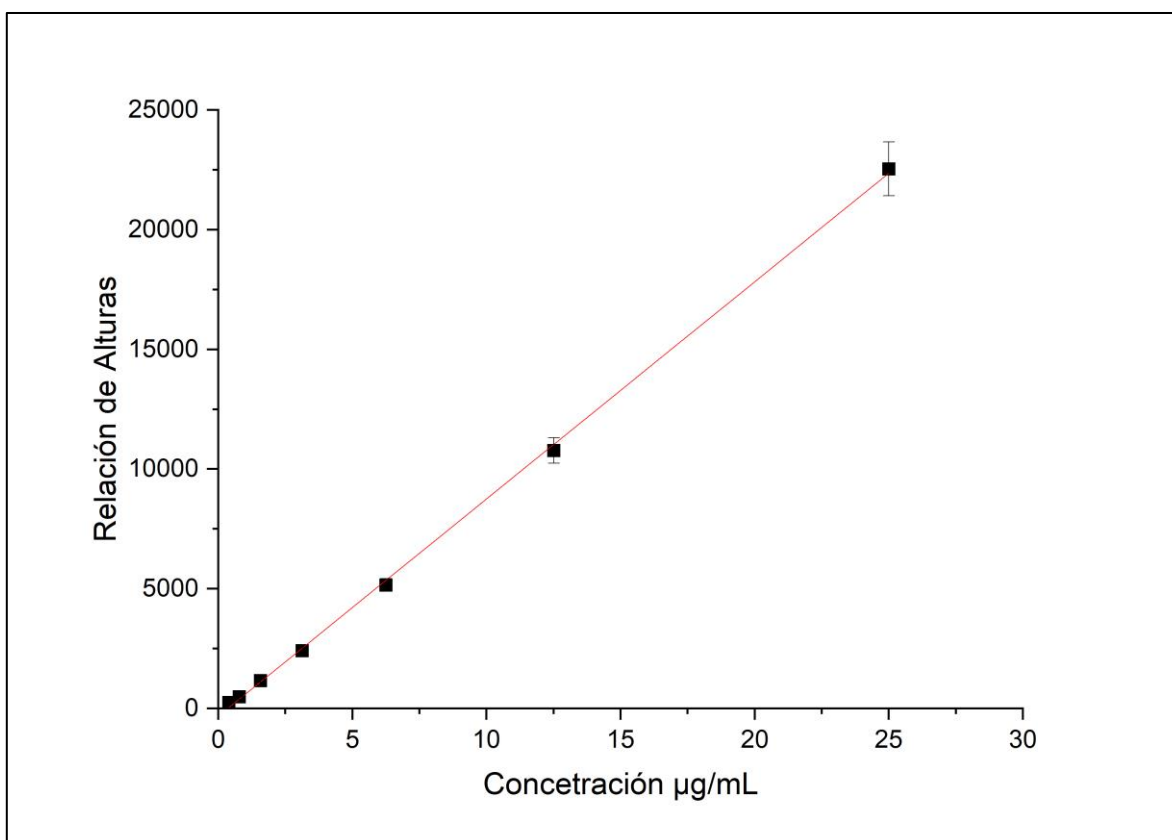


Figura 27. Linealidad del método de cuantificación para Diclofenaco

9.3.6. Linealidad de Ibuprofeno (IBU).

Tabla 30. Tabla de linealidad del método para Ibuprofeno.

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Altura Promedio
25	14472.04675
12.5	7303.41025
6.25	3799.8845
3.125	2149.464
1.5625	1322.7665
0.78125	1086.64475
0.390625	727.928
m	556.4451
b	465.3216
r	0.9997

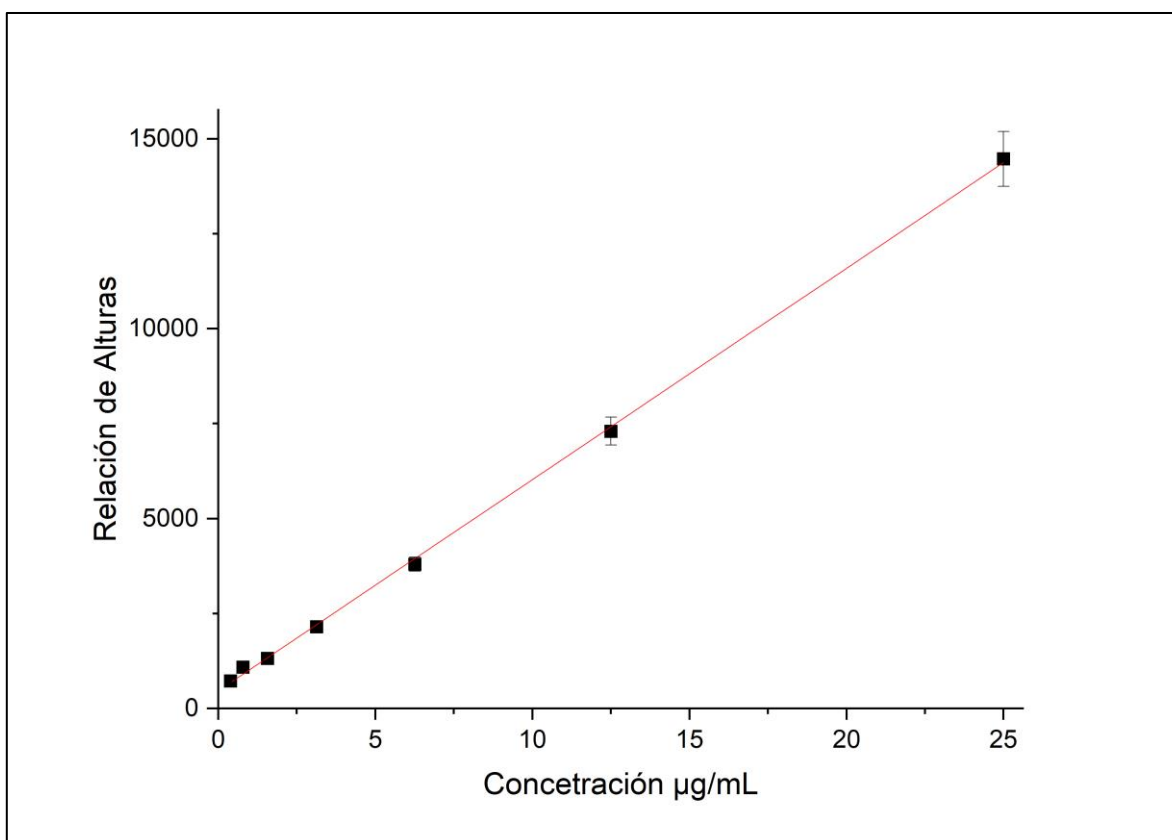


Figura 28. Linealidad del método de cuantificación para Ibuprofeno.

9.4. Límites de detección, límites cuantificación e intervalo de confianza de la pendiente.

Como parte de la evaluación de la linealidad y sensibilidad del método, se determinaron los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para cada analito, así como los intervalos de confianza de la pendiente (β_1) de las curvas de calibración, cuyos resultados se resumen en la tabla 31. Los valores de LOD y LOQ se estimaron a partir de la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración.

Tabla 31. Resumen límites de detección, límites de cuantificación e intervalos de confianza.

Fármaco	IC(β_1) de Alturas	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
Ácido Salicílico	589.677 - 273.943	0.06478	0.3239
Ketorolaco	328.176 - 214.364	0.03458	0.1729
Naproxeno	1800.451 - 1508.349	0.01564	0.0782
Diclofenaco	1360.040 - 438.040	0.01816	0.0908
Ibuprofeno	965.740 - 121.880	0.0275	0.1375

En todos los casos, los LOQ obtenidos se encuentran por debajo de las concentraciones más bajas evaluadas en el estudio de precisión y exactitud; 0.5 $\mu\text{g/mL}$ para ácido salicílico, ketorolaco y naproxeno; 0.3 $\mu\text{g/mL}$ para diclofenaco e ibuprofeno, confirmando que el método es capaz de cuantificar los analitos en los niveles de interés. Particularmente el naproxeno presentó los valores más bajos de LOD (0.01564 $\mu\text{g/mL}$), lo que refleja una alta sensibilidad del método para este compuesto.

Con respecto a los intervalos de confianza de la pendiente, se observaron diferencias notables entre los analitos. El ketorolaco presentó el intervalo de confianza más estrecho, siendo este de 328.176 a 214.364, lo que evidenció una alta consistencia en la respuesta instrumental para este analito a lo largo de los días de trabajo. Por otro lado, el ibuprofeno mostró el intervalo más amplio (965.740 a 121.880), con una diferencia considerable entre el límite superior e inferior, lo que reflejó una mayor variabilidad en la pendiente. El diclofenaco, a pesar de presentar una buena linealidad ($r > 0.99$), también mostró un intervalo de confianza amplio (1360.040 a 438.040), consistente con las deficiencias previamente identificadas en su porcentaje de recuperación y reproducibilidad. Sin embargo, el conjunto, estos resultados confirmaron que el método fue suficientemente sensible para la detección y cuantificación a la hora de su aplicación.

9.5. Precisión y exactitud del método analítico.

A continuación, se presentan los resultados de la evaluación de los parámetros de precisión y exactitud para cada compuesto analizado. La precisión se evaluó mediante repetibilidad (intra-día) y reproducibilidad (inter-día), expresada como el coeficiente de variación (CV%). Los criterios de aceptación de acuerdo con NOM-177/ICH Q2(R1) son:

- $CV \leq 5 \%$ para concentraciones altas y medias.
- $CV \leq 10 \%$ para concentraciones cercanas al límite de cuantificación.

La exactitud se expresa como el porcentaje de recobro promedio de concentraciones conocidas del analito. Criterio de aceptación (NOM-177):

- Recobro entre 80 % y 110 % para niveles bajos y medios.
- Recobro entre 70 % y 120 % para niveles cercanos al límite de detección.

Ácido Salicílico

La tabla 32 muestra los resultados de repetibilidad, analizada a tres concentraciones dentro de la curva de calibración (alta, media y baja). Mientras, que la tabla 33 muestra la evaluación de la precisión evaluada en dos días diferentes. Los coeficientes de variación obtenidos tanto para la repetibilidad como la reproducibilidad son menores al 5 % para las concentraciones altas y medias y al 10 % a concentración baja. En cuanto a la exactitud del método, expresada como porcentaje de recobro, se obtuvieron recobros que van del 93.221 % al 100.397 % en los dos días evaluados (tabla 34). Por lo que se puede establecer que se cuenta con un método preciso y exacto para la cuantificación de ácido salicílico.

Precisión:

Tabla 32. Repetibilidad de Ácido salicílico

Niveles de concentración (µg/mL)			
Concentración Nominal	3	1	0.5
Promedio	2.974	0.991	0.495
DE	0.084	0.004	0.005
CV (%)	2.809	0.433	1.052

Tabla 33. Reproducibilidad de Ácido salicílico

Niveles de concentración Recuperada (µg/mL)						
Concentración Nominal	Día 1			Día 2		
	3	1	0.5	3	1	0.5
Promedio	2.9744	0.990	0.495	3.011	0.932	0.468
DE	0.0835	0.004	0.005	0.011	0.046	0.029
CV (%)	2.809	0.433	1.052	0.385	5.015	6.374

Tabla 34. Exactitud de Ácido salicílico

Niveles de Recobro (%)						
Concentración Nominal	Día 1			Día 2		
	3 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL
Promedio	99.147	99.082	99.052	100.397	93.221	93.680
DE	2.785	0.429	1.042	0.387	4.676	5.971
CV (%)	2.809	0.433	1.052	0.385	5.016	6.374

Ketorolaco

Las tablas 35 y 36 muestran los resultados de la evaluación de la precisión del método para la cuantificación de ketorolaco. El coeficiente de variación obtenido durante la prueba de repetibilidad fue adecuado para los tres niveles de concentración evaluada. Mientras que en la prueba de reproducibilidad se observa que el mayor porcentaje de variación se obtuvo con la concentración más baja evaluada (8.7 %). La prueba de exactitud (tabla 37), mostró el recobro más bajo a una concentración de 1 µg/mL (91.9 % de recobro). Las pruebas de precisión y exactitud se cumplen para el método de cuantificación de ketorolaco.

Precisión:

Tabla 35. Repetibilidad de ketorolaco

Niveles de concentración (µg/mL)			
Concentración Nominal	3	1	0.5
Promedio	3.028	1.024	0.515
DE	0.107	0.009	0.020
CV (%)	3.550	0.850	3.867

Tabla 36. Reproducibilidad de ketorolaco

Niveles de concentración Recuperada (µg/mL)						
Concentración Nominal	Día 1			Día 2		
	3	1	0.5	3	1	0.5
Promedio	3.028	1.024	0.515	2.801	0.919	0.481
DE	0.107	0.009	0.020	0.044	0.049	0.042
CV (%)	3.550	0.850	3.867	1.566	5.364	8.736

Tabla 37. Exactitud de ketorolaco

Niveles de Recobro (%)						
Concentración Nominal	Día 1			Día 2		
	3 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL	3 µg/mL	1 µg/mL	0.5 µg/mL
Promedio	100.926	102.361	103.051	93.369	91.907	96.124
DE	3.583	0.870	3.985	1.462	4.930	8.397
CV (%)	3.550	0.850	3.867	1.566	5.364	8.736

Naproxeno

En la evaluación de precisión, la repetibilidad (tabla 38) mostró coeficientes de variación (CV) de 1.468 %, 1.385 % y 2.323 % para las concentraciones de 3, 1 y 0.5 µg/mL, respectivamente, cumpliendo con los criterios establecidos, siendo estos menores que 5 % para niveles alto y medio; y menores al 10 % para nivel bajo. En cuanto a la prueba de reproducibilidad (tabla 39), el día 1 presentó los mismos CV, mientras que en el día 2 se obtuvieron CV de 0.511 %, 1.961 % y 12.497 %. Para la prueba de la exactitud (tabla 40), los porcentajes de recobro en ambos días oscilaron entre 92.142 % y 104.611 %, valores que se encuentran dentro de los rangos establecidos por la normativa, siendo estos de 80 a 110 % para niveles bajos y medios.

Precisión:

Tabla 38. Repetibilidad de naproxeno

Niveles de concentración (µg/mL)			
Concentración Nominal	3	1	0.5
Promedio	2.897	1.007	0.516
DE	0.043	0.014	0.012
CV (%)	1.468	1.385	2.323

Tabla 39. Reproducibilidad de naproxeno

Niveles de concentración Recuperada (µg/mL)						
Concentración Nominal	Día 1			Día 2		
	3	1	0.5	3	1	0.5
Promedio	2.897	1.007	0.516	3.138	0.987	0.461
DE	0.043	0.014	0.012	0.016	0.019	0.058
CV (%)	1.468	1.385	2.323	0.511	1.961	12.497

Tabla 40. Exactitud de naproxeno

Niveles de Recobro (%)						
Concentración Nominal µg/mL	Día 1			Día 2		
	3	1	0.5	3	1	0.5
Promedio	96.573	100.695	103.101	104.611	98.726	92.142
DE	1.417	1.394	2.395	0.535	1.936	11.515
CV (%)	1.468	1.385	2.323	0.511	1.961	12.497

Diclofenaco

Los resultados de la prueba de repetibilidad (tabla 41) se presentaron valores de CV de 1.223 % (23 µg/mL), 2.099 % (6 µg/mL) y 1.898 % (3 µg/mL), todos dentro del criterio los cuales deben ser menores al 5 % para niveles alto y medio. En reproducibilidad (tabla 42), el día 1 mostró CV similares, mientras que el día 2 presentó CV de 1.214 %, 2.862 % y 11.670 %; En exactitud (tabla 43), los recobros en ambos días oscilaron entre 64.706 % y 89.589 %, observándose que los valores del día 2 para las concentraciones de 6 y 3 µg/mL se encuentran dentro del rango normativo, mientras que los de 23 µg/mL están por debajo del límite inferior aceptable del 80 %.

Precisión:

Tabla 41. Repetibilidad de diclofenaco

Niveles de concentración (µg/mL)			
Concentración Nominal	23	6	3
Promedio	14.882	5.156	2.688
DE	0.182	0.108	0.051
CV (%)	1.223	2.099	1.898

Tabla 42. Reproducibilidad de diclofenaco

Niveles de concentración Recuperada (µg/mL)						
Concentración Nominal	Día 1			Día 2		
	23	6	3	23	6	3
Promedio	14.882	5.156	2.688	15.639	4.618	2.126
DE	0.182	0.108	0.051	0.190	0.132	0.248
CV (%)	1.223	2.099	1.898	1.214	2.862	11.670

Tabla 43. Exactitud de diclofenaco

Niveles de Recobro (%)						
Concentración Nominal µg/mL	Día 1			Día 2		
	23	6	3	23	6	3
Promedio	64.706	85.930	89.589	67.996	76.962	70.862
DE	0.792	1.804	1.700	0.825	2.203	8.270
CV (%)	1.223	2.099	1.898	1.214	2.862	11.670

Ibuprofeno

La repetibilidad (tabla 44) mostró CV de 2.237 % (23 µg/mL), 2.337 % (6 µg/mL) y 1.619 % (3 µg/mL), valores que cumplen con el criterio de CV menor o igual al 5 % para niveles alto y medio. En reproducibilidad (tabla 45), el día 1 presentó CV similares a repetibilidad, mientras que en el día 2 se obtuvieron CV de 1.136 % (23 µg/mL), 10.934 % (6 µg/mL) y 11.912 % (3 µg/mL). En exactitud (tabla 46), los recobros del día 1 oscilaron entre 65.546 % y 86.624 %, mientras que en el día 2 fueron de 72.673 % a 82.631 %. La concentración alta (23 µg/mL) presentó recobros por debajo del 80 % en ambos días.

Precisión:

Tabla 44. Repetibilidad de ibuprofeno

Niveles de concentración (µg/mL)			
Concentración Nominal	23	6	3
Promedio	15.076	5.126	2.599
DE	0.337	0.120	0.042
CV (%)	2.237	2.337	1.619

Tabla 45. Reproducibilidad de ibuprofeno

Niveles de concentración Recuperada (µg/mL)						
Concentración Nominal	Día 1			Día 2		
	23	6	3	23	6	3
Promedio	15.076	5.126	2.599	16.715	4.958	2.137
DE	0.337	0.120	0.042	0.190	0.542	0.255
CV (%)	2.237	2.337	1.619	1.136	10.934	11.912

Tabla 46. Exactitud de ibuprofeno

Niveles de Recobro (%)						
Concentración Nominal µg/mL	Día 1			Día 2		
	23	6	3	23	6	3
Promedio	65.546	85.441	86.624	72.673	82.631	71.241
DE	1.466	1.997	1.403	0.825	9.035	8.486
CV (%)	2.237	2.337	1.619	1.136	10.934	11.912

9.6. Detección y cuantificación de AINEs en aguas residuales

El análisis de aguas residuales de ingreso a la PTAR “El Rayo” del municipio de Temixco, tuvo como objetivo evaluar la presencia y detección de los cinco compuestos estudiados. Los resultados, expresados en $\mu\text{g/mL}$ se presentan en la tabla 47. De los cuatro periodos de muestreo analizado, únicamente se detectó la presencia de ácido salicílico en los periodos C y D con concentraciones de 0.1875 $\mu\text{g/mL}$ y 0.2291 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El resto de los AINEs no se detectaron bajo las condiciones experimentales establecidas (N/D). El monitoreo revela que el ácido salicílico, es un contaminante detectable en una matriz compleja, como lo son las aguas residuales, en ciertas temporadas. La falta de detección del resto de los AINEs no implica su ausencia, este fenómeno sugiere que, de estar presentes, lo hacen en concentraciones traza que comprometen la sensibilidad del método analítico utilizado.

Tabla 47. Reporte de análisis de muestras: PTAR “El Rayo” Temixco

Periodo	Tipo de Punto	AS ($\mu\text{g/mL}$)	KET ($\mu\text{g/mL}$)	NAP ($\mu\text{g/mL}$)	DIC ($\mu\text{g/mL}$)	IBU ($\mu\text{g/mL}$)
A	Entrada	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
B	Entrada	N/D				
C	Entrada	0.1875				
D	Entrada	0.2291				

El muestreo realizado en el periodo “A” realizado en el municipio de Jiutepec tuvo como hallazgo la ausencia total de detección para todos los AINEs analizados en los distintos puntos de muestreo, incluyendo el punto considerado como “zona industrial” (entrada de la PTAR ECCACIV) y la “carga integrada” (salida de la PTAR). Los resultados se muestran en la tabla 48.

Tabla 48. Reporte de análisis de muestras de Jiutepec: Periodo A - 14 de julio 2025

Punto de muestreo	Tipo de Punto	AS ($\mu\text{g/mL}$)	KET ($\mu\text{g/mL}$)	NAP ($\mu\text{g/mL}$)	DIC ($\mu\text{g/mL}$)	IBU ($\mu\text{g/mL}$)
Canal CIVAC	Antes de influencia industrial	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Barranca de Analco	Descarga relevante					
Canal CIVAC	Zona de mezcla					
Barranca de Analco	PTAR ECCACIV					
Barranca de Analco	Carga integrada					

El monitoreo realizado en Jiutepec indica que, en las condiciones del muestreo y con la metodología analítica empleada, no se detectaron concentraciones de AINEs en ninguno de los puntos evaluados. Estos hallazgos se atribuyen a las condiciones ambientales suscitadas en el periodo, la presencia de lluvia constante favorece la dilución de los contaminantes comprometiendo la detección a la hora de haber sido analizados por cromatografía. El análisis de los tres periodos consecutivos realizados en Jiutepec durante los meses de noviembre y diciembre del 2025 (tablas 49-51) reveló patrones importantes sobre la presencia, distribución temporal y posible origen de los AINEs en los cuerpos de agua del municipio. A continuación, se muestra el reporte de los resultados.

Tabla 49. Reporte de análisis de muestras de Jiutepec: Periodo B - 24 de noviembre

Punto de muestreo	Tipo de Punto	AS (µg/mL)	KET (µg/mL)	NAP (µg/mL)	DIC (µg/mL)	IBU (µg/mL)
Canal CIVAC	Antes de influencia industrial	0.234	N/D	0.0046	N/D	N/D
Barranca de Analco	Descarga relevante	N/D	N/D	N/D		
Canal CIVAC	Zona de mezcla	0.0927	0.1031	0.0085		
Barranca de Analco	Influente PTAR ECCACIV	0.0079	0.0728	N/D		
Barranca de Analco	Carga integrada	0.4132	0.1166	N/D		

Uno de los aspectos importantes encontrados en esta investigación es la variabilidad en los perfiles de contaminación entre los tres periodos de muestreo. Esta variabilidad sugiere que la presencia de estos fármacos no es constante, sino que es la consecuencia de descargas intermitentes que posiblemente se encuentren ligadas a ciclos de producción industrial o a patrones de consumo y vertidos a nivel doméstico, además de considerar las condiciones hidrológicas cambiantes, tales como las lluvias, responsables de la dilución y arrastre de contaminantes.

Tabla 50. Reporte de análisis de muestras de Jiutepec: Periodo B - 25 de noviembre 2025

Punto de muestreo	Tipo de Punto	AS (µg/mL)	KET (µg/mL)	NAP (µg/mL)	DIC (µg/mL)	IBU (µg/mL)
Canal CIVAC	Antes de influencia industrial	0.7401	N/D	0.0793	N/D	N/D
Barranca de Analco	Descarga relevante	0.0909	0.0964	0.0116		
Canal CIVAC	Zona de mezcla	0.1232	0.2481	N/D		
Barranca de Analco	Influente PTAR ECCACIV	0.0045	N/D	N/D		
Barranca de Analco	Carga integrada	0.9792	N/D	N/D		

Tabla 51. Reporte de análisis de muestras de Jiutepec: Periodo C - 2 de diciembre 2025

Punto de muestreo	Tipo de Punto	AS (µg/mL)	KET (µg/mL)	NAP (µg/mL)	DIC (µg/mL)	IBU (µg/mL)
Canal CIVAC	Antes de influencia industrial	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Barranca de Analco	Descarga relevante	0.0203	N/D	N/D		
Canal CIVAC	Zona de mezcla	0.0168	N/D	N/D		
Barranca de Analco	Entrada PTAR ECCACIV	N/D	N/D	N/D		
Barranca de Analco	Carga integrada	N/D	N/D	N/D		
Canal de Unidad Habitacional.	Entrada PTAR el Texcal	0.00914	N/D	N/D		

Con base en los resultados reportados en las tablas 49, 50 y 51, el ácido salicílico (AS) presentó concentraciones que oscilan entre los 0.0045 µg /mL, valor mínimo registrado en la barranca de Analco (Zona Industrial) el 25 de noviembre de 2025 y el valor máximo de 0.9792 µg /mL, registrado en la misma barranca en el punto “aguas abajo” en la misma fecha. El monitoreo multitemporal en Jiutepec demuestra que los AINEs, particularmente el ácido salicílico, son contaminantes habituales en los cuerpos de agua del municipio, con una clara influencia de descargas industriales que introducen compuestos como el ketorolaco. El punto “aguas abajo” en la barranca de Analco se consolida como el sitio de mayor carga contaminante, cabe mencionar que, aquí se encuentra ubicada la salida de la PTAR de ECCACIV la cual se incorpora al último punto de la ruta de muestreo.

9.7. Ensayos *in silico* de riesgo ecotoxicológico.

La evaluación de la toxicidad *in silico* mediante la plataforma admetSAR 3.0 evalúa el potencial riesgo ecotoxicológico de distintos compuestos. Los resultados de la escala de toxicidad la muestra de 0 a 100 %, donde una toxicidad del 0 % implica que no existen potenciales efectos tóxicos, mientras que la del 100 % implicaría que el compuesto tiene una toxicidad muy elevada sobre la especie evaluada.

Los análisis *in silico* con admetSAR 3.0 se muestran en la figura 29, éstos revelaron que de los AINEs que se evaluaron sobre cuatro especies de organismos, el ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno y ketorolaco presentan la mayor toxicidad (98, 99.7, 98.9 y 98 %, respectivamente), especialmente en *Tetrahymena pyriformis*, una especie de protozoo muy utilizado en modelos toxicológicos. Representando con ello, que los AINEs, son muy tóxicos para esta especie. El análisis del nivel trófico más alto evaluado fue sobre dos especies de peces, el pez luna de agallas azules y la trucha arcoíris, mediante admetSAR 3.0. Se mostraron resultados más variables para los cinco antiinflamatorios evaluados. El AS y KET mostraron las menores toxicidades (28.9 y 22 %, respectivamente) para el pez luna, mientras que diclofenaco mostró la mayor toxicidad (83.1 %) para esta especie. También

para la trucha arcoíris, AS y ketorolaco fueron los menos tóxicos y diclofenaco el más alto. De las cuatro especies evaluadas, sobre *Daphnia magna* se observó la menor ecotoxicidad de todos los AINEs evaluados; la menor toxicidad se obtenida fue del 8.1 % (AS) y la mayor del 72.2 % (diclofenaco). Toda esta evaluación sugiere que el mayor efecto toxico de los AINEs ocurre sobre consumidores primarios (*Tetrahymena pyriformis*) y especies de niveles tróficos superiores dentro de la cadena alimenticia de organismos acuáticos de agua dulce.

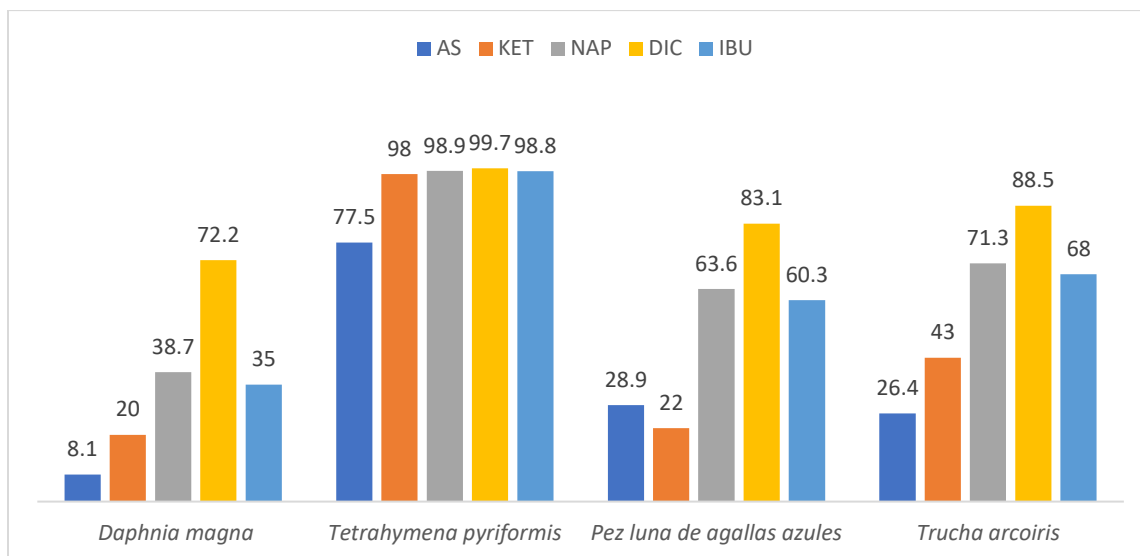


Figura 29. Análisis toxicológico *in silico* de AINEs mediante la plataforma admetSAR 3.0.

La afectación a protozoos es preocupante, ya que altera la degradación de materia orgánica y la estabilidad del ecosistema. Estos hallazgos subrayan la necesidad de monitorear y regular la presencia de estos fármacos en cuerpos de agua. La información destaca que los AINEs pueden representar un riesgo ambiental al afectar organismos acuáticos clave, especialmente protozoos y peces, lo que podría alterar el equilibrio ecológico.

Se evaluó el potencial tóxico de cinco AINEs mediante el uso de las plataformas VEGA y preADMET. Éstos permiten la estimación de la concentración letal media (CL_{50}). En la tabla 52 se muestra el análisis de AINEs, sobre *Daphnia magna*, considerando las plataformas antes mencionadas y admetSAR 3.0. En *Daphnia magna*, los resultados muestran una clara diferencia en los niveles de toxicidad entre los compuestos evaluados. Según VEGA y preADMET, que reportan valores de CL_{50} en mg/L, diclofenaco se identifica como el compuesto más tóxico, con valores muy bajos (0.48 mg/L en VEGA y 0.030 mg/L en preADMET), lo que indica alta susceptibilidad del microcrustáceo a este AINE. En contraste, el ácido salicílico presenta la menor toxicidad, alcanzando valores notablemente más elevados (47.64 mg/L en VEGA y 0.66 mg/L en preADMET), que corresponden a baja peligrosidad ecotoxicológica. La plataforma admetSAR, aunque basada en probabilidades de toxicidad (%), sigue el mismo patrón, colocando a diclofenaco y naproxeno con los mayores porcentajes, lo que refuerza la consistencia entre plataformas y sugiere un posible riesgo que requiere confirmación experimental para organismos planctónicos.

Tabla 52. Ensayo *in silico* de toxicidad aguda: *Daphnia magna*

Fármaco	admetSAR 3.0 (%)	VEGA mg/L	preADMET mg/L
Ácido Salicílico	8.1	47.64	0.66
Ketorolaco	20	2.72	0.126
Naproxeno	38.7	2.5	0.127
Diclofenaco	72.2	0.48	0.030
Ibuprofeno	35	0.57	0.096

En peces, las tendencias de toxicidad son similares a las observadas en *Daphnia magna*, destacándose nuevamente diclofenaco como el compuesto más tóxico (tabla 53), con un valor de CL₅₀ de 1.09 mg/L en VEGA y un valor extremadamente bajo en preADMET (0.0013 mg/L), lo que lo coloca dentro de la categoría de compuestos altamente peligrosos para organismos acuáticos vertebrados. Ketorolaco, ibuprofeno y naproxeno muestran toxicidad moderada, mientras que el ácido salicílico permanece como el compuesto menos riesgoso, con valores de CL₅₀ superiores (10.79 mg/L en VEGA; 0.180 mg/L en preADMET). Los porcentajes de admetSAR refuerzan esta clasificación al otorgar mayores probabilidades de toxicidad a diclofenaco, consistente con su comportamiento ecotoxicológico crítico.

Tabla 53. Ensayo de toxicidad *in silico* aguda en Peces: *Oncorhynchus mykiss*

Fármaco	admetSAR 3.0 (%)	VEGA mg/L	preADMET mg/L
Ácido Salicílico	26.4	10.79	0.180
Ketorolaco	43	2.4	0.017
Naproxeno	71.3	2.86	0.027
Diclofenaco	88.5	1.09	0.0013
Ibuprofeno	68	5.22	0.012

En el caso de las algas (tabla 54), los resultados confirman nuevamente una elevada sensibilidad hacia algunos AINEs, especialmente diclofenaco, que presenta los valores de EC₅₀ más bajos entre todas las plataformas evaluadas (0.1124 mg/L en VEGA y 0.019 mg/L en preADMET). Este comportamiento indica un fuerte impacto potencial sobre organismos fotosintéticos primarios. Naproxeno e ibuprofeno muestran toxicidad intermedia, mientras que el ácido salicílico se mantiene consistentemente como el compuesto menos tóxico, respaldado por valores altos de CL₅₀ y de probabilidad de no toxicidad.

Tabla 54. Ensayo de toxicidad *in silico* aguda en Algas: *Selenastrum capricornutum*

Fármaco	admetSAR 3.0 (%)	VEGA mg/L	preADMET mg/L
Ácido Salicílico	23	5.98	0.11
Ketorolaco	69.38	5.39	0.06
Naproxeno	59.9	3.41	0.059
Diclofenaco	73.1	0.1124	0.019
Ibuprofeno	52.7	1.58	0.027

9.8. Determinación de CL₅₀ en el modelo *in vivo* de *Daphnia magna*

9.8.1. Pruebas preliminares de toxicidad aguda

Para la determinación de la CL₅₀, se realizaron una serie de pruebas; las primeras fueron las exploratorias, en las que se evaluaron diferentes rangos concentraciones para cada fármaco (tabla 55) Sin embargo, en este rango de concentración evaluado no se alcanzó el 0 y 100 % de mortalidad para todos los compuestos, por lo que se modificó el rango de concentraciones de tal forma que se alcanzará aproximadamente el 100, 50 y 0 % de mortalidad de los organismos.

Tabla 55. mortalidad de pruebas preliminares de toxicidad de AINEs.

Fármaco	Concentraciones (µg/mL)					Rangos de Mortalidad (%)
AS	50	40	32.22	16.01	6.01	10 -100
KET	25	18.93	14.32	7.16	3.58	30 -80
NAP	130	120	100	85.34	21.35	10 - 90
DIC	20	18.5	17.5	15	4.38	20 - 90
IBU	20	18	16.8	13.6	4	10 -100

9.8.2. Prueba definitiva de toxicidad aguda

Con base en los resultados de las pruebas preliminares se realizaron las pruebas definitivas sobre la mortalidad de *Daphnia magna* tras 24 horas de exposición. Los resultados se muestran en la tabla 56. Las pruebas se realizaron por duplicado, con un control positivo (dicromato de potasio) y uno negativo (medio de cultivo). Para el AS, el rango de concentración evaluado fue de 0.2 a 45 mg/L y su CL₅₀ = 20.57 mg/L; ketorolaco de 1 a 100 mg/L y su CL₅₀ = 41.54 mg/L; naproxeno de 7 a 190 mg/L y su CL₅₀ = 123.31 mg/L; diclofenaco de 2 a 40 mg/L y su CL₅₀ = 22.37 mg/L; por último, ibuprofeno con un rango de concentración de 2 a 80 mg/L y su CL₅₀ = 5.24 mg/L. De acuerdo con los resultados los fármacos causaron una mayor toxicidad a mediada que la concentración aumentaba, este patrón se vuelve más visible en las concentraciones más altas de fármaco.

Tabla 56. CL₅₀ obtenidas tras la prueba de toxicidad aguda con *Daphnia magna*.

Fármaco	Concentración (mg/L)	Número de individuos <i>D. magna</i>	24 horas	
			PROBIT	Mortalidad (%)
Ácido Salicílico	0.2	10	0	0
	0.5		4.33	25
	20		5.00	50
	40		8.09	100
	45		8.09	100
	CL ₅₀		20.57 mg/L	
Ketorolaco	1	10	0	0
	13.4		3.94	15
	25		4.33	25
	50		5	35
	100		4.48	30
	CL ₅₀		41.54 mg/L	
Naproxeno	7	10	0	0
	70		4.61	35
	90		5.25	60
	160		5.84	80
	190		6.28	90
	CL ₅₀		123.31 mg/L	
Diclofenaco	2	10	0	0
	8		4.31	25
	12		4.48	30
	15		4.87	45
	40		6.64	95
	CL ₅₀		22.37 mg/L	
Ibuprofeno	2	10	0	0
	10		0	0
	20		5	50
	40		5	50
	80		6.28	90
	CL ₅₀		5.24 mg/L	

9.9. Cuantificación de la CL₅₀ de AINEs en modelo de *Daphnia magna*.

La mayoría de los AINEs contienen grupos funcionales (por ejemplo, grupos aromáticos, –F, –Cl, –CF₃, etc.) que son altamente resistentes al metabolismo. Esto aumenta la vida media no solo en el cuerpo humano, sino que también prolonga el tiempo de degradación en el ambiente. En ambientes acuáticos, los AINEs pueden sufrir procesos de degradación natural como fotólisis, hidrólisis y degradación microbiana (43,44).

En este trabajo con la finalidad de verificar la precisión de las concentraciones iniciales preparadas, se realizó la cuantificación de los fármacos en los medios de exposición por CLAR. El objetivo de esta actividad consistió en verificar que los resultados de los bioensayos de toxicidad fueran atribuibles a las concentraciones reales. La tabla 57 indica las concentraciones iniciales de las soluciones stock que se utilizaron para la prueba de exposición de CL₅₀ de los fármacos.

Tabla 57. Concentraciones de las soluciones stock de AINEs para la realización de la prueba de toxicidad.

Medio	Concentración de soluciones stock (mg/L)
Ácido salicílico	50
Ketorolaco	100
Naproxeno	190
Diclofenaco	40
Ibuprofeno	80

La cuantificación de los AINEs por CLAR se realizó tomando en cuenta la CL₅₀ obtenida tras las pruebas de toxicidad, los resultados obtenidos de esta prueba se muestran en la tabla 58 donde se comparan la concentración correspondiente a la CL₅₀ que se determinó para cada fármaco mediante análisis probit y el promedio de la concentración determinada por el equipo de cromatografía, visto como concentración recuperada.

En el caso de ácido salicílico, los resultados de toxicidad obtenidos reflejan concordancia entre la CL₅₀ determinada tras la prueba de toxicidad (20.57 mg/L) y las concentraciones reales (44.31 mg/L) con una recuperación aproximada del 88.62 % este rango se encuentra dentro de los rangos aceptados en matrices complejas (70 a 120 %). Por otro lado, ketorolaco presentó un comportamiento similar, cuyos valores se encuentran dentro de los parámetros aceptables (106.60 %). Estos resultados sugieren que el compuesto no presentó cambios en el medio durante los ensayos, por lo tanto, los resultados de toxicidad son válidos.

Los resultados correspondientes a naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno presentan una pérdida moderada en el promedio de la concentración recuperada un rango que va del 1.55 al 29.28 %, estos porcentajes sugieren discrepancia con los valores iniciales de las concentraciones del medio de exposición. Sin embargo, un estudio sobre los efectos de la bioconcentración, bioquímicos y conductuales realizados en *Daphnia magna*, sugiere que fármacos antiinflamatorios no esteroideos como el diclofenaco, tras someterse a pruebas de toxicidad por exposición, presentó factores de bioconcentración de 70.94 y 8.02 para las concentraciones de exposición nominales de 5 y 100 µg/L, respectivamente. Demostrando que este organismo acumula activamente el diclofenaco en sus tejidos reduciendo su concentración en agua (45).

Otra investigación reconoce que *Daphnia magna* es uno de los organismos modelo más utilizados para evaluar la toxicidad de AINEs y otros fármacos, y que la captación y bioacumulación son procesos clave que debe considerarse en la interpretación de los resultados toxicológicos. Los organismos pueden absorber los compuestos a través de las branquias y el tracto digestivo reduciendo la contracción en el medio acuoso durante el ensayo (37).

Tabla 58. Concentraciones nominales (CL₅₀) vs concentración recuperada de los medios donde se realizaron las pruebas de toxicidad.

Muestra	CL ₅₀ (mg / L)	Promedio de concentración recuperada (mg/ L)	Porcentaje recuperado (%)
Acido salicílico	20.57	44.31	88.62
Ketorolaco	41.54	106.066	106.066
Naproxeno	123.31	55.64	29.28
Diclofenaco	22.37	0.62	1.55
Ibuprofeno	5.24	24.82	31.02

Finalmente, el estudio integró la verificación analítica de concentraciones en bioensayos de toxicidad y monitoreo ambiental de AINEs en aguas residuales. En los ensayos de toxicidad se identificó al ácido salicílico como el compuesto de mayor recuperación con un 88.62 % de la concentración nominal del medio de exposición utilizado en la prueba de toxicidad, por lo que la se considera aprobada la prueba de exactitud. Por otra parte, el monitoreo en Jiutepec confirmó la presencia de AINEs en cuerpos de agua con variabilidad temporal, destacando el ácido salicílico como el compuesto más frecuente y persistente en la Barranca de Analco. Por su parte, la PTAR “El Rayo” (Temixco) solo se detectó ácido salicílico de forma ocasional. En conjunto, los resultados evidencian que los AINEs, particularmente el ácido salicílico, actúa como contaminante emergente en la zona de estudio, con aportes tanto domésticos como industriales.

10. Conclusiones

- 1) En las encuestas aplicadas en SAPAC se determinó que el grupo de medicamentos con mayor presencia en los hogares de los usuarios son los del grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Así mismo se comprobó que la mayoría de la población (81.25%) no conoce ni realiza prácticas de disposición adecuada de medicamentos.
- 2) Se calculó el valor predictivo de riesgo de impacto ambiental de los AINEs sobre especies acuáticas. La evaluación sugiere que el mayor efecto tóxico ocurre sobre los consumidores primarios (peces).
- 3) Se desarrolló y validó un método analítico para cuantificación de ácido salicílico, ketorolaco, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno mediante cromatografía líquida de alta resolución con los parámetros linealidad de > 0.99 , una precisión y exactitud con coeficientes de variación $< 15 \%$, según lo establecido por diferentes guías de validación como la ICH Q2 y la NOM-177-SSA1-2013.
- 4) Se detectó y cuantificó la presencia de AINEs en las muestras de aguas residuales; se determinó que el ácido salicílico es un contaminante habitual que compone los desechos del municipio de Temixco y en la zona industrial de municipio de Jiutepec.
- 5) Se diseñó y aplicó un modelo *in vivo* con *Daphnia magna* y se evaluó la toxicidad de AINEs a partir de pruebas de toxicidad aguda determinando una $CL_{50} = 20.57 \text{ mg/L}$ para AS, 41.54 mg/L para KET, 123.31 mg/L para NAP, para 22.37 mg/L para DIC y 5.24 mg/L para IBU, mediante análisis probit.

11. Expectativas

- Se espera que la investigación desarrollada se posicione como la base para futuros proyectos contemplados para el estudio de los fármacos desde la una perspectiva ecológica y ambiental.
- Continuar con el desarrollo de nuevos modelos *in vivo* para la determinación de toxicidad aguda y crónica en diferentes niveles tróficos como productores primarios, consumidores primarios, secundarios y terciarios y realizar análisis complementarios para determinar factores de riesgo ambiental como la bioacumulación y la biomagnificación.
- El método analítico desarrollado constituye un punto de partida prometedor para el monitoreo de AINEs en el ambiente, cuyo alcance puede ser expandido de manera gradual hacia matrices más complejas y hacia enfoques analíticos de mayor resolución, contribuyendo así a una mejor comprensión de la presencia, el destino y los efectos ecológicos de estos contaminantes emergentes.
- El método analítico se podría implementar en la evaluación de la remoción de AINEs en procesos de biorremediación utilizando diferentes microorganismos.

12.Anexos

Anexo 1: Formato de encuestas aplicada a los usuarios del Sistema de Agua Potable y Alcantarillado de Cuernavaca (SAPAC).

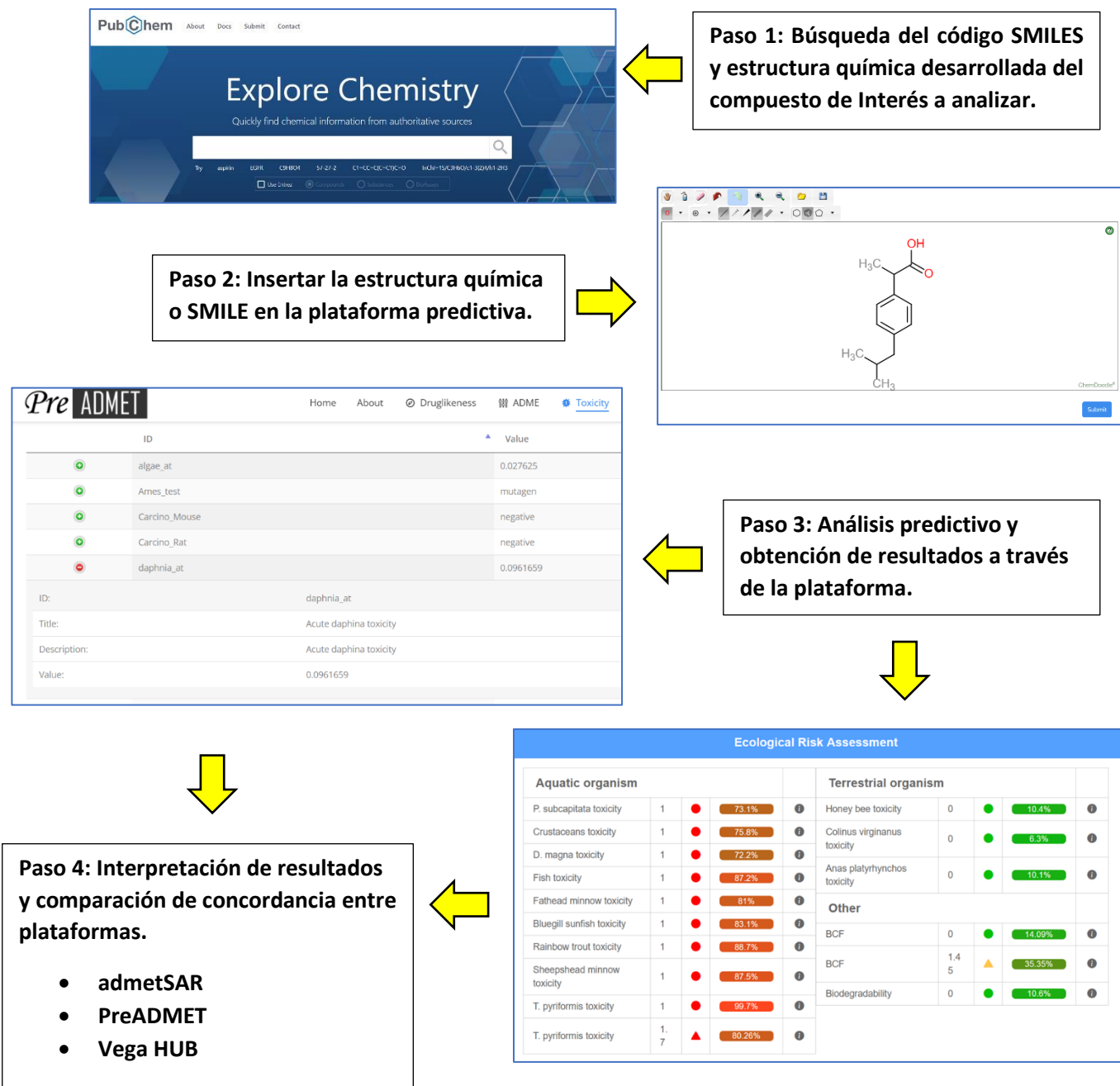
Sección de preguntas de carácter sociodemográfico.	
Indique su sexo ☐ Hombre ☐ Mujer	Indique su edad ☐ Menor a 18 ☐ 18 a 24 años ☐ 25 a 34 años ☐ 35 a 44 años ☐ 45 a 54 años ☐ Más de 54 años
Indique su grado de escolaridad ☐ Primaria ☐ Secundaria ☐ Bachillerato ☐ Licenciatura ☐ Posgrado ☐ No Estudia Indique su lugar de residencia: _____	Indique el número de personas que viven en su hogar ☐ De 2 a 3 personas ☐ De 4 a 6 personas ☐ De 7 a 10 personas ☐ 10 o más personas ☐ Vive solo

Sección de preguntas relacionadas con el uso y desecho de medicamentos en el hogar, lea con atención y responda.	
¿Es usted un profesional sanitario apto para prescribir o dispensar medicamentos? ☐ Sí ☐ No ¿Alguna vez ha recibido información de cómo deshacerse de los medicamentos de manera adecuada? ☐ Sí ☐ No	¿Cuál es el sitio donde almacena los medicamentos en su hogar? Seleccione las opciones. ☐ Botiquín ☐ Tocador ☐ Armario/cajón ☐ Refrigerador ☐ Otro, especificar: _____
¿Padece alguna enfermedad crónica? ☐ Sí ☐ No ¿Su tratamiento requiere un almacén especial? ☐ Sí ☐ No Especifique el tipo de almacenamiento: _____	¿Qué tipo de medicamentos suele almacenar en su hogar? ☐ Antihipertensivo ☐ Antidiabéticos ☐ Antibióticos ☐ Antiparasitarios ☐ AINEs ☐ Antitusígeno ☐ Antiulcerosos/antiácidos ☐ Laxantes ☐ Anticonceptivos
¿Qué método utiliza usted para deshacerse de medicamentos? ☐ Los deposita en la basura ☐ Los desecha por el retrete o en el lavadero (W.C. o tarja) ☐ Los quema ☐ Los regala a amigos o familiares ☐ Los devuelve a la farmacia o al hospital ☐ Los deposita en un contenedor asignado (SINGREM) ☐ Los utiliza como fertilizante para las plantas	¿Con qué frecuencia desecha los medicamentos en su hogar? ☐ Una vez a la semana ☐ Una vez al mes ☐ Una vez cada 3 meses ☐ Una vez cada 6 meses ☐ Una vez al año
¿Conoce usted los sitios aprobados para deshacerse de los medicamentos caducos? (Contenedores del SINGREM). ☐ Sí ☐ No	

Anexo 2: Procedimiento para la realización de los ensayos toxicológicos *in silico* a través de plataformas de predicción: admetSAR 3.0, PreADMET y VEGA 1.2.4.

admetSAR y PreADMET:

Para realizar las pruebas de toxicidad aguda de cada molécula se recurrió al siguiente flujo de trabajo:

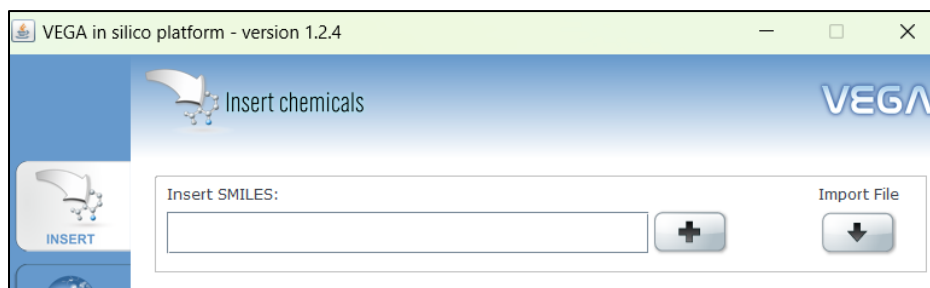


Software de predicción: VEGA in silico platform version 1.2.4

Para realizar las pruebas de toxicidad aguda de cada molécula se recurrió al siguiente flujo de trabajo:

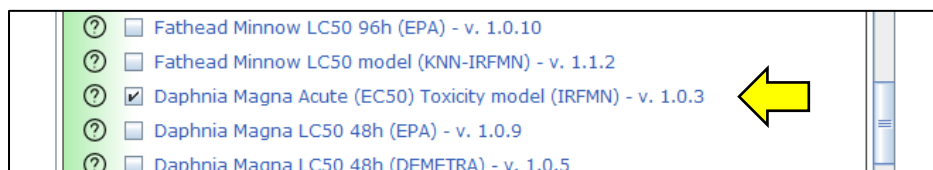
A. Identificación de la sustancia a analizar

- Búsqueda de la estructura de la sustancia activa en formato SMILES.



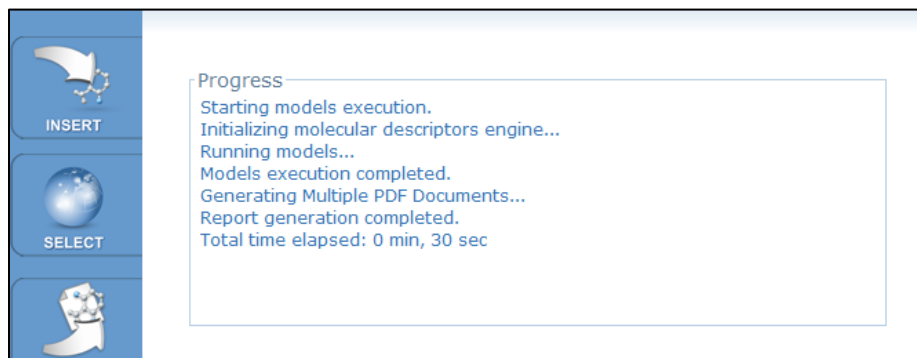
B. Selección del modelo

- Para este ensayo se designó como “endpoint” el modelo de toxicidad aguda.



C. Ejecución de la predicción

- El software VEGA genera un reporte el cual incluye
 - Valor estimado
 - ADI por sus siglas en inglés Aplicability Domain Index: Confiabilidad de la predicción en escala de 0 (baja) a 1 (alta)



D. Interpretación de los resultados

- Determinar si el ADI es alto o bajo, según el resultado y realizar las correcciones y o pruebas complementarias correspondientes
- Comparación de los resultados consultando los ensayos tanto predictivos como *in vivo* de otras fuentes, así como los resultados del modelo biológico complementario de este proyecto.

Anexo 3: Elaboración de agua dura como medio de cultivo de D. magna para pruebas de toxicidad aguda.

Nota: Por cada litro de agua dura que se quiera elaborar, mezclar 25 mL de cada una de las soluciones stock:

1. Solución de cloruro de calcio di hidratado.
2. Solución de sulfato de magnesio heptahidratado.
3. Solución de bicarbonato de sodio.
4. Solución de cloruro de potasio.

Pruebas fisicoquímicas para la evaluación de la calidad de agua dura:

- **Medir temperatura:** tomar una muestra de agua dura de 50 mL con ayuda de un termómetro tomar la temperatura del agua dura el cual debe estar dentro de los siguientes parámetros. ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)
- **Medir pH:** con un potenciómetro determinar el pH del agua dura. (7.0- 8.5)
- **Medir conductividad:** con un potenciómetro medir la conductividad del agua dura. (400 - 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$)

Determinación de dureza:

- Tomar 50 mL de la solución (agua dura) en un matraz Erlenmeyer.
- Adicionar 1mL de la solución amortiguadora de amonio.
- Añadir 8 gotas de indicador de hidroxilamina.
- Titular con solución EDTA 0.01 M hasta el punto final del vire que es de rojo vino a azul.
- Para calcular la dureza total expresada en mg/L de CaCO_3 se aplica la siguiente ecuación

$$\text{Ec. 4: } DT = \frac{(\text{mL gastados})(M) (100.1)(1000)}{\text{volumen de la muestra en mL}}$$

Donde:

- M= Molaridad.
- DT =Dureza Total

Determinación de oxígeno disuelto (O.D) en muestras de agua dura.

El oxígeno (O₂) disuelto (OD) en el agua es la cantidad de oxígeno presente en forma líquida en el agua. Se mide en miligramos por litro (mg/L) o partes por millón (ppm). Los lineamientos de calidad se muestran en la Tabla 59.

Tabla 59. Lineamientos para la calidad de agua según la OMS.

Nivel de OD (ppm)	Calidad de agua
0.0 – 4.0	Algunas poblaciones de peces y macroinvertebrados empezarán a disminuir.
4.1 -7.9	Aceptable
8.0 -12.0	Buena
12.0 +	Repetir la prueba

Tabla 60. Materiales, reactivos y equipos para la determinación de oxígeno disuelto:

Materiales	Reactivos	Equipos
• Botella yodometrica de 125mL • Pipeta volumétrica de 25 mL • Matraz Erlenmeyer de 125mL • Pipeta graduada de 1 mL • Bureta graduada de 25 mL • Soporte universal con pinzas para bureta • Vidrio de reloj • Espátula • Mortero	• Tiosulfato de sodio • Ácido sulfúrico concentrado • Sulfato manganoso hidratado o cloruro manganoso trihidratado • Yoduro de potasio • Hidróxido de sodio • Almidón • Agua de rio, lago, riachuelo, estanque, chorro • Agua destilada	• Campana de extracción • Balanza

Preparación de reactivos:

1. **Reactivo alcalino de yoduro de potasio:** Pesar 25 g de Hidróxido de sodio (NaOH) y 6.75 g de yoduro de potasio (KI) diluir y aforar en 50 mL de agua destilada.
2. **Solución de sulfato manganoso:** Pesar 16.25 g de Sulfato manganoso hidratado (MnSO₄ * H₂O) diluir y aforar en 50 mL de agua destilada.
3. **Solución de almidón al 1%:** Pesar 1 g de almidón soluble y disolver en 80 mL de agua caliente y se lleva a un matraz para aforar a 100 mL con agua destilada fría.

Procedimiento

Parte 1. Valoración de tiosulfato de sodio 0.01 N

1. En un matraz volumétrico de 1000 mL disolver 2.6 g de tiosulfato de sodio y 20 miligramos de carbonato de sodio en 800 mL de agua (destilada y desionizada a porciones iguales) y llevar a volumen de 1L con el mismo disolvente.
2. Valorar la solución como se indica a continuación: Pesar 70 mg de dicromato de potasio (previamente pulverizado y secado a 120 °C durante 4 h). Disolver en 100 mL de agua en un matraz yodometría de 500 mL y agitar hasta disolución. Añadir por orden: 0.5 g de yoduro de potasio, 0.0666 g de bicarbonato de sodio, 0.16 mL de ácido clorhídrico. Insertar el tapón en el matraz, mezclar y dejar reposar en la oscuridad durante 10 min exactamente. Enjuagar el tapón y las paredes internas del matraz con agua.
3. Titular el yodo liberado con la solución de tiosulfato de sodio 0.01 N hasta que vire a color verde amarillento (Figura 6).
4. Agregar 3.0 mL de solución indicadora de almidón y continuar la titulación hasta la desaparición del color azul marino (Figura 7).
5. Titular un blanco de reactivos y hacer las correcciones necesarias.
6. Calcular la normalidad considerando que cada mililitro de solución valorada de tiosulfato de sodio 0.01 N es equivalente a: 0.4903 mg de dicromato de potasio

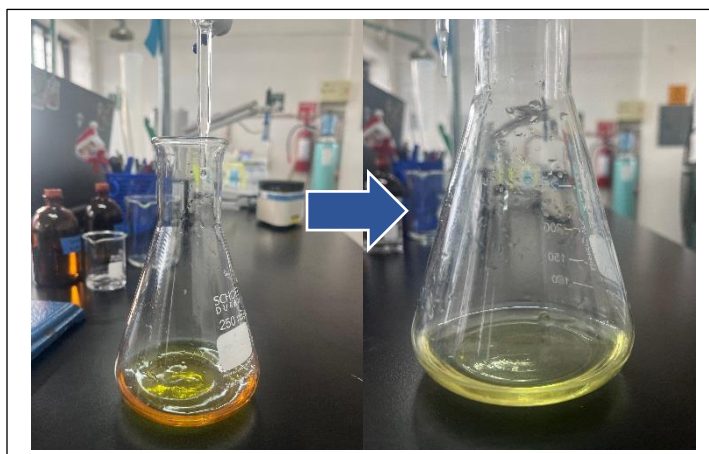


Figura 30. Primer vire de titulación de amarillo ámbar a verde amarillento.

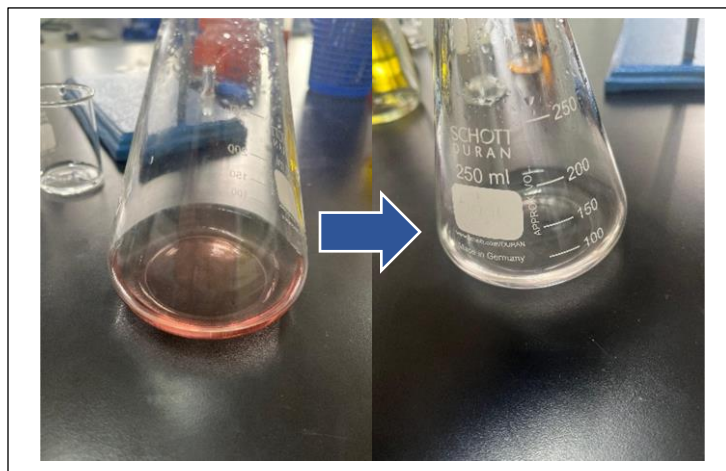


Figura 31. Muestra con indicador y modificación de color con la solución de tiosulfato de sodio.

Parte 2. Tratamiento de la muestra acuática

1. Llenar lentamente y sobre la pared de la botella Wrinkler de *300 mL con la muestra acuática y tapar sin dejar burbujas.
2. Decantar la botella con la finalidad de eliminar excedentes.
3. Retirar la tapa.
4. Agregar 2.4 mL de sulfato manganoso.
5. Agregar 2.4 mL de yoduro de potasio.
6. Tapar sin dejar burbujas, desechar el sobrante; mezclar y dejar descansar por 5 minutos en un lugar oscuro.
7. Sacar de la caja oscura, observando que la solución de la botella haya sedimentado una tercera parte del contenido (Figura 32).
8. Destapar, agregar 2.4 mL de ácido sulfúrico.
9. Tapar y desechar el sobrante.
10. Mezclar hasta que el color de la botella sea uniforme (color amarillo ámbar) como la que se muestra en la figura 32.

Parte 3. Titulación de muestra acuática.

1. Vaciar 100 mL de muestra preparada a un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
2. Titular con tiosulfato de sodio 0.01 N hasta obtener un color amarillo claro (figura 9), que marca el inicio de la titulación. Añadir 7 gotas de almidón (indicador) hasta el vire de color azul oscuro – verde (figura 33), las gotas de la solución de almidón al añadir serán del sobrenadante del frasco.



Figura 32. Proceso de sedimentación de la muestra acuática y aspecto uniforme.



Figura 33. Primer vire de titulación a amarillo claro.

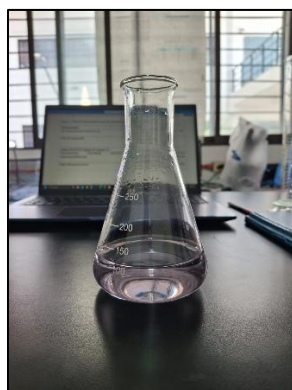


Figura 34. Muestra de agua con indicador.

3. Titular hasta la desaparición del color (incolore) para llegar al punto final de la titulación figura 35.

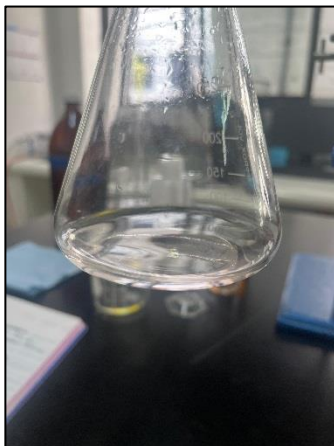


Figura 35. Punto final de la titulación.

4. Anotar el volumen registrado.
5. Realizar cálculos.

Tabla 61. Cálculos para determinar la cantidad de oxígeno presente

Ecuaciones	Leyenda
$N = \text{Equivalentes} / \text{volumen (L)}$	N=normalidad (equivalentes gramo por volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
$PM = M \text{ soluto} / PE$	PM = peso molecular M soluto = masa de soluto Pe = Peso equivalente
$\text{Equiv Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = \text{Equiv I}_2 = \text{Equiv O}_2$	
$\text{Equivalentes O}_2 = \text{masa O}_2 / \text{Masa de equivalentes O}_2$	Masa O_2 = masa de oxígeno expresada en mg Mmasa miliequiv O = masa miliequivalente del oxígeno expresado en mg/mequiv
$\text{mg/L} = \text{masa} / \text{volumen}$	V=volumen de la muestra de agua expresada en litros $\text{mg/L O}_2 = \text{ppm O}_2$

Valoración de tiosulfato de sodio 0.1 N

1. En un matraz volumétrico de 1 000 mL, disolver 26 g de tiosulfato de sodio y 200 mg de carbonato de sodio en 800 mL de agua recientemente hervida y fría. Llevar a volumen con el mismo disolvente.
2. Valorar la solución como se indica a continuación: pesar 70 mg de dicromato de potasio (previamente pulverizado y secado a 120°C durante 4 h), disolver en 100 mL de agua en un matraz yodométrico de 500 mL. Agitar hasta disolución, quitar el tapón y rápidamente agregar 0.5 g de yoduro de potasio, 0.666 g de bicarbonato de sodio y 1.6 mL de ácido

clorhídrico. Insertar el tapón en el matraz, mezclar y dejar reposar en la oscuridad durante 10 min exactamente. Enjuagar el tapón y las paredes internas del matraz con agua.

3. Titular el yodo liberado con la solución de tiosulfato de sodio hasta vire a color verde amarillento. Agregar 3.0 mL de SI de almidón y continuar la titulación hasta la disminución del color azul marino.
4. Titular un blanco de reactivos y hacer las correcciones necesarias.
5. Calcular la normalidad, considerando que cada mililitro de SV de tiosulfato de sodio 0,1 N ó 0,1 M es equivalente a 4,903 mg de dicromato de potasio.

Valoración de dicromato de potasio 0.1 N

1. En un matraz volumétrico de 1 000 mL, disolver 4.903 g de dicromato de potasio en 800 mL de agua y llevar a volumen con agua.
2. Valorar la solución como se indica a continuación: pasar 25 mL de esta solución, a un matraz yodométrico de 500 mL, agregar 2.0 g de yoduro de potasio (libre de yodato), 200 mL de agua y 5.0 mL de ácido clorhídrico, tapar el matraz y dejar reposar durante 10 min en la oscuridad.
3. Titular el yodo liberado con SV de tiosulfato de sodio 0.1 N, a un color amarillo claro, en este momento agregar 3.0 mL de SI de almidón soluble; continuar la titulación hasta que el color azul cambie a verde brillante.
4. Hacer las correcciones necesarias titulando un blanco de reactivos.
5. Calcular la normalidad considerando que cada mililitro de SV de tiosulfato de sodio 0.1 N ó 0.1 M es equivalente a 1.0 mL de solución de dicromato de potasio 0.1 N ó 0.0167 M, o cada mililitro de SV de tiosulfato de sodio 0,1 N es equivalente a 4,9 mg de $K_2Cr_2O_7$.

Anexo 4: Condiciones ambientales para el cultivo y mantenimiento de organismos de *Daphnia magna*.

Para la instalación de un cultivo de *D. magna*, es necesario contar con un área libre de sustancias tóxicas (gases, vapores, etcétera), que puedan entrar en contacto directo con los cultivos y alterar su sensibilidad y respuesta. Cada lote debe ser iniciado con neonatos de menos de 24 h de nacidos en estado óptimo, colocándolos en recipientes de boca ancha. El cultivo debe mantenerse en agua dura reconstituida con una dureza $250 \text{ mg/L} \pm 25 \text{ mg/L}$.

- El cultivo debe mantenerse en condiciones controladas de intensidad de luz en un ámbito de 600 lx a 1000 lx (lux) un fotoperiodo de 16 h de luz por 8 h de oscuridad. Para la iluminación del cultivo deben utilizarse lámparas fluorescentes “luz blanca o de día” que proporcionen la luminosidad adecuada.
- Mantener la temperatura ambiental de los cultivos a $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.
- Los niveles del oxígeno disuelto se deben mantener por arriba de 2 mg/L, esto se logra mediante:
- La recuperación semanal del volumen de agua dura reconstituida que se pierde por evaporación y por limpieza del cultivo.
- El recambio de aproximadamente tres cuartas partes del total del volumen del cultivo, aproximadamente cada 15 días.

Recambio de agua:

El agua de cultivo, después de un tiempo determinado pierde sus características iniciales debido a la materia orgánica acumulada, por lo cual debe renovarse de forma parcial por lo menos dos veces por semana y cada 15 días, se sugiere hacer un recambio mayor sustrayendo aproximadamente tres cuartas partes del volumen contenido en cada recipiente. Todos los recipientes con cultivos deben limpiarse al menos dos veces por semana, removiendo los restos de alimento del fondo.

Alimentación:

Pesar 2 g de levadura de panadería y disolver en un recipiente de 1L mezclar con agua destilada, almacenar en refrigeración a 4°C . Antes de usar agitar para resuspender la levadura y agregar 5 gotas /litro como alimento para el cultivo de *Daphnia magna*.

Anexo 5: Relación de alturas registradas en el análisis de fármacos para prueba de linealidad del método analítico.

Nota: Altura 1 y Altura 2 corresponden a un día de trabajo, Altura 3 y Altura 4, corresponden al segundo día de trabajo.

Tabla 62. Ácido Salicílico

Concentración µg/mL	Día 1		Día 2		Altura $\bar{x}$
	Altura 1	Altura 2	Altura 3	Altura 4	
5	2274.382	1982.252	2541.932	2562.912	2340.3695
2.5	1110.538	1109.053	1208.53	1319.496	1186.90425
1.25	593.683	553.508	669.697	645.844	615.683
0.625	409.011	331.315	396.317	378.548	378.79775
0.3125	132.729	186.709	278.761	211.659	202.4645
0.15625	195.339	97.807	134.333	143.657	142.784
0.078125	159.72	26.554	72.161	73.443	82.9695

Tabla 63. Ketorolaco

Concentración µg/mL	Día 1		Día 2		Altura $\bar{x}$
	Altura 1	Altura 2	Altura 3	Altura 4	
5	1320.194	1296.474	1379.138	1504.209	1375.00375
2.5	648.152	601.43	630.87	731.91	653.0905
1.25	320.119	308.808	284.346	313.527	306.7
0.625	111.056	139.177	126.545	130.609	126.84675
0.3125	61.512	52.745	56.744	60.259	57.815
0.15625	22.8	23.42	12.007	9.45	16.91925
0.078125	8.47	8.222	6.72	4.052	6.866

Tabla 64. Naproxeno

Concentración µg/mL	Día 1		Día 2		Altura $\bar{x}$
	Altura 1	Altura 2	Altura 3	Altura 4	
5	8422.188	7697.218	9296.272	9988.107	8850.94625
2.5	4344.675	4062.715	4439.33	4692.145	4384.71625
1.25	2275.698	2093.049	2229.429	2227.058	2206.3085
0.625	1263.686	992.594	1127.885	1143.989	1132.0385
0.3125	614.42	619.624	689.323	490.195	603.3905
0.15625	380.468	342.64	346.913	318.388	347.10225
0.078125	342.947	263.175	270.75	215.888	273.19

Tabla 65. Diclofenaco

Concentración µg/mL	Día 1		Día 2		Altura $\bar{x}$
	Altura 1	Altura 2	Altura 3	Altura 4	
25	22323.182	19740.531	24322.119	23761.666	22536.8745
12.5	11015.497	10068.552	10513.334	11509.916	10776.82475
6.25	5170.737	5029.112	5142.036	5309.233	5162.7795
3.125	2378.252	2463.45	2403.682	2412.496	2414.47
1.5625	1333.279	1095.584	1023.315	1191.724	1160.9755
0.78125	499.548	463.481	556.359	469.582	497.2425
0.390625	324.031	238.392	204.878	254.224	255.38125

Tabla 66. Ibuprofeno

Concentración µg/mL	Día 1		Día 2		Altura $\bar{x}$
	Altura 1	Altura 2	Altura 3	Altura 4	
25	14024.365	12744.678	15459.684	15659.46	14472.04675
12.5	7213.311	6693.388	7352.531	7954.411	7303.41025
6.25	3662.724	3610.707	3883.36	4042.747	3799.8845
3.125	2058.207	2044.604	2245.542	2249.503	2149.464
1.5625	1035.077	1243.209	1551.526	1461.254	1322.7665
0.78125	883.638	884.365	1022.027	1556.549	1086.64475
0.390625	865.426	766.548	260.713	1019.025	727.928

Referencias bibliográficas

1. Castro-Pastrana LI, Baños-Medina MI, López-Luna MA, Torres-García BL. Ecofarmacovigilancia en México: perspectivas para su implementación.
2. Moreno-Ortiz VC, Martínez-Núñez JM, Kravzov-Jinich J, Alberto L, Moreno-Bonett C, Altagracia-Martínez M. Los medicamentos de receta de origen sintético y su impacto en el medio ambiente. *Rev Mex Cienc Farm.* 2013.
3. Peñate IQ, Haza UJJ, Wilhelm AM. Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. Vol. 40. 40(3).
4. Aspirin [Internet]. [citado 6 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00945>
5. Salicylic acid [Internet]. [citado 4 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00936>
6. Ketorolac [Internet]. [citado 6 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00465>
7. PubChem. Naproxen [Internet]. [citado 6 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/156391>
8. PubChem. Diclofenac [Internet]. [citado 6 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3033>
9. PubChem. Ibuprofen [Internet]. [citado 6 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3672>
10. Thanapandiyani K, E. P. Pesticides Impact on Wildlife [Internet]. 4(10). 5 de julio de 2023;4(10):714-6. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/372116596_Pesticides_Impact_on_Wildlife
11. Shanmugam G, Sampath S, Selvaraj KK, Larsson DGJ, Ramaswamy BR. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Indian rivers. *Environ Sci Pollut Res.* enero de 2014;21(2):921-31. doi:10.1007/s11356-013-1957-6
12. Rivera-Jaimes JA, Postigo C, Melgoza-Alemán RM, Aceña J, Barceló D, López De Alda M. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci Total Environ.* febrero de 2018;613-614:1263-74. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.134
13. Zhao J, Ying G, Liu Y, Chen F, Yang J, Wang L, et al. Occurrence and a screening-level risk assessment of human pharmaceuticals in the Pearl River system, South China. *Environ Toxicol Chem.* junio de 2010;29(6):1377-84. doi:10.1002/etc.161
14. Duan YP, Meng XZ, Wen ZH, Ke RH, Chen L. Multi-phase partitioning, ecological risk and fate of acidic pharmaceuticals in a wastewater receiving river: The role of colloids. *Sci Total Environ.* marzo de 2013;447:267-73. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.017
15. Brozinski JM, Lahti M, Meierjohann A, Oikari A, Kronberg L. 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.* 2 de enero de 2013;47(1):342-8. doi:10.1021/es303013j
16. Mompelat S, Le Bot B, Thomas O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ Int.* julio de 2009;35(5):803-14. doi:10.1016/j.envint.2008.10.008
17. Jux U, Baginski RM, Arnold HG, Krönke M, Seng PN. Detection of pharmaceutical contaminations of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings. *Int J Hyg Environ Health.* 2002;205(5):393-8. doi:10.1078/1438-4639-00166

18. Ascar L, Ahumada I, López A, Quintanilla F, Leiva K. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Determination in Water Samples by HPLC-DAD under Isocratic Conditions. *J Braz Chem Soc.* 2013. doi:10.5935/0103-5053.20130150
19. Iqbal M, Ezzeldin E, Haq N, Alam P. An Ultrapformance Liquid Chromatography Tandem–Mass Spectrometry Method for Determination of Multiclass Pharmaceuticals in Water Sample by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined with Ultrasound Assisted Reverse Extraction from Solidified Floating Organic Droplets. *ACS Omega.* 23 de marzo de 2021;6(11):7524-32. doi:10.1021/acsomega.0c06047
20. Siemens J, Huschek G, Siebe C, Kaupenjohann M. Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City–Mezquital Valley. *Water Res.* abril de 2008;42(8-9):2124-34. doi:10.1016/j.watres.2007.11.019
21. Félix–Cañedo TE, Durán–Álvarez JC, Jiménez–Cisneros B. The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Sci Total Environ.* junio de 2013;454-455:109-18. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.02.088
22. Gibson R, Durán–Álvarez JC, Estrada KL, Chávez A, Jiménez Cisneros B. Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere.* diciembre de 2010;81(11):1437-45. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.006
23. Comité Núcleo del ProAire, Antonio F Sarmiento G. Programa de Gestión para Mejorar la Calidad del Aire en Morelos 2018 - 2027 [Internet]. COMISIÓN AMBIENTAL DE LA MEGALÓPOLIS; 2018 [citado 24 de junio de 2026]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/326354019_ProAire_Morelos_2018-2027
24. Khan A, Shams DF, Khan W, Ijaz A, Qasim M, Saad M, et al. Prevalence of selected pharmaceuticals in surface water receiving untreated sewage in northwest Pakistan. *Environ Monit Assess.* junio de 2018;190(6):324. doi:10.1007/s10661-018-6683-6
25. Vargas Aguilar AA, Fuentes Condori R, Vargas Aguilar AA, Fuentes Condori R. Estudios in Silico, Simulando Vida en un Entorno Virtual. *Gac Médica Boliv.* 2021;44(2):278-9. doi:10.47993/gmb.v44i2.263
26. Beyleveld G, White KM, Ayllon J, Shaw ML. New-generation screening assays for the detection of anti-influenza compounds targeting viral and host functions. *Antiviral Res.* 1 de octubre de 2013;100(1):120-32. doi:10.1016/j.antiviral.2013.07.018
27. Hemmerich J, Ecker GF. In silico toxicology: From structure–activity relationships towards deep learning and adverse outcome pathways. *WIREs Comput Mol Sci.* julio de 2020;10(4):e1475. doi:10.1002/wcms.1475
28. Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use [Internet]. 2024. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-environmental-risk-assessment-medicinal-products-human-use-revision-1_en.pdf
29. Campos MD, Soto SEE. Métodos de bioevaluación de compuestos bioactivos [Internet]. 2023;375. doi:10.30973/2025/metodos_bioevaluacion
30. Roncaglioni A, Lombardo A, Benfenati E. The VEGAHUB Platform: The Philosophy and the Tools. *Altern Lab Anim ATLA.* marzo de 2022;50(2):121-35. doi:10.1177/02611929221090530 PubMed PMID: 35382564.
31. Yang H, Lou C, Sun L, Li J, Cai Y, Wang Z, et al. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. Wren J, editor. *Bioinformatics.* 15 de marzo de 2019;35(6):1067-9. doi:10.1093/bioinformatics/bty707
32. admetSAR 3.0: Resource [Internet]. [citado 12 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR3/resource.php>

33. O'Rourke K, Engelmann B, Altenburger R, Rolle-Kampczyk U, Grintzalis K. Molecular Responses of Daphnids to Chronic Exposures to Pharmaceuticals. *Int J Mol Sci.* 17 de febrero de 2023;24(4):4100. doi:10.3390/ijms24044100 PubMed PMID: 36835510; PubMed Central PMCID: PMC9964447.
34. NMX-AA-087-SCFI-2010 [Internet]. [citado 24 de junio de 2026]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166797/NMX-AA-087-SCFI-2010.pdf>
35. Ebert D. Introduction to Daphnia Biology. En: *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia* [Internet] [Internet]. National Center for Biotechnology Information (US); 2005 [citado 18 de agosto de 2025]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/>
36. Guo J, Ren J, Chang C, Duan Q, Li J, Kanerva M, et al. Freshwater crustacean exposed to active pharmaceutical ingredients: ecotoxicological effects and mechanisms. *Environ Sci Pollut Res Int.* 8 de marzo de 2023;30. doi:10.1007/s11356-023-26169-0
37. Tkaczyk A, Bownik A, Dudka J, Kowal K, Ślaska B. Daphnia magna model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Sci Total Environ.* abril de 2021;763:143038. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143038
38. Antunes SC, Castro BB. Pulgas-de-água (*Daphnia* spp.). *Rev Ciênc Elem.* 2017;5(4). doi:10.24927/rce2017.050
39. INEGI. México en cifras [Internet]. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI; 1998 [citado 4 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/>
40. Calculator.net [Internet]. [citado 4 de septiembre de 2024]. Sample Size Calculator. Disponible en: <https://www.calculator.net/sample-size-calculator.html?type=1&cl=95&ci=5&pp=11&ps=1971520&x=Calculate>
41. NMX-AA-003-1980 [Internet]. [citado 24 de junio de 2026]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166762/NMX-AA-003-1980.pdf>
42. NOM-001-ECOL-1996 [Internet]. [citado 24 de junio de 2026]. Disponible en: <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/60197.pdf>
43. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyanobacteria and algae in laboratory strains and in natural algal assemblages - PubMed [Internet]. [citado 24 de junio de 2026]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26967537/>
44. Sanjeeb Mohapatra, Nara Menon, Lokesh P. Padhye, Sankara Sarma V. Tatiparti. Contaminants in Drinking and Wastewater Sources [Internet]. 2021 [citado 24 de junio de 2026]. 65-94 p. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/342567630_Natural_Attenuation_of_Pharmaceuticals_in_the_Aquatic_Environment_and_Role_of_Photorransformation doi:10.1007/978-981-15-4599-3_3
45. Nkoom M, Lu G, Liu J, Dong H, Yang H. Bioconcentration, behavioral, and biochemical effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in *Daphnia magna*. *Environ Sci Pollut Res.* febrero de 2019;26(6):5704-12. doi:10.1007/s11356-018-04072-3

VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Luis Antonio Luna Robles

Título de la tesis: “Cuantificación de AINES y su evaluación eco-toxicológica en muestras acuáticas de Jiutepec y Temixco”

Grado a obtener:

☒ Maestría en Farmacia

☐ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Antonio Monroy Noyola

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Sí, se aprueba tal como se presenta

☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma del miembro del jurado

09/06/26

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

ANTONIO MONROY NOYOLA | Fecha:2026-06-09 14:34:23 | FIRMANTE

F3bEneS52lu5bYBspPolN8FdlOMjU7YvdlAeAz1V7V1t1igUsfVbsFgo08ZKZeRQG3BPvtXdUmcgVi+jOfQKe/B49AYbx/okhMrYZCqJFWqnUfXS4DIYsNfFh5z1EWaq7lpvd
OsgHzLH3DuGjCZoDRMxeny35FsR5nwiLKcda/8FJeCCENGtdJujM6SRfl47kOTIRuJZz1CLxs83irBubPfl852ru4JtnVnvnFGNDc/5Vxlv9Nd10QVL3+08LZ/3n/eq3NU2rCNK
Hz+unN4wwKHrNRZNkAfwgSo/mmqtIqvGg9JR6SSb/xhONWk0lUPz3qxlRIe+iknIBTln1kg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



nbicsqWNR

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gXRZdCGTtcszveokR340pSFKGW6GPuTX>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Luis Antonio Luna Robles

Título de la tesis: “Cuantificación de AINES y su evaluación eco-toxicológica en muestras acuáticas de Jiutepec y Temixco”

Grado a obtener:

☒ Maestría en Farmacia

☐ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Sí, se aprueba tal como se presenta

☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma del miembro del jurado

12/06/26
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN | Fecha:2026-06-12 11:02:44 | FIRMANTE

Kp9ZBlo2RE5KYfpNmm5hPsgxD4b8m8it5wE4j8taR9pA2/vjhuaN3YRPSaEJz15857Wxx2V8NITsUzHMB96BIYcDThbOIR2Hqwhfinkv+wdodoX9DgZ9AbXOmry+kGVnU9N
UlsCWSUOvdHN92EJx6TmmmkAgAagUGl3uVF4YOjdjCIK0dkqNI3UOL+GEUsYbNo+p6NrneaaoTxi7DPIY5Ya0q7REBrOt83ro8Kf6UJu9PrdkWyxkqYIrKkHmt8dfYMFP8x
k/0FRf8+9GAZvkEMp/M0pQ2U9YzoLjLu8VMZYJ8PCfGsDgLfjql/lpQAZ43RNed5QECxMJ5HXp/uOtdA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



69FgdVS1A

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/B04r9JADv1824Xs0de5UPNXU7OBAKI3e>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Luis Antonio Luna Robles

Título de la tesis: “Cuantificación de AINES y su evaluación eco-toxicológica en muestras acuáticas de Jiutepec y Temixco”

Grado a obtener:

☒ Maestría en Farmacia

☐ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. María Antonieta Gómez Solís

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Sí, se aprueba tal como se presenta

☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma del miembro del jurado

12/06/26
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

MARIA ANTONIETA GOMEZ SOLIS | Fecha:2026-06-22 08:18:20 | FIRMANTE

K1jyiWuu0B3Y0qbx12zA5zgOyPEkBJ9YN/jPNaptlrEP1Brs+6jjEpbgkCDfUKSEH53J6RrQmreK+7UJTFxDekMP+4pd3K5UD2KGGJ8+Xg/GFE0q3WVypIRYPYvOg4jBnYGq
mj/RVYEMyXTGpyhVsgU1CNXB8i9opJuLbV9t9gSI/Un7yOeAjRA+Aj3walqjIWQY4L5RMFd7iu8FEBdYEF5Ecm71KNXPPxPZ4aAfle6oT19hAK6byVyWBsAiSaUZOW/vMu7
vkLnD9um2Ce3/+9jRzmcpmTrdURMfRM9SOlr8mGBICxgCXP3RRLN0GVbL2PijSbZDrSEyHXraws76rQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



AC1k5lxW8

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/MHH8A1UUJwuSvj4AFt2IUjyyXTeJFGOY>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA

FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Luis Antonio Luna Robles

Título de la tesis: “Cuantificación de AINES y su evaluación eco-toxicológica en muestras acuáticas de Jiutepec y Temixco”

Grado a obtener:

☒ Maestría en Farmacia

☐ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. María Luisa Castrejón Godínez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Sí, se aprueba tal como se presenta

☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma del miembro del jurado

22/06/26

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2026-06-22 17:17:49 | FIRMANTE

fmON2Q5/szRHvvM6ZbVGv4Xoy39SD2LBf0wcPUNYtsiP19LKIQG2Stp91NNc8P0QzpTKLP65opGXgW8rHaHOxeKkEm6rVS6DvAi7pB2yPUOaH56lOHleVKeJuTBGFXin
BFwDZrriMABbNnEnNPgoJ+SVHjSuFvwGopHzgC7xObtRA5LwtHFddBesPS5w1THRtQivUzMshlkq9j1BPi6BSvMs1XAxSaFEkyX4VQw9ieqo36yKxJaGE825JrXAJ4CYXnl
YYkFvo5s+LxmCAfinV04fGbkE5CXWuMO/LI4U3hy9dn5LE90J9SpU+jzN2niRDGgBYcfKeOS9uc1pa+YZA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[gQIXU00JZ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vKB1qDShXMcECOSfMet7FiyDMjAQ01xy>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA

FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Luis Antonio Luna Robles

Título de la tesis: “Cuantificación de AINES y su evaluación eco-toxicológica en muestras acuáticas de Jiutepec y Temixco”

Grado a obtener:

☒ Maestría en Farmacia

☐ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Adriana Valladares Méndez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Si se aprueba tal como se presenta

☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma del miembro del jurado

22/06/2026

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

ADRIANA VALLADARES MENDEZ | Fecha:2026-06-22 15:44:16 | FIRMANTE

Fhb/Pa63Qnn8ZQ6jPKnUlpBZldJFPFI9n6+NzkBicFykrOLuY8nJINR0A95PNzESw9IRyeAmA0J1EvZBx5fRslG9oPb5klaYlmg8vJ/jNGlaUu/0lripBgHZeVpoO/1fesHkpT2x3CSWXIHdk6078Lz4AEv5bxPOZR8iQeWVPJg8olor6mY7ztb9U8zQRIQkc30f9uo7Rji0PFfQxeR7ZTLsJdzwlZS4aLGDYxwsdGXqlRc+KxHJCoJDqmj4HPsGmAX08hfmX62o5nhtVg8Kh+7R3bNd6YzJcRvhLLuGTZgq85LOgLwYkmUwnQAnfzfzZVtcKGqjV0m8Mg9UMN3zGA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Se2dJpOum](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/OWVD0s1cbpC00rGGST9BrU25v1f2an9n>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029