



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LABORATORIO DE GENÉTICA TOXICOLÓGICA

**“POTENCIAL DE RIESGO Y EFECTOS BIOLÓGICOS EN
Danio rerio POR PRESENCIA EN EL AMBIENTE DE
FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS
(AINES) DE ALTO CONSUMO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

BIÓL. ARMANDO RODRÍGUEZ ANAYA

DIRECTOR TESIS: DR. JUAN CARLOS GAYTÁN OYARZÚN

CODIRECTOR: DR. FRANCISCO PRIETO GARCÍA

COMITÉ:

DR. ALBERTO JOSÉ GORDILLO MARTÍNEZ

DRA. YOLANDA SANTILLÁN MARMOLEJO

AGOSTO 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Institute of Basic Sciences and Engineering
Dirección
 Dean

AAQ-ICBI/1314/2016.

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
 DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que el Comité Revisor asignado al alumno **Lic. en Biól. Armando Rodríguez Anaya**, del **Doctorado en Ciencias Ambientales**, con número de cuenta **132872**, que presenta el manuscrito de tesis titulado **“Potencial de riesgo y efectos biológicos en *Danio rerio* por presencia en el ambiente de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) de alto consumo”**, después de revisar el trabajo antes referido, ha decidido autorizar la impresión del mismo hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se registran las firmas de conformidad de los integrantes del Comité Revisor.

PRESIDENTE	Dr. Alberto José Gordillo Martínez
SECRETARIO	Dr. Francisco Prieto García
VOCAL	Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún
SUPLENTE	Dra. Yolanda Santillán Marmolejo

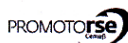
Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

“Amor, Orden y Progreso”

Mineral de la Reforma, Hgo. 27 de julio del 2016.

Dr. Armando Aza Pozo
 Director del ICBI

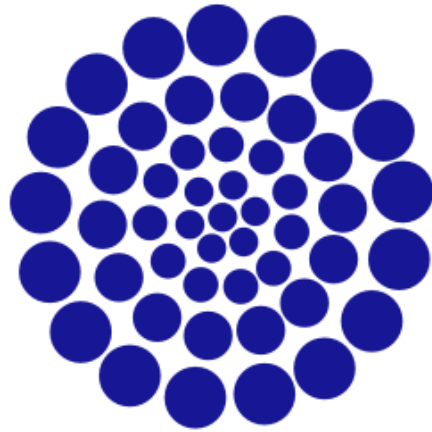


Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts 2231, Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Por la beca otorgada durante los estudios del Doctorado para la realización de esta tesis se agradece a:



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

AGRADECIMIENTOS

- A la **Unidad de Servicio Académico ACUARIO** de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma Nacional de México (**UNAM**), por permitirme realizar la estancia de investigación, la cual contribuyó de forma importante a este trabajo, agradeciendo de manera particular y especial a la **M. en C. Ma. Estela Pérez Cruz**, por las atenciones prestadas, brindándome el material biológico necesario, además, el equipo para llevar a cabo los experimentos, resaltando la calidad humana recibida en mi estancia, siempre mostrando una buena disposición, amabilidad, preocupación y paciencia, gracias maestra. De igual forma agradezco al **M. en C. Ignacio Andrés Morales Salas**, por las enseñanzas, las atenciones hacia mi persona, por las opiniones y observaciones.
- A la **Unidad de Farmacología Clínica Facultad de Medicina UNAM**, agradeciendo de manera particular y especial al **Q.F.B. Juan Manuel Jiménez Vargas**, resaltando la disposición y tiempo dedicado en la ayuda para la cuantificación y detección de fármacos, contribuyendo de manera considerable a esta tesis, apoyando con todo el material y equipo necesario sin costo alguno, además de los métodos y técnicas.
- A la **Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo** y en particular al Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) y al Centro de Investigaciones Biológicas (CIB).

AGRADECIMIENTOS

- A **DIOS**, dándome el sentido de la gratitud y humildad, permitiendo vivir bonitas experiencias, ya que hay una fuerza en el universo que subyace a todo este hermoso caos.
- A mi **MAMÁ Y PAPÁ** por su confianza, paciencia, amor y apoyo incondicional en este camino, este logro es gracias a ellos, porque no tendría nada si no fuera por estas maravillosas personas, que afortunadamente son mis padres, todos mis éxitos son de ellos.
- A mis **ABUELITAS Y HERMANA** por estar conmigo al regalarme su cariño y comprensión, dándome ánimos para no rendirme.
- A mis tíos, tías, primos y primas por la ayuda que me proporcionaron y la amistad brindada, en especial a mi primo **Andrés y Chucho** que siempre estuvieron pendiente de mi proceso, dándome palabras de aliento para seguir, además de su amistad.
- A la **Biól. Kenia Gisele**, porque durante el doctorado siempre veías la forma de ayudarme y motivarme para sacar adelante cada semestre, gracias por escuchar mis quejas y estar conmigo en las buenas y las malas, gracias por tolerar el tiempo que le invertía al doctorado descuidando muchos aspectos personales.
- A mis amigos los nuevos y los viejos, por su apoyo y convivencias haciendo menos pesado el doctorado.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco la colaboración de los integrantes del Comité Revisor por sus comentarios y correcciones en todo el proceso del doctorado y elaboración de tesis.
- Al **Dr. Gaytán** por dirigir mi tesis y compartir sus conocimientos, siempre tenía tiempo para atenderme a pesar de su horario complicado, gracias por depositar la confianza y ser paciente conmigo, ayudándome a contrarrestar mis deficiencias.
- Al **Dr. Gordillo** por la transmisión de sus conocimientos y ayuda en todo momento, además de los comentarios duros pero sinceros que te hacen crecer como persona.
- Al **Dr. Prieto** por estar pendiente de mí, apoyando en todo momento con sus comentarios, asimismo de la ayuda para la publicación de artículos.
- A la **Dra. Yolanda Marmolejo** por los consejos, asesorías y preocuparse en todo momento por mí y por este proyecto, también, a su esposo el **Dr. Fidel Pérez Moreno** por la ayuda en cuestiones de química analítica.
- Al **Dr. Pablo Octavio Aguilar**, aunque no formaba parte del comité, estuvo pendiente de mi formación académica, su ayuda fue muy valiosa para realizar y comprender los análisis estadísticos.
- Al **Dr. Alan Reyes Silva**, por auxiliarme en las encuestas en los centros de salud y ayudarme en bastantes ocasiones.
- A mis compañeros del laboratorio por las opiniones, observaciones y ayuda cuando la requería.
- A la **Dra. Maritza López Herrera** y al **Divemaster Juan Carlos Márquez Romero** por permitirme formar parte del equipo de buceo, el cual ha ayudado mucho a mi formación académica y personal, descubriendo una de mis pasiones.
- A todos aquellos que de una u otra forma han contribuido en mi formación académica y han creído en mí

Nomenclatura sobresaliente

AINES: Antiinflamatorios no esteroides

CL₅₀: Concentración letal cincuenta

DarTa: *Danio rerio* Teratology assay

DarT: *Danio rerio* a general model in ecotoxicology and toxicology

DRETA: *Danio rerio* embryotoxicity and teratogenicity assay

EDAR: Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales

EPRAS: Evaluación de Potencial de Riesgos Ambientales y Efectos a la Salud

ERFCA: Evaluación Rápida de Fuentes de Contaminación Ambiental (en aire, agua y suelos)

ERPbio: Evaluación Rápida de Biodiversidad para Estimar Prioridad Biológica

HPLC-MS/MS: Cromatografía líquida rápida de alta eficacia asociada a espectrometría de masas tándem

MER: Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México

ÍNDICE

ÍNDICE.....	8
ÍNDICE DE TABLAS	13
ÍNDICE DE FIGURAS	15
1. INTRODUCCIÓN	17
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1 Características del área urbana.....	18
2.2 Agua	19
2.3 Contaminación ambiental.....	20
2.3.1 Contaminación del agua	21
2.3.2 Tipo de contaminantes en agua	21
2.4 Contaminantes emergentes.....	22
2.5 Residuos peligrosos	23
2.6 Fármacos.....	24
2.6.1 Los antiinflamatorios no esteroideos: AINEs (Non-steroidal antiinflammatory drugs: NSAIDs).....	25
3. ANTECEDENTES	30
3.1 Toxicocinética y cinética de los fármacos	30
3.2 Fármacos en el ambiente.....	31
3.2.1 Fármacos en México	35
3.3 Técnicas analíticas.....	36
3.3.1 Principios y funcionamiento de Cromatografía líquida rápida de alta eficacia asociada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS).....	37
3.3.1.1 Cromatografía líquida (LC).....	37
3.3.1.2 Espectrometría de masas (MS).....	38
3.3.1.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).....	41
3.3.1.4 Ionización por Electrospray (ESI).....	42
3.3.1.5 Analizadores de espectrometría de masas.....	43

3.3.1.6 Equipos de espectrometría de masas MS/MS	43
3.3.1.7 HPLC infinity 1290 Agilent acoplado a un detector de masas tándem (MS/MS) marca Agilent modelo 6460 de triple cuádruplo con fuente de ionización ESI (electrospray)-Jet Stream con MRM activada (monitorización de reacciones múltiples).....	45
3.4 Evaluación de potencial de riesgo	46
3.4.1 “Evaluación de Potencial de Riesgos Ambientales y Efectos a la Salud” (EPRAS)	46
3.5 Evaluación biológica	48
3.5.1 Bioindicadores	48
3.5.2 Biomonitores	49
3.5.3 Bioensayo	49
3.6 Peces como bioensayos	51
3.7 <i>Danio rerio</i> (pez cebra)	52
3.7.1 Ventajas del bioensayo <i>Danio rerio</i> (pez cebra)	53
3.7.2 Prueba DarTa (<i>Danio rerio</i> Teratology assay)	55
4. JUSTIFICACIÓN.....	59
5. OBJETIVOS.....	60
5.1 Objetivo general.....	60
5.2 Objetivos específicos	60
6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	61
6.1 Venta de fármacos	61
6.1.1 Diseño de estudio	61
6.1.2 Descripción del sitio	61
6.1.3 Población de estudio y tamaño de muestra	65
6.1.4 Criterios de inclusión.....	65
6.1.5 Criterios de exclusión	66
6.1.6 Encuestas.....	66
6.1.7 Aplicación del cuestionario.....	66
6.2 Evaluación de Potencial de Riesgos.....	67

6.2.1	Criterios fundamentales de “Evaluación de Potencial de Riesgo Ambientales y Efectos a la Salud (EPRAS)”	67
6.2.2	Cuestionario	82
6.3	Prueba DarTa (<i>Danio rerio</i> teratology assay) bioensayos de toxicidad y teratogénesis	91
6.3.1	Adquisición y desinfección de organismos experimentales	91
6.3.2	Lote de mantenimiento de los organismos	91
6.3.3	Inducción conducta reproductiva	93
6.3.4	Índice de ovoposición, viabilidad y eclosión	94
6.3.5	Producción de huevos para la prueba DarTa	95
6.3.6	Validación del etanol como un control negativo	95
6.3.6.1	<i>Análisis estadísticos para validar al etanol, como control negativo</i>	<i>97</i>
6.3.7	Valoración del efecto tóxico de los cinco fármacos	98
6.3.7.1	<i>Análisis estadísticos para valoración del efecto tóxico de los cinco fármacos</i>	<i>99</i>
6.3.8	Tratamiento para evaluar daño teratogénicos en columna vertebral de los cinco fármacos.....	100
6.3.8.1	<i>Análisis estadísticos para determinar efecto teratogénico de los cinco fármacos.....</i>	<i>100</i>
6.3.9	Estándares utilizados para pruebas de toxicidad y teratogénesis	105
6.4	Análisis químicos.....	105
6.4.1	Toma de la muestra	105
6.4.2	Análisis fisicoquímico	106
6.4.3	Cuantificación de AINEs.....	107
6.4.4	Estándares	107
6.4.5	Equipo.....	108
6.4.6	Curvas de calibración	109
6.4.7	Muestras de agua.....	109
6.5	Matriz de colorimetría.....	111
7.	RESULTADOS	112

7.1 Encuestas sector salud pública (hospitales y centros de salud) y farmacias de Pachuca-Mineral de la Reforma	112
7.1.1 Encuestas sector salud pública (hospitales y centros de salud)	112
7.1.2 Encuestas en farmacias	114
7.1.3 Encuestas en farmacias, hospitales y centros de salud de Pachuca-Mineral de la Reforma	115
7.1.2 Análisis estadístico encuestas	116
7.2 Prueba EPRAS.....	118
7.3 Prueba DarTa	121
7.3.1 Índice de fertilidad y viabilidad.....	121
7.3.2 Evaluación del efecto tóxico	122
7.3.2.1 <i>Controles</i>	<i>122</i>
7.3.2.2 <i>Ácido acetilsalicílico</i>	<i>123</i>
7.3.2.3 <i>Paracetamol.....</i>	<i>125</i>
7.3.2.4 <i>Naproxeno</i>	<i>126</i>
7.3.2.5 <i>Diclofenaco</i>	<i>128</i>
7.3.2.6 <i>Ibuprofeno</i>	<i>130</i>
7.3.3 Daño en columna vertebral (DarTa) de fármacos AINEs	132
7.3.3.1 <i>Ácido acetilsalicílico</i>	<i>132</i>
7.3.3.2 <i>Paracetamol.....</i>	<i>135</i>
7.3.3.3 <i>Diclofenaco</i>	<i>138</i>
7.3.3.4 <i>Naproxeno</i>	<i>141</i>
7.4.3.4 <i>Ibuprofeno</i>	<i>144</i>
7.3.5 Tipos de malformaciones en columna vertebral presentes en AINEs	148
7.3.5.1 <i>Organismos sin malformación</i>	<i>148</i>
7.3.5.2 <i>Organismos con malformaciones sencillas.....</i>	<i>149</i>
7.3.5.3 <i>Organismos con malformaciones dobles.....</i>	<i>150</i>
7.3.5.5 <i>Organismos con malformaciones múltiples</i>	<i>151</i>
7.3.5.6 <i>Organismos con malformaciones curvas.....</i>	<i>152</i>
7.3.5.7 <i>Organismos con malformaciones en aleta caudal</i>	<i>153</i>

7.3.5.8 Organismos con malformaciones en gancho	154
7.3.5.9 Organismos con ausencia de cuerpo	155
7.4 Análisis químicos.....	156
7.4.1 Caracterización fisicoquímica.....	156
7.4.2 Curvas de calibración de los cinco fármacos y cromatogramas obtenidos....	157
7.4.2.1 Análisis químicos ácido acetilsalicílico.....	157
7.4.2.2 Análisis químicos ibuprofeno	159
7.4.2.3 Análisis químicos naproxeno	160
7.4.2.4 Análisis químicos paracetamol	162
7.4.3 Cuantificación	164
7.5 Matriz de colorimetría	166
8. DISCUSIÓN	167
9. CONCLUSIONES	176
10. BIBLIOGRAFÍA.....	179

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Clasificación general de los tipos de contaminantes (adaptada de Orozco, 2003)	22
Tabla II. Contaminantes emergentes y ejemplos (adaptada de Barceló, 2003)	23
Tabla III. Clasificación de AINEs por grupo químico (adaptada de Pérez-Ruiz et al., 2002)	27
Tabla IVa-b. Cuadro básico de AINEs (adaptada de IMSS, 2011; FACMED UNAM, 2013)	28- 29
Tabla V. Concentración de AINEs en ambientes acuáticos	34
Tabla VI. Fármacos AINEs en cuerpos de agua de México	36
Tabla VII. Toxicidad de AINEs en diferentes bioensayos	51
Tabla VIII. Pez cebra como bioensayo para fármacos	58
Tabla IXa-i. Cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad y sector poblacional, así como efecto biológico y conceptos importantes para la determinación del potencial de riesgo	69-80
Tabla X. Condiciones físico-químicas óptimas (adaptada de González, 2005; Rivera, 2006; Gaytán et al., 2008; Tetra Test Kit [®] , 2015)	92
Tabla XI Clasificación y descripción de malformaciones en columna vertebral de <i>Danio rerio</i> modificada de (Rivera, 2006; Gaytán et al., 2008).	102
Tabla XII. Sustancias de referencia utilizadas	107
Tabla XIII. Parámetros para las Curvas de calibración	109
Tabla XIV. Reactivos, materiales y equipos utilizados en la técnica HPLC-MS/MS	110
Tabla XV. Matriz de dos vías con 19 variables con valores obtenidos	119
Tabla XVI Índice de fertilidad y viabilidad	121
Tabla XVII. Frecuencia espontánea de malformaciones en columna vertebral	121
Tabla XVIII. Parámetros para la prueba de toxicidad de ácido acetilsalicílico	124
Tabla XIX. Parámetros para la prueba de toxicidad de paracetamol	125
Tabla XX. Parámetros para la prueba de toxicidad de naproxeno	127
Tabla XXI. Parámetros para la prueba de toxicidad de diclofenaco	129
Tabla XXII. Parámetros para la prueba de toxicidad de ibuprofeno	130
Tabla XXIII. Frecuencia y tipo de malformaciones en columna vertebral por exposición a ácido acetilsalicílico	133
Tabla XXIV. Prueba U Mann-Whitney de ácido acetilsalicílico	133
Tabla XXV. Frecuencia y tipo de malformaciones por exposición a paracetamol	136
Tabla XXVI. Prueba U Mann-Whitney de paracetamol	137
Tabla XXVII. Frecuencia y tipo de malformaciones en columna vertebral de acuerdo a la concentración de exposición de diclofenaco	139
Tabla XXVIII. Prueba U Mann-Whitney de diclofenaco	140

Tabla XXIX. Frecuencia y tipo de malformaciones en columna vertebral de acuerdo a la concentración de exposición de naproxeno	142
Tabla XXX. Prueba U Mann-Whitney de naproxeno.....	143
Tabla XXXI. Frecuencia y tipo de malformaciones en columna vertebral de acuerdo a la concentración de exposición de ibuprofeno	145
Tabla XXXII. Prueba U Mann-Whitney de ibuprofeno.....	146
Tabla XXXIII. Caracterización fisicoquímica del agua residual de la zona de Pachuca-Hidalgo	156
Tabla XXXIV. Cuantificación de AINEs de agua residual de Pachuca-Mineral de la Reforma	165
Tabla XXXV. Matriz de colorimetría.....	166

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Grado de presión de recursos hídricos en México en el año 2007 (SEMARNAT, 2009)	20
Fig. 2 Vías de entrada de fármacos al medio acuático (adaptada de Kümmerer, 2008)	32
Fig. 3 Dimorfismo sexual de <i>Danio rerio</i> (adaptada de González, 2005)	53
Fig. 4 Embrión traslucido de <i>Danio rerio</i> desarrollo embrionario 16.5 horas (15 somitas vista dorsal)	54
Fig. 5 Zona de muestreo de Pachuca, 206 farmacias registradas (INEGI, 2014), situadas en cinco bloques de acuerdo a colonias existentes	63
Fig. 6 Zona de muestreo de Mineral de la Reforma, 51 farmacias registradas (INEGI, 2014), situadas en cinco bloques de acuerdo a colonias existentes	64
Fig. 7 Molécula hipotética con diferentes grupos sustituyentes considerados con alerta estructural (Tennant y Ashby 1991).....	90
Fig. 8 Adquisición y desinfección de organismos experimentales	91
Fig. 9 Agua en reposo con las condiciones fisicoquímicas específicas.....	93
Fig. 10 Organismos en pecera de reproducción con red de maternidad.....	94
Fig. 11 Esquema general de prueba DarTa para ensayos de toxicidad y teratogénesis (adaptado de Lammer et al., 2009).....	96
Fig. 12 División del cuerpo de <i>Danio rerio</i> propuesta por Rivera, 2006 y Gaytán et al., 2008	101
Fig. 13 Tomas de muestras del canal abierto de aguas residuales 20°3'-12.07" Norte y 98°45' 10.00 Oeste"	106
Fig. 14 Cantidad de fármacos prescritos en el sector de salud pública en kg/año	113
Fig. 15 Cantidad de fármacos en el sector de salud pública en kg/año	114
Fig. 16 Cantidad de fármacos de venta libre en farmacias en kg/año, mes y día.....	115
Fig. 17 Total de fármacos en la zona de Pachuca-Mineral de la Reforma en kg/año	116
Fig. 18 Comparación de la prueba U de Mann-Whitney de ventas y prescripciones de AINEs	117
Fig. 19 Modelo Tripartita de Potencial de Riesgo construido con indicadores endógenos	120
Fig. 20 Análisis Tukey controles.....	123
Fig. 21 Regresión lineal dosis-respuesta ácido acetilsalicílico	124
Fig. 22 Regresión lineal dosis-respuesta paracetamol	126
Fig. 23 Regresión lineal dosis-respuesta naproxeno	127
Fig. 24 Regresión lineal dosis-respuesta diclofenaco.....	129
Fig. 25 Regresión lineal dosis-respuesta ibuprofeno	131
Fig. 26 Diagramas de cajas y bigotes del efecto teratogénico de ácido acetilsalicílico	135

Fig. 27 Diagramas de cajas y bigotes del efecto teratogénico de paracetamol.....	137
Fig. 28 Diagramas de cajas y bigotes del efecto teratogénico diclofenaco	141
Fig. 29 Diagramas de cajas y bigotes del efecto teratogénico de naproxeno.....	144
Fig. 30 Diagramas de cajas y bigotes del efecto teratogénico de ibuprofeno	147
Fig. 31 Alevines sin malformaciones en columna vertebral.....	148
Fig. 32 Alevines con malformaciones sencillas.....	149
Fig. 33 Alevines con malformaciones dobles	150
Fig. 34 Alevines con malformaciones múltiples	151
Fig. 35 Alevines con malformaciones curvas.....	152
Fig. 36 Alevines con malformaciones en aleta caudal	153
Fig. 37 Alevines con malformaciones en forma de gancho.....	154
Fig. 38 Alevines con ausencia de cuerpo.....	155
Fig. 39 Curva de calibración de ácido acetilsalicílico.....	157
Fig. 40 Cromatogramas de ácido acetilsalicílico.....	158
Fig. 41 Curva de calibración de ibuprofeno.....	159
Fig. 42 Cromatogramas de ibuprofeno	160
Fig. 43 Curva de calibración de naproxeno	161
Fig. 44 Cromatogramas de naproxeno	162
Fig. 45 Curva de calibración de paracetamol	163
Fig. 46 Cromatogramas paracetamol	164

1. INTRODUCCIÓN

Los fármacos son un grupo de sustancias químicas y biológicas con usos terapéuticos, lo que implica grandes cantidades de compuestos activos que se administran para tratar, curar o prevenir enfermedades que aquejan al humano, también son utilizados en agroindustria para acelerar el crecimiento y cuidar la salud de los animales (Daughton y Ternes, 1999 y Fent et al., 2006). Las ventas de productos farmacéuticos aumentan cada año en un 5 a 7% aproximadamente; en 2008 la venta mundial de fármacos dejó una cifra total de ganancia de 602 billones de dólares (Corcoran et al., 2010), lo anterior sustenta, una de las preocupaciones que van de manera ascendente entorno a la contaminación por presencia y efectos negativos de productos farmacéuticos (Daughton y Ternes, 1999). Desde 1980 investigaciones científicas muestran presencia en el ambiente de medicamentos, introducidos principalmente a través de la excreción en su forma original y metabolitos, en aguas residuales de: hospitales, hogares y centros donde se aglomera un potencial número de personas, como también fábricas de fármacos, agroindustria, piscicultura, mala disposición de medicamentos caducos y efluentes finales de plantas de tratamiento de agua residuales, representan fuentes principales de ingreso de productos farmacéuticos a aguas residuales, superficiales y subterráneas (Kosjek et al., 2005; Fent et al., 2006; Kümmerer, 2010; Valcárcel et al., 2011). Las concentraciones en las que se encuentran normalmente estos contaminantes en el agua, son en concentraciones de ng/L o µg/L (Kümmerer, 2010).

Diferentes fármacos producen efectos tóxicos crónicos (estrogénicos, genotóxicos, cancerígenos y teratogénicos) y tóxicos agudos durante su exposición; un gran número de especies son más sensible a los efectos de un fármaco en comparación con la de los seres humanos o animales de crianza (Corcoran et al., 2010). Se han reportado fármacos y sus metabolitos en concentraciones traza en sistemas de agua potable, esto implica que la exposición de los seres humanos a los residuos farmacéuticos es latente, sin embargo, no hay estudios que demuestren los efectos adversos en la salud humana derivados de la presencia de fármacos en agua potable o por ingesta de organismos acuáticos que han acumulado estos residuos farmacéuticos (Cunningham et al., 2009). Dentro de la

identificación y cuantificación de medicamentos en el ambiente, destacan los fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINEs) que predominan en el análisis de muestras ambientales, así como en las listas de prescripción médica (Kosjek et al., 2005; Santos et al., 2010). La finalidad de este trabajo es evaluar el potencial de riesgo y efectos biológicos en *Danio rerio* (Pez cebra) por medio de la técnica DarTa (*Danio rerio* teratology assay) por fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) de alto consumo como contaminantes emergentes presentes en aguas residuales de la zona de Pachuca-Mineral de la Reforma, complementando con la cuantificación y detección de AINEs de alto consumo a través de técnica HPLC-MS/MS, para fundamentar futuras normatividades e investigaciones.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Características del área urbana

El estado de Hidalgo se ubica en la parte centro sur del país entre los paralelos 32°43'-14°32' latitud norte y 86°42'-118°22' de longitud oeste; posee una superficie de 20 905 km² y está dividido en 84 municipios (INEGI, 2007; INEGI, 2010); en la ciudad de Pachuca la mayor parte del suelo está ocupado por la zona urbana (44.24%) y el uso agrícola (30.76%), lo que deja espacios reducidos para la vegetación de matorral (9.0%) pastizal y bosques (8.0%) respectivamente (INEGI, 2009); se ubica en una latitud de 20° 7' norte y longitud de 98° 44' oeste sobre 2 400 msnm, el rango de temperatura es de 10-16 °C y con un rango de precipitación de 400-900 mm. El crecimiento urbano de Pachuca, se debe: aparición de nuevas relaciones multiculturales, desarrollos inmobiliarios, accesos carreteros, demandas sociales, infraestructura y servicios, nuevos procesos de urbanización, entre otros. Actualmente Pachuca cuenta con una población de 267 862 habitantes, 72 903 viviendas particulares habitadas y 115 439 automóviles registrados en circulación (INEGI, 2010). Los datos anteriores proporcionan evidencia del problema de la expansión de la ciudad con implicaciones económicas, sociales y culturales que es necesario atender, pero que también, exigen una preocupación prioritaria en cuestiones ambientales y salud pública.

Una de las principales problemáticas del crecimiento de una población es la demanda de servicios médicos de calidad, atendiendo a esta necesidad, en años recientes han aumentado unidades médicas públicas y privadas. En Hidalgo existen 951 unidades médicas públicas de las cuales 37 ubicadas en Pachuca, dos pertenecientes al IMSS, dos al IMSS-OPORTUNIDADES, tres del ISSSTE y 29 a la Secretaría de Salud del Estado (INEGI, 2010). En el área de Pachuca existen 206 farmacias registradas y 51 en Mineral de la Reforma (INEGI, 2014).

Estas unidades médicas son sistemas de gran relevancia y alta necesidad, sin embargo, el manejo desordenado de sus descargas de agua residuales que generan, son un riesgo potencial para los ecosistemas y la salud, debido principalmente a la presencia de fármacos, (tanto por excretas como por la mala disposición de medicamentos caducos por parte de la población en general, al ser eliminados en las tazas de los baños).

La urbanización puede ser definida como: la presencia humana concentrada en los entornos residenciales e industriales que afecta a sus asociados, esta puede ser medida por uno o varios atributos, como tipo-densidad de casas, distancia entre áreas urbanas y tipo-densidad de caminos (Mcintyre et al., 2000). La urbanización, fenómeno que está causando impactos negativos ambientales y a la salud de las poblaciones en las últimas décadas en México, así como en diferentes partes del mundo; también visto como el aumento sobre demanda de recursos naturales. Un ejemplo del impacto de la urbanización, es el incremento de extracción de agua para suministrar actividades como: agricultura, diversas industrias, hospitales y para consumo de la población.

2.2 Agua

La disponibilidad de agua promedio anual en el mundo es de 1 386 millones de km^3 , de los cuales sólo el 2.5% (35 millones de km^3) es agua dulce aunado a que de esta cifra el 70% no está disponible para consumo humano debido a que se encuentra principalmente en glaciares, nieve o hielo y “permafrost” (CONAGUA, 2011). En México la disponibilidad natural media anual de agua es de 458 km^3 , siendo mayor en el sureste del país y menor en la zona norte. El estado de Hidalgo se encuentra ubicado en tres regiones hidrológicas:

Golfo Norte, Aguas del Valle de México y Golfo Centro; Pachuca se ubica dentro de la región hidrológica aguas del Valle de México en el cual, la demanda por recursos hídricos es elevada y genera porcentajes de grados de presión muy fuertes mayores a 100 (Fig.1) (SEMARNAT, 2009).



Fig. 1 Grado de presión de recursos hídricos en México en el año 2007 (SEMARNAT, 2009)

Según SEMARNAT (2012), en el año 2010 la generación de aguas residuales en nuestro país fue de 235.08 m³/s, de esta cantidad se colectó 209.07 m³/s y 93.60 m³/s terminó en diferentes procesos de tratamiento de aguas en las diferentes plantas de que se ubican en el territorio mexicano, identificando que la contribución de Hidalgo con sus 17 plantas en operación fue de 0.3672 m³/s, caudal que equivale de 2 a 10 % del total de agua residual tratada en México.

2.3 Contaminación ambiental

El concepto de contaminación ambiental se define como, introducción o presencia de sustancias, organismos o formas de energía, en ambientes al que no pertenecen o en cantidades superiores a las propias de manera natural, por un tiempo suficiente y bajo condiciones tales que éstas sustancias interfieren en la salud del ambiente biótico y abiótico; este efecto siempre ha existido de manera natural pero el agravamiento de este problema se debe a intensas y constantes actividades humanas; las principales causas de

contaminación se deben a las actividades antropogénicas como: generación de energía, explotación de recursos naturales, distintos tipos de industrias, actividades agrícolas-ganaderas, medios de transporte y actividades cotidianas que se realizan en los hogares (Quiterio-Pérez, 2012), y en particular para nuestro caso, a las aguas residuales generadas en los hospitales y del ramo.

2.3.1 Contaminación del agua

Se produce a través de introducción directa o indirecta en cauces o acuíferos de sustancias sólidas, líquidas, gaseosas, así como de energía calórica, entre otras. Esta contaminación es causante de daños en organismos vivos del medio acuático, así como efectos en características físicas y químicas del agua, además de representar un peligro para la salud de personas y animales asociados a cuerpos de agua (Orozco, 2003).

De las diversas definiciones que existen de contaminación, destacan tres aspectos fundamentales: (1) se parte de la composición natural del agua, no de agua pura, (2) se mide la contaminación en función del uso al que el agua está destinada y (3) se considera contaminación la provocada de forma directa o indirecta por actividades humanas; los efectos más graves de la contaminación ocurren cuando la entrada de sustancias de origen natural, sintético o ambos rebasa la capacidad de los entornos naturales para asimilarlas y/o degradarlas (Orozco, 2003).

2.3.2 Tipo de contaminantes en agua

Los contaminantes en el agua se pueden colocar en extensas listas, lo cual hace difícil caracterizar cada tipo de agente contaminante; una de las clasificaciones más usadas se basa en la naturaleza física, química o biológica (Tabla I).

El número de posibles agentes contaminantes es muy alto, por lo tanto los parámetros en la mayoría de los casos se engloban en grupos, pero también, dejando una serie de contaminantes que se les considera como emergentes.

Tabla I. Clasificación general de los tipos de contaminantes (adaptada de Orozco, 2003)

Origen	Tipo de contaminante
Agentes físicos	*Calor
Compuestos químicos inorgánicos	*Sales (aniones y cationes) *Ácidos y bases * Elementos tóxicos (metales y no metales) *Elementos radioactivos *Gases *Especies minerales no disueltas
Compuestos químicos orgánicos	*Hidratos de carbono *Proteínas *Aminoácidos *Aceites y grasas *Jabones y detergentes *Pesticidas *Policlorobifenilos * Productos farmacéuticos *Hidrocarburos aromáticos policíclicos *Productos de higiene personal
Bionutrientes	*Compuestos nitrogenados *Compuestos fosforados
Microorganismos	*Bacterias * Hongos *Algas *Virus

2.4 Contaminantes emergentes

Existen infinidad de actividades humanas que se realizan cotidianamente, que por más sencillas que parezcan generan impactos en el medio ambiente. La aparición de productos farmacéuticos en el ambiente acuático, es un tema de agenda para las ciencias ambientales. Los cuerpos de agua dulce, enfrentan la carga de 100 000 sustancias químicas, que son incorporadas por el uso de aproximadamente 300 millones de toneladas de compuestos sintéticos, que se utilizan anualmente en manufactura de diversos productos (Schriks et al., 2010).

Día a día se sintetizan y optimizan fármacos para tener mayor eficacia en la mitigación de enfermedades. Su presencia en el medio ambiente representa una gran problemática; estos compuestos químicos de diferente estructura y naturaleza, son conocidos como contaminantes emergentes, los cuales se localizan en una extensa lista de sustancias (Tabla II), sustancias de las que se tiene escasa información acerca del impacto que provocan en el ambiente y daños en la salud de la biota; las características de estos contaminantes son: constante presencia en el medio ambiente, continuo ingreso a

sistemas ambientales, elevado consumo en el mercado, rápida transformación en subproductos y alto grado de eliminación (Barceló, 2003). En distintas regiones del mundo, incluido México, no se cuenta con una regulación específica de concentraciones permisibles en el ambiente de estos agentes contaminantes, debido a la falta de preocupación por estos. En los últimos años, diversas investigaciones demuestran que deben ser incluidos en normas especiales por los efectos dañinos que pueden generar en ecosistemas y salud pública (Díaz-Cruz et al., 2009).

Tabla II. Contaminantes emergentes y ejemplos (adaptada de Barceló, 2003)

Grupos de compuestos	Ejemplos de contaminantes emergentes
PRODUCTOS FARMACÉUTICOS	
Antibióticos veterinarios y médicos	Eritromicina, lincomicina, sulfametoxazol
Analgésicos-Antiinflamatorios	Acetaminofén, ácido acetilsalicílico, codeína, diclofenaco, fenoprofeno, ibuprofeno
Uso psiquiátrico	Carbamazepina, diazepam, fluoxetina
Reguladores de lípidos	Ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico, atorvastatina, bezafibrato
Beta bloqueadores	Atenolol, metoprolol, propanolol, timolol
Rayos X (medios de contraste)	Diatrizoato, lopamidol, lopromida
Esteroides y hormonas (anticonceptivos)	Estradiol, estriol, estrona, dietilelbestrol
PRODUCTOS DE HIGIENE PERSONAL	
Perfumes	Fragancias, policíclicos y macrocíclicos
Protectores solares	Benzofenona
Repelentes de insectos	N,N-dietiltoluamida
Antisépticos	Triclosan, clorofeno
DETERGENTES TENSIOACTIVOS Y METABOLITOS	Etoxilatos de alquifenol, alquifenoles (nonilfenol y octilfenol), carboxilatos de alquifenol
RETARDADORES DE LLAMA	Difenil éteres polibromados (PBDEs), tetrabromo bisfenol A, tris(2-cloroetil)fosfato
ADITIVOS Y AGENTES INDUSTRIALES	Agentes quelantes (EDTA), sulfonados aromáticos
ADITIVOS DE LA GASOLINA	Dialquí éteres, metil-t-butil éter (MTBE)
SUBPRODUCTOS DE DESINFECCIÓN	Bromato, bromoacetónitrilos, bromoácidos, bromoaldehídos, cianoformaldehídos, NDMA, yodo-THMs

2.5 Residuos peligrosos

Un residuo es todo material o producto cuyo propietario desecha al medio ambiente; las particularidades de residuos peligrosos son: Corrosividad, Reactividad, Explosividad, Toxicidad, Inflamabilidad o que contengan Agentes Biológicos Infecciosos (CRETIB), en el caso de México el Artículo 31 de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de

los residuos (LGPGIR), contempla elementos y uno de ellos son los fármacos. Si el residuo no se clasifica como peligroso en el Artículo 31 de la LGPGIR, se debe consultar en listados de la Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, esta establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y listados de residuos peligrosos. Si el residuo tampoco está en los listados de la NOM-052-SEMARNAT-2005, puede estar sujeto a instrumentos regulatorios, en los que pueda considerarse como peligroso, de acuerdo a los criterios que en ellos se establezcan. Entre los criterios establecidos la identificación de las características de explosividad y biológico infeccioso es mediante revisión bibliográfica, la referencia a consultar es la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 norma que hace referencia a protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológico-infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo. Los generadores de residuos peligrosos tienen como obligación inscribirse en el registro de generadores, llevar una bitácora mensual donde quedará asentada la generación de residuos y dar a estos residuos el manejo previsto en la norma NOM-54-SEMARNAT-93 (SEMARNAT, 2013).

Dentro de estas normas y listados no se toma en cuenta concentración de fármacos en orina y materia fecal, así mismo en la NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización" no existe las concentraciones permisibles de ningún tipo de fármaco.

2.6 Fármacos

Importantes para la economía mundial debido a que presentan una demanda globalizada constante. A nivel mundial, la industria farmacéutica en México se ubica en noveno sitio en importancia debido al dinamismo que presenta (Torres-Guerra y Gutiérrez, 2009). En general los fármacos son un grupo de sustancias químicas sintéticas y naturales, utilizados en diferentes usos terapéuticos, con la finalidad de: prevención, diagnóstico, tratamiento, mitigación y cura de enfermedades, lo que implica grandes cantidades de diferentes

compuestos activos que se administran de acuerdo a las necesidades específicas. De manera general los fármacos se pueden clasificar en: analgesia, anestesia, cardiología, dermatología, endocrinología y metabolismo, enfermedades infecciosas y parasitarias, enfermedades inmunoalérgicas, gastroenterología, gineco-obstetricia, hematología, intoxicaciones, nefrología y urología, neumología, neurología, nutriología, oftalmología, oncología, otorrinolaringología, planificación familiar, psiquiatría, reumatología y traumatología, soluciones electrolíticas y sustituto del plasma, vacunas, toxoides, inmunoglobulinas y antitoxinas (IMSS, 2011).

2.6.1 Los antiinflamatorios no esteroideos: AINEs (Non-steroidal antiinflammatory drugs: NSAIDs)

Son los medicamentos con mayor prescripción médica y a nivel mundial de los más solicitados debido a su venta libre; su función principal es contrarrestar condiciones inflamatorias y dolores músculo-esqueléticos. Son ácidos orgánicos débiles que presentan gran afinidad por los lípidos en medios ácidos y las proteínas plasmáticas, lo que determina una distribución selectiva en los tejidos inflamados y su acción farmacológica (Khetan y Collins, 2007; Prieto, 2007).

Son un conjunto heterogéneo de compuestos químicos generalmente no relacionados entre sí, que comparten acciones terapéuticas para el control en diverso grado del dolor (analgésicos), inflamación (antiinflamatorios) y fiebre (antipiréticos); actúan mediante la inhibición reversible o irreversible de la enzima ciclooxigenasa (COx), en la isoforma COx-1 (constitutiva) y COx-2 (proinflamatoria) o en ambas; estas ciclooxigenasa son responsables de la síntesis de diferentes prostaglandinas de acción rápida; las prostaglandinas son mediadoras de inflamación (prostaglandinas sintetizadas por COX-2) pero también tienen funciones protectoras de: mucosa gástrica, riñón y endotelio (prostaglandinas sintetizadas por COX-1); debido a estas funciones protectoras de las prostaglandinas cuando son suministrados los AINEs, inhiben tanto a prostaglandinas protectoras como a las que influyen en el proceso inflamatorio, por lo tanto existen efectos antiinflamatorios positivos pero también persisten los efectos adversos por la inhibición de las funciones

protectoras; estos fármacos son utilizados frecuentemente en el área reumatología, odontología, traumatología y atención primaria, sin embargo, pueden causar efectos adversos en el sistema gastrointestinal, hematopoyético y renal; la úlcera gastrointestinal es uno de los efectos secundarios más frecuente y grave, especialmente en casos de sobredosis y abuso crónico. Además, como todos los medicamentos, pueden interaccionar con otros medicamentos y pueden causar reacciones alérgicas (Khetan y Collins, 2007; Prieto, 2007).

Los AINEs se pueden clasificar por su principal grupo químico (Tabla III). Dentro de la variedad de AINEs, existen algunos de mayor interés, como: ácido acetilsalicílico en su presentación oral de 100 y 500 mg con una dosis total al día de dos a tres mg, ibuprofeno en su presentación oral de 200, 400, 600, 800 mg con una dosis total al día de dos a cuatro mg, naproxeno en su presentación oral de 200, 250, 500, 750 mg con una dosis total al día de un mg, diclofenaco en su presentación oral de 50, 75, 100 mg con una dosis total al día de 200 mg y paracetamol en su presentación oral de 100 y 500 mg (Pérez-Ruiz et al., 2002).

En la tabla IVa-b se muestran características de los AINEs de interés para el presente trabajo, estos fármacos son esenciales en México ya que se encuentran en el cuadro básico del IMSS.

Tabla III. Clasificación de AINEs por grupo químico (adaptada de Pérez-Ruiz et al., 2002)

Grupo químico	Compuesto activo
Salicilatos	ASA (ácido acetilsalicílico)
Derivados pirazolónicos	Aminofenazona (dipirona o metamizol) Fenilbutazona Azaprofazona
Derivados del para-aminofenol	Acetaminofen (paracetamol o tylenol)
Derivados del ácido acético	Indometacina Sulindaco Glucametacina
Derivados carboxílicos y pirrolpirrólicos	Etodolaco Ketorolaco
Derivados del ácido fenilacético	Diclofenaco (voltaren) Aclofenaco Tolmetina
Derivados del ácido n-acetilntranílico	Ácido mefenámico Niflumico Meclofenamico Clonixinato de lisina
Derivados del ácido propiónico	Ibuprofeno Naproxeno Ketoprofeno Flurbiprofeno Fenoprofeno Oxaprozina
Derivados enólicos	Piroxican Meloxican Tenoxican
Nimesulida, sulfonilida	
Grupo naftilalcanonas	Nabumetona

Tabla IVa. Cuadro básico de AINEs (adaptada de IMSS, 2011; FACMED UNAM, 2013)

Fármaco	Grupo químico	Efectos adversos	Indicaciones terapéuticas	Farmacocinética/ Administración
Ácido acetilsalicílico	Salicilatos	Pérdida de la audición, náusea, vómito, hemorragia gastrointestinal, hepatitis tóxica, reacciones de hipersensibilidad	Indicado como antipirético, antiinflamatorio y como antiagregante plaquetario. Útil para artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante y fiebre reumática aguda.	Los salicilatos se eliminan del organismo mediante excreción renal Oral
Diclofenaco	Derivados del ácido fenilacético:	Queratitis, ardor, visión borrosa, prurito, eritema, fotosensibilidad.	Antiinflamatorio que posee actividades analgésicas y antipiréticas y está indicado por vía para el tratamiento de enfermedades reumáticas agudas, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artrosis lumbalgia, gota en fase aguda, inflamación postraumática y postoperatoria, cólico renal y biliar, migraña aguda, y como profilaxis para dolor postoperatorio y dismenorrea	Los metabolitos se excretan en orina, 65% y por bilis, 35% Oral e intramuscular
Ibuprofeno	Derivado del ácido propiónico	Estreñimiento, diarrea, gases o distensión abdominal, mareo, vómito, nerviosismo, zumbidos en los oídos	Utilizado para el tratamiento de estados dolorosos, acompañados de inflamación significativa como artritis reumatoide leve y alteraciones musculoesqueléticas (osteoartritis, lumbago, bursitis, tendinitis, hombro doloroso, esguinces, torceduras, etc.). Se utiliza para el tratamiento del dolor moderado en postoperatorio, en dolor dental, postepisiotomía, dismenorrea primaria, dolor de cabeza.	Más del 90% de una dosis ingerida se excreta por la orina como metabolitos. Oral

Tabla IVb. Cuadro básico de AINEs (adaptada de IMSS, 2011; FACMED UNAM, 2013)

Fármaco	Grupo Químico	Efectos adversos	Indicaciones terapéuticas	Farmacocinética/ Administración
Naproxeno	Derivado del ácido propiónico	Náusea, irritación gástrica, diarrea, vértigo, cefalalgia, hipersensibilidad cruzada con aspirina y otros antiinflamatorios no esteroides	Tratamiento de la artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante y artritis juvenil. También está indicado para el tratamiento de tendinitis, bursitis esguinces y para el manejo del dolor postquirúrgico.	Aproximadamente 95% es excretado en la orina. Oral
Paracetamol	Derivados del para-aminofenol	Erupción cutánea, neutropenia, pancitopenia, necrosis hepática, necrosis túbulorrenal e hipoglucemia	Afecciones articulares, otalgias, cefaleas, dolor odontogénico, neuralgias, procedimientos quirúrgicos menores etc. Tratamiento de la fiebre	En la orina se excreta sin cambio entre 1 y 2% de la dosis Oral y oftalmológica

3. ANTECEDENTES

3.1 Toxicocinética y cinética de los fármacos

Después de la administración de los fármacos un gran porcentaje de estos compuestos se excreta sin alterar el metabolito activo, la orina contribuye generalmente en 55-88% del total de ingesta que se excreta, y las heces contribuyen parcialmente en la incorporación de fármacos o sus metabolitos en aguas superficiales, aguas subterráneas y sistemas de aguas residuales principalmente (Lienert et al., 2007), o pueden ser metabolizados mediante reacciones bioquímicas para convertir compuestos hidrófobos y con mayor polaridad, estas características ayudan a que los residuos sean más fáciles de excretar por medio de dos fases principalmente: Fase I, se realizan reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y Fase II, se forman conjugados; biotransformación de uno o más metabolitos ocurre en las dos fases (Santos et al., 2010).

Otra forma en que se incorporan estos compuestos a cuerpos de agua, es por la incorrecta disposición de fármacos al exceder la fecha de caducidad; este manejo no selectivo de restos de fármacos es una vía potencial de entrada que contamina el medio ambiente, sobre todo en hospitales y/o por actividades veterinarias. Las vías de entrada de productos farmacéuticos a aguas superficiales y subterráneas son variadas, entre las que destacan: hospitales, manufactura en industria farmacéutica, industria cárnica y ganadera, acuicultura y centros donde se aglomera un potencial número de personas (Fig.2); la principal es, la descarga de efluentes de aguas residuales sin un tratamiento previo e incorporación de aguas provenientes de plantas de tratamiento municipales; lodos generados por plantas de tratamiento, son fuentes de contaminación directa del suelo y generalmente se utilizan como fertilizantes sin sospechar la presencia de fármacos, estos lodos son esparcidos sobre huertos; el estiércol que se genera en ranchos ganaderos por lo general lleva dosis de medicamentos veterinarios; la contaminación del suelo es evidente, pero la presencia de lluvias fuertes, puede ocasionar escurrimiento dejando latente la posibilidad de contaminar aguas superficiales y subterráneas (Kümmerer, 2008; Santos et al., 2010).

Otra actividad importante que es fuente de contaminación, es la acuicultura cuyos fármacos utilizados para esta actividad económica, así como, los metabolitos y productos de degradación,

se vierten directamente en las aguas superficiales; la industria farmacéutica aporta gran cantidad de estos contaminantes, desde vertido de sus efluentes directo en aguas superficiales o la integración en las aguas residuales (Fig.2) (Kümmerer, 2008; Santos et al., 2010).

3.2 Fármacos en el ambiente

Su incorporación al medio acuático, puede atribuirse a diferentes fuentes, como: descargas de agua de industrias farmacéuticas, hogares, granjas, excretas humanas y de animales pero la principal fuente de contaminación, son los hospitales, los cuales requieren una cantidad significativa de agua por día para mantener los diferentes servicios que brindan en las distintas áreas dispuestas dentro de su estructura, el agua residual generada depende especialmente de: número de camas de hospital, edad de los pacientes, servicios generales (cocina, lavandería, baños y comedores), número de salas de operación y consultorios, políticas de protección al medio ambiente, factores culturales y geográficas (Verlicchi et al., 2010).

La mayoría de los compuestos activos de los fármacos no se eliminan eficazmente durante el tratamiento de las aguas residuales, algunos compuestos tienden a persistir mientras que otros ligeramente se degradan. El ingrediente activo del fármaco o sus metabolitos entran al medio acuático a través de la excreción. Los compuestos activos de los fármacos y sus metabolitos no se eliminan por completo por tratamientos convencionales de estaciones depuradoras de aguas residuales municipales (EDAR), ya que las EDAR fueron construidas con el objetivo de eliminar principalmente carbono, nitrógeno y compuestos de fósforo, así como agentes microbiológicos, de esta manera los fármacos y sus metabolitos persisten el tiempo suficiente para entrar en sistemas de agua potable, por lo tanto la exposición de los humanos a estos contaminantes es una constante por el consumo de agua o por consumo de organismos acuáticos tales como los peces que bioacumulan los residuos farmacéuticos (Cunningham et al., 2009). Ante este semblante de magnitud y urgencia, diversos estudios están tratando de establecer una lista de sustancias farmacéuticas prioritarias en términos de ecotoxicología y riesgo sanitario.

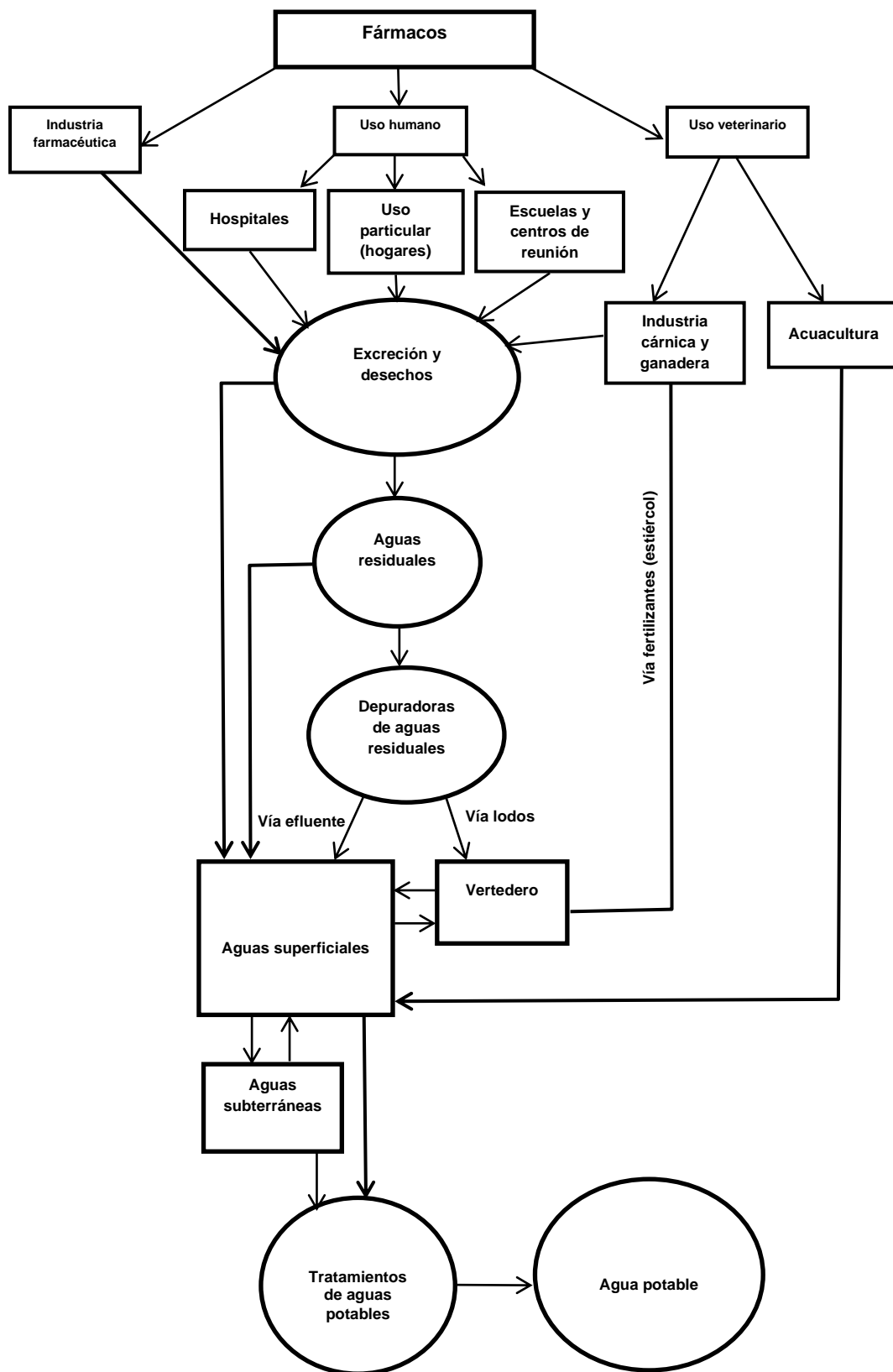


Fig. 2 Vías de entrada de fármacos al medio acuático (adaptada de Kümmeler, 2008)

Los productos farmacéuticos son novedosos y poco estudiados, de ahí su importancia como contaminantes, debido a que se ha reportado su presencia en aguas residuales, sedimentos, lodos, aguas superficiales y aguas subterráneas. Las concentraciones en las que se encuentran normalmente estos contaminantes emergentes en el medio ambiente varían de ng/L o µg/L en ríos, aguas residuales y plantas de tratamiento (Brandmayr et al., 2015). La cuantificación exacta de productos farmacéuticos, especialmente en muestras ambientales puede ser un desafío analítico, debido sus bajos niveles de ocurrencia, niveles de detección, calidad, tipos, permanencia, degradación y movilidad de los contaminantes en los cuerpos de agua. La cromatografía de gases y de líquidos en combinación con métodos de extracción y limpieza proporciona la capacidad de cuantificar muchos compuestos, entre estos, los fármacos y sus metabolitos debajo de concentraciones de ng/L. La electroforesis capilar (CE) también es utilizada para el análisis de productos farmacéuticos, teniendo como ventaja que la operación es menos compleja y costosa pero con límites de detección de µg/L (Fatta-Kassinos et al., 2011).

Los AINEs (diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, ketoprofeno, y indometacina) son los productos farmacéuticos humanos, regularmente detectados en aguas residuales y superficiales, en concentraciones de ng/L (Almeida et al., 2013). En Europa, el naproxeno es uno de los fármacos frecuentemente detectados en el medio ambiente acuático, incluyendo agua potable, los datos sobre su destino ambiental son muy escasos. Este fármaco se considera de alta prioridad en base a su alto consumo, propiedades físico-químicas, toxicidad, persistencia y presencia de agua (Grenni et al., 2013).

En aguas residuales y aguas superficiales de Europa destaca el ibuprofeno, el cual es detectado con mayor frecuencia y en concentraciones superiores a 5 µg/L, en aguas superficiales (Murray et al., 2010; Almeida et al., 2013).

Carbamazepina, cafeína, ácido clofíbrico, diclofenaco, ácido fenofíbrico, gemfibrozilo y naproxeno se han detectado en Alemania. Algunos AINEs se han manifestado en diferentes concentraciones, con una media para el: diclofenaco (0.15 µg/L), ibuprofeno (0.006 µg/L), ketoprofeno (0.01µg/L) y naproxeno (0.004 µg/L) (Murray et al., 2010; Almeida et al., 2013). En lo que se refiere al diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, paracetamol y ácido acetilsalicílico la

tabla V muestra algunos de los niveles cuantificados de AINEs, expresados por diferentes autores en diferentes ambientes acuáticos y por distintos procedimientos analíticos, siendo el ibuprofeno y paracetamol los de mayores concentraciones cuantificadas.

Tabla V. Concentración de AINEs en ambientes acuáticos

Fármaco	Localización *Procedimiento analítico	Concentraciones µg/L	Referencia
Ácido acetilsalicílico	En ríos de Rumania. * EFS-CG-EM	0.030–0.037	(Moldovan, 2006)
	Afluente de EDAR en Japón * EFS-CG-EM	0.47-19.4	(Nakada et al., 2006)
Diclofenaco	Aguas subterráneas de Alemania * EFS-CG-EM	0.59	(Sacher et al., 2001)
	Afluente de EDAR en Suiza * EFS-CG-EM	1.3-2.9	(Tauxe-Wuersch et al., 2005)
	Efluente de Hospital en España * EFS-HPLC-EM/EM	0.06-1.9	(Gómez et al., 2006)
Ibuprofeno	Afluente de EDAR en Reino unido *EFS	7.741 -33.764	(Roberts y Thomas, 2006)
	Afluente de EDAR en España * EFS-GC-MS	34-168	(Gómez et al., 2007)
	Aguas subterráneas de EUA * EFS-HPLC-MS/MS	3.11	(Barnes et al., 2008)
Naproxeno	Afluente de EDAR en Suecia * EFS-GC-MS	3.65	(Bendz et al., 2005)
	Efluente de EDAR de Canadá * EFS-GC-MS/MS	0.2714–7.9623	(Verenitch et al., 2006)
	Agua de río de Alemania * HPLC-MS/MS	0.07	(Hernando et al., 2006)
Paracetamol	Efluente de hospital de España * EFS-HPLC-MS/MS	0.5–29	(Gómez et al., 2006)
	Afluente de EDAR en España * EFS-GC-MS	29–246	(Gómez et al., 2007)
	Aguas subterráneas en EUA * EFS-LC-EM	0.38	(Barnes et al., 2008)

* Extracción de Fase Sólida (EFS), cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alta eficacia con detección por espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS), cromatografía de gas con espectrometría de con detección por espectrometría de masas en tándem; cromatografía líquida con detección de espectrofotometría de masas (LC-MS).

3.2.1 Fármacos en México

La mayoría de aguas residuales de la ciudad de México se envía sin tratar al Valle de Tula, Hidalgo. Durante muchos años estas se han utilizado para irrigar los cultivos; este tipo de agua introduce contaminantes orgánicos en suelos y tienden a llegar a los acuíferos de la región (Gibson et al., 2010).

Se han detectado concentraciones de fármacos considerados contaminantes emergentes orgánicos en las aguas residuales del Valle del Mezquital (ibuprofeno naproxeno y diclofenaco), las concentraciones detectadas reflejan que la tasa de empleo del naproxeno es relativamente alto (Tabla VI). Estos contaminantes farmacéuticos son polares lo que les da la capacidad suficientemente alta para moverse a través del perfil del suelo, incrementando su cinética ambiental y con la persistencia suficiente para contaminar el acuífero de la región (Gibson et al., 2010).

Siemens y colaboradores (2008), calculan las concentraciones existentes en efluentes de aguas residuales de la Ciudad de México con dirección al Valle del Mezquital, que sirven como sistemas de riego agrícola; encontrando que, las concentraciones de ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco mayores a 1 µg/L son un potencial de riesgo para la salud y una alta probabilidad de contaminación de aguas subterráneas a consecuencia de la irrigación de los campos de cultivo con aguas residuales

Con base en una revisión bibliográfica del 2008-2015, se tienen cinco referencias de los fármacos ácido acetilsalicílico, diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno y naproxeno como contaminantes emergentes en cuerpos de agua de México en concentraciones de µg/L (Tabla VI).

Tabla VI. Fármacos AINEs en cuerpos de agua de México

Ubicación	Fármacos concentraciones µg/L	Referencia
Canales de riego del Valle del Mezquital agua proveniente de la Ciudad de México	Ibuprofeno (0.21-0.54) Naproxeno (0.80-5.60) Diclofenaco (0.12-0.50)	(Siemens et al., 2008)
Canales de riego del Valle de Tula	Ibuprofeno (0.742-1.406) Naproxeno (7.267-13.589) Diclofenaco (2.052-4.824)	(Gibson et al., 2010)
Agua potable Lerma-Cutzamala Agua subterránea	Diclofenaco (0.001)	(Félix-Cañedo et al., 2013)
Agua potable Lerma-Cutzamala Aguas superficiales	Ibuprofeno (0.015-0.045) Naproxeno (0.0052-0.186) Diclofenaco (0.028-0.032)	(Félix-Cañedo et al., 2013)
Reservorio Mandín Agua potable	Ibuprofeno (3.61-4.51) Naproxeno (0.18-0.21) Diclofenaco (0.20-0.31)	(González-González et al., 2014)
Efluente de planta de manufactura de AINEs de Toluca	Ibuprofeno (35.33-100.40) Naproxeno (654.70-1717.31) Diclofenaco (27.27-104.63) Paracetamol (698.30-3034.41)	(SanJuan-Reyes et al., 2015)

3.3 Técnicas analíticas

Actualmente se han desarrollado varios métodos analíticos de alta sensibilidad para detectar y cuantificar en el ambiente la presencia de sustancias potencialmente tóxicas, en donde los resultados ayudan a descifrar el significado toxicológico, genético y/o evolutivo de la exposición corta o prolongada a estos agentes químicos (Gaytán, 2006).

Para detectar y cuantificar fármacos AINEs (contaminantes emergentes) en muestras ambientales de manera confiable, se necesita de una gran cantidad de análisis de alta

sensibilidad, debido a que generalmente estos se encuentran debajo de los límites de la técnica analítica a utilizar. La cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas tándem (HPLC-MS/MS), es la técnica preferible para detección y cuantificación en concentraciones de hasta fentogramos (aunque generalmente en el ambiente se encuentran en nanogramos o microgramos), aunque también, cuenta con métodos por cromatografía de gases y diferentes detectores. A pesar de la utilización de instrumentos analíticos altamente sensibles y confiables, la exacta preparación de las muestras es tan necesaria como el correcto funcionamiento del equipo para obtener excelentes resultados (González-González et al., 2014; SanJuan-Reyes et al., 2015).

3.3.1 Principios y funcionamiento de Cromatografía líquida rápida de alta eficacia asociada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS)

3.3.1.1 Cromatografía líquida (LC)

La información de este apartado es de: Grimalt-Brea, 2009 y Giménez-Pérez, 2012.

Es un procedimiento que permite la separación, identificación y cuantificación, en cortos períodos de tiempo, de sustancias o grupos de sustancias, poco volátiles o térmicamente inestables, o que se transforman en sus derivados volátiles. Es importante que la muestra sea soluble en un disolvente, condición que no cumplen las sustancias de alto peso molecular, pero si todas las sustancias orgánicas e inorgánicas iónicas. Con la LC se pueden obtener tanto resultados cuantitativos como cualitativos. El análisis cuantitativo se basa en la medida de alturas y áreas de los picos cromatográficos que muestran la concentración de la sustancia a estudiar, en cambio el análisis cualitativo se basa en la identificación del analito en los tiempos de retención. La muestra se desplaza junto con la fase móvil, los componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria de la columna se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, mientras que los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas.

El equipo de cromatografía líquida lo componen:

1) Depósito de la fase móvil: depende del procedimiento, esta puede ser acetonitrilo, metanol o una mezcla de ambos. Las fases móviles se preparan diariamente.

2) Bomba: se encarga de succionar la fase móvil. Tiene una gran capacidad para trabajar a altas presiones, es quien genera el caudal. Si la elución es isocrática (fase móvil constante) es suficiente una bomba y un canal de disolvente. Si la elución es en gradiente (cambia la composición de la fase móvil a lo largo del tiempo del análisis) normalmente se necesita una bomba con un sistema de dosificación de cada uno de los eluyentes, la mezcla se realiza a baja presión y antes de ser impulsados. También se puede realizar con dos o más bombas mezclándose tras ser impulsados (a altas presiones).

3) Sistema de inyección: se encarga de introducir la muestra sin tener que parar el flujo. Son automáticos y de volumen variable, poseen una jeringa para medir el volumen exacto.

4) Columna: existen según el compuesto que se quiera determinar, matrices analizadas, así como distintos tipos y tamaños de partícula que se quiere separar. Además, para un mismo tipo de columna existen distintos tamaños, lo que permite el uso de distintos volúmenes de carga.

5) Detector: el equipo de cromatografía líquida se puede acoplar a diversos tipos de detectores, en el caso de este trabajo se utiliza un espectrómetro de masas tándem (MS/MS). Hay diferentes denominaciones para los equipos de cromatografía líquida según su eficacia, rapidez o resolución. Para esta investigación, se utilizó un equipo de cromatografía líquida rápida de alta eficacia (HPLC).

3.3.1.2 Espectrometría de masas (MS).

La información de este apartado es de: Grimalt-Brea, 2009 y Giménez-Pérez, 2012.

Se utilizan para extraer información acerca de masa molecular y estructura del compuesto analizado. Estos equipos pueden ser utilizados tanto para análisis cualitativos como cuantitativos. El acoplamiento de espectrometría de masas, se llevó a cabo en 1956, cuando se empezó a usar el primer cromatógrafo de gases asociado a un espectrómetro de masas (GC-MS); el acoplamiento de esta técnica a la cromatografía líquida era más complejo, debido a la dificultad de ionizar a vacío una molécula que se encontraba en un disolvente, casi dos décadas

después gracias al desarrollo de la ionización química a presión atmosférica (API) junto con el "Electrospray" (desarrollado anteriormente para otros fines), se comenzó a utilizar la cromatografía líquida asociada a la espectrometría de masas (LC-MS). Esta técnica utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Las sustancias químicas se identifican separando los iones gaseosos por la desviación que sufren. El espectrómetro requiere un trayecto de colisión libre para los iones y, por lo tanto, funciona al vacío o en condiciones casi de vacío.

Los espectrómetros de masas constan de cuatro partes básicas: un sistema de introducción de la muestra en el equipo, fuente de ionización, analizador y detector. A continuación, se explican:

1) Un sistema de introducción de la muestra, diseñado para una mínima pérdida de vacío. La muestra se puede introducir directamente al espectrómetro de masas con una jeringa o a través de otro equipo cromatográfico acoplado, ya sea de gases o de líquidos (GC-MS o LC-MS).

2) Una fuente de ionización, en la cual se produce un haz de partículas proveniente de la muestra y se crean los fragmentos de iones gaseosos de la muestra. Hay dos clases de fuentes de ionización:

- Fuentes en fase gaseosa (como ionización química, ionización por impacto de electrones e ionización por campo); la muestra se volatiliza fuera de la fuente de energía y antes de ionizar los componentes gaseosos.
- Fuentes de desorción (como desorción por campo, bombardeo de átomos acelerados, Matrix Assisted Laser Desorption y electrospray), en este tipo de fuentes los iones se forman en la fase condensada y permite el análisis de moléculas no volátiles y térmicamente inestables.

La fuente de ionización utilizada para éste trabajo fue electrospray; este permite el análisis de moléculas de naturaleza polar que puedan cargarse positiva o negativamente en disolución, es un tipo de técnica de ionización a presión atmosférica. Las moléculas con carga en su estructura interna son muy adecuadas para ser analizadas mediante esta técnica, en el caso de que la molécula no posea carga en su estructura se adiciona un ácido o base volátil con el fin de

generarla. En este caso la muestra debe ser soluble, no es posible analizar muestras insolubles. Con esta técnica se pueden generar iones múltiplemente cargados, lo que permite abordar el estudio de moléculas con una masa molecular por encima del límite del analizador, siempre y cuando se produzca el proceso de multicarga. La presencia de sales en la muestra puede inhibir la ionización del producto.

El electrospray se puede acoplar a un LC para analizar mezclas de productos polares. Es una técnica de ionización que no produce apenas fragmentación en la molécula, aportando poca información estructural de la misma. Se produce normalmente el ion $M+H^+$ en modo positivo y el ion $M-H^-$ en modo negativo. Los iones observados proceden de la muestra en disolución y no existen iones procedentes de la matriz como en el caso de otro tipo de fuentes.

3) Tras la fuente de ionización, la siguiente parte del espectrómetro de masas es un analizador, que se encarga de separar los iones que se producen en la fuente de acuerdo a las relaciones de masa/carga (m/z). Hay diferentes tipos de analizadores: de sector magnético, por tiempo de vuelo, por trampa de iones y de cuadrupolo (simple o triple).

Para este análisis se utilizó, el de triple cuadrupolo; está formado por cuatro rodillos paralelos a los que se aplica una corriente continua que afecta la trayectoria de los iones viajando por el trayecto centralizado entre los cuatro rodillos. Para las condiciones de voltaje introducidas en el equipo, solamente los iones de una relación masa/carga determinada pueden pasar a través del filtro del triple cuadrupolo, mientras los otros son barridos como moléculas descargadas. Para la obtención de espectros de masas de forma rutinaria, se trabaja en condiciones de baja resolución obteniendo espectros de masas en los que se representan las relaciones m/z de los iones obtenidos. Actualmente, este diseño de espectrómetro de masas es el más extendido y usado. La razón reside en el hecho que los cuadrupolos ofrecen un buen compromiso con el rango de masas (de 40 a 4000 amu), reproducibilidad y precisión para la cuantificación, además de una alta sensibilidad.

4) Por último, se encuentra el detector, en el cual los iones separados son recogidos caracterizados.

3.3.1.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

La información de este apartado es de: Grimalt-Brea, 2009 y Giménez-Pérez, 2012.

Técnica analítica más extendida en la última década en el campo de química analítica aplicada a los estudios sobre medio ambiente, alimentos y salud pública. Su éxito es una consecuencia de la combinación de una técnica de separación (LC) que presenta una gran versatilidad y las capacidades de la MS. La MS se ha presentado como la posibilidad analítica de alcanzar una muy alta sensibilidad incluso hasta niveles de pg/L, debido a su gran especificidad. Además, presenta la habilidad única de medir los iones con masa exacta, proporcionando información de la composición elemental, permitiendo establecer las rutas de fragmentación. Incluso, ha sido posible aplicar todas esas cualidades en muestras de alta complejidad, alcanzando niveles de resolución inimaginables hace unos años con instrumentos considerados de alta/media resolución.

De forma muy básica, se puede definir el funcionamiento de la MS en los siguientes pasos: (a) la ionización, en la que las moléculas de los analitos pasan a estado gaseoso ionizándose, adicionándose o eliminándose un electrón o un protón. El exceso de energía proporcionado en este paso también puede transformarse en una fragmentación de la molécula, generando iones fragmento. (b) El siguiente paso es separación y análisis de la masa de los iones moleculares y sus fragmentos cargados basándose en su relación m/z . (c) Medida, amplificación y creación de espectros de masas. Para que el segundo paso se desarrolle correctamente, es necesario trabajar con alto vacío, permitiendo el movimiento libre de los iones en el espacio, sin la interferencia de otras especies con las que puedan colisionar generando la fragmentación de los iones moleculares y/o producir nuevas especies por reacciones ión-molécula. Este último efecto produciría una reducción de la sensibilidad y resolución del análisis, generando resultados ambiguos o mala interpretación. La asociación entre cromatografía líquida y espectrometría de masas se hizo posible gracias al desarrollo de técnicas de ionización a presión atmosférica (API).

Las técnicas de API usadas en LC-MS son electrospray y APCI (ionización química a presión atmosférica). En ambas técnicas se utilizan voltajes altos y nebulización mecánica para producir iones en fase gaseosa. Producen poca fragmentación y son técnicas muy sensibles.

Las diferencias entre ellas se observan en la forma que tiene cada una de generar los iones:

- La ionización química a presión atmosférica ioniza en fase gaseosa, por lo que se recomienda para compuestos menos polares y más pequeños con cierta volatilidad, ya que se aplica un flujo de nitrógeno (gas nebulizador) y altas temperaturas (300-600 °C), con el fin de evaporar el disolvente procedente del cromatógrafo de líquidos.
- El electrospray ioniza en disolución, por lo que está muy indicado para compuestos polares y biomoléculas (poco volátiles y termolábiles).

3.3.1.4 Ionización por Electrospray (ESI)

La información de este apartado es de: Grimalt-Brea, 2009 y Giménez-Pérez, 2012.

Se produce por aplicar un alto voltaje (3-6 kV) sobre un capilar conductor por el que circula un pequeño flujo de fase móvil de la LC a presión atmosférica. La elevada diferencia de potencial crea un campo eléctrico que induce acumulación de cargas sobre la superficie del líquido al final del capilar, rompiéndose en pequeñas gotas de solvente cargado. Estas gotas de solvente se dispersan como consecuencia de la introducción de un flujo de gas inerte coaxial al flujo de la fase móvil, este gas también provoca la evaporación o pérdida del resto de solvente en las gotas, ya que circula a altas temperaturas.

El flujo óptimo proveniente de la cromatografía líquida debe ser del orden de 2 a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, sin embargo se han aplicado flujos mayores, de hasta 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, empleando diseños de fuentes con energía adicional, temperatura o flujo del gas, lo que permite una mejor dispersión de las gotas a partir del capilar. Originalmente la interfase ESI se consideró como una fuente de ionización dirigida a análisis de proteínas, pues es frecuente la formación iones con más de una carga. Por ejemplo, un compuesto de masa molecular 12000, si se adquiere 20 cargas se observará a m/z 601 ó 599 en función del tipo de ionización, positiva o negativa, respectivamente. De forma que la interfase ESI permite el análisis de macromoléculas en instrumentos MS donde su rango de masas no alcanzaría su peso molecular. De ahí que posteriormente, fue aplicada no sólo a otros polímeros o biopolímeros, sino también a moléculas polares de pequeño tamaño molecular. Los iones que se forman en ESI pueden ser de

carga positiva o negativa, generalmente se presentan como: (a) en modo positivo, iones de moléculas protonadas, aductos de sodio, potasio o amonio; (b) en modo negativo, iones moleculares desprotonados o aductos de formiato o acetato.

3.3.1.5 Analizadores de espectrometría de masas

La información de este apartado es de: Grimalt-Brea, 2009 y Giménez-Pérez, 2012.

Alma del espectrómetro de masas, el principio físico en el que se basa su diseño y forma de dispersar los iones y después focalizarlos en función de la relación masa/carga (indicado comúnmente como m/q o m/z) es el que promueve, la diferencia entre los distintos instrumentos de espectrometría de masa.

En el diseño de los analizadores de MS se distinguen como los más populares: cuadrupolo (Quadrupole, Q), trampa de iones cuadrupolares (Quadrupole Ion Trap, QIT), trampa de iones lineales (Linear Ion Trap, LIT), Orbitrap, resonancia de ión ciclotrón (Ion Cyclotron Resonance, ICR), sector magnético y TOF.

La capacidad de un analizador se evalúa de forma general en base a las siguientes características: rango de masas, resolución de masa, eficiencia de transmisión de iones, exactitud de masa, rango dinámico de linealidad, velocidad de barrido y sensibilidad. Por otro lado, otros factores que también determinan la elección de un instrumento u otro son su adaptabilidad y coste económico.

3.3.1.6 Equipos de espectrometría de masas MS/MS

La información de este apartado fue obtenida de: Grimalt-Brea, 2009 y Giménez-Pérez, 2012.

Si se tiene en cuenta que una vez volatilizada e ionizada la molécula de interés, va a ser filtrada en relación a su m/z , la detección de esta se lleva a cabo aislada de cualquier otra especie no ionizada o ionizada con m/z diferente. Sumado a este hecho, se tiene en cuenta que podemos fragmentarla obteniendo especies químicas derivadas de la molécula de interés, podremos decir que la espectrometría de masas es una técnica con un alto grado de especificidad. Pero existen casos en los que se hace necesario un mayor grado de especificidad (análisis en los que la concentración en la que aparece la especie de interés es muy baja y en matrices muy

"complejas"). Para ello hay que limpiar la muestra en el analizador antes de que llegue al detector, esto lo hacen los equipos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

El equipo que se utilizó es un espectrómetro de masas en tándem con analizador de triple cuadrupolo y su funcionamiento es tres etapas:

- 1) El efluente previamente volatilizado e ionizado, pasa a través del primer cuadrupolo (Q1) donde se focaliza un ion en relación a su m/z (al igual que ocurría en la MS convencional).
- 2) Este ion (llamado ion precursor) es transferido a un segundo cuadrupolo (Q2) que se comporta como una célula de colisión donde interacciona con un gas de colisión y se fragmenta.
- 3) En el tercer cuadrupolo (Q3) se focaliza uno o varios de los iones producto proveniente de la fragmentación del ion precursor.

Existen diferentes formas de llevar a cabo una medida en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo:

- Product ion scan: el ion precursor es fijado en Q1 y transferido a Q2 donde se fragmenta. Los iones producto originados son medidos mediante el barrido en Q3. En este modo, se obtiene el típico espectro MS/MS. Este es el método más empleado para LC-MS y la ionización por electrospray, y es la que se ha utilizado con el equipo HPLC-MS/MS para los métodos de este estudio con MRM activada (monitorización de reacciones múltiples).

- Precursor ion scan: en este caso, en Q3 se fija la medida de un ion producto determinado y se hace el barrido en Q1. El resultado obtenido es el espectro del ion precursor del que proviene el ion producto fijado en Q3. Este método es útil para GC-MS y/o ionización química o por impacto electrónico.

Neutra ion scan: se lleva a cabo un barrido tanto en Q1 como en Q3 con el objetivo de obtener el espectro del ion precursor que sufre la pérdida de una especie neutra. Está indicado para ionización química e impacto electrónico.

3.3.1.7 HPLC infinity 1290 Agilent acoplado a un detector de masas tándem (MS/MS) marca Agilent modelo 6460 de triple cuádruplo con fuente de ionización ESI (electrospray)-Jet Stream con MRM activada (monitorización de reacciones múltiples)

La información de este apartado fue obtenida de: Agilent technologies Inc, 2010.

El equipo mejora los límites de detección en más de seis veces, rompiendo la barrera de sensibilidad de los femtogramos para muchos compuestos. Proporciona máxima sensibilidad para el análisis de compuestos farmacéuticos, oligocontaminantes alimentarios o medioambientales, metabolitos y biomarcadores. Posee sensibilidad a nivel de femtogramos, con independencia de la aplicación. La maximización de la generación y transmisión de iones a lo largo de un amplio rango de masas garantiza los límites de detección y cuantificación más bajos para la más amplia variedad de tipos de muestra.

Rápida cuantificación de múltiples analitos. La MRM (monitorización de reacciones múltiples) permite analizar cientos de compuestos por inyección con velocidades MRM de 150 por segundo o superiores. La máxima sensibilidad de su clase, con tecnología Agilent Jet Stream de focalización del gradiente térmico, para separaciones de flujo convencional o HPLC-Chip/MS para separaciones de nanoflujo, proporciona la mejor sensibilidad de su clase para una gama más amplia de aplicaciones

Óptima cuantificación. El software MassHunter Optimizer de Agilent determina automáticamente las transiciones de los analitos y los parámetros instrumentales óptimos para conseguir la máxima sensibilidad. La innovadora monitorización de reacciones múltiples (MRM) programada simplifica adicionalmente el desarrollo de métodos y garantiza la obtención de estadísticas iónicas consistentes que permitan obtener datos cuantitativos de la máxima calidad posible. Los datos obtenidos de un espectro de ion producto que se puede utilizar para la búsqueda en bibliotecas, identificación y confirmación. Estos espectros de ion producto se pueden buscar en una biblioteca específica de una aplicación como como bases de datos y bibliotecas de compuestos personales Agilent o bibliotecas espectrales públicas.

3.4 Evaluación de potencial de riesgo

En la mayoría de los casos para identificar y cuantificar contaminantes ambientales, se requiere tiempo y técnicas analíticas costosas para validar los resultados; pero en la mayoría de los casos se requiere de tomas decisión rápidas y fáciles de interpretar. La evaluación de riesgos ambientales ha tenido origen en las últimas décadas con la finalidad de prevención, reducción de riesgos y primordialmente dar sustento a nuevas leyes que abarquen en sus párrafos la protección del ambiente biótico y abiótico, salud humana y una buena calidad de vida, estas preocupaciones se incrementan diariamente a consecuencia de la exposición directa y/o indirecta a contaminantes. En la actualidad, la evaluación de riesgos ambientales debe de tener la exigencia de ser una técnica multidisciplinaria, para poder abordar la problemática en diferentes vertientes y la solución sea envolvente (Gaytán et al., 2012).

El proceso de investigación científica analítica para confirmar si existe un riesgo latente es: extensivo, complicado y consume mucho tiempo. Una herramienta para la toma de decisiones de manera rápida es la **“EVALUACIÓN DE POTENCIAL DE RIESGO”**, considerada como una técnica de evaluación sinóptica que permite determinar una o más variables de manera clara, rápida y resumida capaz de atender el estatus de urgente de alguna variable, proyectando resultados adaptables a la realidad, confiables y favoreciendo la toma de decisiones rápidas (Sánchez et al., 2007; Gaytán et al., 2012).

Una alternativa para la toma de decisiones rápidas es la **“Evaluación de Potencial de Riesgos Ambientales y Efectos a la Salud” (EPRAS)** propuesta en el presente trabajo.

3.4.1 “Evaluación de Potencial de Riesgos Ambientales y Efectos a la Salud” (EPRAS)

Es una metodología alternativa para la toma de decisiones rápidas en este caso de los fármacos (AINEs), la cual es una herramienta que permite identificar situaciones de potencial de riesgo biológico y ambiental, basada en el análisis sistemático de reportes bibliográficos y observaciones simples, para determinar cualitativamente el impacto de variables ambientales, biológicas y situacionales de manera clara, rápida y resumida.

Fundamento metodológico:

- La primera de ellas es el método para establecer el **“Potencial de Riesgo”** citada por Quiterio-Pérez en el 2012, la cual se utilizó para determinar Pesticidas Organoclorados (POs), método que establece la peligrosidad que tienen estos compuestos basada en su: presencia en la zona de estudio, cinética ambiental, uso, frecuencia, persistencia, concentración, probabilidad de exposición, peligrosidad y capacidad de daño biológico para priorizar su evaluación biológica.
- La segunda corresponde a la **Evaluación Rápida de Fuentes de Contaminación Ambiental (en aire, agua y suelos), ERFCA** por sus siglas en español es otro pedestal de EPRAS. Técnica que permite de manera rápida la determinación de fuentes de contaminación potencial y de tipos de contaminantes (WHO, 1982; Gaytán et al., 2012).
- El tercero es el **Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México (MER)**, es otra técnica que se basa en escalas numéricas jerárquicas que pondera los factores que afectan a la biodiversidad mexicana; con los resultados se puede asignar a un taxón a las categorías de riesgo que están en la NOM-059-SEMARNAT-2010. El MER se basa en cuatro variables: a) La amplitud de la distribución del taxón en México, b) El estado del hábitat con respecto al desarrollo natural del taxón, c) La vulnerabilidad biológica intrínseca del taxón y d) El impacto de la actividad humana sobre el taxón (Tambutti et al.,2001; Sánchez et al., 2007; Gaytán et al., 2012).
- Finalmente la **Evaluación Rápida de Biodiversidad para Estimar Prioridad Biológica (ERPBBio)**, técnica resultante de combinar los métodos ERFCA y MER. Su objetivo es establecer criterios que permitan evaluar de manera rápida y fácil la biodiversidad de un área determinada, con base en datos publicados que permitan establecer una prioridad biológica para su conservación, siendo el objetivo principal apoyar en las decisiones de grupos gubernamentales y no gubernamentales sobre la protección, el uso y explotación de los recursos naturales (Gaytán et al., 2012).

3.5 Evaluación biológica

Proceso científico por el cual son identificadas y evaluadas las propiedades tóxicas de sustancias químicas-biológicas, además de la caracterización de los efectos reportados en hechos reales y potenciales adversos sobre la salud, en relación con la exposición de agentes peligrosos ambientales; pueden ser a nivel fisiológico, morfológico, conductual y/o genético (Vera et al., 2001; Quiterio-Pérez, 2012).

La evaluación de los efectos negativos de los contaminantes a nivel biológico es complejo de evaluar directamente en un ecosistema, debido a diferentes variables existentes y aún más complicado reproducir todas las condiciones ambientales reales en pruebas con animales de laboratorio, además del análisis de química analítica necesario, que permita correlacionar la concentración y movilidad de los contaminantes con los efectos biológicos (García-Bonilla et al., 2011; Jar, 2014).

Las pruebas biológicas permiten establecer criterios de calidad ambiental en agua, suelo y aire, para ello se han utilizado gran variedad de organismos como bioindicadores de calidad ambiental, tomando en cuenta la presencia-ausencia y así poder tomar decisiones en corto plazo. El empleo de indicadores biológicos no solo mide la salud del ecosistema, sino también se usa para determinar el impacto negativo al humano y especies silvestres, a través de estimar la evaluación de riesgo y efecto de los mismos (Gaytán et al., 2008; Jar, 2014).

3.5.1 Bioindicadores

Son organismos que de acuerdo a sus características son susceptibles a los cambios efectuados en su entorno de tipo cualitativo así como poseer características tales como: abundantes en el ecosistema; altamente sensibles a cambios químicos o físicos en su entorno y lo más significativo que sus resultados sean a corto plazo. Son organismos de presencia o ausencia, tienen una serie de limitaciones como: cuestiones cuantitativas, limitantes en un diagnóstico de los promotores del impacto ambiental que se identifica en tiempo, lugar y espacio específico. Dentro de las especies indicadoras se tienen a las bacterias, por la simple presencia se pueden identificar compuestos patógenos, por lo general asociados a descargas residuales

con alto contenido orgánico; otro ejemplo son los moluscos que se han tomado en cuenta , por su estilo de alimentación (filtradores); las almejas, mejillones, ostiones su presencia o ausencia indica perturbaciones en su entorno o excelente calidad en el ambiente, aunque cabe remarcar que algunas especies son altamente resistentes a contaminación por desechos orgánicos o metales pesados (EPA, 2002).

Los peces son organismos que se pueden utilizar como probables especies bioindicadores respecto a la calidad ambiental, por su contacto con el agua y cambios en su entorno. Los indicadores biológicos pueden revelar también el efecto producido después de la absorción de cierta dosis de agentes químicos y lugar donde éste ejerce el efecto dentro del organismo (órgano blanco); los indicadores de exposición permiten tener una estimación indirecta del grado de exposición, es decir, el efecto que provoca un químico en un determinado tiempo, de acuerdo a esto, los indicadores de acumulación proveen una evaluación de la concentración de la sustancia retenida en órganos, logrando identificar alteraciones tempranas y totalmente reversibles al organismo (Gaytán, 2006).

3.5.2 Biomonitores

Permiten relacionar la concentración de un contaminante con los efectos producidos. Son organismos con características específicas entorno al conocimiento de sus fluctuaciones en las poblaciones en un periodo de tiempo prudente en un entorno natural, sensibles a los cambios en el medio y lo más importante se pueden determinar contaminantes de manera cuantitativa, ya que se estudian y monitorean en periodos prolongados de tiempo (de la Lanza-Espino, 2000).

3.5.3 Bioensayo

Son organismos que en condiciones controladas (*in vitro* e *in vivo*) permiten correlacionar el efecto de agentes físicos y/o químicos a nivel biológico, que van desde lo más simple hasta los más cercano a la escala evolutiva del ser humano; ofrecen múltiples ventajas como: ofrecer respuestas moleculares, bioquímicas y fisiológicas por la presencia de un agente contaminante

en un organismo determinado, con estas respuestas se pueden extrapolar los resultados al humano. En el caso de los bioensayos con organismos acuáticos, estos ofrecen la única forma de determinar el grado de toxicidad de efluentes y agentes químicos aislados (Quiterio-Pérez, 2012).

Los rangos de variación de los factores considerados pueden ser mayores que los existentes en el ambiente natural, lo que muchas veces facilita el estudio de su modo de acción, también, pueden estudiarse combinaciones de dos o más factores, lo que permite revelar la existencia de antagonismos o sinergismos entre ellos. La posibilidad de controlar muchas de las variables, hace posible la eliminación de las fluctuaciones propias de las condiciones naturales, que generalmente interfieren con la finalidad principal del estudio, pero sus limitaciones están con base a: condiciones controladas y cuidado especial de los organismos, cosa que en la naturaleza no se tiene y están a expensas a las complejas interacciones ecológicas. En general los bioensayos son necesarios para tener una aproximación a la realidad, porque hasta el día de hoy es imposible trabajar con humanos en pruebas directas lo que siempre estará a discusión en el ámbito científico (Gaytán, 2006; INE, 2013).

En la actualidad, la toxicidad aguda de productos farmacéuticos se prueba en diferentes bioensayos pertenecientes a distintitos niveles de organización biológica, como: algas, cnidarios, crustáceos, mejillones y peces. Estos estudios se centran en efectos a corto plazo y desempeñan un papel importante en evaluación del riesgo ambiental, pero en general sirven para considerar la acción tóxica y potencial de los productos farmacéuticos (Parolini et al., 2009). Para determinar si un fármaco en particular genera impactos sobre un ecosistema se realizan diferentes pruebas en laboratorio, con diferentes bioensayos, como crustáceos, sistemas vegetales, peces, mamíferos en los cuales se observa diferentes biomarcadores como: puntos toxicológicos, inmovilización, inhibición en la tasa de crecimiento, alteraciones en órganos vitales y mortalidad (Tabla VII).

Tabla VII. Toxicidad de AINEs en diferentes bioensayos

Fármaco	Especie	Punto toxicológico	Efecto	Referencia
Ácido Acetilsalicílico	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ (48h)= 88.1mg/L	Inmovilización	(Cleuvers, 2004)
Diclofenaco	<i>D. magna</i> <i>Desmodesmus subspicatus</i> <i>Lemna minor</i>	CE ₅₀ (48h)= 68.0 mg/L CE ₅₀ (3 d)= 72 mg/L CE ₅₀ (7 d)= 72 mg/L	Inmovilización Inhibición de la tasa de crecimiento	(Cleuvers, 2003)
Diclofenaco	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	LOEC 1, 5, 20, 100 and 500 µg/L (28 d)	Alteraciones citológicas en el hígado, riñones y branquias	(Tribskorn et al., 2004)
Diclofenaco	<i>Salmo trutta f. fario</i>	NOEC 0.5, 5 and 50 µg/L (21 d)	Alteraciones histopatológicas	(Hoeger et al., 2005)
Ibuprofeno	<i>D. magna</i> <i>D. subspicatus</i> <i>L. minor</i>	CE ₅₀ (48h)= 108 mg/L CE ₅₀ (3 d)= 315 mg/L CE ₅₀ (7 d)= 22 mg/L	Inmovilización Inhibición de la tasa de crecimiento	(Cleuvers, 2003)
Ibuprofeno	<i>Oryzias latipes</i> <i>Thamnocephalus platyurus</i>	CL ₅₀ (96 h)= >100 mg/L CL ₅₀ (24 h)= 19.59 mg/L	Mortalidad	(Kim et al., 2009)
Naproxeno	<i>D. magna</i> <i>D. subspicatus</i> <i>L. minor</i>	CE ₅₀ (48h)= 174 mg/L CE ₅₀ (3 d)= >320 mg/L CE ₅₀ (7 d)= 24.2 mg/L	Inmovilización Inhibición de la tasa de crecimiento	(Cleuvers, 2003)
Naproxeno	<i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Ceriodaphnia dubia</i>	CE ₅₀ (48h)= 0.56 mg/L CE ₅₀ (48 d)= 0.33 mg/L	Inhibición de la tasa de crecimiento Inhibición de la tasa de crecimiento de la población	(Isidori et al., 2005)
Paracetamol	<i>D. Magna</i>	CE ₅₀ (48h)= 50 mg/L	Inmovilización	(Henschel et al., 1997)
Paracetamol	<i>D. Magna</i>	CE ₅₀ (48h)= 30.1 mg/L	Inmovilización	

* (CL₅₀) Concentración letal media, (CE₅₀) concentración efectiva media, (NOEC) Concentración sin efecto observado, (LOEC) Concentración mínima efecto observado

3.6 Peces como bioensayos

Existe un interés muy alto en la evaluación de sistemas acuáticos con este tipo de organismos, porque constituyen el grupo más numeroso de vertebrados y son necesarios para tener una aproximación a la realidad, porque hasta el día de hoy es imposible trabajar con humanos en pruebas directas. México posee 2,122 especies de peces, que equivalen aproximadamente al 12.5 % del total. Estos habitan en cualquier ambiente acuático continental como marino, en altitudes de hasta 5,200 msnm, así como en cuevas, en regiones húmedas o desérticas. Toleran

amplios intervalos de salinidad, temperatura y oxígeno disuelto, algunas especies son tolerantes o intolerantes a la presencia de contaminantes en el agua (Gaytán et al., 2008).

Son un indispensable componente de estrategias integradas de bioensayos de toxicidad para el medio ambiente acuático. La importancia de peces para evaluar el riesgo ambiental se debe a varias razones: 1) El medio acuático es un almacén de muchas sustancias químicas; 2) Desempeñan un papel fundamental en las redes tróficas acuáticas; 3) Son utilizado como vigilantes de la calidad de las aguas potable (biomonitores y bioindicadores) (Lammer et al., 2009). Estudios han correlacionado la exposición de aguas residuales a las variaciones en los niveles de esteroides sexuales, tanto en juveniles y adultos afectando el desarrollo de las gónadas y disminución de la reproducción (Nasevicius y Ekker, 2000). Debido a las enormes ventajas, uno de los peces más utilizados es *Danio rerio* o comúnmente conocido como pez cebra.

3.7 *Danio rerio* (pez cebra)

Es un vertebrado de agua dulce pertenecientes a familia de los ciprínidos. Esta especie es originaria del Himalaya y se encuentra comúnmente en la India, Pakistán, Nepal, Bután y otros partes del sudeste de Asia. Los adultos miden de 3 a 5 cm de largo, el nombre de pez cebra se debe a las rayas azuladas longitudinales parecidas a las de las cebras, abarcando todo su cuerpo; presentan dimorfismo sexual, las hembras son de mayor tamaño que los machos, su abdomen es prominente y las líneas presentan curvaturas, los machos son de menor tamaño que las hembras y no presentan curvaturas en las líneas del cuerpo, debido a que no hay prolongación de abdomen (Fig.3). Es de ambiente bentopelágico de agua dulce, con pH de 6 a 8, así mismo de alta claridad en el agua (\sim >35cm), salinidad de 0-0.6 ppm, profundidad de 15-103 cm, temperatura de 16.5 a 34 °C y es el pez más fácil de criar entre los ovíparos. Estos datos son útiles, porque se pueden aplicar directamente al diseño de los parámetros óptimos para la química del agua del pez cebra en el laboratorio, ya que la producción en cautiverio es de mayor productividad cuando los peces se encuentran en condiciones similares a las que se encuentran en vida silvestre (Amatruda et al., 2002; Lawrence, 2007; Jones y Norton, 2015).



Fig. 3 Dimorfismo sexual de *Danio rerio* (adaptada de González, 2005)

3.7.1 Ventajas del bioensayo *Danio rerio* (pez cebra)

Los adultos son de tamaños fáciles de manipular (3-5 cm), cuenta con un tiempo de maduración corto, es de fácil de crianza, alta descendencia, adquirirlos tienen un bajo costo económico, así mismo, el mantenimiento no requiere gran inversión de tiempo y dinero. La conducta reproductiva es fácil de inducir, sus huevos son traslucidos, por lo tanto para realizar observaciones, no se necesitan de técnicas invasivas que perjudiquen la viabilidad del embrión, las membranas de los huevos son semipermeables, lo cual, permite que la sustancia de interés este en contacto directo con el embrión, tanto los organismos adultos, estadios juveniles y los embriones son resistentes a cambios ambientales, presentan un desarrollo embrionario externo que permite identificar las etapas de desarrollo, menos restricciones éticas, etc. Este organismo es una herramienta ideal para el desarrollo de fármacos, pruebas de toxicidad y efectos secundarios de sustancias peligrosas como contaminantes (Amatruda et al., 2002; Lawrence, 2007; Jones y Norton, 2015).

Debido a la transparencia del embrión, fácil manipulación sin técnicas invasivas, membrana semipermeable, resistentes a cambios ambientales y desarrollo embrionario externo (Fig. 4), se utiliza ampliamente para estudiar manipulaciones genéticas y desarrollo embrionario, este organismo, está categorizado como un modelo animal emergente en ensayos *in vivo*, en el

descubrimiento de fármacos y análisis de efectos negativos de los contaminantes emergentes (Lee y Freeman, 2014; Popovic et al., 2014).

En la década de 1970, se le consideró como un modelo experimental para el estudio del desarrollo embrionario de los vertebrados, biología del desarrollo y enfermedades genéticas (Grunwald y Eisen, 2002).

Es un poderoso bioensayo para profundizar en las patologías humanas, se ha encontrado que el 70% de los genes de enfermedades humanas están presentes en pez cebra, por lo tanto, lo convierte en un modelo ideal para imitar condiciones patológicas humanas. Las alteraciones morfológicas en el desarrollo embrionario del pez cebra se han utilizado desde hace años, para estudiar los efectos de los contaminantes (Prieto y Baéz, 2011; Sharma et al., 2014).

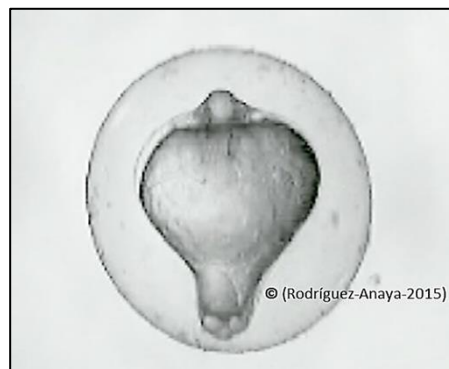


Fig. 4 Embrión traslucido de *Danio rerio* desarrollo embrionario 16.5 horas (15 somitas vista dorsal)

Otras de las ventajas que existen al utilizar pez cebra, las describen ZF Biolabs (2015), en los que indican:

- Se requiere menor cantidad del compuesto a analizar comparado a otros modelos de vertebrados.
- Se evitan los problemas éticos / legales de los roedores.
- Rápida organogénesis entre 48-72 horas.
- Más de 4000 investigadores alrededor del mundo están trabajando con pez cebra.

- Puestas numerosas de embriones comparando a los modelos de mamíferos, lo que permite estadísticamente usar números más significativos.
- Fecundación y desarrollo externos, haciendo posible más fácil la manipulación y observación de embriones que con los modelos de mamíferos.

En los últimos años las pruebas con embriones de peces son pruebas con animales alternativos prometedoras y viables para la toxicología ambiental. Los embriones proporcionan un modelo éticamente aceptable y este tipo de bioensayos corresponden a un rendimiento elevado (Madureira et al., 2011).

3.7.2 Prueba DarTa (*Danio rerio* Teratology assay)

Desde 1986 se sugirió al pez cebra como un modelo con múltiples ventajas, ideal para evaluar daños teratogénicos inducido por contaminantes ambientales (Choi y Yu, 2015).

En 1998 se utilizó al pez cebra para evaluar daño embriotóxico y teratogénico que causaban muestras de agua, a esta prueba se le dio el nombre de **DRETA (*Danio rerio* embryotoxicity and teratogenicity assay)**, teniendo como biomarcador el daño inducido en el corazón (Dietrich et al., 1998).

Oberemm (2000), sugiere el uso de embriones de *Danio rerio* como un buen bioensayo en la evaluación de elementos tóxicos presentes en el agua. Los embriones son más sensitivos que los organismos adultos. En este mismo estudio describe las principales características del desarrollo embrionario (Oberem, 2000).

En el año 2002 surge la **Técnica DarT, (The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio* a general model in ecotoxicology and toxicology)**, la cual, consiste en exponer embriones del pez durante todo el desarrollo embrionario a diferentes concentraciones de distintos compuestos, principalmente contaminantes; después de 48 horas de exposición, los embriones presentaban daños morfo-fisiológicos, por ejemplo: anomalías en el corazón, ojos, cabeza,

aleta caudal, pigmentación, circulación sanguínea, daños teratogénicas etc. En el primer ensayo de DarT, se evaluó el efecto letal, subletal y teratogénico de 34 compuestos tóxicos, mediante la cual se expuso embriones a diferentes concentraciones; los resultados mostraron que después de 48 horas de exposición los embriones presentaban algún tipo de daño, entre los cambios más sobresalientes registrados se encuentran: anomalías en el corazón, ojos, cabeza, aleta caudal, pigmentación, circulación sanguínea y teratogénesis (Nagel, 2002; Kais et al., 2013).

González (2005), indica que la etapa de “alevín” es la más sensible a la acción teratogénica de Cloruro de mercurio (HgCl_2), este estudio origina condiciones físico-químicas óptimas relevantes para posteriormente el surgimiento de la Prueba **DarTa** (**Danio rerio Teratology assay**).

Posteriormente, Rivera (2006), propuso a las malformaciones de columna vertebral, opérculo y aleta del pez cebra como biomarcadores de daño teratogénico, esto permitió postular al pez cebra como un buen indicador biológico, para valorar el daño teratogénico inducido por contaminantes ambientales, a través del análisis de la frecuencia de aparición de malformaciones, clasificándolas, identificando su facilidad de análisis, su reproducibilidad, así como sus ventajas y desventajas para su evaluación. Para ello se utilizaron dos teratógenos positivos de referencia, el trióxido de cromo (CrO_3) y el cloruro de mercurio (HgCl_2), para establecer la sensibilidad del bioensayo a este tipo de daño.

La Prueba DarTa es un modelo alternativo de teratogénesis en un sistema no mamífero, ventaja en costo, tiempo y problemas éticos; esta prueba consiste en exponer embriones del pez durante todo el desarrollo embrionario (72horas), a diferentes concentraciones de los compuestos problema, manteniendo las condiciones físico-químicas óptimas (en la sección de metodología se mencionan); la exposición del agente contaminante es directa debido a la membrana semipermeable del embrión; esta prueba es capaz de determinar la capacidad tóxica del compuesto problema, pero principalmente daño teratogénico, este se observa a

partir de las 72 horas en los biomarcadores de: columna vertebral, opérculo y aleta del pez; la columna vertebral es el biomarcador con mejores resultados, ya que esta se desarrolla al 100% después de las 72 horas, lo que permite determinar la presencia y/o ausencia del daño ocasionado por el compuesto problema, además de que, el tamaño de la muestra no se ve afectado por muerte significativa de individuos, ocasionado por las mismas condiciones naturales; la desventaja de utilizar aletas y opérculo como biomarcadores, es que, estas estructuras se terminan de desarrollar en la etapa juvenil, por lo tanto, hay una mayor pérdida de población experimental debido a las interacciones ecológicas como: competencia, adaptación, canibalismo, enfermedades entre otras lo que implica incrementar el número de embriones a utilizar (Nagel, 2002; Gaytán et al., 2008; Kais et al., 2013).

La prueba DarTa utiliza los embriones de pez cebra, estos se desarrollan independientemente de la madre, son traslucidos en los cuales se puede observar las diferentes etapas embrionarias y se mantienen en agua hasta la eclosión (72 horas); los embriones son de alto rendimiento, además no son considerados como animales de experimentación en la legislación europea, lo cual, los hace éticamente posibles. En los últimos años, han atraído la atención de los toxicólogos por sus diversas ventajas, ya que son considerados como etapas de la vida no protegidas y/o similar a ensayos *in vitro*; son una alternativa de no utilizar animales adultos e evitar el sufrimiento de organismos juveniles y adultos (de Esch et al., 2012; Clemente et al., 2014; Chen et al., 2015).

Numerosos estudios reportan la gran capacidad de análisis de los embriones de *Danio rerio*, para la evaluación del potencial teratogénico provocado por diferentes productos químicos, los embriones muestran una excelente concordancia con los resultados *in vivo* en mamíferos esto hace que la prueba DarTa tenga mayores argumentos para ser utilizada. Retraso del crecimiento se puede considerar como criterio de valoración teratogénica (Van den Bulck et al., 2011). Sin embargo Hermsen y colaboradores (2011), considera que el retraso del crecimiento se puede considerar como un indicador de evaluación semicuantitativo (Tabla VIII).

Los productos farmacéuticos no se encuentran de manera particular en el medio ambiente, sino como una mezcla de diferentes sustancias, diversos metabolitos y transformaciones constantes, el potencial de toxicidad de mezclas de fármacos es un escenario ambientalmente realista (Madureira et al., 2010). Los experimentos con pez cebra expuestos a dosis distintas de fármacos de manera individual y en mezclas complejas, muestran resultados interesantes, respecto en determinar si un fármaco en particular puede o no generar impactos negativos sobre un organismo, como también la gravedad del daño; se observan concentraciones desde los nanogramos hasta microgramos, teniendo efectos como retraso en la eclosión, daño en órganos internos y alteraciones en el funcionamiento normal de los órganos vitales (Tabla VIII).

Tabla VIII. Pez cebra como bioensayo para fármacos

Fármacos	Concentración	Efectos	Cita
Diclofenaco	96 horas 1000-2000 µg/L	Retraso en la eclosión sin malformaciones	(Hallare et al., 2004)
Ibuprofeno	>10 µg/L	Anomalías cardíacas, curvatura espinal, alteraciones en aleta pectoral en embriones	(David y Pancharatna, 2009)
Mezcla de los siguientes fármacos: -Carbamazepin -Ácido fenofibrico -Hidrocloruro de propranolol, -Sulfametoxazol -Trimetoprim	2.18-178 ng/L	Reducción de longitud de cola y cambios en presión arterial media en las primeras etapas de alevín	(Madureira et al., 2011)
Mezcla de los siguientes fármacos:- Acetaminofeno, Emfibrozil, Carbamazepina y Venlafaxina	0.5 µg/L	Atresia elevada de ovocitos Alteraciones histológicas en riñones	(Galus et al., 2013)

4. JUSTIFICACIÓN

Concentraciones de distintos productos farmacéuticos se han detectado en: aguas residuales, superficiales y subterráneas a nivel mundial, incluyendo México. En la actualidad muchos países incluyendo México, no cuenta con una normatividad entorno a límites permisibles de contaminantes emergentes, principalmente fármacos en cuerpos de agua. Después de la administración de los fármacos, de un 55 a un 88 por ciento de estos compuestos, se excreta sin sufrir alteraciones en el compuesto activo, además de sus metabolitos, generando preocupación por las interacciones que tienen estos con el ambiente biótico y abiótico, conjuntamente de las mezclas complejas que se forman al interactuar con otros contaminantes.

Muchos de los efectos tóxicos que causan fármacos y mezclas complejas en el medio biótico aún se desconocen, por lo tanto, es de vital importancia detectarlos y cuantificarlos, a través de técnicas especializadas de química analítica, para relacionar las concentraciones detectadas con los efectos negativos que pueden llegar a ocasionar al estar presentes en cuerpos de agua; la presencia de AINEs se debe a: alta disposición en el mercado, crecimiento de la población, urbanización y venta de fármacos sin prescripción médica, así como, los inadecuados tratamientos de las descargas de aguas residuales, principalmente descargas hospitalarias y aguas residuales municipales, aunado al indebido manejo de farmacéuticos al caducar.

El uso de peces para correlacionar los efectos tóxicos y teratogénicos se ha incrementado en los últimos años; estos organismos son excelentes biomonitores, biomarcadores y bioensayos; esta investigación enfoca el estudio en la especie *Danio rerio*, porque su genoma manifiesta alto grado de semejanza, además de similitudes de funciones fisiológicas con el humano, en procesos fundamentales; este estudio encauza en la técnica DarTa (*Danio rerio* teratology assay) la cual es un modelo alternativo de teratogénesis en un sistema no mamífero, que muestra ventajas en costo, tiempo, comparaciones con mamíferos incluyendo al humano y evita problemas éticos.

El propósito de esta investigación es evaluar el potencial de riesgo y efectos biológicos de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) de alto consumo (naproxeno, ibuprofeno, paracetamol, diclofenaco y ácido acetilsalicílico) en *Danio rerio* (pez cebra) a través de la técnica DarTa, con la finalidad de dejar evidencia de concentraciones cuantificadas en el ambiente acuático para una futura normatividad, para evitar la exposición directa y/o indirecta de estos fármacos, ya que al establecer los efectos biológicos negativos y el potencial de riesgo serán fuertes evidencias de la problemática actual de estos contaminantes emergentes. Es el primer estudio de cuantificación relacionado con fármacos AINEs y el efecto teratogénico en agua residual el estado de Hidalgo; en particular, para la zona de Pachuca y Mineral de la Reforma; la presente investigación da fundamentos para futuras líneas de investigación.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de riesgo y efectos biológicos en *Danio rerio* (Pez cebra) por medio de la técnica DarTa (*Danio rerio* teratology assay) por presencia en el ambiente de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) de alto consumo, como contaminantes emergentes en aguas residuales de la zona de Pachuca-Mineral de la Reforma, complementando con la cuantificación y detección de AINEs de alto consumo a través de técnica HPLC-MS/MS para argumentar futuras normatividades e investigaciones.

5.2 Objetivos específicos

1. Comparar las ventas en kilogramos en el sector de salud pública y farmacias registradas en la zona de Pachuca-Mineral de la Reforma, Hidalgo de cinco AINEs de uso elevado en México, establecidos a través de una revisión bibliográfica (ácido acetilsalicílico, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco) para determinar de manera indirecta su presencia y volumen cualitativo en el ambiente y tener una aproximación al problema de la automedicación
2. Evaluar el “Potencial de Riesgo” de ácido acetilsalicílico, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco a través de una técnica sistemática y sinóptica que permite identificar cuál o cuáles fármacos tienen la probabilidad de inducir un daño biológico y/o ambiental, para

contribuir al estudio de estos compuestos como contaminantes emergentes, además de establecer una nueva metodología.

3. Determinar curvas de toxicidad de: ácido acetilsalicílico, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco, en *Danio rerio* que permitan determinar concentraciones tóxicas y subtóxicas, para a través de estas, evaluar daños teratogénicos en la morfología del biomarcador de columna vertebral por medio de la técnica DarTa para fundamentar futuras normatividades y abrir nuevas líneas de investigación.

4. Detectar y cuantificar ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno, paracetamol y diclofenaco, AINEs de alto consumo, de una muestra compuesta de agua residual, perteneciente a la zona de Pachuca-Mineral de la Reforma, a través de la técnica HPLC-MS/MS, para complementar la evaluación del efecto biológico.

6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.1 Venta de fármacos

6.1.1 Diseño de estudio

Se realizó un estudio descriptivo, observacional y prospectivo, donde se realizaron cuestionarios a los encargados de farmacias del sector salud (hospitales y centros de salud) y farmacias particulares, para obtener datos de comercialización de los fármacos ácido acetilsalicílico, diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol y naproxeno en la ciudad de Pachuca-Mineral de la Reforma.

6.1.2 Descripción del sitio

El estado de Hidalgo se ubica en la parte centro sur del país, entre los paralelos 21° 24' - 19° 36' latitud norte y 97° 58' - 99° 53' de longitud oeste; posee una superficie de 20 905 km² y está dividido en 84 municipios con una población total de 2,665,018 (INEGI, 2007; INEGI, 2010). Pachuca se ubica en una latitud de 20° 7' norte y longitud de 98° 44' oeste sobre 2 400 msnm, con una población de 267 862 individuos, el municipio de Mineral de la reforma se ubica en

latitud 20° 4' N y longitud 98° 42' O sobre 2,420 msnm con una población de 127,404, (INEGI, 2010). En el área de Pachuca existen 206 farmacias, las cuales fueron situadas en cinco bloques de acuerdo a colonias existentes en la capital del Estado (Fig. 5), para el caso de Mineral de la Reforma hay 51 farmacias registradas, las cuales fueron situadas en seis bloques (Fig. 6) (INEGI, 2014). El área cuenta con hospitales públicos de los cuales se muestreo el Hospital General y Obstétrico y cuenta con 13 Centros de Salud: Centro-norponiente, Sur-Poniente, Madero, Abraham Kanal, Santa Matilde, La Raza, Azoyatla, Alcantarilla, Guadalupe, Cuauhtémoc, Providencia, Buenos Aires, San Agustín.

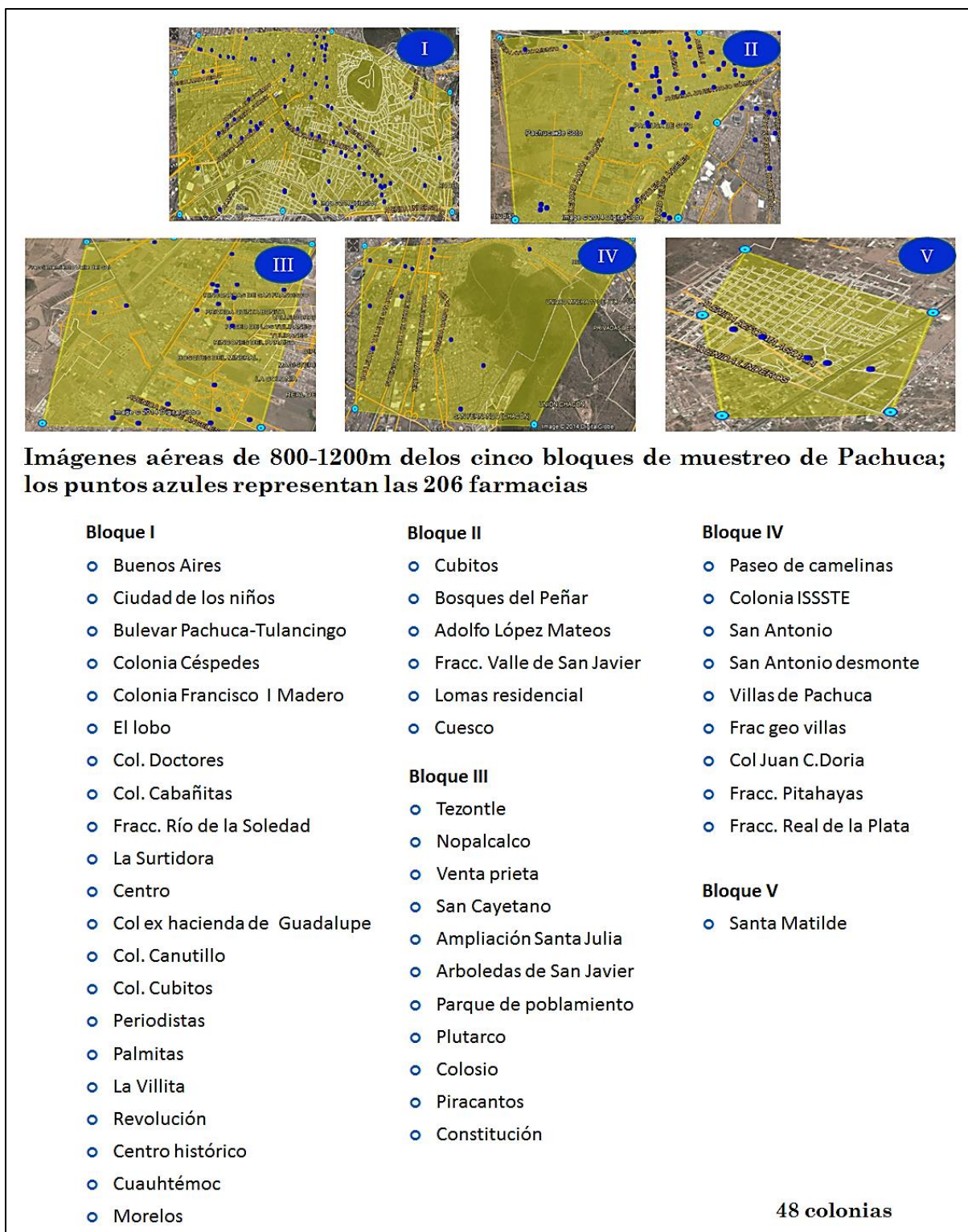
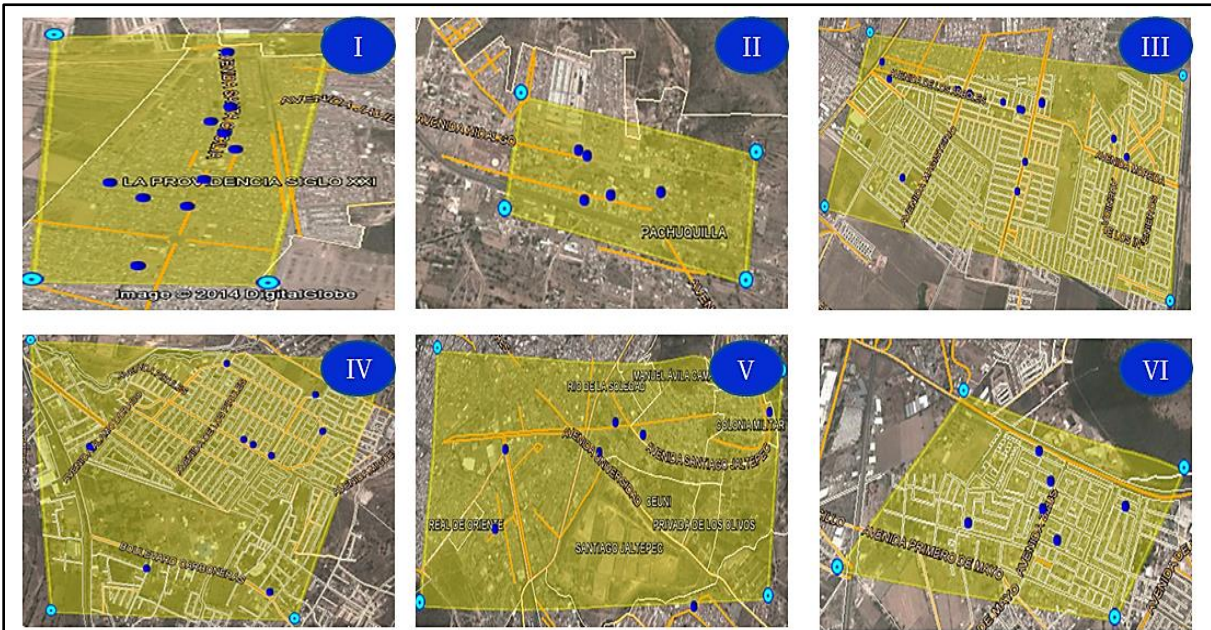


Fig. 5 Zona de muestreo de Pachuca, 206 farmacias registradas (INEGI, 2014), situadas en cinco bloques de acuerdo a colonias existentes



Imágenes aéreas de 800-1200m de los 6 bloques de muestreo de Mineral de la Reforma; los puntos azules representan las 51 farmacias

Bloque I

- Providencia siglo XXI

Bloque II

- Pachuquilla

Bloque III

- Tulipanes
- Forjadores
- La colonia
- San José
- El roble
- Rinconada del Venado II
- Los pinos

Bloque IV

- Carboneras
- Campestre Villas del Álamo
- El Álamo

Bloque V

- Santiago Jaltepec
- Colonia militar
- Manuel Ávila Camacho

Bloque VI

- Unidad Minera 11 de Julio

19 colonias

Fig. 6 Zona de muestreo de Mineral de la Reforma, 51 farmacias registradas (INEGI, 2014), situadas en cinco bloques de acuerdo a colonias existentes

6.1.3 Población de estudio y tamaño de muestra

De un total de 257 farmacias registradas en la zona (INEGI, 2014), se determinó el tamaño representativo de la muestra para la aplicación de las encuestas mediante la fórmula (Daniel, 2011):

$$n = \frac{N^2 * s}{d^2 * (N - 1) + z^2 * s^2}$$

Donde **n**: tamaño de la muestra ideal, **N**: tamaño total de muestra finita, **s**: desviación estándar, **d**: coeficiente de confiabilidad (0.95) *error estándar, **z**: Límite de confiabilidad en una distribución normal estándar. Con base a este análisis estadístico, se seleccionó una muestra representativa de 70 farmacias para garantizar la cuantificación del 95% de la varianza en las ventas. Se aplicaron las encuestas en una muestra estandarizada con base en que presentaran la misma actividad económica, comercio al por menor, comercio al por menor de artículos para el cuidado de la salud, comercio al por menor de productos farmacéuticos y naturistas y farmacia con minisúper y sin minisúper (INEGI, 2014) en dos hospitales públicos y en 13 Centros de Salud antes mencionados Reforma, registrando datos sobre comercialización y prescripción de: ácido acetilsalicílico, diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol y naproxeno. La encuesta fue dirigida a encargados y sólo se utilizaron los datos de las presentaciones en comprimidos, grageas, pastillas y tabletas con su respectivo gramaje, presentación y cantidad de cajas comercializadas al día, convirtiendo los datos a kilogramos por año o en su defecto kilogramos por mes, semana o día mediante la fórmula (Reyes-Silva, 2016):

$$Ventas \text{ en kg al día, mes, año} = \frac{(\text{Núm tabletas, comprimidos, grageas}) * (\text{gramaje mg}) * (\text{Núm cajas vendias al dia, mes, año})}{1\ 000\ 000}$$

6.1.4 Criterios de inclusión

En la zona referida se registran 257 farmacias, de las cuales se seleccionó, con base en un análisis estadístico, una muestra representativa de 70 farmacias para garantizar la cuantificación del 95% de la varianza en las ventas. Estos registros fueron comparados con las ventas en dos hospitales públicos y 13 centros de salud. Se utilizaron datos sobre las presentaciones en comprimidos, grageas, pastillas y tabletas, con su respectivo gramaje, presentación y cantidad

de cajas comercializadas al día, convirtiendo los datos a kilogramos por año o en su defecto kilogramos por día. Las ventas por fármaco y procedencia fueron comparadas con un análisis de U de Mann-Whitney.

El tipo de encuesta fue dirigida, descriptiva, pseudoestratificada, respuesta cerrada y de manera personal a los encargados de farmacia.

6.1.5 Criterios de exclusión

Se excluyeron las farmacias de especialidades y los fármacos de patente. Así mismo solo se utilizaron los datos de las presentaciones de comprimidos, grageas, pastillas y tabletas

6.1.6 Encuestas

El cuestionario incluyó preguntas de abiertas para obtener información como: descripción, gramaje, presentación y cantidad de cajas que se comercializan al día, de: ácido acetilsalicílico, naproxeno, paracetamol, diclofenaco e ibuprofeno.

6.1.7 Aplicación del cuestionario

Fueron aplicados a los encargados de farmacia, seleccionadas aleatoriamente en la zona de Pachuca-Mineral de la Reforma, en un horario de 10:00-14:00 h de lunes a viernes, en el periodo del estudio. Los datos fueron capturados en una base de datos, que posteriormente fue refinada para su análisis.

6.2 Evaluación de Potencial de Riesgos

6.2.1 Criterios fundamentales de “Evaluación de Potencial de Riesgo Ambientales y Efectos a la Salud (EPRAS)”

Es una metodología como alternativa para la toma de decisiones rápidas, en este caso de los fármacos (AINEs), la cual es una herramienta que permite identificar situaciones de potencial de riesgo biológico, basada en reportes bibliográficos, observaciones simples y de manera rápida realizar una evaluación sinóptica, que permite determinar una variable de manera clara, rápida, resumida, que permita obtener resultados aplicables, imparciales y confiables con un propósito definido (Rodríguez-Anaya et al., 2014).

La capacidad que tienen los AINEs de provocar un daño depende tanto de sus propiedades toxicológicas como de las concentraciones ambientales. Estos fármacos tienen diferentes características físico-químicas. En la actualidad los farmacéuticos son contaminantes trascendentales para el medio ambiente y de preocupación prioritaria (Rodríguez-Álvarez et al., 2013). En la Tabla IX a-i se da a conocer información que fue recopilada en la revisión bibliográfica de los fármacos (paracetamol, ibuprofeno, diclofenaco, ácido acetilsalicílico y naproxeno), en cuanto a: cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad, sector poblacional, efecto biológico y otros conceptos importantes de interés para determinar el potencial de riesgo.

EPRAS se basa en tres criterios fundamentales que afectan la posibilidad de que un riesgo ostente contra el bienestar de una población:

1. **CINÉTICA AMBIENTAL**, se evalúan: origen (hospitalario, centros de reunión, hogares, uso veterinario, entre otros), presencia (vida media y persistencia ambiental), consumo, cinética (propiedades físico-químicas como solubilidad, coeficiente de partición lípido-agua ($low_{k_{ow}}$), volatilidad, factor de bioconcentración y fotodegradación).
2. **EXPOSICIÓN, BIODISPONIBILIDAD Y SECTOR POBLACIONAL EXPUESTO**, se evalúan: presencia en más de un medio, presencia en diferentes medios acuáticos, exposición, vías de exposición, formación de conjugados (biotransformación).

3. EFECTOS POTENCIALES Y REPORTADOS, en este rubro se contemplan: datos reportados y/o potenciales a nivel de la toxicidad y/o efectos colaterales (mutagénesis, carcinogénesis, teratogénesis y/o daño reproductivo), especies u organismos sensibles así como por presentar alerta estructural.

Tabla IXa. Cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad y sector poblacional, así como efecto biológico y conceptos importantes para la determinación del potencial de riesgo

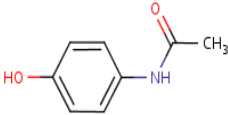
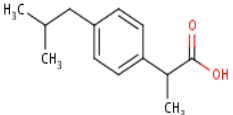
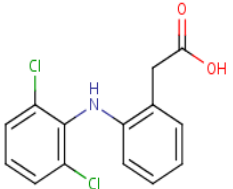
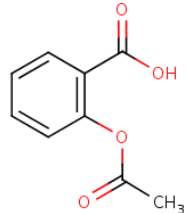
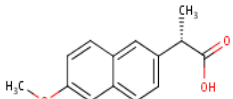
PROPIEDADES	PARACETAMOL	IBUPROFENO	DICLOFENACO	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	NAPROXENO	REFERENCIA
Formula química	C ₈ H ₉ NO ₂	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	C ₉ H ₈ O ₄	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	(Feng et al., 2013)
Estructura química						(TOXNET, 2014)
Peso molecular (g m⁻¹)	151.2	206.3	296.2	180.0	230.3	(Feng et al., 2013)
pKa (20 °C) (logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil)	2.3	3.5–4.	4.1-4.5	3.5	4.2–4.5	(Ziylan y Ince, 2011)
LogKoc (coeficiente de absorción)	2.9	2.5	1.9	1.0	2.5	(Feng et al., 2013)

Tabla IX b. Cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad y sector poblacional, así como efecto biológico y conceptos importantes para la determinación del potencial de riesgo

PROPIEDADES	PARACETAMOL	IBUPROFENO	DICLOFENACO	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	NAPROXENO	REFERENCIA
Movilidad en un medio terrestre	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	(PUBCHEM, 2014)
Presión de vapor (mm Hg)	5.20×10^{-6}	1.86×10^{-4}	6.14×10^{-8}	20 °C: < 1	1.27×10^{-6}	(Ziylan y Ince, 2011)
log Kow Coeficiente de partición lípido / agua	2	3.97 superior al umbral de 3	4.5 superior al umbral de 3	2.26	3.18	(Bouissou-Schurtz et al., 2014)
Solubilidad a 25 °C	Altamente soluble en agua (solubilidad 14.000 mg/L) 14000 ppm	Baja solubilidad en agua de 21 mg/L 21ppm	2.37 mg/L 2.37ppm	2240 mg/L 2240 ppm	15.9 mg/L 15.9 ppm	(Chen et al., 2011)
LogKoc (coeficiente de absorción)	2.9	2.5	1.9	1.0	2.5	(Feng et al., 2013)
Hidrolisis	NO	NO	NO	SI	NO	(Bouissou-Schurtz et al., 2014; PUBCHEM, 2014)

Tabla IX c. Cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad y sector poblacional, así como efecto biológico y conceptos importantes para la determinación del potencial de riesgo

PROPIEDADES	PARACETAMOL	IBUPROFENO	DICLOFENACO	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	NAPROXENO	REFERENCIA
Vida media	20 días	20 días 6.09 Sólidos	8 días 8.47 Sólidos	1hr hasta 12.5 días	27 días 14.29 días Sólidos	(Grenni et al., 2013; Bouissou-Schurtz et al., 2014; PUBCHEM, 2014)
Biodegradabilidad	Fácilmente biodegradable	Biodegradable	Rápida biodegradación	Fácilmente biodegradable	No biodegradable	(Bouissou-Schurtz et al., 2014)
BCF (factor de bioconcentración) en organismos acuáticos	3	3	3	3	3	(Bouissou-Schurtz et al., 2014)
Biodegradación lenta t ½	50–1400 h lenta	450-480 h lenta	SIN DATO	SIN DATO	SIN DATO	(Pal et al., 2010)
Fotodegradación T_{1/2}	56–35 h	600-9900 h pobre degradación	Rápida fotontransformación	Susceptible a la fotólisis directa por la luz solar	fotólisis directa en agua mineral, t _{1/2} : 42 min	(Pal et al., 2010)
Formas metabólicas	Conjugados de sulfato, cisteína paracetamol, mercapturato	*2-[4-(2-hidroxil-2-metil propil) fenil] ácido propiónico *2-[4-(2-carboxipropil) fenil] ácido propiónico *ácido carboxi-hidratrópico (carboxi-HA)	*4'-Hdroxy DCF *4'5-dihydroxy DCF *3'-hydroxy DCF *5'-hydroxy DCF *3' hydroxy-4'-methoxy DCF	*ácido salicílico *ácido orto-hidroxi-hipúrico *ácido gentísico	*6-O-desmetilado metabolito *DM-naproxeno	(DRUGBANK, 2014; TOXNET, 2014)

Tabla IX d. Cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad y sector poblacional, así como efecto biológico y conceptos importantes para la determinación del potencial de riesgo

PROPIEDADES	PARACETAMOL	IBUPROFENO	DICLOFENACO	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	NAPROXENO	REFERENCIA
Concentraciones en agua dulce-ríos y canales (ng/L)	Norteamérica 24.7-65.2 Europa 59-220 Asia y Australia 4.1-73	Norteamérica 0-34.0 Europa 14-44 Asia y Australia 28-360	Norteamérica 11-82 Europa 21-41 Asia y Australia 1.1-6.8	Norteamérica 70-121 Europa <0.3-302 Asia y Australia SIN REGISTRO	Norteamérica 0-135.2 Europa <0.3-146 Asia y Australia 11-181	(Pal et al., 2010)
Concentraciones ng/L EDAR (Estación Depuradora de Aguas Residuales) Y PTAR (Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales)	Norteamérica Europa 59-220 Asia y Australia 128-548	Norteamérica 220-3600 Europa 134-7100 Asia y Australia 65-1758	Norteamérica <0.5-177.1 Europa 460-3300 Asia y Australia 8.8-1271	Norteamérica 47.2-180 Europa 40-190 Asia y Australia 9-2098	Norteamérica <1-5100 Europa 4501-840 Asia y Australia 128-548	(Pal et al., 2010)
Remoción con UV-fotolisis tratamientos de aguas	30-70% (40 mJ/cm ²)	<30% con UV (40 mJ/cm ²)	30-70% con UV (40 mJ/cm ²)	SIN DATO	<30% (40 mJ/cm ²)	(Pal et al., 2010)
Tratamientos químicos	>70% 2.5 mg/L O ₃ y libre de Cl ₂ 3.5 mg/L	> 70% de eliminación (2.5 mg/L de O ₃); Eliminación de 30-70% libre de Cl ₂ (3,5 mg/L)	Remoción de >70% 2.5 mg/L O ₃ y libre de Cl ₂ 3.5 mg/L	SIN DATO	COMPLETA (0.4 mg O ₃ /mg TOC); > 70% de eliminación (2.5 mg/L de O ₃ y libre Cl ₂ 3,5 mg/L)	(Pal et al., 2010)

Tabla IX d. Cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad y sector poblacional, así como efecto biológico y conceptos importantes para la determinación del potencial de riesgo

PROPIEDADES	PARACETAMOL	IBUPROFENO	DICLOFENACO	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	NAPROXENO	REFERENCIA
Concentraciones en agua	Afluente y efluente de planta de tratamiento de aguas residuales, efluente de hospital, agua subterránea USA, río Danubio, río Sava, río Tamis, río Han y agua superficial Reino Unido	Afluente y efluente de planta de tratamiento de aguas residuales, efluente de hospital, agua subterránea USA, agua potable Eslovenia y España, Ríos de Rumania, Rio Paraíba do Sul, río Po, río Lambro, río Høje, río Elver, río Tyne, río Alzette, río Mess y lago Alster	Afluente y efluente de planta de tratamiento de aguas residuales, efluente de hospital, agua subterránea Alemania, agua potable USA y Eslovenia, Ríos de Rumania, Rio Paraíba doSul , río Høje, río Elver, río Alzette, río Mess, lago Alster y rio perlas China	Afluente y efluente de planta de tratamiento de aguas residuales. Ríos de Rumania,	Afluente y efluente de planta de tratamiento de aguas residuales, efluente de hospital, agua subterránea USA, agua potable Eslovenia, BRASIL, Ríos de ALEMANIA, Río Paraíba do Sul, río Høje.	(Santos et al., 2010)
Concentraciones en suelos	Sin reporte	0.1 µg/kg de 4 muestras México 1.51–5.03 µg/kg	0.35–1.16 µg/kg de 18 muestras Hebei, China	Sin reporte	Sin reporte	(Li, 2014)

Tabla IX e. Cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad y sector poblacional, así como efecto biológico y conceptos importantes para la determinación del potencial de riesgo

PROPIEDADES	PARACETAMOL	IBUPROFENO	DICLOFENACO	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	NAPROXENO	REFERENCIA
Consumo (toneladas/años)	403 Inglaterra 95 Suiza 622 Alemania	162 Inglaterra 25 Suiza 70 Finlandia 345 Alemania 14.2 Australia	4.5 Suiza 1 Finlandia 86 Alemania 26 Inglaterra 4.4 Australia	78 Inglaterra 896 Alemania	35 Inglaterra 6.7 Finlandia 22.8 Australia	(Bouissou-Schurtz et al., 2014)
Consumo en Pachuca-Mineral de la Reforma						
Suma de farmacias y hospitales kg/año	1991.74	1593.68	466.29	1150.31	2038.65	(Rodríguez-Anaya et al., 2014)

Tabla IX f. Cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad y sector poblacional, así como efecto biológico y conceptos importantes para la determinación del potencial de riesgo

PROPIEDADES	PARACETAMOL	IBUPROFENO	DICLOFENACO	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	NAPROXENO	REFERENCIA
Toxicidad	-DL ₅₀ oral ratón : 338 mg/kg MAMÍFERO (1) -DL ₅₀ oral rata: 1944 mg/kg MAMÍFERO (1) -LC ₅₀ . <i>Daphnia magna</i> 9.2 mg/L (2) -CL ₅₀ (96hr) <i>Pimephales promelas</i> 814 mg/L (3) -CE ₁₀ <i>Lemna gibba</i> (planta: lenteja de agua): >1.0 mg/L (4) -CE ₅₀ (96h)=14.5mg/l fitoplancton (5) -CE ₅₀ (96h)=22.43 mg/L Zooplancton (5)	-DL ₅₀ oral ratones: 1255 mg/kg (1) -DL ₅₀ oral rata 636 mg/kg (1) -DL ₅₀ ratón oral 740 mg/kg (1) -CL ₅₀ (48h). <i>Daphnia magna</i> 9.1 mg/L (2) -CE ₅₀ <i>Vibrio fischeri</i> 19.1 mg/L (6) -CL ₅₀ , 96 h <i>Lepomis macrochirus</i> (pez) 173 mg/L (6) -- CE ₅₀ <i>Lemna minor</i> (planta:lenteja de agua): 22.0 mg/L (7) -CE ₁₀ <i>Lemna gibba</i> (planta:lenteja de agua): > 1.0 mg/L (4) -CE ₅₀ 96h <i>Skeletonema costatum</i> (alga): 7.1 mg/L (6) -DL ₅₀ (96h) <i>Lepomis macrochi rus</i> (PEZ): 173 mg/L (6)	-LD ₅₀ oral ratones: mg/kg (1)-LD ₅₀ oral mono: 3200 mg/kg (sódico) (1) -LD ₅₀ oral perro: 500 mg/kg (sódico) (1) -LD ₅₀ oral rata: 55-240 mg/kg (1) -LC ₅₀ . <i>Daphnia magna</i> : 22.4 mg/L (2) -EC ₅₀ 30 min <i>Vibrio fischeri</i> (bacteria) :11.45 mg/L (6) -EC ₅₀ (48h) <i>Daphnia magna</i> 11.45 mg/L (6) -EC ₅₀ (48h) <i>Cerodaphnia dubia</i> (crustáceo): 22.7 mg/L (6) -EC ₅₀ 7 días <i>Lemna minor</i> (planta acuática vascular):7.5 mg/L (6) -LOEC(48h) reproducción <i>Brachionus calyciflorus</i> (rotífero): 25 mg/L (6) -LOEC, 10 días, <i>Danio rerio</i> (pez cebra): 8 mg/L (6) - LOEC(96h) crecimiento, <i>S. capricornutum</i> (alga verde): 20 mg/L (6) -LOEC, 7 días, reproducción <i>Cerodaphnia dubia</i> (crustacean): 2.0 mg/L (6) -LC ₅₀ (96h) <i>Cyprinus carpio</i> 70.98 mg/L (8) -LC ₅₀ (72h) 0.467 mg/kg <i>Hyaella azteca</i> (Crustáceo) (9)	-LD ₅₀ oral ratón: 250 mg/kg (1) -LD50 ratón oral 1100 mg/kg (1) -LD ₅₀ oral conejo: 1010 mg/kg (1) -LD ₅₀ oral rata: 200 mg/kg (1) -LD ₅₀ oral rata: 1800 mg/kg (1) LD ₅₀ oral perro: 700 mg/kg (1) -LC ₅₀ . <i>Daphnia magna</i> 141 mg/L (2) -LC ₅₀ 48h <i>Daphnia magna</i> = 88.33 mg/L (6)	-LD ₅₀ rata oral: 248 mg/kg (1) -LD ₅₀ ratón oral: 1234 mg/kg (1) -LD ₅₀ perro oral: >1000 mg/kg (1) -LD ₅₀ conejillo de indias oral: 665 mg/kg (1) -LD ₅₀ conejillo de indias oral: 1400 mg/kg (1) --LC ₅₀ <i>Daphnia magna</i> 43.5 mg/L (2) -EC ₅₀ <i>Lemna minor</i> (planta:lenteja de agua): 24.2 mg/L (6) -EC ₅₀ <i>Desmodesmus subspicatus</i> (alga verde): >320.0 mg/L (6) -EC ₅₀ , <i>Vibrio fischeri</i> (bacteria): 35 mg/L (6)	(1) (DRUGBANK, 2014) (3)_(TOXNET, 2014) (5) (Ferrari et al., 2003) (2) (Feng et al., 2013) (4) (Crane et al., 2006) Ferrari et al., 2003) (6) (Cleuvers, 2004; Carlsson et al., 2006) (8) (Oviedo-Gómez et al., 2010) (9) (Islas-Flores et al., 2013)

Tabla IX g1. Cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad y sector poblacional, así como efecto biológico y conceptos importantes para la determinación del potencial de riesgo

PROPIEDADES	PARACETAMOL	IBUPROFENO	DICLOFENACO	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	NAPROXENO	REFERENCIA
Efectos clínicos	Náuseas y vómitos, toxicidad hepática y la insuficiencia de múltiples sistemas y muerte. Dosis altas durante la maternidad se han asociado con daños en el riñón fetal y daño hepático. Afecta a la formación de órganos en una primera exposición en el primer trimestre de embarazo.	Edema periférico y retención de líquidos. Puede causar dispepsia, acidez estomacal, náuseas, vómitos, anorexia, diarrea, estreñimiento, estomatitis, flatulencia, distensión abdominal, dolor epigástrico y dolor abdominal. Se han reportado úlcera péptica y hemorragia digestiva. También puede causar mareos, dolor de cabeza y nerviosismo. Insuficiencia renal aguda acompañada de necrosis tubular aguda.	Los síntomas de sobredosis incluyen pérdida del conocimiento, aumento de la presión intracraneal y la neumonitis por aspiración. humanos y otros mamíferos. Malestar gastrointestinal, náuseas y dolor epigástrico, hemorragia digestiva alta se puede producir después de la ingestión aguda o crónica. Angioedema, urticaria, picazón, sarpullido, e hinchazón también se han reportado con el uso terapéutico. Nefritis intersticial, síndrome nefrótico e insuficiencia renal aguda se puede desarrollar. Efectos hematológicos incluyen agranulocitosis, anemia aplásica y trombocitopenia	Efectos de la sobredosis incluyen: tinnitus, dolor abdominal, hipocalemia, hipoglucemia, pirexia, hiperventilación, arritmias, hipotensión, alucinaciones, insuficiencia renal, confusión, convulsiones, coma y muerte en humanos y otros mamíferos Inhibición del ciclo del ácido cítrico (el metabolismo de hidratos de carbono); estimulación del metabolismo de los lípidos; inhibición del metabolismo del ácido amino; y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. La alcalosis respiratoria, acidosis metabólica, la pérdida de electrolitos Toxicidad del sistema nervioso central (hipoacusia, convulsiones y coma),hipoprotrombinemia y edema pulmonar no cardiogénico.	Los síntomas de sobredosis incluyen somnolencia, ardor de estómago, indigestión, náuseas y vómitos. Dolor de cabeza, fatiga, trastornos cognitivos especialmente en los ancianos.	(DRUGBANK, 2014; TOXNET, 2014)

Tabla IX g2. Cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad y sector poblacional, así como efecto biológico y conceptos importantes para la determinación del potencial de riesgo

PROPIEDADES	PARACETAMOL	IBUPROFENO	DICLOFENACO	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	NAPROXENO	REFERENCIA
Efectos clínicos	Asociación con anemia fetal e ictericia neonatal, si la sobredosis se toma cerca del término del embarazo. Puede haber un mayor riesgo de aborto espontáneo con exposiciones en el primer trimestre.	Los síntomas más comunes de sobredosis son dolor abdominal, náuseas, vómitos, letargo, vértigo, somnolencia, mareos e insomnio. Otros síntomas de sobredosis incluyen, pérdida de conciencia, tinnitus, depresión del SNC,	Hipotensión, bradicardia y taquicardia	Náuseas, vómitos, malestar epigástrico, hemorragia gastrointestinal (típicamente con crónica y rara vez con la intoxicación aguda); taquipnea y hiperpnea; tinnitus, sordera, sudoración, vasodilatación, hiperpirexia (raro), irritabilidad, temblores, visión borrosa, hemorragias subconjuntivales. hiper o hipoglucemia; efectos sobre la sangre: hipoprotrombinemia; efectos sobre el hígado: actividades de aminotransferasa sérica aumento (SGOT y SGPT). Edema pulmonar no cardiogénico; confusión, delirio, estupor, asterixis, coma, edema cerebral (sólo con intoxicación grave); insuficiencia renal aguda; paro cardiorrespiratorio (con sólo la intoxicación grave).	.Efectos gastrointestinales (por ejemplo, dispepsia, ulceración sangrado). Disfunción renal.	(DRUGBANK, 2014; TOXNET, 2014)
		insuficiencia renal, disnea, depresión respiratoria, coma, insuficiencia renal aguda, y la apnea (principalmente en pacientes pediátricos muy jóvenes)	Fibrosis pulmonar	La somnolencia, delirio, letargia, convulsiones, mareos, desorientación, pérdida de conciencia, tinnitus, dolor de cabeza, alucinaciones, y la encefalopatía han sido asociado con la dosificación terapéutica y / o sobredosis de AINEs	Agranulocitosis, trombocitopenia y pancreatitis	
					Broncoconstricción y asma	
					La meningitis aséptica	
					Hepatotoxicidad e ictericia	
					Insuficiencia renal aguda, azotemia y síndrome nefrótico	

Tabla IX h1. Cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad y sector poblacional, así como efecto biológico y conceptos importantes para la determinación del potencial de riesgo

PROPIEDADES	PARACETAMOL	IBUPROFENO	DICLOFENACO	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	NAPROXENO	REFERENCIA
Daño genotóxico	-Daño en el ADN, hámster chino en células V79 de pulmón <i>in vitro</i> ; Daño en células embriogénicas (SCE) células TA ₃ H de ratón <i>in vitro</i> ; <i>Allium cepa</i> aberraciones cromosómicas; micronúcleos en riñón de rata ensayo <i>in vitro</i> ; aberraciones cromosómicas, en células Don-6 hámster chino <i>in vitro</i> ; aberraciones cromosómicas, en células de ovario de hámster chino <i>in vitro</i> ; SCE, linfocitos humanos <i>in vitro</i> ; aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos <i>in vitro</i> (10)	-Débiles aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea de ratón en <i>in vivo</i> (9) ; Puede interferir con diversas vías de señalización en la transcripción de genes en las almejas <i>Ruditapes philippinarum</i> , tales como el metabolismo de ácido araquidónico, la apoptosis, los receptores activados por el proliferador peroxisomal, y el factor nuclear kappa B. Además, varios genes implicados en el metabolismo de los (por ejemplo, glutatión S-transferasa, sulfotransferasa, citocromo (P450) a ser afectados significativamente por la exposición (12) ; estrés oxidativo en <i>Dreissena polymorpha</i> se evidenciaron por niveles inducidos de RNAm en la glándula digestiva de Catalasa y metalotioneína, así como superóxido dismutasa después de uno y cuatro días, respectivamente (13)	-Induce daños de DNA que paralizan la replicación del ADN, que conduce a roturas cromosómicas, así como la síntesis de DNA translesión y mutagénesis medida en células DT40. pollo genéticamente modificados y de tipo salvaje (15) --Induce estrés oxidativo en <i>C. carpio</i> , particularmente en órganos como el hígado y branquias (9) --Induce estrés oxidativo en <i>Hyalella azteca</i> y el conjunto de pruebas que se utilizan (peroxidación lipídica, el contenido de proteínas carbonilo, actividad de las enzimas antioxidantes) constituye un biomarcador de daño temprano adecuada para evaluar la toxicidad de este grupo farmacéutico en especies acuáticas (8)	-Alteración de enzimas antioxidantes, daño en el DNA. Inducción de estrés oxidativo y daño en DNA de <i>D. magna</i> (11) -Aberraciones cromosómicas en células CHL <i>in vitro</i> ; Aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos <i>in vitro</i> ; Débiles aberraciones cromosómicas en fibroblastos humanos <i>in vitro</i> ; Ensayo SCE en las células de médula ósea de ratón <i>in vivo débilmente positivo</i> ; Aberraciones cromosómicas, células de la médula ósea de rata en <i>in vivo</i> (10)	-Débiles aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea de ratón en <i>in vivo</i> (10) -Estrés oxidativo inducido por naproxeno en el hígado de rata la función fisiológica del hígado a través de la alteración de la excreción biliar, que es reconocido como un sistema de desintoxicación (20) -Estrés oxidativo en <i>D. magna</i> (11)	(8) (Oviedo-Gómez et al., 2010) (9) (Islas-Flores et al., 2013) (10) (Brambilla y Martelli, 2009) (11) (Parolini et al., 2009) (12) (Milan et al., 2013) (13) (Contardo-Jara et al., 2011) (14) (Saravanan et al., 2012) (15) Gómez-Oliván et al., 2014) (16) (Liu et al., 2012) (17) (Gonzalez-Rey y Bebianno, 2014) (18) (Schmidt et al., 2011) (19) (Parolini et al., 2011) (20) (Yokoyama et al., 2006)

Tabla IX h2. Cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad y sector poblacional, así como efecto biológico y conceptos importantes para la determinación del potencial de riesgo

PROPIEDADES	PARACETAMOL	IBUPROFENO	DICLOFENACO	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	NAPROXENO	REFERENCIA
Daño genotóxico	-Rupturas monocatenarias de DNA, micronúcleos en células del hígado de ratones <i>in vivo</i> ; aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de ratón <i>in vivo</i> ; micronúcleos en linfocitos humanos <i>in vivo</i> ; aneuploidía, embriones de ratón <i>in vivo</i> ; carcinogénesis a largo plazo y tumores en hígado de ratón; leucemia en ratones; tumores en recto y colon de ratón (10)	-Ligera citogenotoxicidad en hemocitos de <i>Dreissena polymorpha</i> mejillón cebra a mayor concentración aumenta significativamente tanto daño genético y celular. Parece tener un efecto considerable sobre las actividades de las enzimas antioxidantes y desintoxicantes	-Inducción significativa de las actividades de superóxido dismutasa y glutatión reductasa en las branquias, además de una alta actividad de catalasa y niveles de peroxidación lipídica en la glándula digestiva. La regulación de la actividad de la acetilcolinesterasa fue directamente relacionado con los niveles de proteína-vitelogenina como en hembras expuestas, lo que indica una alteración en la actividad estrogénica y función de la neurotransmisión colinérgica (17)			(8) (Oviedo-Gómez et al., 2010) (9) (Islas-Flores et al., 2013) (10) (Brambilla y Martelli, 2009) (11) (Parolini et al., 2009)a (12) (Milan et al., 2013) (13) (Contardo-Jara et al., 2011) (14) (Saravanan et al., 2012) (15) Gómez-Oliván et al., 2014) (16) (Liu et al., 2012)
	-Estrés oxidativo en <i>Hyalella azteca</i> (8)	Daño en hemocitos del DNA de <i>Dreissena polymorpha</i> 0.2 µM (12)	-Inducción de peroxidación lipídica en tejidos <i>Mytilus Spp</i> (Molusco) (18)			(17) (Gonzalez-Rey y Bebianno, 2014)
	-Estrés oxidativo en <i>Cyprinus carpio</i> (9)	Estrés oxidativo en <i>D. magna</i> (11)	-Estrés oxidativo en <i>D. magna</i> (11)			(18) (Schmidt et al., 2011)
	-Daño en hemocitos del DNA de <i>Dreissena polymorpha</i> 0.2 µM (11)	-Estrés oxidativo en <i>Cyprinus carpio</i> (9)	--Estrés oxidativo en <i>Cyprinus carpio</i> (9)	-Inducción de la fragmentación del DNA 41% de los hemocitos <i>Dreissena polymorpha</i> (19)		(19) (Parolini et al., 2011) (20) (Yokoyama et al., 2006)

Tabla IX i. Cinética ambiental, propiedades físico-químicas exposición, biodisponibilidad y sector poblacional, así como efecto biológico y conceptos importantes para la determinación del potencial de riesgo

PROPIEDADES	PARACETAMOL	IBUPROFENO	DICLOFENACO	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	NAPROXENO	REFERENCIA
Daño crónico	<p>-<i>Gyps indicus</i> y <i>Gyps tenuirostris</i> Entre 2000 y 2003, de adultos y subadultos tuvieron mortalidad (5-86%) y disminución de las poblaciones resultantes (34-95%) el problema se asoció con insuficiencia renal y gota visceral debido a la presencia de este fármaco (21).</p> <p>-Malformaciones de la columna vertebral o edema pericárdico, en el pez cebra después de la exposición de embriones de acetaminofén a un nivel de 0,5 µg/L (22)</p> <p>-<i>Oryzias latipes</i> podría alterar la vía esteroideogénica, y por tanto, el balance de las hormonas sexuales, lo que aumenta la vitelogénesis en los peces machos. Alteración endocrina (23)-Disruptores endocrinos putativos son potentes inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, tanto en roedores y células humanos (24)</p>	<p>-<i>Oryzias latipes</i> reproducción de peces, incluyendo la inducción de vitelogenia en los peces machos, menos crías por desove y más huevos por desove. alteraciones endocrinas (25)</p>	<p>-<i>Oncorhynchus mykiss</i> daño en Riñón, hígado, branquias y musculo (26)</p> <p>-Efectos citológicos se encuentran en 1 µg/L, la concentración más baja ensayada, en el hígado, riñón, branquias e intestino de <i>Oncorhynchus.mykiss</i> después de 28 días de exposición (27)</p> <p>-<i>O. mykiss</i> concentración en bilis (28)</p> <p>- <i>O. mykiss</i> concentración Plasma de la sangre (29)</p> <p>- 0.5–50 µg/l Afectan a los tejidos de las branquias y el riñón de los peces de agua dulce, la trucha marrón (<i>Salmo trutta f. Fario</i>), lo que sugiere un posible riesgo para las poblaciones de peces (30)</p>	<p>(21) (Green et al., 2004)</p> <p>(22) (Galus et al., 2013)</p> <p>(23) (Kim et al., 2012)</p> <p>(24) (Kristensen et al., 2012)</p> <p>(25) (Han et al., 2010)</p> <p>(26) (Schwaiger et al., 2004)</p> <p>(27) (Triebkorn et al., 2004)</p> <p>(28) (Mehinto et al., 2010)</p> <p>(29) (Lahti et al., 2011)</p> <p>(30) (Hoeger et al., 2005)</p>		

La primera condición para determinar el potencial de riesgo de AINEs), es que deben estar en el sitio de estudio; por lo que se requiere de evidenciar su presencia de manera directa por estudios de química analítica o de manera indirecta a través de datos estadísticos, encuestas o algún otro método cualitativo y/o cuantitativo que compruebe su presencia. Las evidencias pueden estar basadas en información de su fabricación, origen en el ambiente, liberación (fuente de emisión), uso o almacenaje.

Para valorar los aspectos anteriores, se diseñaron 19 preguntas con base a la Tabla IX a-i, con 3 a 5 opciones o variables analizar, con valores numéricos del 1-5 asignados para su fácil interpretación, siendo el uno el de mínimo potencial de riesgo y el cinco el de máximo potencial de riesgo. En el caso de no existir un dato o referencia bibliográfica se le asignará un valor de 1, debido a la incertidumbre; la selección de las variables fue entorno a las diferencias observadas de la Tabla IX a-i, que reflejen variables significativas en: exposición, sectores expuestos y peligrosidad en general de los fármacos a evaluar.

Los datos generados se vertieron en una matriz de dos vías con 19 variables que corresponden a los 19 cuestionamientos, para culminar la metodología se suman los valores asignados y el valor mayor corresponde al fármaco con mayor potencial de riesgo. Los valores máximos posibles a obtener de cada medicamento son 95 puntos y el menor 19. Las categorías corresponden al potencial de riesgo alto de 95-71 puntos, identificado con el color rojo, potencial de riesgo intermedio de 70-47 puntos, con el color amarillo, potencial de riesgo bajo de 46-23 puntos, con el color verde claro y finalmente, potencial de riesgo nulo, igual o menor a 22 puntos, con el color verde oscuro; las categorías asignadas permitieron determinar el compuesto con mayor o menor potencial de riesgo, así como establecer qué factores influyeron en ello, además de un orden jerárquico

Los valores numéricos se basan en datos generados en estudios de campo y/o investigaciones previas, principalmente publicado en artículos científicos de carácter internacional, así como informes técnicos, normas oficiales y listados, entre otros; permite identificar cuáles son las variables que sustentan los criterios, permitiendo discernir entre el efecto y sus causales.

6.2.2 Cuestionario

1. **Origen.** Número de fuentes de contaminación de los compuestos a evaluar, pudiendo existir para el caso de AINEs fuentes de origen como: hogares, centros de reunión (escuelas, trabajos, etc.), hospitales, uso veterinario, entre otros.
 - A. Más de dos= **5**
 - B. Dos fuentes= **4**
 - C. Una=**3**
 - D. Desconocida= **1**

2. **Consumo.** Con base en las estadísticas y en datos de comercialización se establece qué compuestos a evaluar, en este caso AINEs, es el que más prevalece en el consumo de una población local o en su caso registros de datos mundiales. Con este indicador se puede establecer de manera indirecta que fármaco estará en mayor concentración en el ambiente.
 - A. Fármaco en el primer lugar y segundo en recetas médicas en hospitales, ventas farmacias locales y/o datos de comercialización internacional= **5**
 - B. Fármaco en el tercer lugar de recetas médicas en hospitales, farmacias locales y/o datos de comercialización internacional= **4**
 - C. Fármaco en el cuarto y quinto lugar de recetas médicas en hospitales, farmacias locales y/o datos de comercialización internacional= **3**
 - D. No se cuenta con el dato= **1**

3. **Presencia.** Tiempo o duración de los compuestos a evaluar en el ambiente, su vida media, lo cual es importante en el criterio de que, a mayor persistencia mayor peligrosidad ambiental, según NOM-165-SEMARNAT-2013.

- A. Permanentes (Más de 50 días)= 5
- B. Persistentes (30-50 días)= 4
- C. Moderadamente persistentes (15 a 30 días)= 3
- D. No persistentes (1 a 15 días)= 1

4. Ingreso. Frecuencia o temporalidad en el ambiente de los compuestos a evaluar; permanente refiere a un ingreso continuo a lo largo de un año; temporal por un ingreso por periodos definidos y repetitivos; esporádica o aleatoria se refiere a ingresos irregulares.

- A. Alto ingreso (Permanente)= 5
- B. Mediano Ingreso (Temporal)= 4
- C. Bajo ingreso (Esporádica-aleatoria)= 3
- D. No se cuenta con información= 1

5. Solubilidad en agua. Basada en la clasificación de Badii-Zabeh y colaboradores (2005), en donde la identificación de la variable puede inferir en mayor movilidad en los sistemas acuáticos y mayor biodisponibilidad. A mayor solubilidad más movilidad; las sustancias con solubilidad acuosa mayor a 500 partes por millón (ppm), son muy móviles en el ecosistema y a sistemas biológicos; sustancias con una solubilidad acuosa mayor a 25 ppm hasta 500 ppm, presentan un solubilidad media, en tanto que aquellos con una solubilidad acuosa menor a 25 ppm, tienden a inmovilizarse en los suelos. (Cinética ambiental).

- A. Alta Solubilidad (Mayor a 500 ppm)= 5
- B. Solubilidad media (25 a 500 ppm)= 4
- C. Baja solubilidad (Menor a 25 ppm)= 3
- D. No se cuenta con información= 1

6. Solubilidad en agua. Basada en la clasificación de Badii-Zabeh y colaboradores (2005), en donde la identificación de la variable puede inferir mayor persistencia en el organismo, debido a que sustancias con alta solubilidad entran rápido al organismo y de la misma manera se excreta, en cambio sustancias con baja solubilidad permanecen más tiempo. Sustancias con solubilidad acuosa menor a 25 ppm tienden a concentrarse en los organismos vivos, sustancias con una solubilidad acuosa de 25 ppm a 500 ppm, se concentran de manera media en los organismos. Las sustancias con solubilidad acuosa mayor a 500 ppm, son de persistencia baja en organismos.

- A. Baja solubilidad menor a 25 ppm= **5**
- B. Solubilidad acuosa mayor a 25 ppm= **4**
- C. Solubilidad mayor a 500 ppm= **3**
- D. No se cuenta con información= **1**

7. Presión de vapor. Determina su volatilidad. Se relaciona con una movilidad a la atmósfera y biodisponibilidad en el aire al respirar. Mayor a 10^{-3} mm de Hg y a 25 °C son muy volátiles, por lo tanto tienen una gran movilidad y se dispersan hacia la atmósfera; existen sustancias ligeramente volátiles, menos móviles, con presiones entre 10^{-4} y 10^{-6} mm de Hg a 25 °C y las no volátiles que son más persistentes en suelos y agua, con presión de vapor menor a los 10^{-7} mm de Hg (Badii-Zabeh et al., 2005).

- A. Altamente volátiles (Mayor a 10^{-3} mm de Hg)= **5**
- B. Ligeramente volátiles (10^{-4} y 10^{-6} mm de Hg)= **4**
- C. No volátiles (10^{-7} mm de Hg)= **3**
- D. No se cuenta con información= **1**

8. Factor de bioconcentración (BCF). Es la cifra que expresa, la relación entre la concentración de la sustancia en un organismo y la concentración de la misma en el ambiente. Se calcula dividiendo, concentración en tejidos entre concentración de

exposición o en el medio circundante (INECC, 2014). Generalmente el BCF es mayor o igual a 1.0 es potencialmente bioacumulativo y un BCF mayor o igual a 100 es altamente bioacumulativo (Badii-Zabeh et al., 2005). Según los criterios adversos para el medio ambiente de la NOM-165-SEMARNAT-2013 una sustancia con un BCF mayor o igual 500 es altamente bioacumulable. Este rubro trata de establecer la posibilidad de que un compuesto ingrese y persista dentro de un sistema biológico, con base al equilibrio entre sus propiedades físico-químicas y la vía de exposición.

- A. Extremadamente bioacumulativo (BCF mayor o igual a 500)= **5**
- B. Alto factor bioacumulativo (BCF mayor o igual a 100)= **4**
- C. Potencialmente bioacumulativo (BCF mayor o igual a 1.0)= **3**
- D. No se cuenta con información= **1**

9. Coeficiente de partición lípido / agua (low_{kow}). Información indirecta sobre la solubilización y distribución en un organismo vivo; los contaminantes con bajos valores de Kow menor a 10 son compuestos hidrofílicos y si Kow mayor a 10^4 son compuestos hidrofóbicos (Badii-Zabeh et al., 2005). Según los criterios de bioacumulación de NOM-165-SEMARNAT-2013 en donde se menciona que si el log kow es mayor o igual 4 es bioacumulable.

- A. Altamente bioacumulable (>4)= **5**
- B. Medianamente bioacumulable (2-4)= **4**
- C. Baja bioacumulación (1-2)= **3**
- D. No se cuenta con el dato= **1**

10. Fotodegradación. Se refiere a las propiedades de los compuestos de ser permanentes o disminuir con el tiempo en función de la descomposición, debido a la exposición a la luz solar. Entiéndase que un compuesto con menor fotodegradación, tienen mayor permanencia en el ambiente y mayor peligrosidad.

- A. Sin fotodegradación= **5**
- B. Pobre fotodegradación= **4**
- C. Rápida fotodegradación= **3**
- D. No se cuenta con el dato= **1**

11. Presencia en más de un medio. Permite determinar peligrosidad de los compuestos a través de una relación lineal al incremento de ambientes, en donde se puede distribuir un contaminante.

- A. En diferentes medios abióticos (Agua, aire, y/o suelo) y bióticos= **5**
- B. Dos o más medios abióticos (Agua, aire y/o suelo)= **4**
- C. Un medio abiótico (Agua, aire o suelo)= **3**
- D. No se cuenta con el dato= **1**

12. Presencia en diferentes medios acuáticos. Es la presencia de los compuestos a evaluar en medios acuáticos, entendiéndose que a mayor cantidad de medios acuáticos, en los que se distribuye el compuesto, mayor la posibilidad de contacto con sistemas biológicos y con humanos.

- A. Agua potable, subterránea, superficial, afluyente y efluente de aguas residuales = **5**
- B. Agua subterránea, superficial, afluyente y efluente de aguas residuales= **4**
- C. Agua superficiales , afluyente y efluente de aguas residuales= **3**
- D. Afluyente y efluente de aguas residuales= **1**

13. Exposición. El indicador trata de establecer la posibilidad combinada de ejercer un efecto biológico, basada en el contacto físico entre los compuestos a evaluar, en este caso AINEs y humanos, contra el número de ambientes o medios en donde se encuentre disperso y/o por el consumo elevado debido a la automedicación y/o receta médica.

- A. Posibilidad de exposición alta (Múltiples contactos y alto consumo)= **5**
- B. Posibilidad de exposición media (Múltiples contactos y consumo medio)= **4**
- C. Posibilidad de exposición baja (Múltiples contactos con bajo consumo)= **3**
- D. Posibilidad de exposición desconocida= **1**

14. Formación de metabolitos. Establece si los compuestos de interés forman metabolitos primarios o secundarios, que pueden ser detectados a través de la excreción, lo cual aumenta su peligrosidad en el ambiente, debido a que el compuesto y sus metabolitos, pueden ejercer efectos secundarios, lo cual los cataloga como más peligrosos.

- A. Alta peligrosidad (5 o más metabolitos)= **5**
- B. Media peligrosidad (de 2 a 4 metabolitos)= **4**
- C. Baja peligrosidad (1 metabolito)= **3**
- D. No se cuenta con el dato= **1**
- E. No forma metabolitos= **0**

15. Efecto biológico. Se mide a través de la peligrosidad de los compuestos a evaluar, con base a su: concentración, datos reportados de toxicidad, efectos secundarios en diferentes bioensayos e incluso en humanos.

- A. Alta peligrosidad. Efectos clínicos y/o efectos secundarios en pruebas *in vitro* en humanos= **5**
- B. Media peligrosidad. Efectos secundarios en bioensayos= **4**
- C. Baja peligrosidad. Solo datos de efectos tóxicos= **3**
- D. No se cuenta con el dato= **1**

16. Efecto Biológico. Capacidad que tienen los compuestos a evaluar de ocasionar daños biológicos en humanos u otros sistemas mamíferos, *in vivo* o *in vitro*; basado en efectos tóxicos, genéticos, carcinogénicos y/o reproductivos.

- A. Alta peligrosidad. Humanos *in vivo*= 5
- B. Media peligrosidad. Sistemas mamíferos y humanos *in vitro*= 4
- C. Baja peligrosidad. Sistemas mamíferos= 3
- D. No se cuenta con el dato= 1

17. Efecto Biológico. Capacidad que tienen los compuestos a evaluar de ocasionar daños biológicos en sistemas no mamíferos, *in vivo* o *in vitro*; basado en efectos tóxicos, genéticos, carcinogénicos y/o reproductivos.

- A. Alta peligrosidad. En 2 o más sistemas en diferente escala evolutiva= 5
- B. Media peligrosidad. Solo en sistemas animales= 4
- C. Baja peligrosidad. Solo en sistemas vegetales= 3
- D. Poca peligrosidad. Solo en sistemas procariontes= 2
- E. No se cuenta con el dato= 1

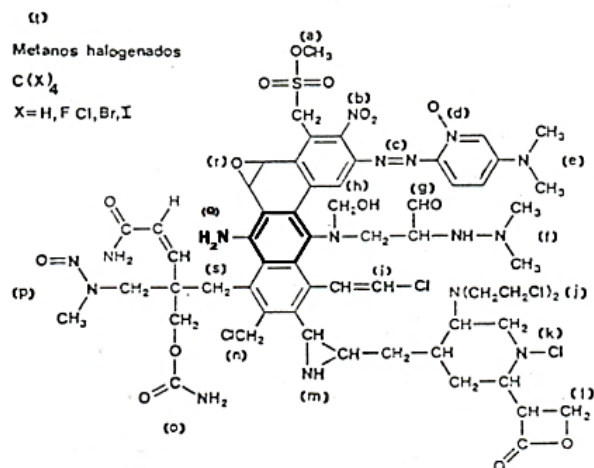
18. Efecto Biológico. Este rubro trata de establecer la capacidad daño biológico de los compuestos a evaluar, con base en la estructura química reportada, identificando la presencia de alguna alerta estructural (Tennant y Ashby en 1991) (Fig. 7).

- A. Alta peligrosidad. Con dos o más grupos sustituyentes considerados con alerta estructural= 5
- B. Media peligrosidad. con un grupo sustituyente considerado con alerta estructural= 3
- C. Baja peligrosidad. se desconoce si tiene algún grupo sustituyentes considerados con alerta estructural= 1

19. Efectos adversos al ambiente. Este rubro trata de establecer de acuerdo con la NOM-165-SEMARNAT-2013, las sustancias químicas que se producen o usan en el país y al ser emitidas o transferidas, causan efectos adversos al medio ambiente, debido a su toxicidad, persistencia ambiental y bioacumulación, de acuerdo con los criterios establecidos en los apéndices

- A. Alta peligrosidad. Las sustancias químicas que cumplan con al menos un criterio de toxicidad del Apéndice 3.2 en combinación con el criterio de persistencia ambiental y alguno de bioacumulación, establecidos en la NOM-165-SEMARNAT-2013= **5**
- B. Mediana peligrosidad. Las sustancias químicas que cumplan con al menos uno de los criterios de toxicidad del Apéndice 3.2 en combinación con el criterio de persistencia ambiental o alguno de bioacumulación, establecidos en la NOM-165-SEMARNAT-2013= **4**
- C. Peligrosidad. Las sustancias químicas que cumplan con al menos uno de los criterios de toxicidad del Apéndice 3.2 o con el criterio de persistencia ambiental o alguno de bioacumulación, establecidos en la NOM-165-SEMARNAT-2013= **3**
- D. No se cuenta con el dato= **1**

ALERTA ESTRUCTURAL



- A) ALQUIL ESTERES DE ACIDO FOSFONICO O SULFONICO
- B) GRUPOS NITROAROMATICOS
- C) GRUPO AZOAROMATICOS
- D) ANILLOS AROMATICOS N-OXIDOS
- E) GRUPO AROMATICOS MONO Y DIALQUILAMINOS
- F) ALQUILHIDRAZINAS
- G) ALQUILALDEHIDOS
- H) DERIVADOS DE N-METILO
- I) MONOALOGENOS
- J) FAMILIAS DE N Y S MOSTAZA
- K) N-CLORAMINAS
- L) PROPIOLACTONAS Y PROPIOSULFONAS
- M) AZIRIDINILOS AROMATICOS Y ALIFATICOS
- N) SUSTITUYENTES PRIMARIOS ALQUILADOS AROMATICOS Y ALIFATICOS
- O) DERIVADOS URETANOS
- P) ALQUIL NITROSAMINAS
- Q) AMINAS AROMATICAS Y SUS ESTERES
- R) EPOXIDOS ALIFATICOS Y OXIDOS AROMATICOS
- S) CENTRO DE REACTIVIDAD DE MICHEL
- T) HALOMONOCARBONADOS

Fig. 7 Molécula hipotética con diferentes grupos sustituyentes considerados con alerta estructural (Tennant y Ashby 1991)

6.3 Prueba DarTa (*Danio rerio* teratology assay) bioensayos de toxicidad y teratogénesis

6.3.1 Adquisición y desinfección de organismos experimentales

Se llevó a cabo en un periodo de dos semanas, en los cuales, se toman en cuenta criterios de inclusión y exclusión: tamaño, estado de salud y conducta. El acuario de 70 litros se acondicionó con un filtro biológico, aeración constante, calentador de 100 Watts con temperatura controlada entre 27 ± 1 °C (Fig. 8) (Rivera, 2006; Walker et al., 2006; Gaytán et al., 2008; Brox et al., 2014).



Fig. 8 Adquisición y desinfección de organismos experimentales

6.3.2 Lote de mantenimiento de los organismos

Al culminar las dos semanas, se contabilizaron los organismos, que no excedió de los 60 individuos. La pecera de 70 litros se mantuvo, en condiciones físico-químicas óptimas (Tabla X), de igual manera se llenó otra de la misma capacidad y mismas condiciones “pecera de agua de reposo” (Fig.9) con la finalidad de utilizarla en los recambios de agua diarios para no afectar las condiciones ideales (Westerfield, 1995; Rivera, 2006).

Tabla X. Condiciones físico-químicas óptimas (adaptada de González, 2005; Rivera, 2006; Gaytán et al., 2008; Tetra Test Kit[®], 2015)

Condiciones físico-químicas	Condiciones óptimas	Efectos negativos de malas condiciones
Luz solar	No recomendada de manera directa al acuario	Evaporación, formación de algas, favorece la ovoposición de adultos, en alevines afecta el desarrollo embrionario
Temperatura	27±1 °C en acuarios alejados de parrilla, estufa o equipos que produzcan calor	Evaporación, desarrollo de protozoarios, formación de microalgas
Dureza °dH grado alemán (Deutsche Härte)	6-16 °dH	Metabolismo de los peces
Carbonatos totales KH	3-10°dH	Fluctuaciones pone en riesgo la salud de la población
NO₂	0.3-0.8 mg/L Tolerable hasta 1.6 mg/L	Demasiados nitritos reduce la capacidad de transporte de oxígeno
pH	pH 7-8	No determinado
Corrientes de aire	Ventanas cerradas o cualquier orificio	Contaminación por polvos o partículas
Instalaciones	Mantenimiento del equipo	Revisión diaria para buen funcionamiento Lugar aislado para evitar el estrés de los peces
Espacio	Suficiente para manipulación de organismos	Espacio intra pecera: se debe considerar un equilibrio entre capacidad de pecera con peces quedando una proporción en 1 litro- 5 peces. Espacio inter peceras: entre peceras deben tener un espacio de 10 cm. Para realizar observaciones

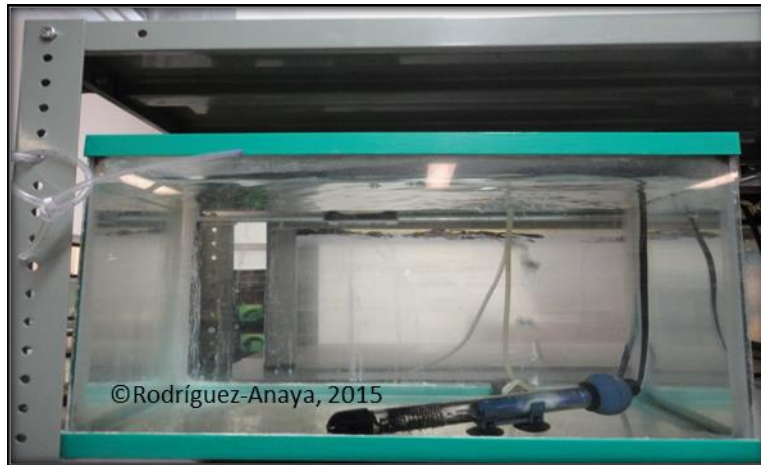


Fig. 9 Agua en reposo con las condiciones fisicoquímicas específicas

La alimentación se administró en función de los requerimientos nutricionales específicos, es decir, de acuerdo a la etapa de desarrollo; los adultos se alimentan tres veces al día con alimento seco (Hojuelas Wardley), agregándoles la cantidad necesaria para alimentarlos durante cinco minutos, transcurrido el tiempo se elimina el sobrante para evitar contaminación. Durante la etapa de reproducción se requiere un mayor aporte de lípidos y carbohidratos, es por ello que su dieta se complementó con alimento vivo de *Artemia sp* o en su caso *Daphnia magna* con la finalidad de obtener mayor número de huevos en cada ovoposición. Otro factor importante es el recambio de agua, el cual, se realizó diariamente, eliminando el 50% de la misma y agregando agua en reposo para el llenado (Rivera, 2006; Lawrence, 2007).

6.3.3 Inducción conducta reproductiva

Se seleccionaron los peces con tallas grandes; la edad en la que los organismos son más fértiles es entre los 8 y 16 meses. Para asegurar la fecundación y la ovoposición, se separaron machos y hembras en acuarios con las mismas condiciones físico-químicas ya mencionadas, estos se separan una semana antes de la fecha anunciada, para la reproducción y ovoposición, además se mantuvieron con un fotoperiodo constante, de 12 horas luz y 12 oscuridad. Para iniciar la reproducción, los peces se colocan en la proporción ideal de tres machos y dos hembras 3:2, en una pecera de 4 litros con una malla fina, esta malla (red de maternidad) tiene el tamaño suficiente para que los huevos traspasen los orificios, los embriones por su misma densidad se

depositan en el fondo de la pecera y la malla evita que los ejemplares adultos lleguen a estos, evitando el canibalismo. El número de huevos obtenidos con la proporción 3:2 no fue suficiente, la problemática se resolvió realizando cruza masivas de 50 hembras y 70 machos, en una pecera de 70 litros utilizando una red de maternidad de mayor tamaño, obteniendo un número elevado de embriones (Fig. 10) (Trevarrow y Robison, 2004; Lawrence, 2007).

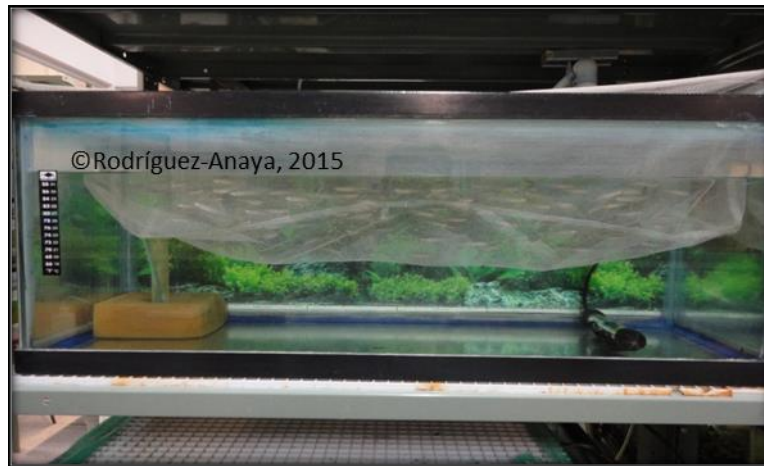


Fig. 10 Organismos en pecera de reproducción con red de maternidad

Los huevos no son adhesivos entre sí ni con la superficie, por lo que fueron depositados en el fondo de la pecera, para su recolección se utilizó un sifón. La eclosión ocurre aproximadamente a las 72 horas de su desarrollo; a temperaturas bajas, el tiempo de eclosión se incrementa notablemente. Se mantuvo una buena aeración y una limpieza estricta (Kimmel et al., 1995).

6.3.4 Índice de ovoposición, viabilidad y eclosión

La colocación de machos y hembras en maternidades, se realizó un día antes del experimento, con la finalidad de optimizar las ovoposiciones. La sobrevivencia de los huevos, se detectó a través de la frecuencia de eclosión, la cual, se favorecía cuando los huevos eran trasladados a un cristalizador. El traslado de los embriones, de la pecera al cristalizador, se realizó en un intervalo no mayor de 2 h, para evitar la contaminación de los embriones por las heces de los adultos, restos de comida y muerte por pérdida del corion, ante la posible presencia de hongos y protozoarios.

Para evaluar el índice de viabilidad y fertilidad, los huevos obtenidos se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL, llenados hasta 100 mL con agua en las condiciones ya reportadas, con constante aireación y se sumergieron un 70% en peceras de 20 L, efectuando un baño maría que mantenía la temperatura del agua de los frascos a 24 ± 1 °C (Fig. 11) (Lawrence, 2007).

6.3.5 Producción de huevos para la prueba DarTa

Las pruebas de toxicidad y teratogénesis con embriones, inician después de la fertilización, en el intervalo de 0-4 horas después que sucede de la fecundación (estado de 128 células). Comenzando la exposición sin el mínimo contratiempo, se seleccionaron de 20 a 30 huevos viables al azar por grupo de tratamiento, la selección se realizó a través de un microscopio estereoscópico binocular, los huevos no viables son opacos y se desecharon. Los huevos viables se transfirieron a un matraz de Erlenmeyer de 125 mL, que contenían 100 mL de las diferentes concentraciones problema, además de los controles de agua y etanol al 0.5% cuando era requerido. Los matraces experimentales se sometieron a constante aireación y se sumergieron un 70% en peceras de 20 L, que contenía agua en reposo, calentador regulable de 100 W, bomba de oxígeno que recirculaba el agua, permitiendo que la temperatura del agua fuera homogénea en toda la pecera (24 ± 1 °C), durante las 72 hrs de exposición. Este esquema aplica para pruebas de toxicidad y teratogénesis (Fig. 11).

6.3.6 Validación del etanol como un control negativo

Exposiciones de concentraciones de etanol al 2.9%, presentan anomalías físicas notables y las tasas de mortalidad altas. Los embriones expuestos a etanol durante un periodo de 0-8 horas después de la fertilización a una concentración de 1.5%, se observa que no hay diferencia estadística significativa entre las tasas de supervivencia con los controles (Bilotta et al., 2004). El etanol es necesario, porque se agrega a las pruebas realizadas con los fármacos con baja solubilidad a 25 °C que son: diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno, en el caso del ácido acetilsalicílico y paracetamol (acetaminofén) que son altamente solubles en agua a 25 °C no se utilizó este disolvente orgánico (Chen et al., 2011).

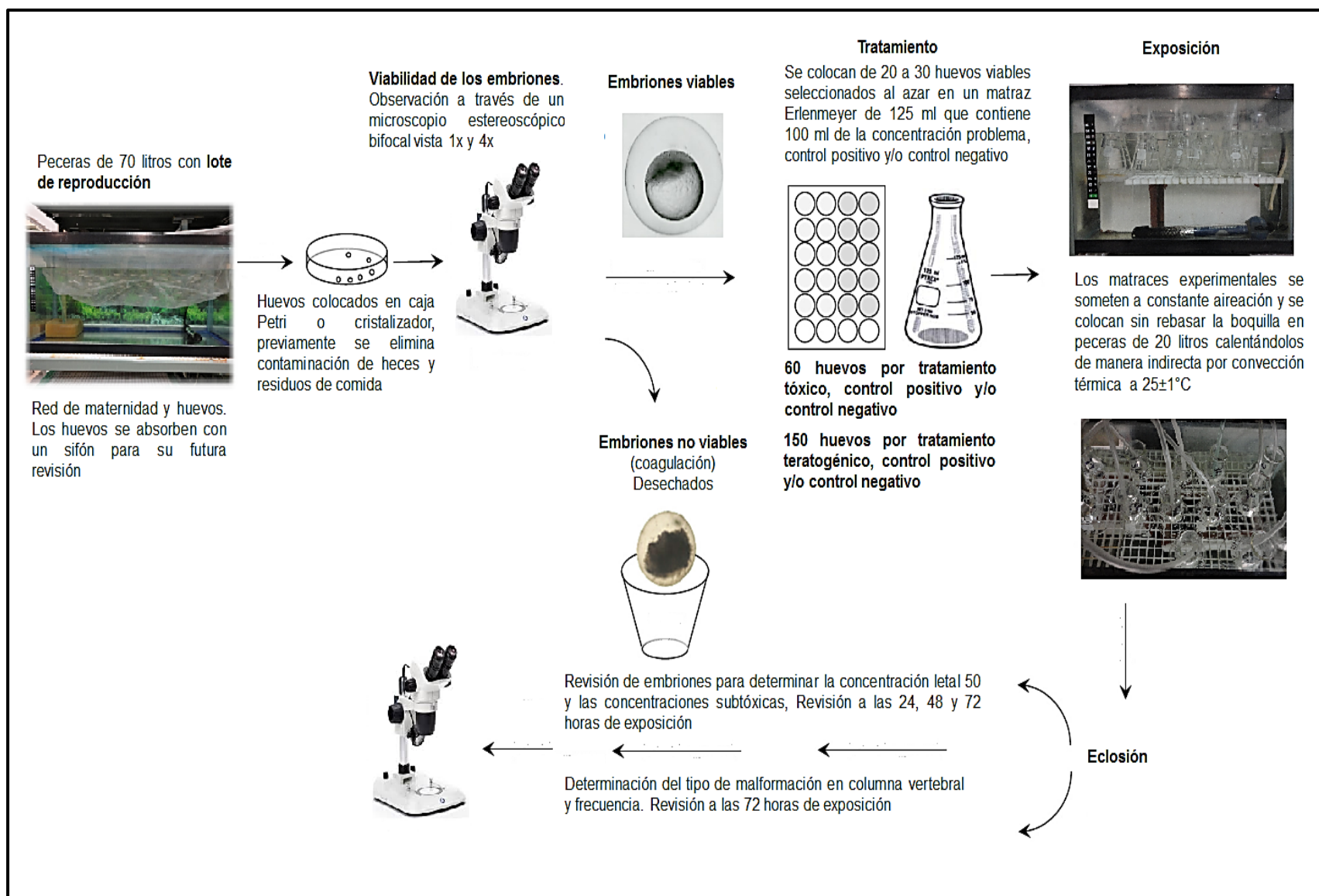


Fig. 11 Esquema general de prueba DarTa para ensayos de toxicidad y teratogénesis (adaptado de Lammer et al., 2009)

Para validar al etanol como un control negativo de toxicidad y teratogénesis, se utilizaron 540 embriones, 30 embriones por matraz Erlenmeyer de 125 mL, que contenían 100 mL de concentración problema, en este caso etanol al 0.5%, además se utilizaron 540 embriones en control de agua en reposo, para equiparar los resultados; la revisión de los embriones, para determinar mortalidad se realizó a las 24, 48 y 72 horas de exposición, se realizó el mismo procedimiento que se muestra en la (Fig. 11).

6.3.6.1 Análisis estadísticos para validar al etanol, como control negativo

Con los datos obtenidos de mortalidad en los controles, se realizó un análisis estadístico; en primera instancia, para determinar la distribución normal de los datos, al comprobar este supuesto, se utilizó una prueba paramétrica de Análisis de Varianza de dos vías (ANOVA), que permite medir el efecto de dos o más factores (variables independientes) sobre una determinada variable de respuesta (dependiente); en este caso determinar si la concentración del etanol al 0.5% y el tiempo de exposición tenían efecto sobre la mortalidad de los embriones en donde:

A1) Hipótesis nula. No existe efecto del control agua y el control etanol al 0.5% sobre la mortalidad.

A2) Hipótesis alternativa. Existe efecto del control agua y el control etanol al 0.5% sobre la mortalidad

B1) Hipótesis nula. No existe efecto del tiempo de exposición al control agua y el control etanol al 0.5% sobre la mortalidad.

B2) Hipótesis alternativa. Existe efecto del tiempo al control agua y el control etanol al 0.5% sobre la mortalidad.

C1) Hipótesis nula. No existe efecto de la interacción del control agua y el control etanol al 0.5% con el tiempo de exposición.

C2) Hipótesis alternativa. Existe efecto de la interacción del control agua y el control etanol al 0.5% con el tiempo de exposición.

De manera adicional, se realizó la prueba de Levene y Bartlett, para comprobar homogeneidad de las varianzas, en ambos casos, sirven para comprobar el supuesto de homocedasticidad, haciendo más confiable la prueba de ANOVA de dos vías.

Al encontrar diferencias significativas, en la prueba de ANOVA de dos vías, se realizó un análisis de Tukey el cual permite comparar pares de medias. Se le considera una prueba de rango fijo porque solo utiliza un valor (W) para todas las posibles comparaciones, el análisis permite identificar las diferencias o similitudes entre los distintos tratamientos.

6.3.7 Valoración del efecto tóxico de los cinco fármacos

Se determinó la toxicidad de los cinco fármacos AINEs (ácido acetilsalicílico, paracetamol, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno) a partir de probar diferentes concentraciones al azar, con la finalidad de establecer la curva de dosis-respuesta de cada fármaco respectivamente, la cual permite determinar la recta de la correlación de la regresión lineal (" r^2 ") con respecto a la concentración empleada y las muertes cuantificadas, para determinar la concentración letal 50 (CL_{50}) y a partir de esta, determinar dosis subtóxicas para pruebas de teratogénesis, además de concentraciones tóxicas. Si r^2 es cercano o igual a 1, el ajuste es excelente y las predicciones realizadas a partir del modelo obtenido serán alta confiabilidad (el modelo obtenido resulta verdaderamente representativo); si r^2 es cercano o igual a 0, se tratará de un ajuste malo en el que las predicciones que se realicen a partir del modelo obtenido no serán fiables (el modelo obtenido no resulta representativo de la realidad).

Se utilizaron 60 huevos viables por concentración del fármaco de interés, 20 huevos por matraz Erlenmeyer de 125 mL, que contenían 100 mL de concentración problema, la disolución constó de agua en reposo, añadiendo etanol absoluto al 0.5% (únicamente para: ibuprofeno, diclofenaco y naproxeno) y añadiendo la cantidad de analito correspondiente del fármaco problema, esta disolución se llevó a cabo en agitación constante, se utilizó un control de agua en reposo por concentración problema y cuando aplicaba para fármacos no solubles, se utilizaron controles de etanol al 0.5%, para determinar mortalidad se realizó a las 24, 48 y 72 horas de exposición, se realizó el mismo procedimiento que se muestra en la (Fig. 11).

6.3.7.1 Análisis estadísticos para valoración del efecto tóxico de los cinco fármacos

De manera adicional, con los datos obtenidos de toxicidad, se realizó un análisis estadístico; en primera instancia, para determinar la distribución normal de los datos, al comprobar este supuesto, se utilizó una prueba paramétrica de Análisis de Varianza de dos vías (ANOVA), en este caso determinar si la concentración del fármaco y el tiempo de exposición tenían efecto sobre la mortalidad de los embriones en donde:

A1) Hipótesis nula. No existe efecto de la concentración del fármaco sobre la mortalidad.

A2) Hipótesis alternativa. Existe efecto de la concentración del fármaco sobre la mortalidad.

B1) Hipótesis nula. No existe efecto del tiempo de exposición al fármaco sobre la mortalidad.

B2) Hipótesis alternativa. Existe efecto del tiempo de exposición al fármaco sobre la mortalidad.

C1) Hipótesis nula. No existe efecto de la interacción de la concentración del fármaco y el tiempo de exposición.

C2) Hipótesis alternativa. Existe efecto de la interacción de la concentración del fármaco y el tiempo de exposición.

De manera adicional, se realizó la prueba de Levene y Bartlett, para comprobar homogeneidad de las varianzas, en ambos casos, sirven para comprobar el supuesto de homocedasticidad, haciendo más confiable la prueba de ANOVA.

Al encontrar diferencias significativas, en la prueba de ANOVA de dos vías, se realizó un análisis de Dunnet (comparaciones múltiples con un testigo) con la finalidad de validar las CL_{50} , concentraciones tóxicas (concentraciones superiores a CL_{50}) y concentraciones subtóxicas (concentraciones inferiores a la CL_{50}). El tener evidencia de que las concentraciones que están por debajo de la CL_{50} permiten establecer dosis subtóxicas para experimentos de teratogénesis, ya que al utilizar concentraciones superiores a la CL_{50} encubre efectos teratogénicos al causar la muerte de más del 50% de la población experimental.

6.3.8 Tratamiento para evaluar daño teratogénicos en columna vertebral de los cinco fármacos

Después de validar las CL_{50} y concentraciones subtóxicas de cada fármaco, se procedió a evaluar el efecto teratogénico en columna vertebral, para esto, se emplearon 150 embriones de entre 4-10 horas de embriogénesis, divididos en cinco muestras de 30 embriones (5 matraces Erlenmeyer de 125 mL con 30 embriones cada uno) por concentración problema (100 mL), las cuales corresponden a las concentraciones proximales a CL_{50} , CL_{25} , $CL_{12.5}$ y $CL_{6.25}$ más un control de 30 embriones en una concentración de agua en reposo (un control por cada concentración problema) y cuando aplicaba para fármacos no solubles, se utilizaron controles de etanol al 0.5%, posteriormente se siguió el procedimiento de la Figura 11. Los organismos se revisaron a las 72 horas, en donde se cuantifico el número de malformaciones además del tipo de estas.

6.3.8.1 Análisis estadísticos para determinar efecto teratogénico de los cinco fármacos

De manera adicional con los datos de frecuencia de malformaciones, se realizó un análisis para determinar la distribución normal de los datos, en este caso los datos de teratogénesis no siguen una distribución normal, por lo tanto, se utilizaron pruebas no paramétricas; en primer lugar análisis de Kruskal-Wallis, el cual permite identificar si existen diferencias significativas entre tratamientos, en este caso si la concentración evaluada es teratogénica con respecto a los controles. En caso de existir diferencia significativa, la frecuencia de malformaciones en columna vertebral, se analizó por medio de una prueba U de Mann-Whitney, la cual es una prueba no paramétrica alternativa de t-Student para dos muestras independientes, y se utiliza para comparar si dos poblaciones tienen la misma distribución de probabilidades o bien si tienen la misma mediana. Sirve para conocer diferencias entre los distintos tratamientos (concentraciones) con respecto al efecto que provocan en los embriones (teratogénesis) pero dando relevancia a evidenciar que concentraciones provocan un efecto teratogénico con respecto a los controles en donde:

Hipótesis nula (H_0)= $M_x=M_y$. Las medianas de malformaciones en columna vertebral son iguales entre los dos grupos de tratamientos de los fármacos de interés (concentraciones).

Hipótesis alternativa (Ha)= $Mx \neq My$. Las medianas de malformaciones en columna vertebral son diferentes entre los dos grupos de tratamientos de los fármacos de interés (concentraciones).

Entorno a las malformaciones reportadas en columna vertebral, se dividió el cuerpo del organismo en tres áreas: cefálica, media y caudal (Fig. 12), para identificar de manera más sencilla la parte afectada de la columna vertebral; en cuanto a las malformaciones, estas se clasificaron en sencillas, dobles, múltiples, curvas, espiral, aleta caudal, gancho y ausencia de cuerpo estas se observan dorsales y/o laterales (Tabla XI), además de manera independiente se observó la posible existencia de alteraciones en la pigmentación y malformaciones en el sistema óseo (Rivera, 2006; Gaytán et al., 2008).

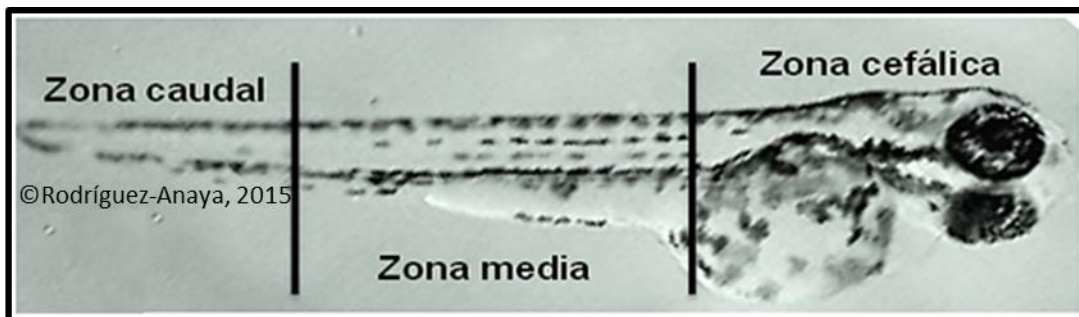

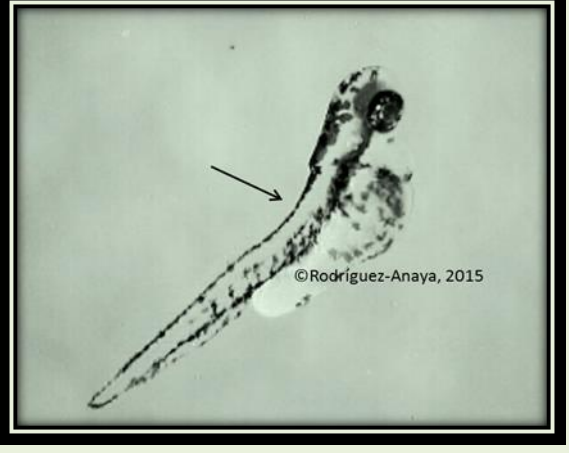

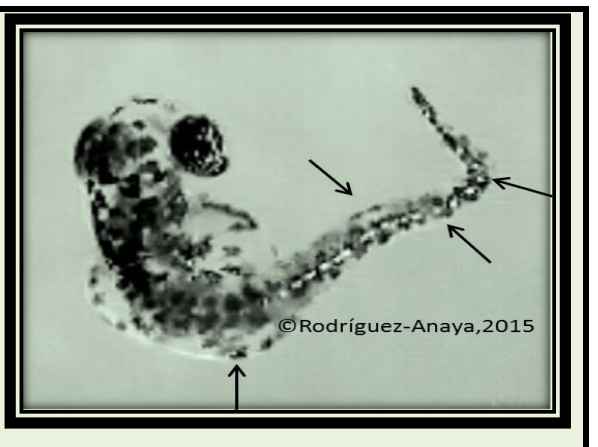







Fig. 12 División del cuerpo de *Danio rerio* propuesta por Rivera, 2006 y Gaytán et al., 2008

Tabla XI Clasificación y descripción de malformaciones en columna vertebral de *Danio rerio* modificada de (Rivera, 2006; Gaytán et al., 2008)

Malformación	Descripción	Imagen
<p>Organismo sin malformaciones</p>	<p>El alevín de <i>Danio rerio</i> no presenta ninguna malformación en columna vertebral, se observa de manera recta el organismo asimilándose a un alfiler</p>	
<p>Malformaciones sencillas</p>	<p>Las malformaciones sencillas son aquellas en las que el alevín de <i>Danio rerio</i> presenta un solo doblez (malformación), ya sea lateral o dorsal, estas se observaron en la zona cefálica y/o media</p>	
<p>Malformaciones dobles</p>	<p>Son aquellas en las que el alevín de <i>Danio rerio</i> presenta dos dobleces, una en la zona media o zona cefálica de la columna vertebral, además de una en la zona caudal, ya sea lateral o dorsal</p>	

<p>Malformaciones múltiples</p>	<p>Son aquellas en las que el alevín de <i>Danio rerio</i>, presenta tres o más dobleces, en la zona cefálica, media y/o caudal, ya sea lateral o dorsal</p>	
<p>Malformaciones Curvas</p>	<p>El alevín de <i>Danio rerio</i>, presenta una curvatura en la zona cefálica, media y/o caudal, lo cual ocasiona que el alevín nade en círculo</p>	
<p>Malformaciones en aleta caudal</p>	<p>Son aquellas en las que el alevín de <i>Danio rerio</i>, presenta un pequeño doblez en la aleta caudal</p>	

<p>Malformaciones en gancho</p>	<p>Son aquellas en las que el alevín de <i>Danio rerio</i>, presenta un doblez en la zona media y/o zona caudal, dando el aspecto de gancho</p>	 <p>©Rodríguez-Anaya, 2015</p>
<p>Malformaciones en espiral</p>	<p>Son aquellas en las que el alevín de <i>Danio rerio</i>, presenta un enroscamiento en forma de espiral en la zona caudal. Foto de Rivera, 2006.</p>	
<p>Ausencia de cuerpo</p>	<p>Es aquella en las que el alevín de <i>Danio rerio</i>, presenta falta de alguna parte cuerpo y aún sigue con vida</p>	 <p>©Rodríguez-Anaya, 2015</p>

6.3.9 Estándares utilizados para pruebas de toxicidad y teratogénesis

A continuación, se enlistan los fármacos utilizados en las pruebas de toxicidad y los ensayos de teratogénesis (DarTa):

- Ácido acetilsalicílico-SigmaAldrich-99%
- Ibuprofeno-JT Baker-99%
- NaproxenoSigma-Aldrich-99%
- Diclofenaco-Sigma-Aldrich-99%
- Paracetamol (Acetaminofén)Sigma-Aldrich-99%

6.4 Análisis químicos

6.4.1 Toma de la muestra

Se tomaron cuatro muestras simples, en intervalos de dos horas para conformar una muestra compuesta, obteniendo un volumen final de dos litros como se estipula en la norma oficial mexicana, que establece los lineamientos generales y recomendaciones para muestrear las descargas de aguas residuales (NMX-AA-003-1980) y la norma oficial mexicana, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de los sistemas de alcantarillado o drenaje municipal (NOM-067-ECOL-1994). Las tomas de muestra se realizaron en el canal abierto de aguas residuales ubicado entre los paralelos 20°3'-12.07" Norte y 98°45' 10.00" Oeste, el 8 de diciembre del 2014 con la finalidad de obtener una muestra representativa de las aguas residuales de la ciudad de Pachuca y Mineral de la Reforma (Fig. 13), atendiendo a que esta parte del canal abierto se encuentra próximo al final del canal del río de las avenidas y cerca del final de la zona conurbada; el agua residual de este canal es utilizada para riego de cultivos como: forraje, alfalfa, cebada y maíz. Las muestras simples fueron colectadas con probeta de plástico de 250 mL, previamente lavada con ácido nítrico al 30 % (Sigma-Aldrich) (tres lavados) y enjuagadas con agua desionizada; las muestras simples fueron vaciadas en un en recipientes de polietileno de 20 L con tapón, previamente lavado con ácido nítrico al 30% (tres lavados) y luego realizando enjuagues con agua desionizada (cuatro enjuagues). La muestra fue etiquetada y protegida de la luz solar y artificial, después del muestreo fueron transportadas inmediatamente al laboratorio donde fueron almacenadas a 4 °C (González-González et al., 2014; SanJuan-Reyes et al., 2015)

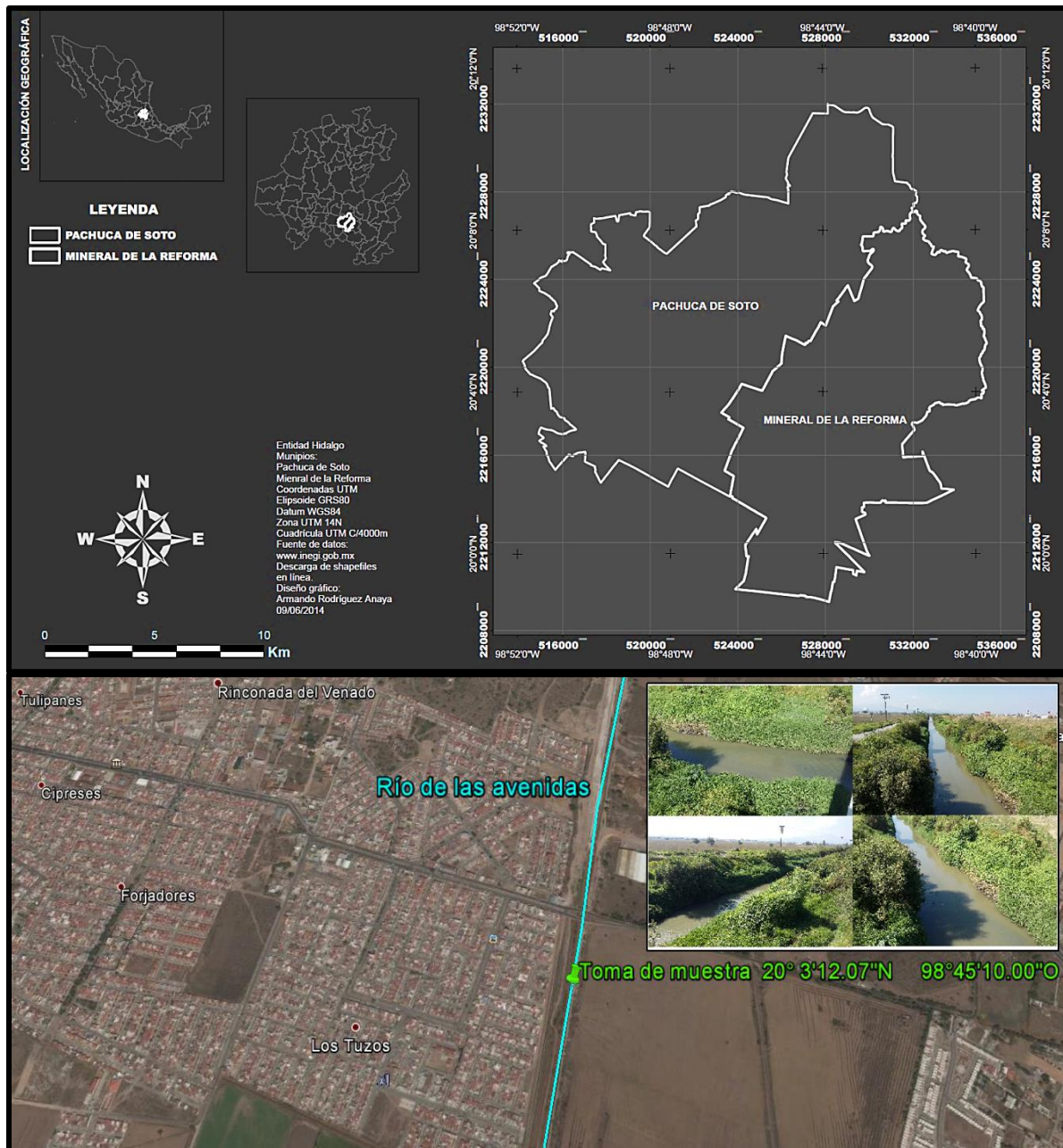


Fig. 13 Tomas de muestras del canal abierto de aguas residuales 20°3'-12.07" Norte y 98°45' 10.00 Oeste"

6.4.2 Análisis fisicoquímico

Se procedió a realizar la caracterización fisicoquímica de la muestra compuesta, el 08 de diciembre del 2014. Los parámetros que se evaluaron fueron: temperatura, oxígeno disuelto, pH, dureza, resistencia, conductividad, solidos suspendidos totales, salinidad y porcentaje de oxígeno disuelto a través de un equipo multiparámetros HANNA 9828.

6.4.3 Cuantificación de AINEs

Se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia asociada a espectrometría de masas tándem (HPLC-MS/MS) como a continuación se describe:

6.4.4 Estándares

Las soluciones estándares para las curvas de calibración de ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno y paracetamol se prepararon en una mezcla de 70:30 de acetonitrilo y formiato de amonio (10 mM) a pH 6, para mantener el pH en las condiciones deseadas, se regulaba con HCl al 1M. La concentración de los estándares de los fármacos antes mencionados se estableció en 10 µg/mL y fueron almacenados a una temperatura de -8 °C y se mantuvieron en la obscuridad. Se preparó una solución de 1000 µg/mL de cada fármaco la cual se utilizó para realizar la sincronización de la espectrometría de masas (MS), además de una solución de 200 µg/mL para estudios de recuperación y soluciones de 1, 2, 10, 50 y 250 µg/mL de los AINEs (ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno y paracetamol) para la calibración del instrumento MS/MS (González-González et al., 2014; SanJuan-Reyes et al., 2015). En la Tabla XII se muestran las sustancias de referencia utilizadas.

Tabla XII. Sustancias de referencia utilizadas

Nombre	Lote	Proveedor	Pureza
Ácido acetilsalicílico	K0F112	USP	99.80%
Ibuprofeno	K0J008	USP	99.90%
Naproxeno	J0H044	USP	99.90%
Paracetamol (Acetaminofén)	K01244	USP	99.80%

6.4.5 Equipo

Los métodos fueron desarrollados en el equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)-MS/MS; el equipo usado HPLC infinity 1290 Agilent acoplado a un detector de masas (MS/MS) marca Agilent modelo 6460 de triple cuádruplo con fuente de ionización ESI (electrospray)-Jet Stream con MRM activada (monitorización de reacciones múltiples). Las condiciones cromatográficas de alta definición de resolución rápida o por sus siglas en inglés RRHD (Rapid Resolution High Definition), para el caso de ibuprofeno y paracetamol se utilizó una columna de cromatografía marca ZORBAX ECLIPSE PLUS C₁₈ (diámetro interno 2.1mm × 50 mm de largo y un tamaño de partícula 1.8 μm) manteniendo una temperatura de 40 °C; para los fármacos ácido acetilsalicílico y naproxeno se utilizó una columna de cromatografía marca CHROMOLITH C₁₈ (diámetro interno 2 mm × 50 mm de largo) manteniendo una temperatura de 40 °C. Para ambas columnas la fase móvil fue 70:30 v/v aplicada isocráticamente (la composición no varía respecto al tiempo). El flujo fue de 0.2 mL/min, el tiempo de corrida de 2.5 minutos y la presión máxima alcanzada fue de 600 bar (González-González et al., 2014; SanJuan-Reyes et al., 2015).

El volumen de inyección y el tiempo de retención para ácido acetilsalicílico fueron de 2 μL y 1.06 min, para ibuprofeno 10 μL y 2.08 min, naproxeno 5μL y 1.45 min, finalmente paracetamol con 5 μL y 1.18 min.

La fase de lavado está compuesta de una proporción de disolventes, que permite eliminar los restos de los fármacos entre inyecciones, siendo 80:20 v/v una mezcla de acetonitrilo y formiato de amonio 10 mM. Los fármacos antes mencionados, fueron cuantificados por un equipo Agilent modelo 6460 de triple cuádruplo equipado con una fuente de ionización ESI (electrospray)-Jet Stream) con MRM activada (monitorización de reacciones múltiples). La fuente de ionización ESI (electrospray) se utilizó en todo momento en el modo positivo. El voltaje del electrospray operó a 4 KV. La cromatografía de masas (MS) recolectó los datos en modo de iones negativos. La optimización de MS, se realizó mediante una infusión directa de 10 μg/mL de ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno y paracetamol; a continuación se selecciona el modo de ionización y el ion precursor (González-González et al., 2014; SanJuan-Reyes et al., 2015).

6.4.6 Curvas de calibración

Ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno y paracetamol fueron realizadas utilizando soluciones estándares en ng/mL (Tabla XIII), preparadas en solución de la fase móvil. Los coeficientes de la regresión lineal para los fármacos antes mencionados, fueron de R^2 de ≥ 0.99 , el detector de MS/MS se mantuvo de acuerdo a las especificaciones del fabricante y limpiando regularmente; cuando se registraban cambios en las pendientes de las curvas de calibración en el 50% o más, el detector se sometió a una limpieza adicional (González-González et al., 2014; SanJuan-Reyes et al., 2015).

Tabla XIII. Parámetros para las Curvas de calibración

FÁRMACO	CURVA DE CALIBRACIÓN (ng/mL)						PUNTOS CONTROL (ng/mL)		
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	PCB	PCM	PCA
Ácido acetilsalicílico	0.5	1	2	4	7	10	0.7	3.5	9
Ibuprofeno	1	2	4	6	8	10	1.5	3.5	9
Naproxeno	1.5	4	6	8	10	12	3	7	9
Paracetamol	10	20	40	60	80	100	15	35	90

PCB: punto de control bajo; PCM: punto de control medio; PCA: punto de control alto

6.4.7 Muestras de agua

Directamente del recipiente de polietileno de 20 L con tapón, donde estaba contenida la muestra compuesta, se tomaron 50 mL, se colocaron en tubos criogénicos de 10 mL y se almacenaron en un ultracongelador, a una temperatura de -70 °C. Después de la ultracongelación, la muestras son descongeladas a temperatura ambiente hasta mantenerlas a una temperatura de 4 °C, esta temperatura se mantiene a través de un refrigerador, este procedimiento se realiza para comenzar con la fase de extracción líquido-líquido. Los 50 mL fueron filtrados al vacío a través de filtros de microfibras de vidrio (GF/C Whatman, UK) de 1.0 μm , a continuación, se realizó una filtración con filtros de membrana de nilón (Whatman, Cambridge, UK) de 0.45 - μm ; de la muestra recién filtrada se tomaron 200 μL a través de una

micropipeta, estos 200 μ L se trasladaron a microtubos de polipropileno a los cuales se les adiciona 1 mL de metilterbutil éter y se agitaron a máxima velocidad en vortex; a continuación las muestras se centrifugan a 13000 rpm durante cinco minutos, después se toman 800 μ L de la fase orgánica y se colocan en un tubo liso; la extracción se repitió por quintuplicado y las fases orgánicas se combinaron, esta muestra se evapora bajo corriente de nitrógeno a 40 °C; finalmente la muestra se reconstruye con Acetonitrilo:Formiato de amonio 80:20 v/v (González-González et al., 2014; SanJuan-Reyes et al., 2015). En la Tabla XIV se muestra las especificaciones de los reactivos, materiales y equipos utilizados.

Tabla XIV. Reactivos, materiales y equipos utilizados en la técnica HPLC-MS/MS

SOLUCIONES	MATERIALES	EQUIPOS
Agua HPLC	Matraz volumétrico de 2 mL	Ultracongelador THERMOSCIENTIFIC 88300A60
Metanol HPLC	Matraz volumétrico de 5 mL	Agitador vortex GENIE 2 G560
Acetonitrilo HPLC	Matraz volumétrico de 10 mL	Agitador Múltiple HEIDOLPH MULTIREAX
Formiato de amonio RA	Probeta de 100 mL	Evaporador de Nitrógeno LABCONCO RAPID VAP VERTEX
	Probeta de 500 mL	Microcentrifuga HERMLEZ 233 M-2
	Vaso de precipitados de 20 mL	Refrigerador VICTER SA DE CV VPC 10C
	Vaso de precipitados de 50 mL	Micropipeta BRAND 704774
	Microtubos de polipropileno	Micropipeta BRAND 704782
	Placas de 96 pozos y cierres	Micropipeta EPPENDORF MULTIPETTE PLUS
	Tubos criogénicos 10 ml	Balanza analítica SCIENTECH SM50IW

6.5 Matriz de colorimetría

Se realizó con la finalidad de establecer el fármaco con mayor prioridad de acuerdo a los diferentes variables analizadas en este trabajo; se otorga el color rojo (5 puntos), cuando la variable analizada es de preocupación prioritaria, al sumar todas las variables, se obtiene la puntuación total, el rango de preocupación prioritaria es de 30 a 24 puntos; se otorga el color naranja (4 puntos), cuando la variable analizada indica preocupación alta, al sumar todas las variables, se obtiene la puntuación total, el rango de preocupación alta es de 23 a 18 puntos; se otorga el color amarillo (3 puntos), cuando la variable analizada indica preocupación intermedia, al sumar todas las variables, se obtiene la puntuación total, el rango de preocupación intermedia es de 17 a 12 puntos; se otorga el color verde claro (2 puntos), cuando la variable analizada indica preocupación baja, al sumar todas las variables, se obtiene la puntuación total, el rango de preocupación baja es de 11 a 6 puntos y finalmente se otorga el color verde oscuro (1 puntos), cuando la variable analizada indica preocupación nula, los símbolos de interrogación indican que se desconoce el valor de la variable por lo tanto se les adjudica el color amarillo, al sumar todas las variables, se obtiene la puntuación total, el rango de preocupación es menor a los seis puntos.

7. RESULTADOS

7.1 Encuestas sector salud pública (hospitales y centros de salud) y farmacias de Pachuca-Mineral de la Reforma

7.1.1 Encuestas sector salud pública (hospitales y centros de salud)

Con base en la información obtenida en los trece centros de salud y dos hospitales de la zona de Pachuca-Mineral de la Reforma, se utilizaron los datos de las presentaciones en comprimidos, grageas, pastillas y tabletas con su respectivo gramaje, presentación y cantidad de cajas comercializadas al día, convirtiendo los datos a kilogramos por año mediante la fórmula mencionada anteriormente (Reyes-Silva, 2016). El centro de salud Nor-Poniente ocupa el primer lugar en prescripción de fármacos, en orden descendente se presentan los volúmenes de abasto; el paracetamol con 25 kg/año seguido del ácido acetilsalicílico con 17.64 kg/año, naproxeno 16.2 kg/año, diclofenaco 9.6 kg/año y finalmente el ibuprofeno con 0 kg/año, este fármaco es peculiar debido a que en el sector salud de la zona de Hidalgo es un medicamento que no está dentro del cuadro básico; el centro de salud Madero ocupa la segunda posición en prescripciones médicas con: paracetamol 49.2, naproxeno 36.9, ácido acetilsalicílico 5.16 y diclofenaco 3.6 kg/año; el tercer centro de salud es el Sur-Poniente: paracetamol 25, naproxeno 18, diclofenaco 7.2 y ácido acetilsalicílico 6.6 kg/año, el hospital general ocupa el cuarto lugar, este registra: paracetamol con 39, diclofenaco 9.6, naproxeno 9 y ácido acetilsalicílico 4.2 kg/año; el hospital obstétrico en quinto lugar registra: paracetamol con 29.04, naproxeno 1.04, diclofenaco 0.04 y ácido acetilsalicílico 0.06 kg/año, el centro de salud santa Matilde en séptimo lugar con: Naproxeno 8.8, paracetamol 5.9, ácido acetilsalicílico 2.4 y diclofenaco 1.8 kg/año. Los demás centros de salud registran menos de 10 kg/año en abasto de las recetas médicas de los cinco medicamentos antes mencionados, el centro de salud con menor suministros es el de La Raza con solamente 0.9 kg/año de paracetamol (Fig.14).

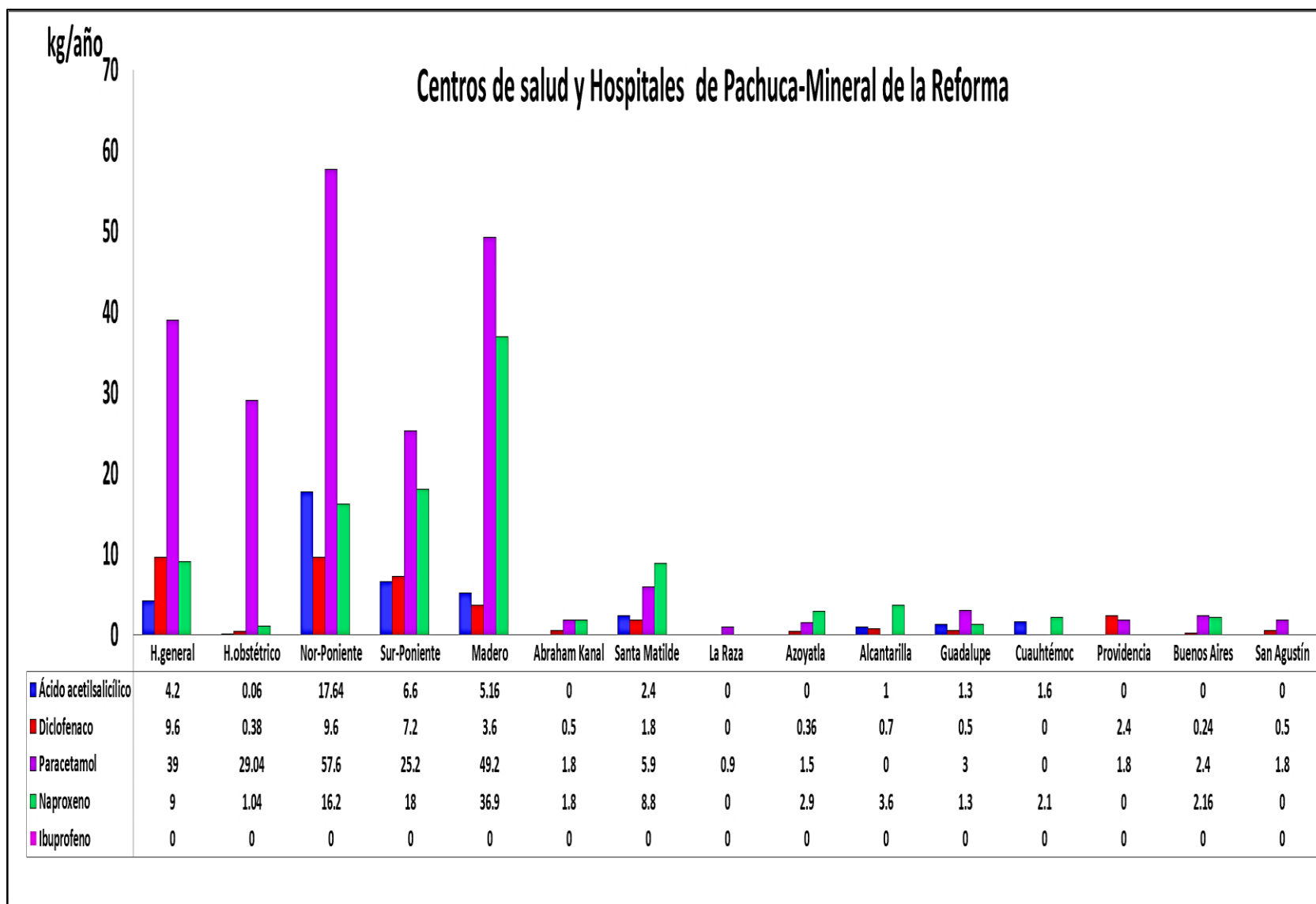


Fig. 14 Cantidad de fármacos prescritos en el sector de salud pública en kg/año

Los resultados generales de las encuestas dirigidas a los encargados de farmacia del sector salud, se sumaron para obtener el total suministrado de cada fármaco. De esta manera el medicamento que se suministra en con mayor frecuencia en la zona de Pachuca-Mineral de la Reforma es el paracetamol, con un total de 219.14 kg/año, en segundo sitio es el naproxeno con 103 kg/año. Alejados de los dos fármacos anteriormente mencionados se encuentra el ácido acetilsalicílico con 39.96 y diclofenaco 37.38 kg/año (Fig. 15); el ibuprofeno no se tiene registro debido a la que no se encuentra en el cuadro básico de medicamentos del sector salud pública de Hidalgo.

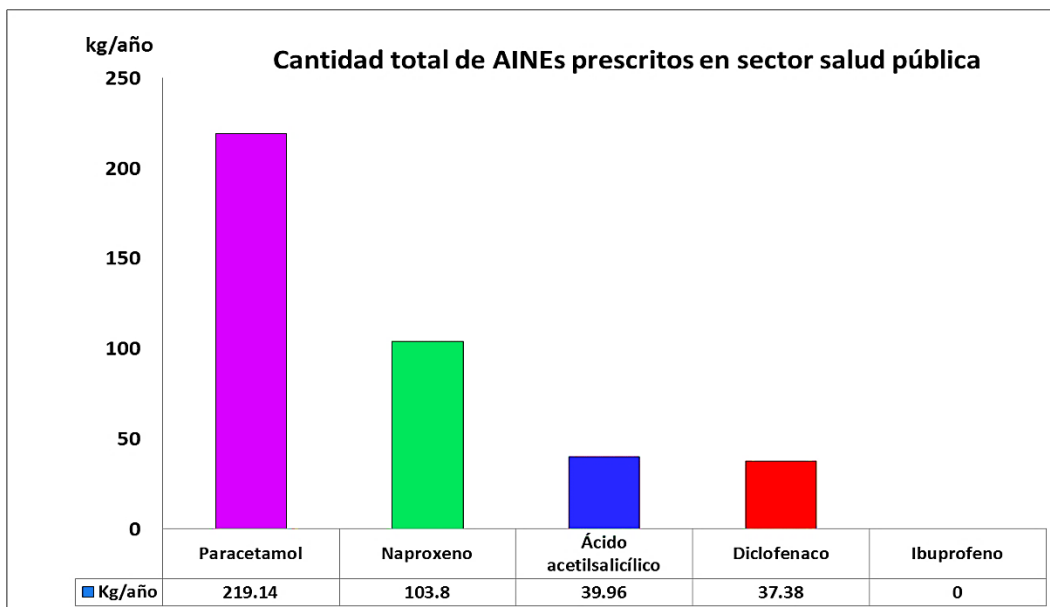


Fig. 15 Cantidad de fármacos en el sector de salud pública en kg/año

7.1.2 Encuestas en farmacias

En la zona referida se registran 257 farmacias, de las cuales se seleccionaron 70 que es la muestra representativa en base a un analisis estadistico (Daniel, 2011). De la misma manera se utilizaron datos sobre las presentaciones en comprimidos, grageas, pastillas y tabletas, con su respectivo gramaje, presentación y cantidad de cajas comercializadas al día, convirtiendo los datos a kilogramos por día, semana y año (Reyes-Silva, 2016). El fármaco con mayores ventas en la zona referida es el naproxeno con un total de 1934.85 kg/año, seguido del paracetamol con 1772.60 kg/año, a continuación el ibuprofeno con 1593.68 kg/año; el ácido acetilsalicílico ocupa

un lugar importante en ventas con 1110.55 kg/año; el fármaco menos solicitado es el diclofenaco con 454.63 kg/año (Fig. 16).

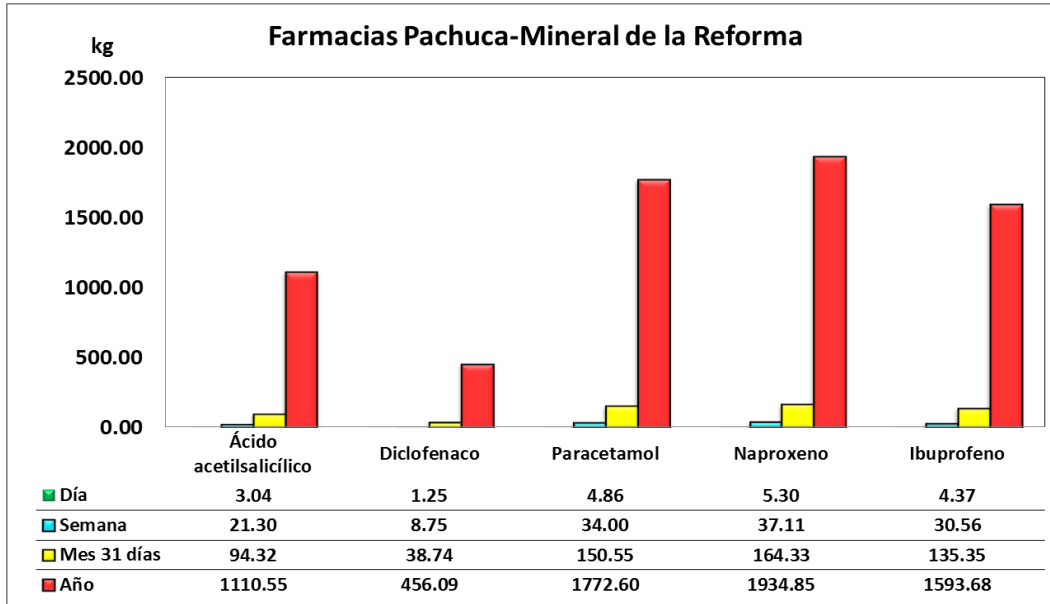


Fig. 16 Cantidad de fármacos de venta libre en farmacias en kg/año, mes y día

7.1.3 Encuestas en farmacias, hospitales y centros de salud de Pachuca-Mineral de la Reforma

Los resultados obtenidos en las encuestas de los centros de salud, hospitales y farmacias muestran que al año por medio de la venta libre y recetas médica los fármacos de mayor demanda en la zona referida son: naproxeno con un total de 2038.65 kg/año y paracetamol con 1991.74 kg/año. El ibuprofeno aunque no es recetado el sector de salud pública es un fármaco que en las farmacias de venta libre tiene un total de 1593.68 kg/año; el ácido acetilsalicílico se encuentra en la cuarta posición con un total de 1150.31 kg/año. Alejado de los fármacos antes mencionados se visualiza el diclofenaco con 466.29 kg/año (Fig. 17).

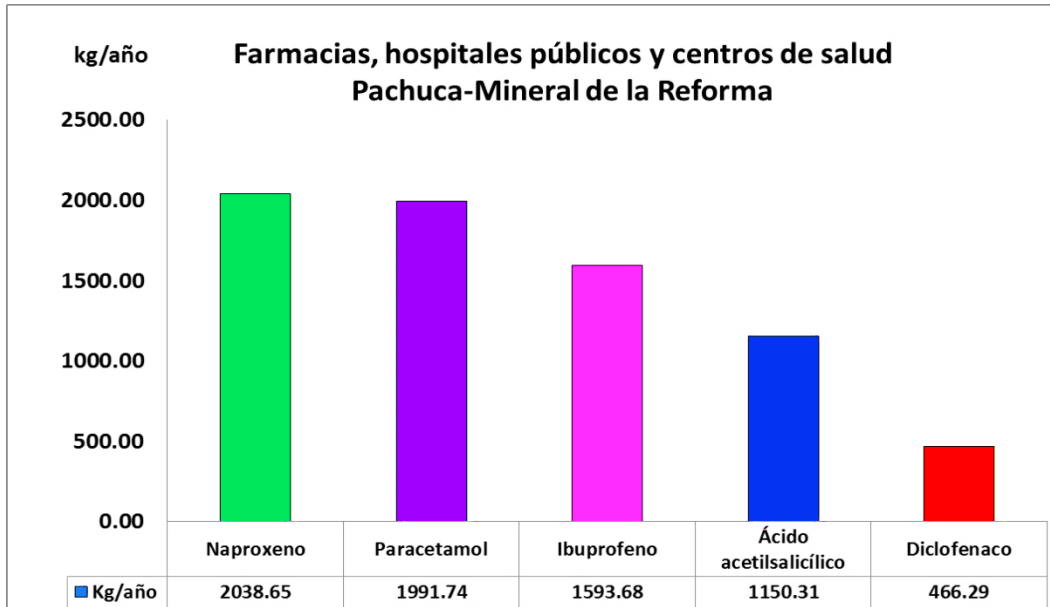


Fig. 17 Total de fármacos en la zona de Pachuca-Mineral de la Reforma en kg/año

7.1.2 Análisis estadístico encuestas

En la zona referida se registran 257 farmacias, de las cuales se seleccionó, con base en un análisis estadístico, una muestra representativa de 70 farmacias para garantizar la cuantificación del 95% de la varianza en las ventas. Estos registros fueron comparados con las ventas en dos hospitales públicos y 13 centros de salud. Se utilizaron datos sobre las presentaciones en comprimidos, grageas, pastillas y tabletas, con su respectivo gramaje, presentación y cantidad de cajas comercializadas al día, convirtiendo los datos a kilogramos por año y en kilogramos al día. Las ventas por fármaco y procedencia fueron comparadas con un análisis de Mann-Whitney.

Los cinco fármacos se comercializan principalmente por venta libre y no por prescripción (Mann Whitney H1, 84: 5.6 a 34.8, $p < 0.05$ en todos los casos). En orden descendente, se comercializan por venta libre naproxeno, paracetamol, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico y diclofenaco. En el orden por prescripción es: paracetamol, naproxeno, ácido acetilsalicílico, diclofenaco e ibuprofeno. Los volúmenes de venta en farmacias oscilan entre 6 y 30 kg al día, para hospitales

y centros de salud las prescripciones médicas van desde menos de un kilo hasta 22 kg al año (Fig. 18).

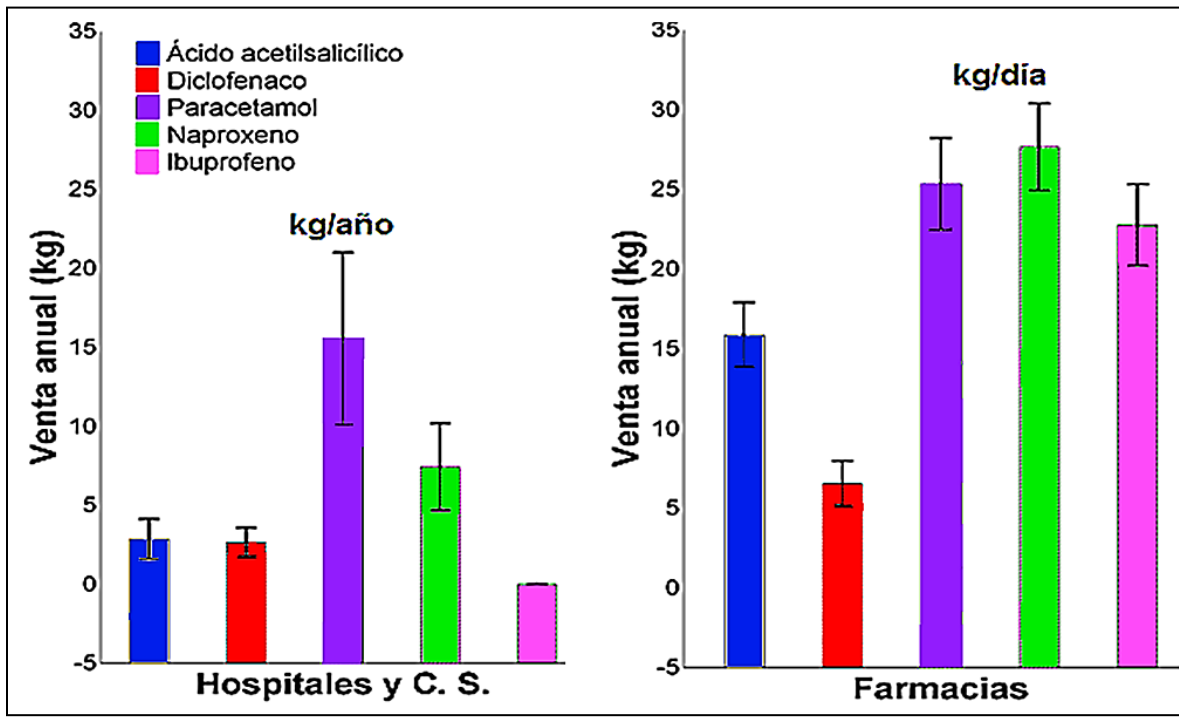


Fig. 18 Comparación de la prueba U de Mann-Whitney de ventas y prescripciones de AINEs





7.2 Prueba EPRAS

En la tabla XV, correspondiente a la matriz de dos vías con 19 variables, se puede observar que:

- Ibuprofeno, como diclofenaco son de alto potencial de riesgo, identificados por el color rojo ambos, alcanzan un valor de 73 puntos.
- Naproxeno y paracetamol también están situados en la categoría de potencial de riesgo alto, con 71 puntos
- Ácido acetilsalicílico con valor de 66 puntos, se clasificó en potencial de riesgo intermedio.

Diclofenaco = Ibuprofeno = Naproxeno = Paracetamol > Aspirina

Tabla XV. Matriz de dos vías con 19 variables con valores obtenidos

	Potencial de riesgo alto 95-71 puntos
	Potencial de riesgo intermedio 70-47 puntos
	Potencial de riesgo bajo 46-23 puntos
	Potencial de riesgo nulo < 22

INDICADOR		Fármacos AINEs				
		DIC	IBU	NPX	PAR	ASA
CINÉTICA AMBIENTAL	1. Origen	5	5	5	5	4
	2. Consumo	3	3	5	5	3
	3. Presencia	3	3	3	3	1
	4. Ingreso	5	5	5	5	5
	5. Solubilidad en agua (a)	3	5	3	5	5
	6. Solubilidad en agua (b)	5	4	5	4	4
	7. Presión de vapor	4	5	4	4	5
	8. Bioconcentración (BCF)	2	2	2	2	2
	9. Coeficiente de partición	4	3	4	3	3
	10. Fotodegradación	4	3	3	3	3
EXPOSICIÓN, BIODISPONIBILIDAD Y SECTOR POBLACIONAL EXPUESTO	11. Presencia en más de un medio	4	4	3	3	3
	12. Presencia en diferentes medios acuáticos	5	5	5	4	4
	13. Exposición	5	4	5	5	3
	14. Metabolitos	4	5	4	4	4
EFECTOS POTENCIALES Y REPORTADOS	15. Efectos en humanos	5	5	5	5	5
	16. Efecto biológico (sistemas mamíferos y humanos)	3	3	3	4	4
	17. Efecto biológico (sistemas no mamíferos)	5	5	5	5	5
	18. Alerta estructural	1	1	1	1	1
	19. Efectos adversos al ambiente	3	3	1	1	1
	TOTAL	73	73	71	71	66

*(IBU) Ibuprofeno, (DIC) Diclofenaco, (NPX) Naproxeno, (PAR) Paracetamol y (ASA) Ácido acetilsalicílico

La Figura 19, se muestra el Modelo Tripartita de Potencial de Riesgo construido con indicadores endógenos, propuesto en el presente trabajo, con base en: (1) CINÉTICA AMBIENTAL (CA), esta corresponde a los 10 primeros indicadores; (2) EXPOSICIÓN, BIODISPONIBILIDAD Y SECTORES EXPUESTOS (EBSE) que representa los próximos cuatro indicadores y finalmente (3) EFECTOS POTENCIALES Y REPORTADOS (EPR) que son los últimos cinco indicadores. En este modelo, se puede identificar la correlación entre los dos primeros componentes (CA y EBSE) que limitan la posibilidad de un riesgo ambiental o la salud humana; la probabilidad de ocurrencia de un evento de riesgo (Peligrosidad), equivalente al puntaje de los primeros 14 indicadores (1-14). La magnitud del daño ambiental o a la salud se determina por la correlación entre los componentes EBSE y EPR; basada en la suma de puntos de los indicadores del 11 al 19. La correlación entre los componentes CA y EPR, define la magnitud del Riesgo ambiental o a la salud; este valor corresponde a la puntuación en los primeros 10 indicadores (1-10) y los últimos cinco (15 a 19). FINALMENTE LA CORRELACIÓN ENTRE EL RIESGO, LA PELIGROSIDAD Y EL DAÑO DEFINE EL POTENCIAL DE RIESGO (PR).



Fig. 19 Modelo Tripartita de Potencial de Riesgo construido con indicadores endógenos

7.3 Prueba DarTa

7.3.1 Índice de fertilidad y viabilidad

La evaluación del efecto biológico, se realizó con base al índice de fertilidad y viabilidad, se analizaron 2643 embriones (100%), de los cuales 2519 embriones fueron viables, representando un promedio de 95.27% (Tabla XVI), estos resultados indican que estos lotes de organismos adultos tienen un alto índice de fertilidad además de un elevado índice de viabilidad de embriones lo que comprueba que el lote experimental es ideal para realizar las pruebas tóxicas y teratogénicas.

Tabla XVI Índice de fertilidad y viabilidad

Lote	Número de embriones	Embriones viables	Porcentaje
1	938	907	96.69 %
2	883	831	94.11 %
3	822	781	95.01 %
Total	Índice de fertilidad 2643	2519	Media 95.27 %

De los embriones viables de los lotes experimentales (Tabla XVI), se continuó con el desarrollo pasadas las 72 horas hasta la eclosión de todos los embriones (73 horas), este desarrollo se llevó a cabo en base al esquema general de la técnica DarTa (Fig. 11) con la finalidad de observar las malformaciones espontáneas que presentaban y la ocurrencia de las mismas; de los 2519 embriones viables se obtuvieron 28 alevines con un grado de malformación en columna vertebral (Tabla XVII).

Tabla XVII. Frecuencia espontánea de malformaciones en columna vertebral

Lote	Embriones viables	Malformaciones en columna vertebral	Porcentaje	Eclosión
1	907	9	0.99 %	898
2	831	6	0.72 %	825
3	781	11	1.03 %	770
Total	2519	28	Media 1.12 %	2493 (99 %)

7.3.2 Evaluación del efecto tóxico

Se determinó la toxicidad de los cinco fármacos AINEs (ácido acetilsalicílico, paracetamol, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno) a partir de probar diferentes concentraciones al azar, se estableció la regresión lineal de dosis-respuesta de cada fármaco respectivamente, que permitió determinar las distintas CL_{50} , concentraciones subtóxicas y tóxicas.

7.3.2.1 Controles

La interacción del tiempo de exposición con el control agua y etanol al 0.5%, tienen diferencia significativa, por lo tanto, estas variables dependen una de la otra para ocasionar muerte de embriones, en donde $F(2,12) = 20.6000$, $p = 0.000132$, cuando se encuentra interacción entre dos variables, no tiene sentido estimar los efectos de los factores por separado. Se comprueba el supuesto homogeneidad de las varianzas. Al encontrar diferencias significativas, se realizó un análisis de Tukey para mostrar las diferencias entre los controles (Fig.20). Este análisis demuestra que el control agua y el control etanol a las 24 horas no tienen diferencias significativas, en conjunto del etanol a las 48 horas, pertenecientes al grupo **a**. El agua a las 48 horas, grupo **b**, difiere significativamente de los demás grupos. En el caso del control agua y control etanol a las 72 horas, no difieren entre sí, grupo **c**, en donde se observa menor mortalidad, el grupo **c** difiere del **a** y **b**. En el caso del agua se observa que la muerte de embriones disminuye conforme aumenta el tiempo, para etanol sucede lo mismo, solo que en las 48 horas, se observa un ligero incremento de muertes, pero a las 72 horas se observa que sigue la tendencia del agua. Se confirma que el etanol es un control negativo debido a que sigue la misma tendencia en dos casos con respecto al agua a las 24 y 72 horas y la diferencia entre las medias del control agua a las 48 horas y control etanol a las 48 horas es mínima; se observa que las muertes en las primeras 48 horas se debe al efecto normal de adaptación de los embriones a las condiciones experimentales, ya que es evidente que a las 72 horas no se presenta ningún deceso en ambos controles y el número de muertes disminuye notablemente en ambos casos a partir de las 48 horas (Fig. 20).

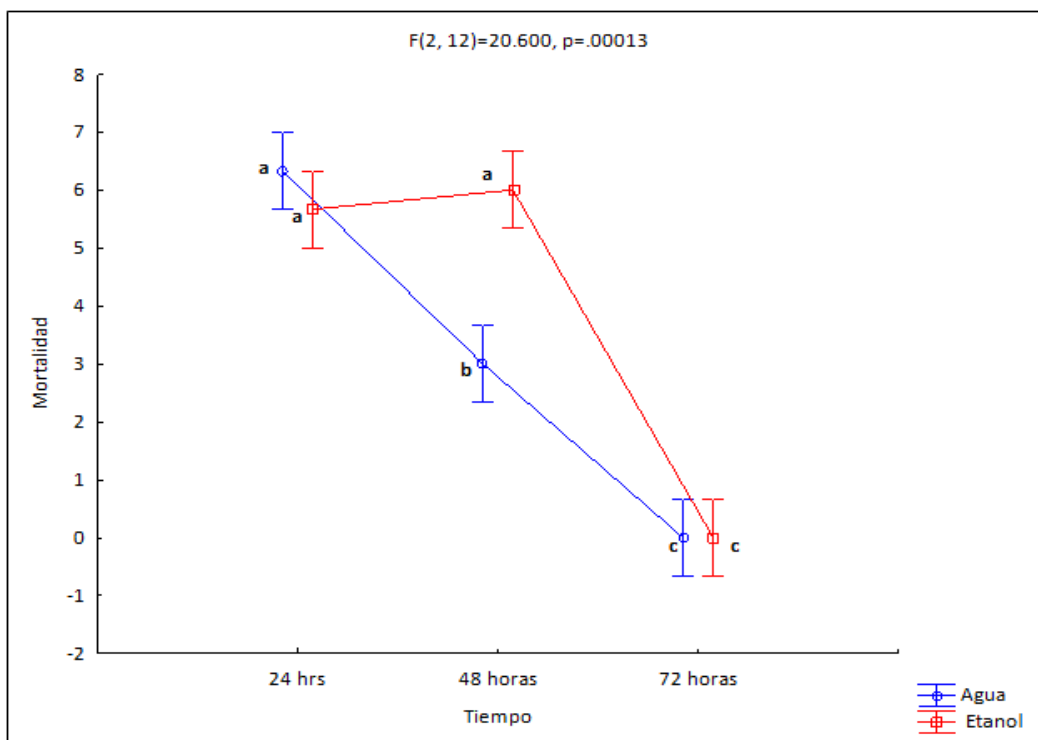


Fig. 20 Análisis Tukey controles

7.3.2.2 Ácido acetilsalicílico

Las concentraciones experimentales elegidas a partir de probar diferentes concentraciones al azar, que permitieron establecer la regresión lineal de dosis-respuesta e identificar las concentraciones tóxicas y subtóxicas, además de la CL_{50} , fueron: 12.5, 25, 50, 100, 200 y 400 mg/L del reactivo; los embriones se revisaron a las 24, 48, 72 horas y se registró el número de embriones muertos por cada tratamiento (Tabla XVIII); se observa que el mayor número de muertes (33 decesos) es en la concentración de 400 mg/L, considerada la más cercana a CL_{50} de todas las concentraciones experimentales; las muertes incrementan conforme la concentración aumenta, mostrando una tendencia lineal y una $R^2=0.99$; en el intersepto existe un 3.33% de muertes espontáneas en ausencia del fármaco y 0.13% en el incremento de muertes en presencia del fármaco por cada ppm (Tabla XVIII y Fig.21); se estableció que la concentración próxima a la CL_{50} utilizada para experimentación fue de 400 mg/L, pero se determinó que la CL_{50} correspondiente a la regresión lineal de dosis-respuesta con $R^2=0.99$ se localiza en 350 mg/L;

concentraciones inferiores a 350 mg/L se consideran concentraciones subtóxicas y concentraciones superiores a esta, se consideran tóxicas (Tabla XVIII y Fig.21).

Tabla XVIII. Parámetros para la prueba de toxicidad de ácido acetilsalicílico

Concentración mg/L	Embriones Utilizados	Embriones Muertos 24 horas	Embriones Muertos 48 horas	Embriones Muertos 72 horas	Porcentaje Total
12.5	60	0	0	1	1 (1.6 %)
25	60	2	1	0	3 (5 %)
50	60	5	2	0	7 (12 %)
100	60	6	3	2	11 (18 %)
200	60	13	7	0	20 (33 %)
400	60	23	5	5	33 (55 %)
0 control Agua	180/6	2	2	0	4 (3%)

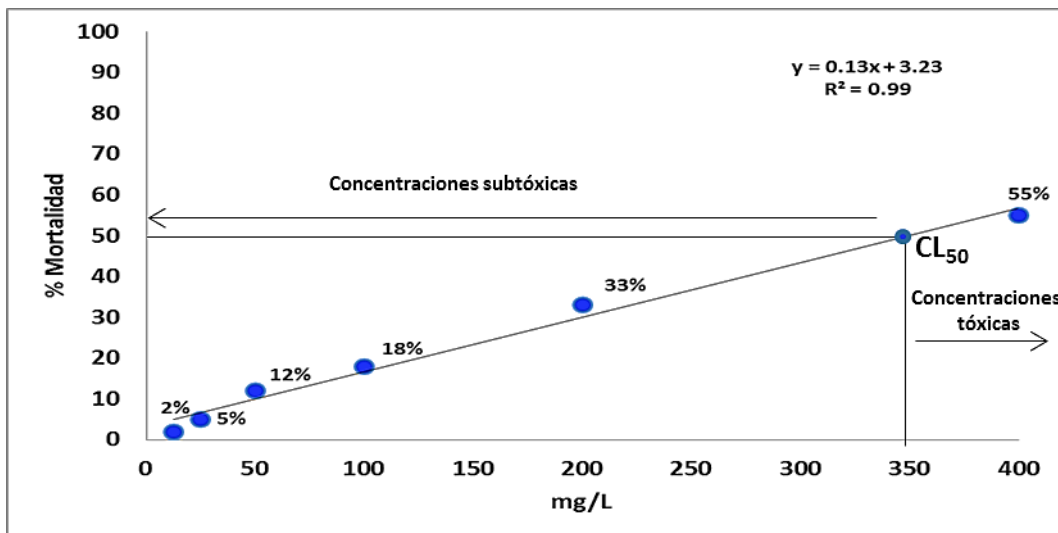


Fig. 21 Regresión lineal dosis-respuesta ácido acetilsalicílico

La validación de la CL_{50} , las concentraciones subtóxicas y tóxicas de la regresión lineal del fármaco anteriormente mencionado, indica que la interacción del tiempo de exposición y la concentración, no tiene diferencia significativa, por lo tanto, las variables influyen de manera independiente en la muerte de embriones, en donde $F(10,2)=16.667$, $p=0.05786$. El análisis de Dunnett, error MS= (cuadrado medio)= 1.0000, df (Grados de libertad) = 2.0000, demuestra que concentraciones superiores a la CL_{50} (350 mg/L) a las 24 horas, son consideradas

concentraciones tóxicas, como es el caso de la concentración de 400 mg/L. Este análisis valida que las concentraciones experimentales de 200, 100, 50, 25 y 12.5 mg/L son concentraciones inferiores a la CL₅₀, por lo tanto son concentraciones subtóxicas. Este es un fármaco de acción temprana (24 horas), pasado este tiempo las muertes disminuyen gradualmente.

7.3.2.3 Paracetamol

Las concentraciones experimentales elegidas fueron: 18.75, 37.5, 75, 150, 200 y 300 mg/L del reactivo; los embriones se revisaron a las 24, 48, 72 horas y se registró el número de embriones muertos por cada tratamiento (Tabla XIX); se observa que el mayor número de muertes (60 decesos) es en la concentración de 300 mg/L considerada la CL₁₀₀, en 200 mg/L es la concentración próxima a CL₇₅ en donde se observaron 44 muertes, 150 mg/L es la CL₅₀ en donde se contabilizaron un total de 26 muertes de embriones; se observa que las muertes incrementan conforme la concentración aumenta, mostrando una tendencia lineal y una $r^2=0.99$ (Tabla XIX y Fig.22); en el intersepto existe un 2.12% de muertes espontáneas en ausencia del fármaco y 0.34% en el incremento de muertes en presencia del fármaco por cada ppm; se determinó que la CL₅₀ correspondiente a la regresión lineal de dosis-respuesta con $R^2=0.99$ se localiza en 150 mg/L, concentración correspondiente a la experimental; concentraciones inferiores a la CL₅₀ se consideran concentraciones subtóxicas y concentraciones superiores a 150 mg/L se consideran tóxicas (Tabla XIX y Fig.22).

Tabla XIX. Parámetros para la prueba de toxicidad de paracetamol

Concentración mg/L	Embriones Utilizados	Embriones Muertos 24 horas	Embriones Muertos 48 horas	Embriones Muertos 72 horas	Porcentaje Total
18.75	60	4	0	0	4 (7 %)
37.5	60	3	3	1	7 (12 %)
75	60	9	3	0	12 (20 %)
150	60	21	5	0	26 (43 %)
200	60	37	3	4	44 (73 %)
300	60	47	13	0	60 (100 %)
Control Agua (C1)	180	3	2	1	6 (3 %)

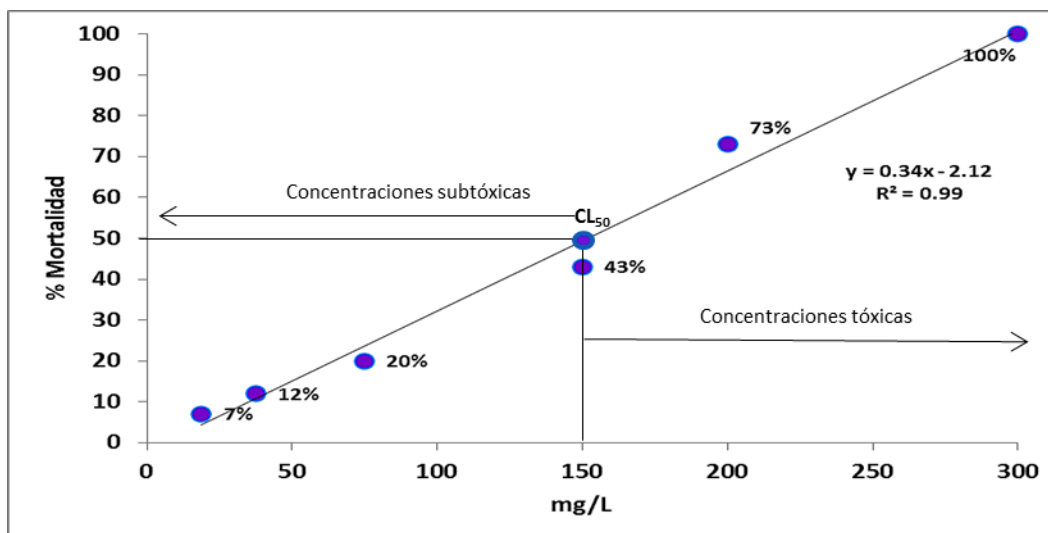


Fig. 22 Regresión lineal dosis-respuesta paracetamol

La validación de la CL_{50} , las concentraciones subtóxicas y tóxicas de la regresión lineal del fármaco anteriormente mencionado, indica que la interacción del tiempo de exposición y la concentración tiene diferencia significativa, por lo tanto, estas variables dependen una de la otra para ocasionar muerte de embriones, en donde $F(10,2) = 20.7289$, $p = 0.046876$. El análisis de Dunnett, $MS = 5.0000$, $df = 2.0000$, demuestra que concentraciones superiores a la CL_{50} (150 mg/L) a las 24 horas, son consideradas concentraciones tóxicas, como es el caso de la concentración de 200 y 300 mg/L. Este análisis valida que las concentraciones experimentales de 75, 37.5 y 18.75 mg/L son concentraciones inferiores a la CL_{50} por lo tanto son concentraciones subtóxicas. Este fármaco es de acción temprana (24 horas), pasado este tiempo, el efecto de mortalidad disminuye gradualmente.

7.3.2.4 Naproxeno

Las concentraciones experimentales elegidas fueron: 2.5, 5, 10, 20, 30 y 40 mg/L del reactivo; los embriones se revisaron a las 24, 48, 72 horas con la finalidad de contabilizar el total de embriones muertos en horas determinadas (Tabla XX); se observa que el mayor número de muertes (60 decesos) es en la concentración de 40 mg/L considerada la CL_{100} , en 30 mg/L es la concentración próxima a CL_{75} en donde se observaron 49 muertes, 20 mg/L es próxima a la CL_{50}

en donde se contabilizaron un total de 29 muertes de embriones (Tabla XX); se observa que las muertes incrementan conforme la concentración aumenta, mostrando una tendencia lineal y una $r^2=0.99$; en el intersepto hay un 1.40 % de muertes espontáneas en ausencia del fármaco y 2.51% en el incremento de muertes en presencia del fármaco por cada ppm; se estableció que la concentración próxima a la CL_{50} utilizada para experimentación para este fármaco es 20 mg/L, pero se determinó que la CL_{50} correspondiente a la regresión lineal de dosis-respuesta con $R^2=0.99$ es 19.5 mg/L; concentraciones inferiores a 19.5 mg/L se consideran concentraciones subtóxicas y concentraciones superiores a esta, se consideran tóxicas (Tabla XX y Fig.23).

Tabla XX. Parámetros para la prueba de toxicidad de naproxeno

Concentración mg/L	Embriones Utilizados	Embriones Muertos 24 horas	Embriones Muertos 48 horas	Embriones Muertos 72 horas	Porcentaje Total
2.5	60	4	0	0	4 (7 %)
5	60	5	4	0	9 (15 %)
10	60	2	8	6	16 (27 %)
20	60	14	11	7	29 (48 %)
30	60	19	23	4	49 (81 %)
40	60	22	26	2	60 (100 %)
C1 control Agua	180/6	6	6	0	12 (6.6 %)
C2 control etanol absoluto al 0.5%	180/6	7	3	0	10 (5.55 %)

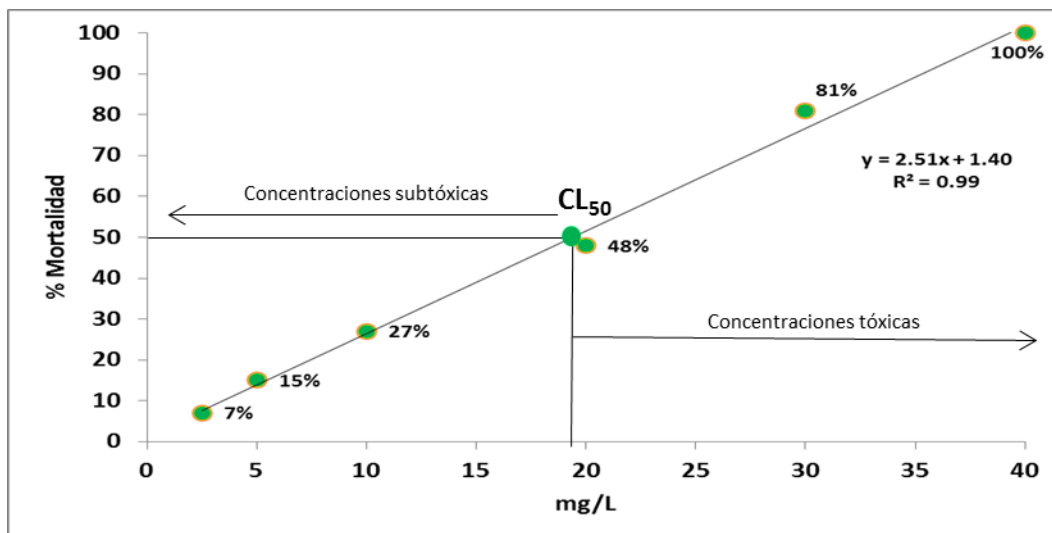


Fig. 23 Regresión lineal dosis-respuesta naproxeno

La validación de la CL_{50} , las concentraciones subtóxicas y tóxicas de la regresión lineal del fármaco anteriormente mencionado, indica que la interacción del tiempo de exposición y la concentración tiene diferencia significativa, por lo tanto, estas variables dependen una de la otra para ocasionar muerte de embriones, en donde $F(13,3) = 16.6667$, $p = 0.020159$. Se comprueba el supuesto de homogeneidad de las varianzas. El análisis de Dunnett, $MS = 5.0000$, $df = 2.0000$, demuestra que concentraciones superiores a la CL_{50} (19.5-20 mg/L), como es el caso de 40 y 30 mg/L a las 24 y 48 horas, son concentraciones tóxicas, el efecto comienza a las 24 horas de exposición, posteriormente a las 48 horas incrementa la mortalidad en ambas concentraciones, pasado este tiempo, el número de muertes decrece. Este análisis valida que las concentraciones experimentales de 10, 5 y 2.5 mg/L son concentraciones inferiores a la CL_{50} por lo tanto son concentraciones subtóxicas. El naproxeno es un fármaco en donde el efecto tóxico comienza a las 24 horas y va incrementando hasta las 48 horas, consumiéndose este tiempo, el efecto de mortalidad disminuye gradualmente.

7.3.2.5 Diclofenaco

Las concentraciones experimentales elegidas fueron: 2.5, 5, 10, 20, 30 y 50 mg/L del reactivo; los embriones se revisaron a las 24, 48, 72 horas con la finalidad de contabilizar el total de embriones muertos en estas horas determinadas; se observa que el mayor número de muertes (60 decesos), es en la concentración de 50 mg/L, considerada la CL_{100} , en 30 mg/L es la concentración próxima a CL_{75} , en donde se observaron 47 muertes, 20 mg/L es próxima a la CL_{50} , en donde se contabilizaron un total de 31 muertes de embriones (Tabla XXI); se observa que las muertes incrementan conforme la concentración aumenta, mostrando una tendencia lineal y una $r^2 = 0.99$; en el intersección hay un 4.22% de muertes espontáneas en ausencia del fármaco y 2.09% en el incremento de muertes en presencia del fármaco por cada ppm; se estableció que la concentración próxima a la CL_{50} utilizada para experimentación para este fármaco es 20 mg/L, pero se determinó que la CL_{50} correspondiente a la regresión lineal de dosis-respuesta con $R^2 = 0.96$ es 22 mg/L; concentraciones inferiores a la CL_{50} se consideran concentraciones subtóxicas y concentraciones superiores se consideran tóxicas (Tabla XXI y Fig.24).

Tabla XXI. Parámetros para la prueba de toxicidad de diclofenaco

Concentración mg/L	Embriones Utilizados	Embriones Muertos 24 horas	Embriones Muertos 48 horas	Embriones Muertos 72 horas	Porcentaje Total
2.5	60	3	0	0	3 (5 %)
5	60	3	2	2	7 (12 %)
10	60	2	3	9	14 (23 %)
20	60	2	10	17	31 (52 %)
30	60	4	15	28	47 (78 %)
50	60	4	22	34	60 (100 %)
0 control Agua	180	7	3	0	10 (6 %)
0 control etanol absoluto al 0.5%	180	6	6	0	12 (7 %)

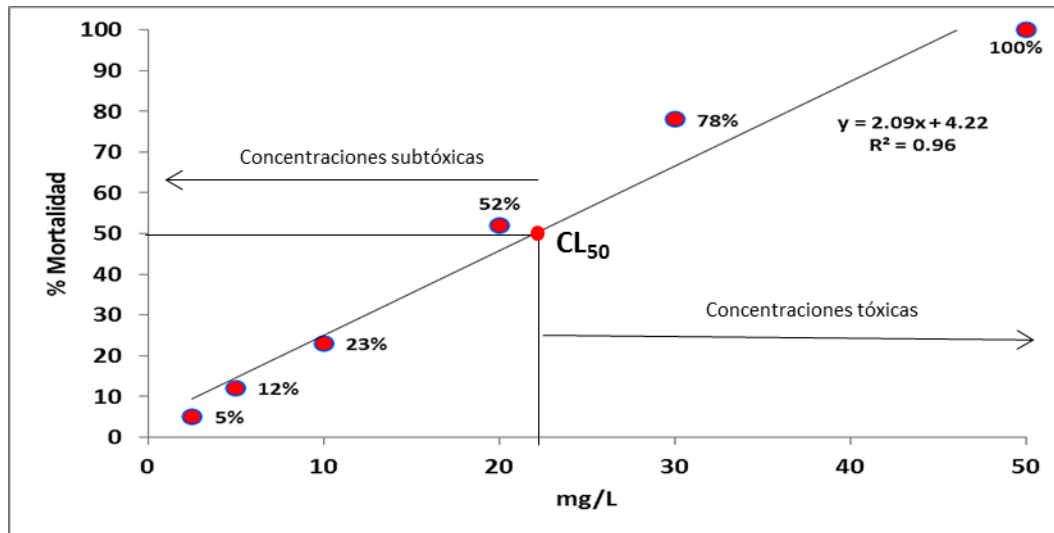


Fig. 24 Regresión lineal dosis-respuesta diclofenaco

La validación de la CL_{50} , las concentraciones subtóxicas y tóxicas de la regresión lineal del fármaco anteriormente mencionado, indica que la interacción del tiempo de exposición y la concentración tiene diferencia significativa, por lo tanto, estas variables dependen una de la otra para ocasionar muerte de embriones, en donde $F(13,3) = 35.9708$, $p = 0.006589$. Se comprueba el supuesto de homogeneidad de las varianzas. El análisis de Dunnett, $MS = 1.6667$, $df = 3.0000$, demuestra que concentraciones superiores (50 y 30 mg/L), a la CL_{50} (22 mg/L) a las 48 y 72 horas, son consideradas concentraciones tóxicas, el efecto comienza a las 48 horas de exposición, posteriormente a las 72 horas incrementa la mortalidad en ambas concentraciones.

Este análisis valida que las concentraciones experimentales de 20, 10, 5 y 2.5 mg/L son concentraciones inferiores a la CL₅₀ por lo tanto son concentraciones subtóxicas. El diclofenaco es de efecto tóxico retardado, ampliando su efecto a las 72 horas, considerado un fármaco en donde el efecto de toxicidad comienza a las 48 horas y va incrementando gradualmente pasado este tiempo de exposición.

7.3.2.6 Ibuprofeno

Las concentraciones experimentales elegidas fueron: 1.5, 3, 6, 12, 25 y 35 mg/L del reactivo; los embriones se revisaron a las 24, 48, 72 horas, con la finalidad de contabilizar el total de embriones muertos en estas horas determinadas; se observa que el mayor número de muertes (60 decesos) es en la concentración de 35 mg/L, considerada la CL₁₀₀, 25 mg/L es la concentración próxima a CL₇₅, en donde se observaron 43 muertes, 12 mg/L es próxima a la CL₅₀, en donde se contabilizaron un total de 32 muertes de embriones (Tabla XXII); se observa que las muertes incrementan conforme la concentración aumenta, mostrando una tendencia lineal y una $r^2=0.99$; en el intersepto hay un 2.22% de muertes espontáneas en ausencia del fármaco y 2.86% en el incremento de muertes en presencia del fármaco por cada ppm; se estableció que la concentración próxima a la CL₅₀ utilizada para experimentación para este fármaco es 12 mg/L, pero se determinó que la CL₅₀ correspondiente a la regresión lineal de dosis-respuesta con $R^2=0.96$ es 16.8 mg/L; las concentraciones de 1.5, 3, 6 mg/L son consideradas concentraciones subtóxicas (Tabla XXII y Fig.25).

Tabla XXII. Parámetros para la prueba de toxicidad de ibuprofeno

Concentración mg/L	Embriones Utilizados	Embriones Muertos 24 horas	Embriones Muertos 48 horas	Embriones Muertos 72 horas	Porcentaje Total
1.5	60	3	0	0	3 (5 %)
3	60	5	0	0	5 (8 %)
6	60	2	3	7	12 (20 %)
12	60	5	11	16	32 (53 %)
25	60	7	10	26	43 (71 %)
35	60	15	33	12	60 (100 %)
0 control Agua	180	5	3	0	8 (4 %)
0 control etanol absoluto al 0.5%	180	5	6	0	11 (6 %)

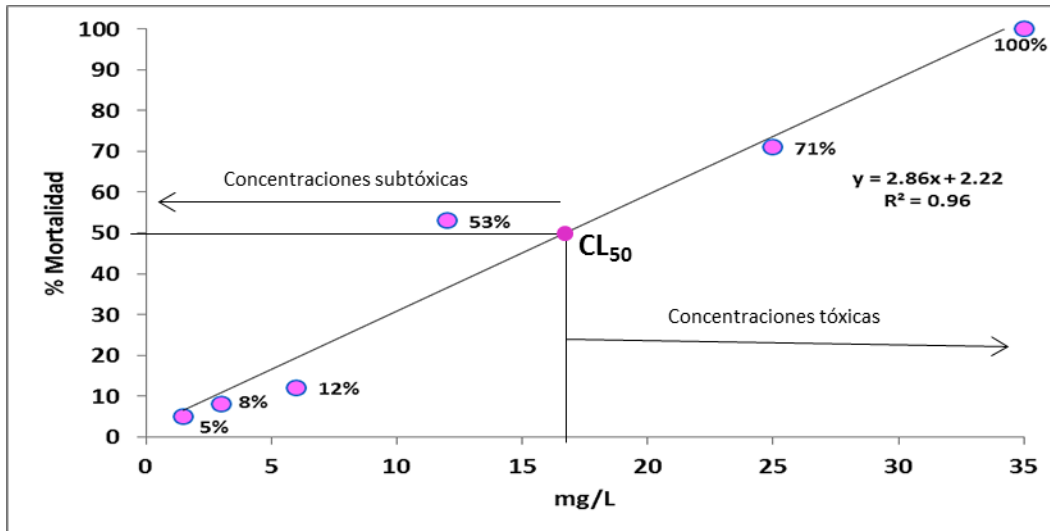


Fig. 25 Regresión lineal dosis-respuesta ibuprofeno

La validación de la CL₅₀, las concentraciones subtóxicas y tóxicas de la regresión lineal del fármaco anteriormente mencionado, indica que la interacción del tiempo de exposición y la concentración tiene diferencia significativa, por lo tanto, estas variables dependen una de la otra para ocasionar muerte de embriones, en donde $F(12,3) = 31.6713$, $p = 0.007941$. Se comprueba el supuesto de homogeneidad de las varianzas. El análisis de Dunnett, $MS = 1.5000$, $df = 3.0000$, demuestra que concentraciones superiores (35 y 25 mg/L), a la CL₅₀ (16.8 mg/L), a las 24, 48 y 72 horas, son consideradas concentraciones tóxicas, el efecto comienza a las 24 horas de exposición, posteriormente a las 48 horas se observa el mismo grado de mortalidad y posteriormente incrementa a las 72 horas. Este análisis valida que las concentraciones experimentales de 12, 6, 3 y 1.5 mg/L son concentraciones inferiores a la CL₅₀ por lo tanto son concentraciones subtóxicas. Es un fármaco muy inestable y agresivo, ya que puede mostrar diferentes incrementos de mortalidad a los diferentes tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas).

7.3.3 Daño en columna vertebral (DarTa) de fármacos AINEs

7.3.3.1 Ácido acetilsalicílico

A partir de la CL_{50} (350 mg/L), se obtuvieron cuatro dosis subtóxicas experimentales, para los tratamientos de teratogénesis 25, 50, 100, 200 mg/L, además de la 400 mg/L considerada como la concentración experimental, más cercana a la CL_{50} real.

En la tabla XXIII, se observa que el número total de malformaciones fue de 78, las de mayor frecuencia fueron las sencillas (59), seguida de aleta caudal (9), curvas (6), gancho (2) y presentándose un solo caso dobles y ausencia de cuerpo; la presencia de malformaciones múltiples y en espiral no fueron observadas, de manera adicional se midieron los indicadores de alteración en la pigmentación y malformaciones en el sistema óseo las cuales no fueron observados. La concentración en donde se obtuvo mayor número de malformaciones fue en 400 mg/L perteneciente a la CL_{50} , con un total de 27, siendo las de mayor frecuencia las sencillas (19), tres en aleta caudal, tres curvas, una doble y una tipo gancho; en la concentración de 200 mg/L se obtuvo un total de 19, siendo la de mayor frecuencia las sencillas con 15, dos curvas, una en aleta caudal y una ausencia de cuerpo; en la concentración de 100 mg/L, se observaron un total de 13, las de mayor frecuencia, las sencillas con ocho, aleta caudal con cuatro y una malformación curva; en 50 mg/L, se observaron un total de 12, con mayor frecuencia las sencillas, con 11 y una en forma de gancho; en 25 mg/L, un total de seis, con mayor frecuencia las sencillas con cinco y una de aleta caudal, finalmente en el control solo se observó una malformación sencilla. Las concentraciones sombreados con gris, son las que mostraron diferencia significativa con respecto al control, por lo tanto se asume que son concentraciones de efecto teratogénico, de manera más detallada se observa posteriormente, el análisis estadístico en la tabla XXIV y fig. 26.

Tabla XXIII. Frecuencia y tipo de malformaciones en columna vertebral por exposición a ácido acetilsalicílico

[mg/L] 72 hrs *expo.	Embriones Utilizados	MALFORMACIONES EN COLUMNA VERTEBRAL									*Alter. Pig.	*Malf. Sist. Óseo
		*S	*D	*M	*C	*AC	*G	*ES	*Aus. Cuerpo	Total		
25	150/5	5	0	0	0	1	0	0	0	6	0	0
50	150/5	11	0	0	0	0	1	0	0	12	0	0
100	150/5	8	0	0	1	4	0	0	0	13	0	0
200	150/5	15	0	0	2	1	0	0	1	19	0	0
CL ₅₀ 400	150/5	19	1	0	3	3	1	0	0	27	0	0
control H ₂ O	150/5	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		TOTAL DEL TIPO DE MALFORMACIONES								78		
		59	1	0	6	9	2	0	1			

*expo: exposición; S: sencilla; D: doble; M: múltiple; C: curva; ES: Espiral, AC: aleta caudal; G: Gancho; Aus. Cuerpo: Ausencia de cuerpo; Alter. Pig: alteración de pigmento Malf. Sist.: malformación sistema

El análisis de Kruskal-Wallis, exhibe diferencias significativas entre tratamientos, en donde, H (5, N= 30) =20.77608, p =.0009; al evidenciar diferencias significativas, en la tabla XXIV se observa la prueba de U de Mann-Whitney con una significancia de 0.05, en donde la hipótesis nula se rechaza cuando T₀ es menor a 5 o T₀ es mayor a 20, mostrando las diferencias entre los diferentes tratamientos con respecto a las malformaciones existentes; los resultados del análisis de U, se esquematizan en grupos alfabéticos, en donde se visualizan las concentraciones que tienen diferencias significativas entorno a daño teratogénico, para mejor comprensión (Fig. 26).

Tabla XXIV. Prueba U Mann-Whitney de ácido acetilsalicílico

Tratamiento U/* (T0)	C1	25	50	100	200	400
C1			*	*	*	*
25	17			*	*	*
50	21	6				*
100	25	1.5	11.5			*
200	25	2	8.5	9		
400	25	0	1	1	5	
		U(0.05, 5) T _{0.5} =5			U(0.975,2) T _{0.975} = 20	

* p < 0.05

Los diagramas de cajas o bigotes, son gráficos basados en cuartiles mediante el cual se visualiza un conjunto de datos. Son estadígrafos de posición que dividen al total de observaciones debidamente ordenadas en cuatro partes de igual tamaño. Suministra información sobre los valores mínimos y máximos, los cuartiles Q_1 , la mediana (Q_2) y Q_3 y sobre la existencia de valores atípicos y la simetría de la distribución. Si la mediana no está en el centro del rectángulo, la distribución no es simétrica. El Q_1 , indica que el 25 % de los datos es menor o igual que el cuartil calculado y el otro 75 % de los datos es mayor; el Q_2 indica que el 50 % de los datos es menor o igual que la mediana y el otro 50 % es mayor que la mediana; el Q_3 indica que el 75 % de los datos es menor o igual que el calculado y 25 % es mayor que el Q_3 . En la fig. 26, el grupo **a** (400 mg/L) difiere significativamente de los demás grupos, con excepción del grupo **ab** (200 mg/L), estos dos grupos muestran el mismo efecto teratogénico; el grupo **ab** muestra el mismo efecto teratogénico del grupo **a, b** (100 mg/L) y **bc** (50mg/L), pero este muestra diferencia con el grupo **cd** (25 mg/L) y **d** (control agua); el grupo **b** muestra diferencia significativa con el grupo **a, cd y d** pero no hay diferencia con el grupo **ab y bc**; el grupo **bc**, se observa que difiere de los grupos **a y d** pero no muestra diferencia con los grupos **ba, b y cd**, el grupo **cd** muestra diferencia con los demás grupos con excepción del grupo **d** perteneciente al control. La mayoría de las concentraciones probadas con excepción de 25 mg/L perteneciente al grupo **cd**, difieren significativamente del control, lo cual establece que el grupo **a, ba, b y bc**, son concentraciones con efecto teratogénico, en el biomarcador de columna vertebral. En comparación con los cinco fármacos probados, el ácido acetilsalicílico es el fármaco que en concentraciones elevadas (400, 200, 100 y 50 mg/L) presenta efecto teratogénico en columna vertebral.

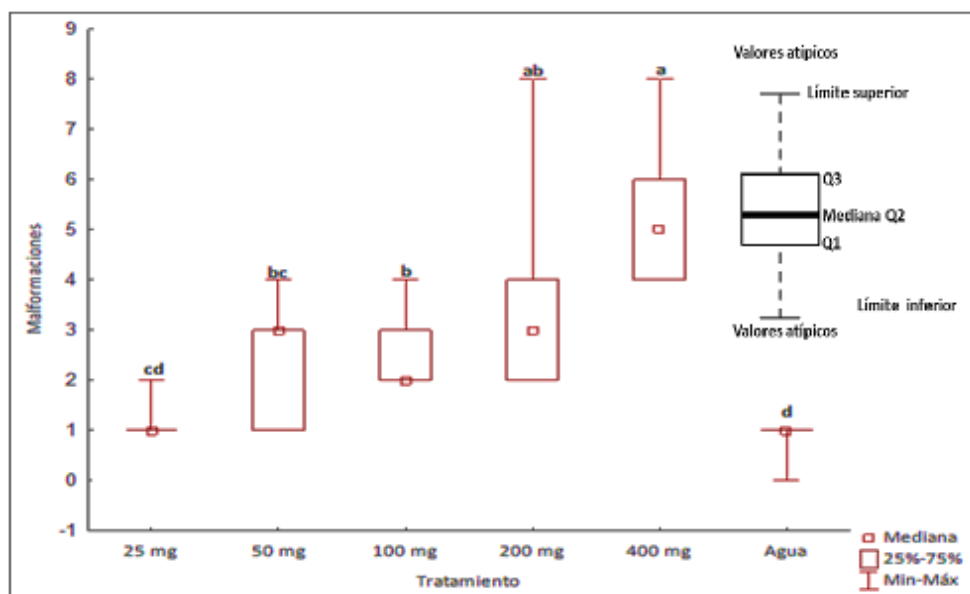


Fig. 26 Diagramas de cajas y bigotes del efecto teratogénico de ácido acetilsalicílico

7.3.3.2 Paracetamol

A partir de la CL_{50} (150 mg/L), se obtuvieron tres concentraciones subtóxicas experimentales, para los tratamientos de teratogénesis 75, 37.5, 18.5 mg/L, además de la CL_{50} (150 mg/L).

En la tabla XXV, se observa que el número total de malformaciones de paracetamol fue de 76, las de mayor frecuencia fueron las sencillas (42), seguida de las de gancho (5), curvas (4), múltiple (1), ausencia de cuerpo (1); la presencia de dobles y en espiral no fueron observadas, de manera adicional se midieron los indicadores de alteración en la pigmentación y malformaciones en el sistema óseo, los cuales no fueron observados. La concentración en donde se obtuvo mayor número de malformaciones fue en la concentración de 150 mg/L, con un total de 28, las de mayor frecuencia, las sencillas (17), nueve en aleta caudal, una curva y una múltiple; en 75 mg/L se observaron un total de 24, con mayor frecuencia las sencillas con 13, aleta caudal 10 y una de ausencia de cuerpo; en 37.5 mg/L, se observaron un total de 16, con mayor frecuencia las sencillas, con seis, seguida de tipo gancho con cinco, tres curvas y dos de aleta caudal; en 18.5 mg/L, se identificaron un total de siete, con mayor frecuencia las sencillas, con cinco y dos en aleta caudal y finalmente el control, en donde solo se observó, una malformación sencilla. Las concentraciones sombreadas con gris, son las que mostraron

diferencia significativa con respecto al control, por lo tanto se asume que son concentraciones de efecto teratogénico, de manera más detallada, se observa posteriormente el análisis estadístico en la tabla XXVI y fig. 27.

Tabla XXV. Frecuencia y tipo de malformaciones por exposición a paracetamol

[mg/L] 72 hrs * expo.	Embriones utilizados	MALFORMACIONES EN COLUMNA VERTEBRAL									* Alter. Pig.	* Malf. Sist. Óseo	
		* S	* D	* M	* C	* AC	* G	* ES	* Aus. cuerpo	Total			
18.75	150/5	5	0	0	0	2	0	0	0	7	0	0	
37.5	150/5	6	0	0	3	2	5	0	0	16	0	0	
75	150/5	13	0	0	0	10	0	0	1	24	0	0	
CL₅₀150	150/5	17	0	1	1	9	0	0	0	28	0	0	
control H ₂ O	150/5	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
		TOTAL DEL TIPO DE MALFORMACIONES									76		
		42	0	1	4	23	5	0	1				

*expo: exposición; S: sencilla; D: doble; M: múltiple; C: curva; ES: Espiral, AC: aleta caudal; G: Gancho; Aus. Cuerpo: Ausencia de cuerpo; Alter. Pig: alteración de pigmento Malf. Sist.: malformación sistema

El análisis de Kruskal-Wallis, exhibe diferencias significativas entre tratamientos, en donde, $H(4, N= 25) = 15.76355 p = .0034$; al evidenciar diferencias significativas, en la tabla XXVI se observa el análisis de U de Mann-Whitney, que muestra una significancia de 0.05 y la hipótesis nula se rechaza cuando T_0 es menor a 5 o T_0 es mayor a 20, mostrando las diferencias entre los diferentes tratamientos con respecto a las malformaciones existentes; los resultados de la tabla XXVI, se esquematizan en grupos alfabéticos en donde se visualizan las concentraciones que tienen diferencias significativas entorno a daño teratogénico, para mejor comprensión (Fig. 27).

Tabla XXVI. Prueba U Mann-Whitney de paracetamol

Tratamiento U/* (T0)	C1	18.75	37.5	75	150
C1				*	*
18.75	16.5			*	*
37.5	23	5.5			
75	25	0.5	5		
150	25	1.5	6.5	10.5	
		U(0.05, 5)		U(0.975, 2)	
* p < 0.05		T _{0.5} =5		T _{0.975} = 20	

En la fig. 27, el grupo **a** (150 y 75 mg/L) difiere significativamente del grupo **b** (37.7, 18.75 mg/L y el control agua); las concentraciones del grupo **a** se consideran concentraciones teratogénicas y entre ellas no existe diferencia significativa entorno a daño teratogénico en el biomarcador columna vertebral; en el caso del grupo **b** (37.7, 18.75 mg/L y el control), no se considera un grupo con efecto teratogénico.

En comparación con los cinco fármacos probados, el paracetamol es el fármaco consecuente del ácido acetilsalicílico en concentraciones elevadas (150, 75 y 37.5 mg/L), en donde se presenta efecto teratogénico en columna vertebral.

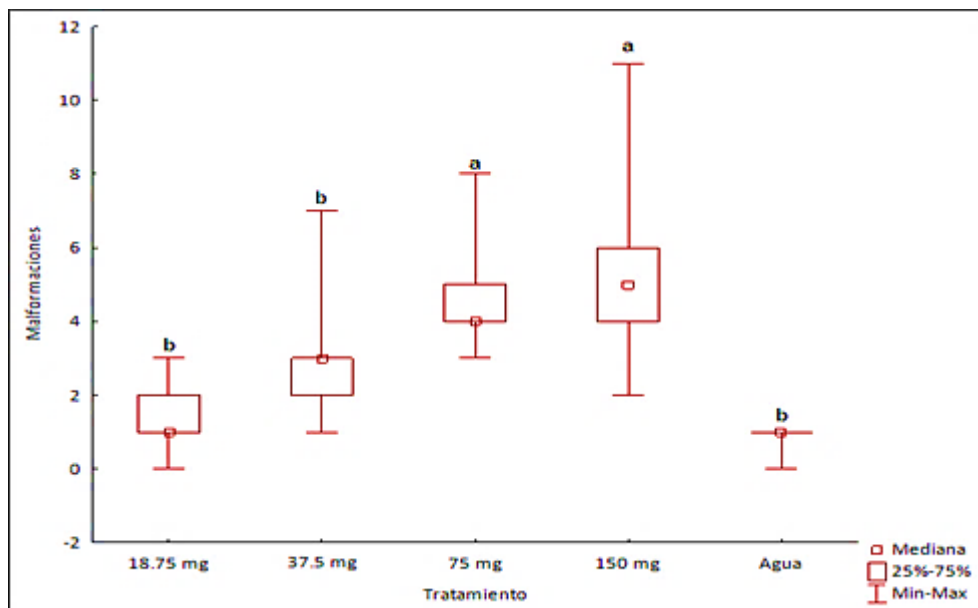


Fig. 27 Diagramas de cajas y bigotes del efecto teratogénico de paracetamol

7.3.3.3 Diclofenaco

A partir de la CL_{50} (22 mg/L), se obtuvieron tres dosis subtóxicas experimentales, para los tratamientos de teratogénesis 5, 10 y 25 mg/L, además de la 20 mg/L considerada como la concentración experimental, más cercana a la CL_{50} real.

En la tabla XXVII, se observa que el número total de malformaciones de diclofenaco fue de 71, las de mayor frecuencia fueron las sencillas (36), seguida de las curvas (12), en forma de gancho (11), dobles (5), aleta caudal (4) y múltiples (3); la presencia de malformaciones en espiral y la ausencia de cuerpo no fueron observadas, de manera adicional se midieron los indicadores de alteración en la pigmentación y malformaciones en el sistema óseo, indicadores que no fueron observados. La concentración en donde se obtuvo mayor número fue en 20 mg/L perteneciente a la CL_{50} con un total de 27, siendo la de mayor frecuencia las sencillas (9), seis de gancho, cinco curvas, tres dobles y dos múltiples; en 10 mg/L, se observaron un total de 24, donde la mayoría fueron sencillas (13), cuatro curvas y cuatro tipo gancho, una doble, una múltiple y una en aleta caudal; en 5mg/L se observaron un total de 13, con una frecuencia mayor entorno a las sencillas con nueve, una múltiple, una doble, una aleta caudal y una en forma de gancho; en 2.5 mg/L se observó un total de cuatro, siendo las sencillas y las curvas las persistentes, con dos respectivamente y finalmente en los controles se observó una malformación sencilla en el control agua y en el control de etanol al 0.5% dos malformaciones. Las concentraciones sombreadas con gris, son las que mostraron diferencia significativa en el análisis estadístico con respecto a los controles, por lo tanto se asume que son concentraciones de efecto teratogénico, de manera más detallada se observa el análisis estadístico en la tabla XXVIII y fig. 28.

Tabla XXVII. Frecuencia y tipo de malformaciones en columna vertebral de acuerdo a la concentración de exposición de diclofenaco

[mg/L] 72 hrs * expo.	Embriones utilizados	MALFORMACIONES EN COLUMNA VERTEBRAL									* Alter. Pig.	* Malf. Sist. Óseo	
		* S	* D	* M	* C	* AC	* G	* ES	* Aus. Cuerpo	Total			
2.5	150/5	2	0	0	2	0	0	0	0	4	0	0	
5	150/5	9	1	0	1	1	1	0	0	13	0	0	
10	150/5	13	1	1	4	1	4	0	0	24	0	0	
CL ₅₀ 20	150/5	9	3	2	5	2	6	0	0	27	0	0	
Control H ₂ O	120/4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
control etanol al 0.5%	120/4	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	
		TOTAL DEL TIPO DE MALFORMACIONES									71		
		36	5	3	12	4	11	0	0				

*expo: exposición; S: sencilla; D: doble; M: múltiple; C: curva; ES: Espiral, AC: aleta caudal; G: Gancho; Aus. C: Ausencia de cuerpo; Alter. Pig: alteración de pigmento Malf. Sist: malformación sistema

El análisis de Kruskal-Wallis, exhibe diferencias significativas entre tratamientos, en donde, $H(5, N= 28) = 24.57248$ $p = .0002$; al evidenciar diferencias significativas, en la tabla XXVIII se observa el análisis de U de Mann-Whitney con una significancia de 0.05 y la hipótesis nula se rechaza cuando T_0 es menor a 5 o T_0 es mayor a 20; en el caso del control de etanol al 0.5%, la hipótesis nula se rechaza cuando T_0 es menor a 2 o T_0 es mayor a 13, mostrando las diferencias entre los diferentes tratamientos con respecto a las malformaciones existentes

Los resultados de la tabla XXVIII se esquematiza en grupos alfabéticos en donde se visualizan las concentraciones que tienen diferencias significativas entorno a daño teratogénico, para mejor comprensión (Fig. 28).

Tabla XXVIII. Prueba U Mann-Whitney de diclofenaco

Tratamiento U/* (T0)	C1	2.5	5	10	20	C2
C1			*	*	*	
2.5	7.5		*	*	*	
5	25	4.5				*
10	25	0	9			*
20	25	4	13.5	12.5		*
* p < 0.05	U(0.05, 5) T _{0.5} = 5		U(0.975, 2) T _{0.975} = 20			
Tratamiento U/* (T0)	C1	2.5	5	10	20	C2
C2	11	10	22	24	24	
* p < 0.05	U(0.05, 5) T _{0.5} = 2		U(0.975, 2) T _{0.975} = 13			

En la fig. 28, el grupo **a** (20, 10 y 5 mg/L) difiere significativamente del grupo **b** (2.5 mg/L, el control agua y el control etanol al 0.5%) por lo tanto las concentraciones del grupo **a** se consideran concentraciones teratogénicas y entre estas no existe diferencia significativa con respecto al daño teratogénico provocado; en el caso del grupo **b** no existe diferencia significativa entre el control agua, el control con etanol y la concentración de 2.5 mg/L, este grupo no ocasiona efecto teratogénico, así mismo, se comprueba que el control de etanol al 0.5% no ocasiona daño en columna vertebral.

En comparación con los cinco fármacos probados, el diclofenaco es el fármaco consecuente del paracetamol en concentraciones bajas (20, 10 y 5 mg/L) en donde se presenta efecto teratogénico en columna vertebral.

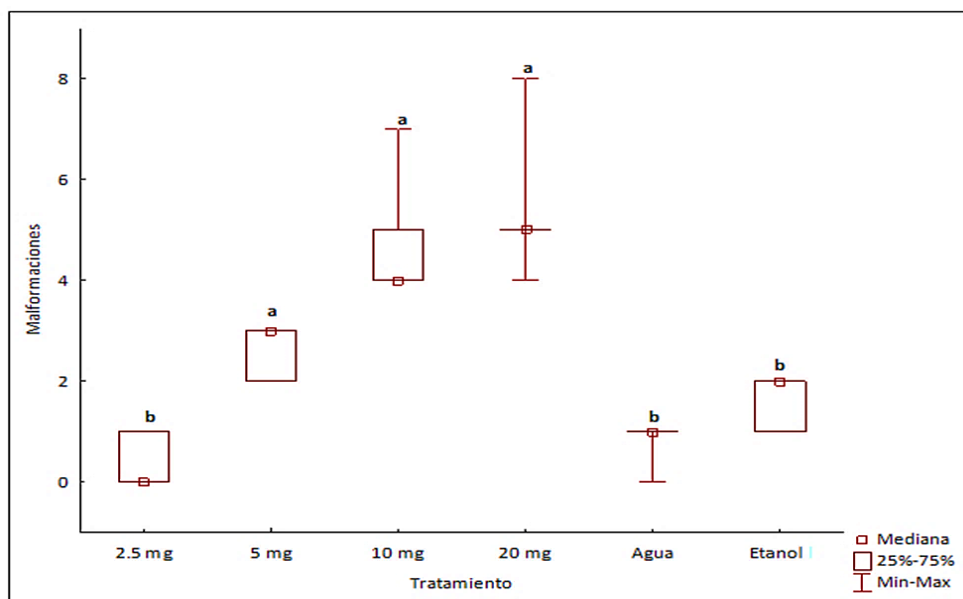


Fig. 28 Diagramas de cajas y bigotes del efecto teratogénico diclofenaco

7.3.3.4 Naproxeno

A partir de la CL_{50} (19.5 mg/L), se obtuvieron tres dosis subtóxicas experimentales, para los tratamientos de teratogénesis 5, 10 y 25 mg/L, además de la 20 mg/L considerada como la concentración experimental, más cercana a la CL_{50} real.

En la tabla XXIX, se observa que el número total de malformaciones fue de 52, las de mayor frecuencia fueron las sencillas (33), seguida de aleta caudal (8), curvas (7), dobles (3) y una múltiple; en espiral, gancho y la ausencia de cuerpo no fueron observadas, de manera adicional se midieron los indicadores de alteración en la pigmentación y malformaciones en el sistema óseo, estos no fueron observados. La concentración en donde se obtuvo mayor número de malformaciones fue en 10 mg/L, con un total de 19, siendo la de mayor frecuencia las sencillas (13), dos en forma curva y en aleta caudal, una doble y una múltiple; en la concentración de 5 mg/L se observaron un total de 15, las sencillas de mayor frecuencia con nueve, cuatro en aleta caudal, una curva y una doble; en 20 mg/L, se observaron 13, con mayor frecuencia las sencillas con siete, cuatro curvas, una doble y una en aleta caudal; en 2.5 mg/L se observaron un total de cuatro, tres sencillas y una en aleta caudal. En los controles se observó una malformación sencilla para el control agua y en el control con etanol al 0.5%, dos malformaciones. Las

concentraciones sombreadas con gris, son las que mostraron diferencia significativa en el análisis estadístico con respecto a los controles, por lo tanto se asume que son concentraciones de efecto teratogénico, de manera más detallada se observa el análisis estadístico en la tabla XXX y fig. 29.

Tabla XXIX. Frecuencia y tipo de malformaciones en columna vertebral de acuerdo a la concentración de exposición de naproxeno

[mg/L] 72 hrs * expo.	Embriones utilizados	MALFORMACIONES EN COLUMNA VERTEBRAL									* Alter. Pig.	* Malf. Sist. Óseo	
		* S	* D	* M	* C	* AC	* G	* ES	* Aus. Cuerpo	Total			
2.5	150/5	3	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	
5	150/5	9	1	0	1	4	0	0	0	15	0	0	
10	150/5	13	1	1	2	2	0	0	0	19	0	0	
CL ₅₀ 20	150/5	7	1	0	4	1	0	0	0	13	0	0	
Control H ₂ O	120/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
control 0.5% etanol	120/4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
		TOTAL DEL TIPO DE MALFORMACIONES									52		
			3	1	7	8	0	0	0				
*expo: exposición; S: sencilla; D: doble; M: múltiple; C: curva; ES: Espiral, AC: aleta caudal; G: Gancho; Aus. C: Ausencia de cuerpo; Alter. Pig: alteración de pigmento Malf. Sist: malformación sistema													

El análisis de Kruskal-Wallis, exhibe diferencias significativas entre tratamientos, en donde, $H(5, N=28) = 13.98875$ $p = .0157$; al evidenciar diferencias significativas, en la tabla XXX se observa el análisis de U de Mann-Whitney con una significancia de 0.05 y la hipótesis nula se rechaza cuando T_0 es menor a 5 o T_0 es mayor a 20; en el caso del control de etanol al 0.5%, la hipótesis nula se rechaza cuando T_0 es menor a 2 o T_0 es mayor a 13, mostrando las diferencias entre los diferentes tratamientos con respecto a las malformaciones existentes

Los resultados de la tabla XXX se esquematiza en grupos alfabéticos en donde se visualizan las concentraciones que tienen diferencias significativas entorno a daño teratogénico, para mejor comprensión (Fig. 29).

Tabla XXX. Prueba U Mann-Whitney de naproxeno

Tratamiento U/* (T0)	C1	2.5	5	10	20	C2
C1			*	*	*	
2.5	12		*	*	*	
5	20.5	0				*
10	25	0	9			*
20	21	0	13.5	18		*
* $p < 0.05$		U(0.05, 5) $T_{0.5}=5$		U(0.975,2) $T_{0.975}=20$		
Tratamiento U/* (T0)	C1	2.5	5	10	20	C2
C2	11	20	24	24	19	
* $p < 0.05$		U(0.05, 5) $T_{0.5}=2$		U(0.975,2) $T_{0.975}=13$		

En la fig. 29, se muestran las diferencias significativas entre los distintos grupos de tratamientos; el grupo **a** (20, 10 y 5 mg/L) difiere significativamente del grupo **b** (2.5 mg/L, el control agua y el control adicionado con etanol) por lo tanto las concentraciones del grupo **a** se consideran concentraciones teratogénicas y entre estas no existe diferencia significativa con respecto al daño teratogénico provocado; en el caso del grupo **b** no existe diferencia significativa entre el control agua, el control etanol y la concentración de 2.5 mg/L, este grupo no ocasiona efecto teratogénico, así mismo, se comprueba que el control de etanol no ocasiona daño en columna vertebral.

En comparación con los cinco fármacos probados, el naproxeno de igual manera que diclofenaco en concentraciones de (20, 10 y 5 mg/L) es donde se presenta efecto teratogénico en columna vertebral.

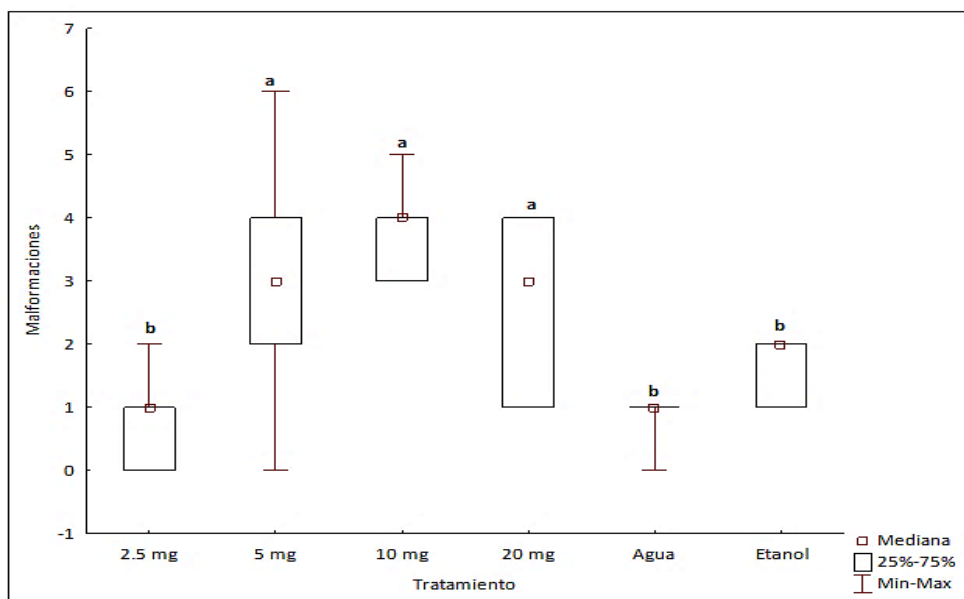


Fig. 29 Diagramas de cajas y bigotes del efecto teratogénico de naproxeno

7.4.3.4 Ibuprofeno

A partir de la CL_{50} (16.8 mg/L), se obtuvieron tres dosis subtóxicas experimentales, para los tratamientos de teratogénesis 1.5, 3 y 6 mg/L, además de la 12 mg/L considerada como la concentración experimental, más cercana a la CL_{50} real.

En la tabla XXXI, se observa que el número total de malformaciones fue de 56, las de mayor frecuencia fueron las sencillas (33), seguida de las de aleta caudal (14), curvas (6), gancho (2) y una doble; la presencia de malformaciones en espiral, múltiple y la ausencia de cuerpo no fueron observadas, de manera adicional se midieron los indicadores de alteración en la pigmentación y malformaciones en el sistema óseo las cuales no fueron observados. La concentración en donde se obtuvo mayor número de malformaciones fue en la concentración de 6 mg/L perteneciente a una de las dosis subtóxicas con un total de 23 malformaciones, siendo la de mayor frecuencia las sencillas (15), tres respectivamente en forma curva y aleta caudal y dos tipo gancho; en la concentración de 12 mg/L se observaron un total de 20 malformaciones siendo las sencillas las de mayor frecuencia con 10, seis en aleta caudal, dos curvas, una doble y una ausencia de cuerpo; la concentración de 3 mg/L presentó nueve en total, la mayor frecuencia fueron las sencillas con cinco, tres de aleta caudal y una curva; la

concentración de 1.5 mg/L presentó un total de cuatro, dos sencillas y dos aleta caudal y finalmente en los controles se observó una malformación sencilla en el control agua y en el control con etanol al 0.5% ninguna malformación. Las concentraciones sombreadas con gris, son las que mostraron diferencia significativa en el análisis estadístico con respecto a los controles, por lo tanto se asume que son concentraciones de efecto teratogénico, de manera más detallada se observa el análisis estadístico en tabla XXXII y la fig. 30.

Tabla XXXI. Frecuencia y tipo de malformaciones en columna vertebral de acuerdo a la concentración de exposición de ibuprofeno

[mg/L] 72 hrs * expo.	Embriones utilizados	MALFORMACIONES EN COLUMNA VERTEBRAL									* Alter. Pig.	* Malf. Sist. Óseo	
		* S	* D	* M	* C	* AC	* G	* ES	* Aus. Cuerpo	Total			
1.5	150/5	2	0	0	0	2	0	0	0	4	0	0	
3	150/5	5	0	0	1	3	0	0	0	9	0	0	
6	150/5	15	0	0	3	3	2	0	0	23	0	0	
CL₅₀12	150/5	10	1	0	2	6	0	0	1	20	0	0	
Control H ₂ O	120/4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
control 0.5% etanol	120/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		TOTAL DEL TIPO DE MALFORMACIONES									57		
		33	1	0	6	14	2	0	1				

*expo: exposición; S: sencilla; D: doble; M: múltiple; C: curva; ES: Espiral, AC: aleta caudal; G: Gancho; Aus. C: Ausencia de cuerpo; Alter. Pig: alteración de pigmento Malf. Sist: malformación sistema

El análisis de Kruskal-Wallis, exhibe diferencias significativas entre tratamientos, en donde, $H(5, N=28) = 13.64832$ $p = .0180$; al evidenciar diferencias significativas, en la tabla XXXII se observa el análisis de U de Mann-Whitney con una significancia de 0.05 y la hipótesis nula se rechaza cuando T_0 es menor a 5 o T_0 es mayor a 20; en el caso del control de etanol al 0.5%, la hipótesis nula se rechaza cuando T_0 es menor a 2 o T_0 es mayor a 13, mostrando las diferencias entre los diferentes tratamientos con respecto a las malformaciones existentes

Los resultados de la tabla XXXII se esquematiza en grupos alfabéticos en donde se visualizan las concentraciones que tienen diferencias significativas entorno a daño teratogénico, para mejor comprensión (Fig. 30).

Tabla XXXII. Prueba U Mann-Whitney de ibuprofeno

Tratamiento U/* (T0)	C1	1.5	3	6	12	C2
C1				*	*	
1.5	12			*	*	
3	17	8		*		
6	25	0	4			*
12	20.5	4	8	11.5		*
* p < 0.05	U(0.05, 5) T _{0.5} =5		U(0.975,2) T _{0.975} = 20			
Tratamiento U/* (T0)	C1	1.5	3	6	12	C2
C2	11	12	13	24	21	
* p < 0.05	U(0.05, 5) T _{0.5} =2		U(0.975,2) T _{0.975} = 13			

En la fig. 30, el grupo **abc** (12 mg/L) difiere significativamente del grupo **d** (control agua, control adicionado con etanol al 0.5% y la concentración problema 1.5 mg/L) pero no difiere del grupo **ba** (6 mg/L) y el grupo **cad** (3 mg/L). El grupo **ba** muestra diferencia significativa con el grupo **cad** y **d**, se observa que no hay diferencia significativa con el grupo **abc**; las concentraciones que provocan daño teratogénico son: 12 mg/L (grupo **abc**) y 6 mg/L (grupo **ba**). El grupo **d** y el grupo **cad** son tratamientos que no se consideran concentraciones con potencial de efecto teratogénico. Se comprueba que el control de etanol al 0.5% no ocasiona daño en columna vertebral.

En comparación con los cinco fármacos probados, el ibuprofeno es el fármaco que en concentraciones menores experimentales (12 y 6 mg/L), presenta efecto teratogénico en columna vertebral.

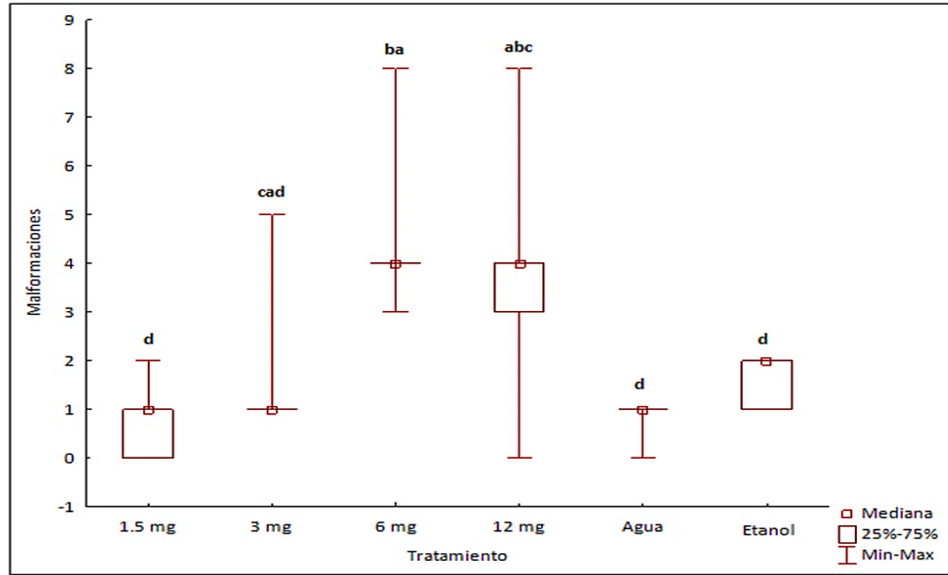


Fig. 30 Diagramas de cajas y bigotes del efecto teratogénico de ibuprofeno

7.3.5 Tipos de malformaciones en columna vertebral presentes en AINEs

7.3.5.1 Organismos sin malformación

Se observan alevines sanos, presentes en los controles de agua y etanol al 0.5% (Fig.31).

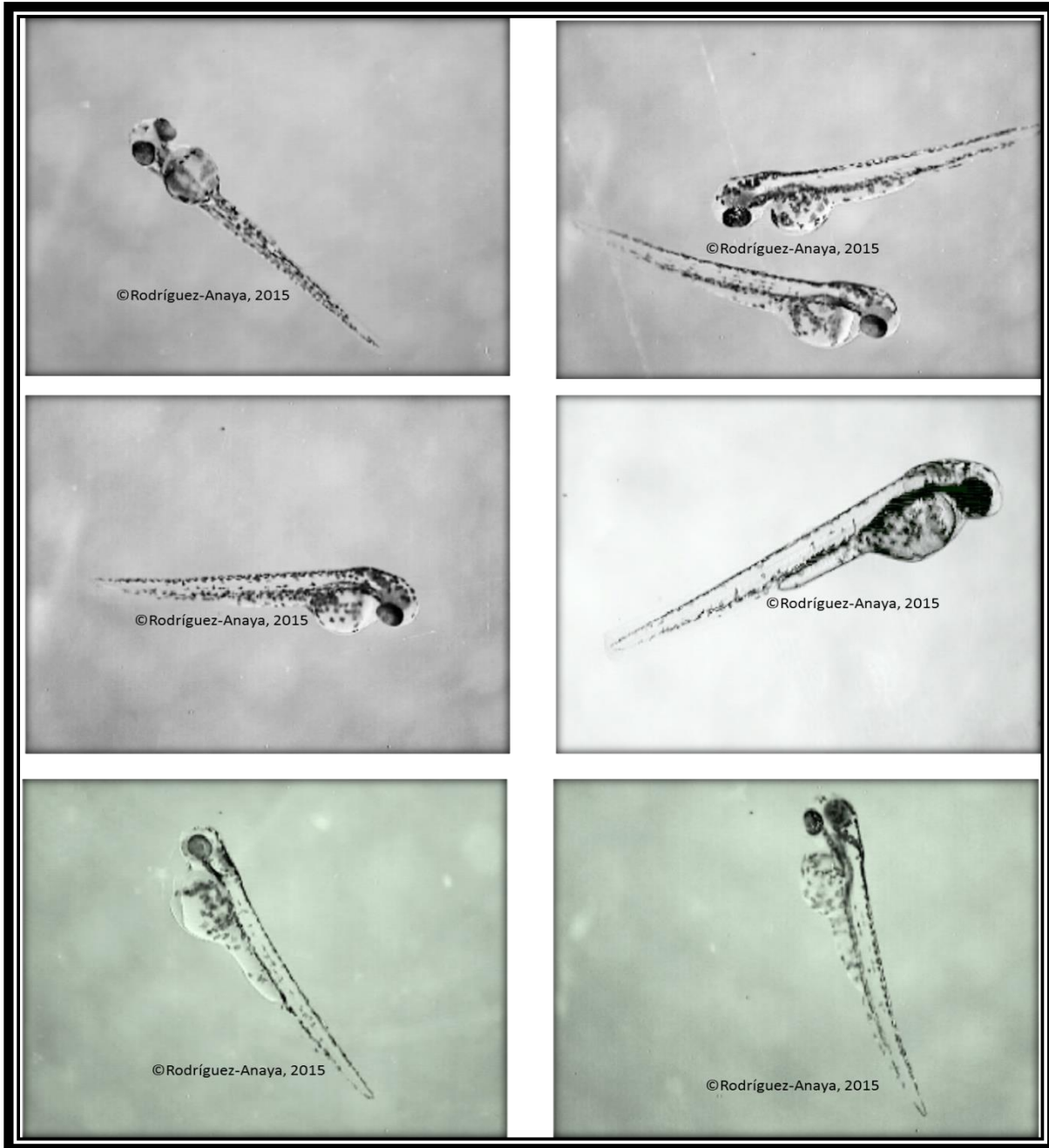


Fig. 31 Alevines sin malformaciones en columna vertebral

7.3.5.2 Organismos con malformaciones sencillas

Las malformaciones sencillas están presentes en los cinco fármacos (Fig. 32).

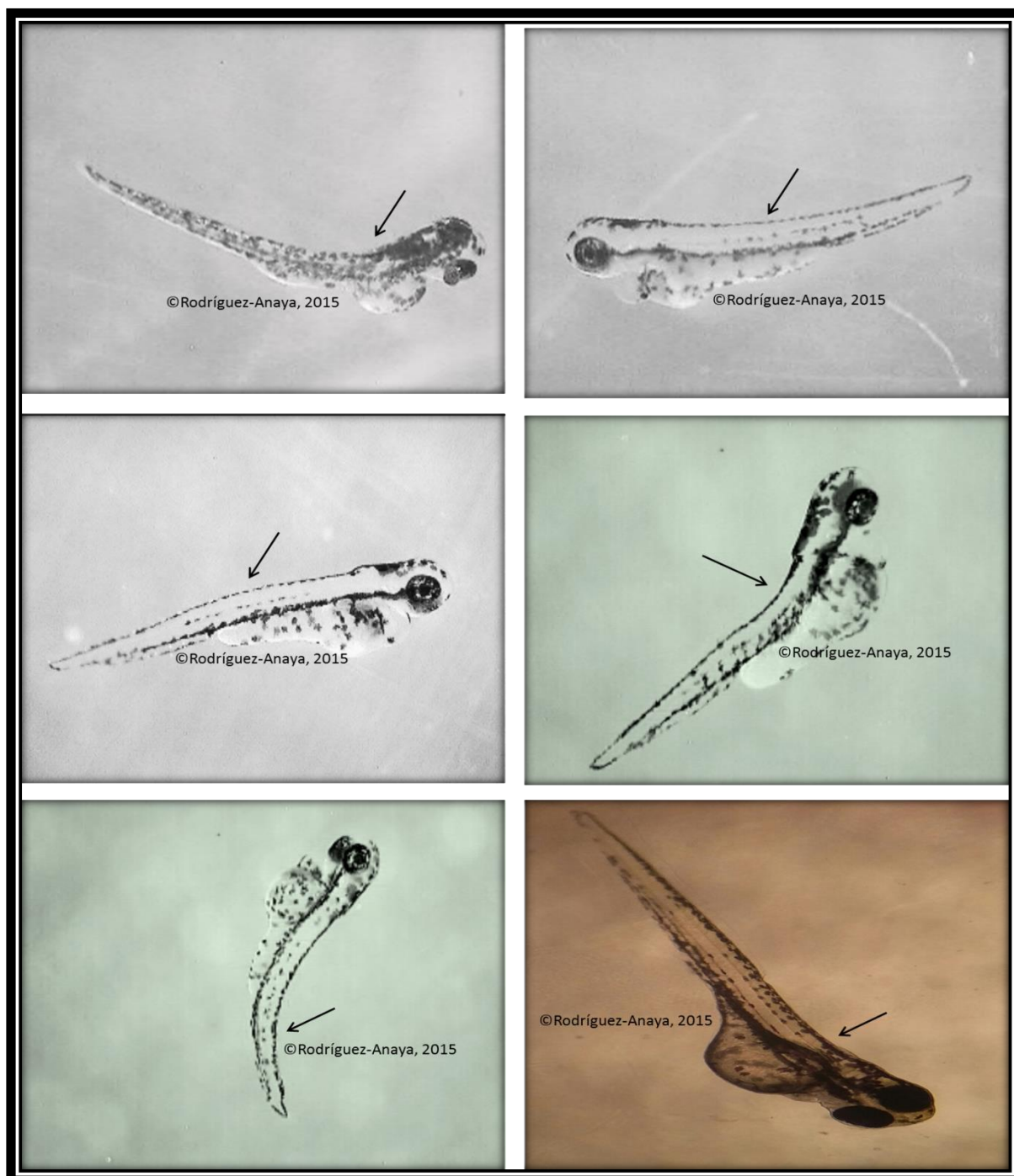


Fig. 32 Alevines con malformaciones sencillas

7.3.5.3 Organismos con malformaciones dobles

Estas malformaciones estuvieron presentes en todos los farmacos con excepción del paracetamol (Fig. 33).

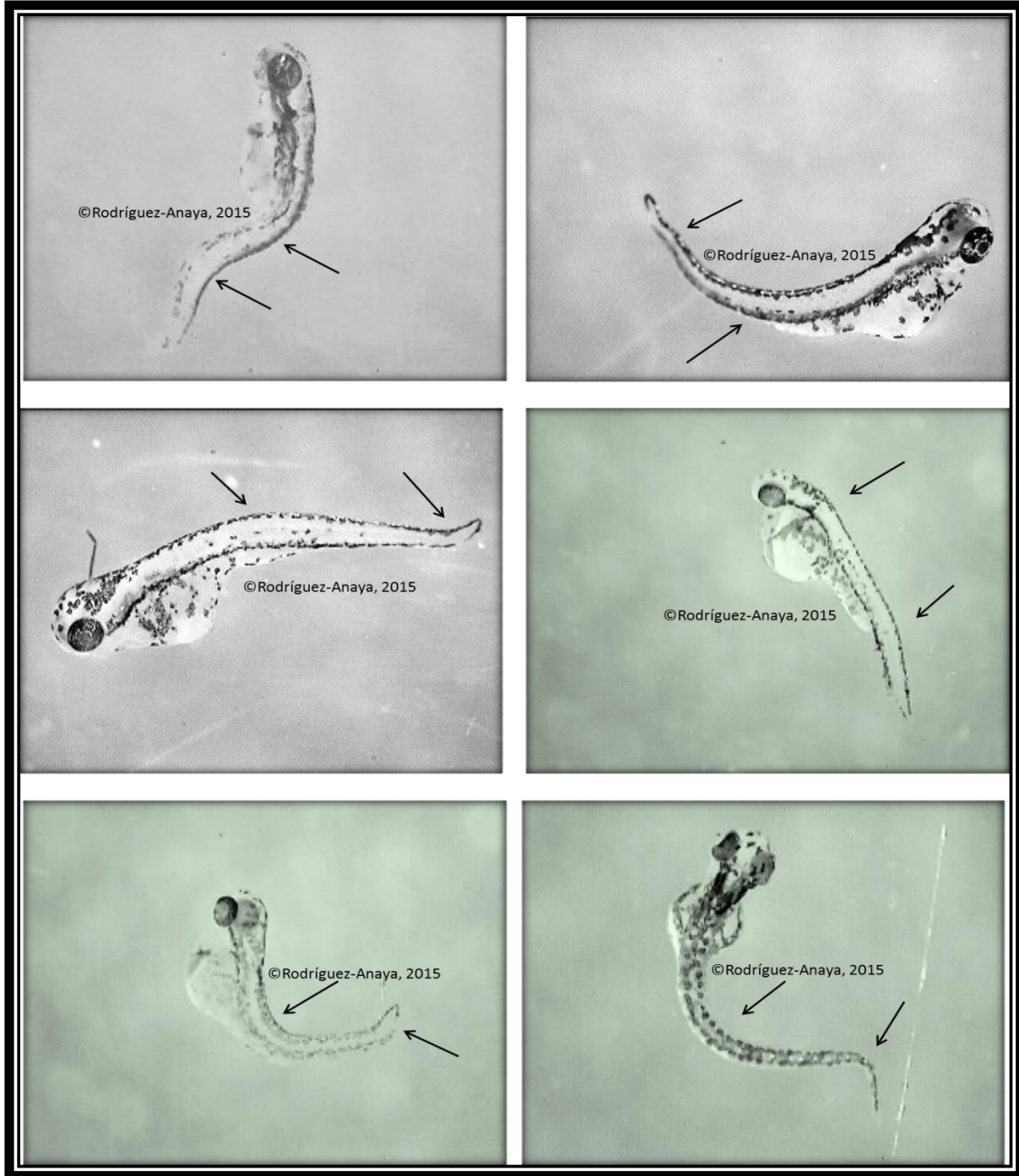


Fig. 33 Alevines con malformaciones dobles

7.3.5.5 Organismos con malformaciones múltiples

Estas estuvieron presentes en la mayoría de los fármacos, con excepción del ácido acetilsalicílico e ibuprofeno (Fig. 34).

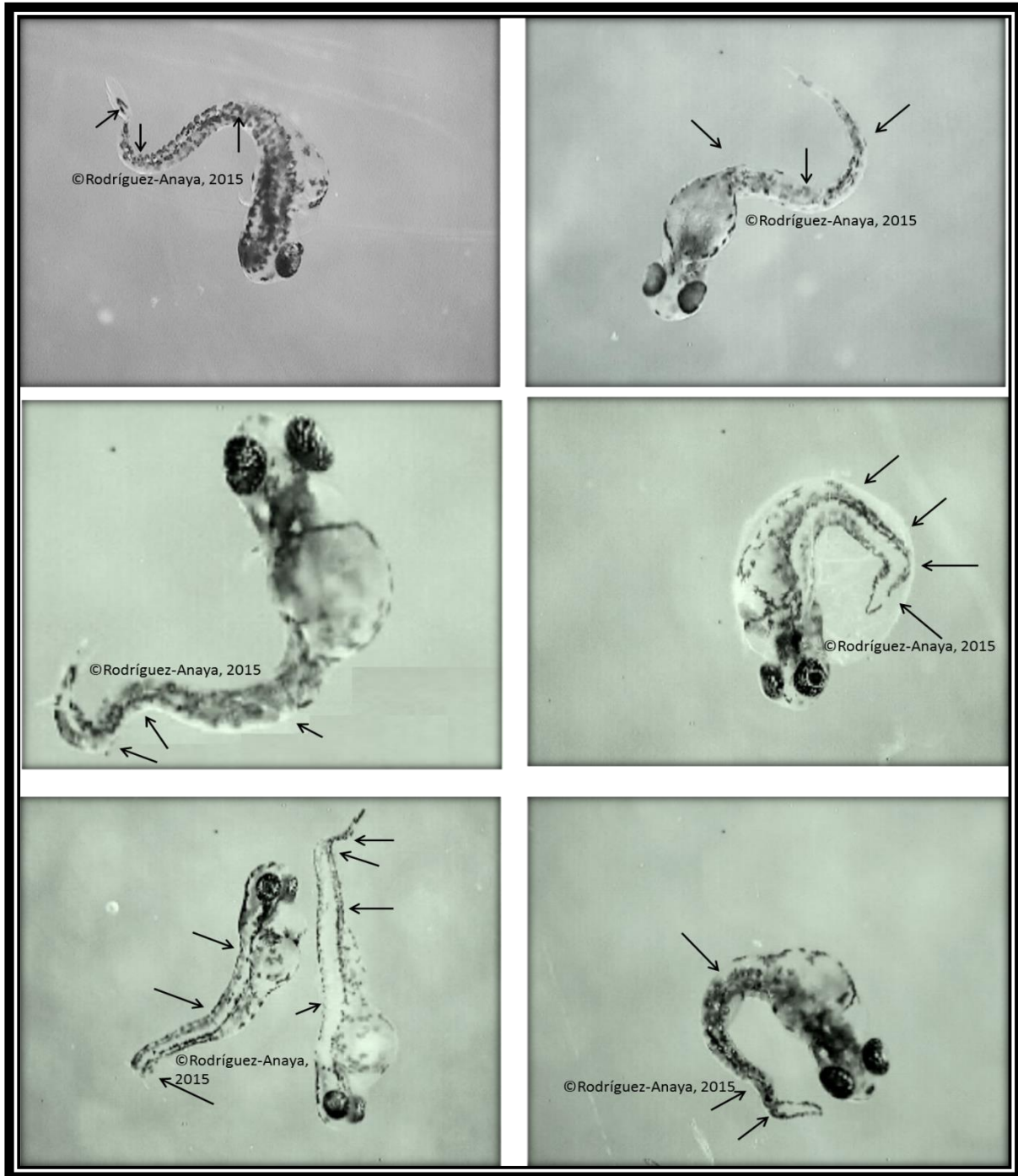


Fig. 34 Alevines con malformaciones múltiples

7.3.5.6 Organismos con malformaciones curvas

Estas estuvieron presentes en los cinco AINEs (Fig. 35).

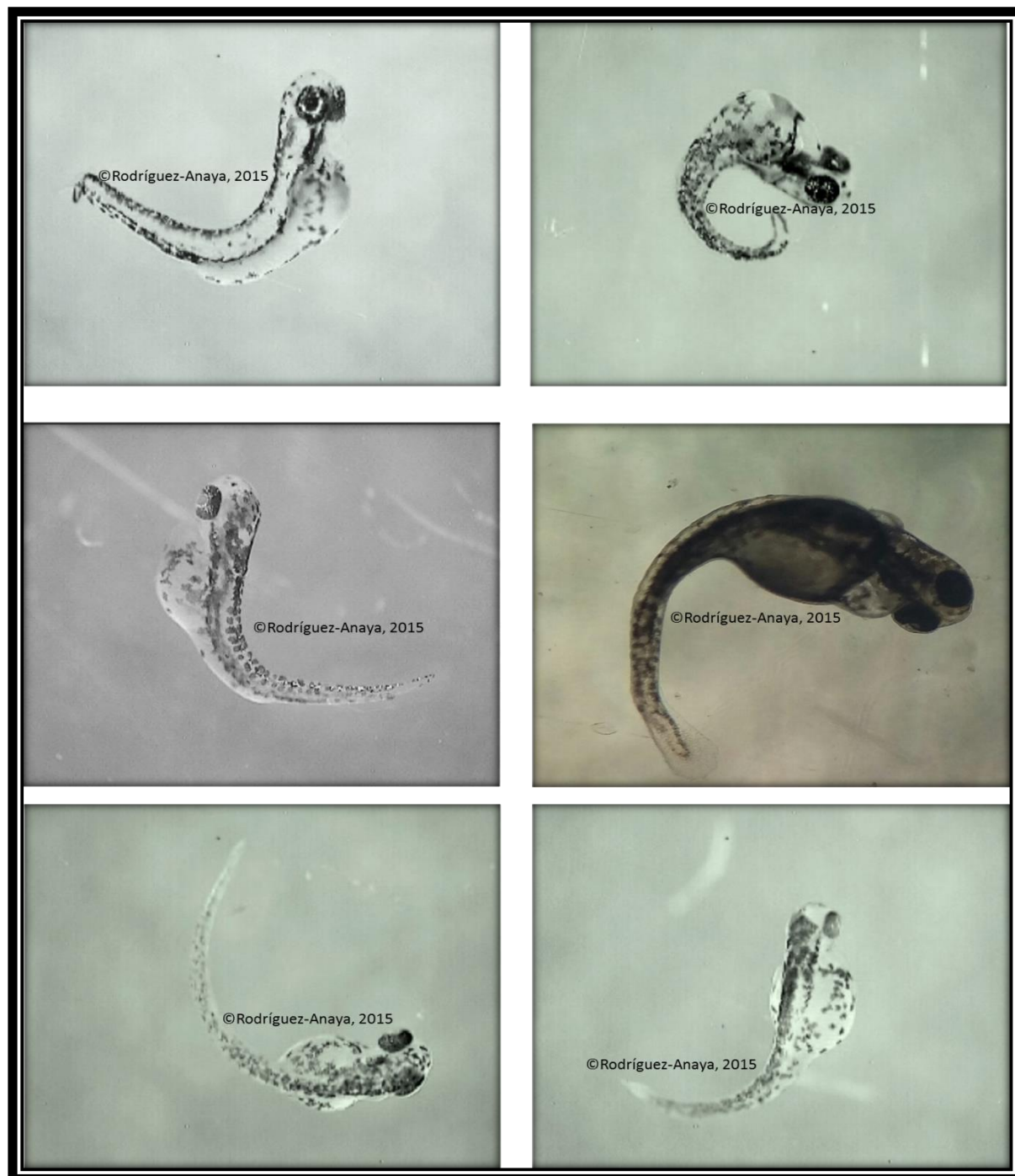


Fig. 35 Alevines con malformaciones curvas

7.3.5.7 Organismos con malformaciones en aleta caudal

Estas estuvieron presentes en los cinco AINEs (Fig. 36).

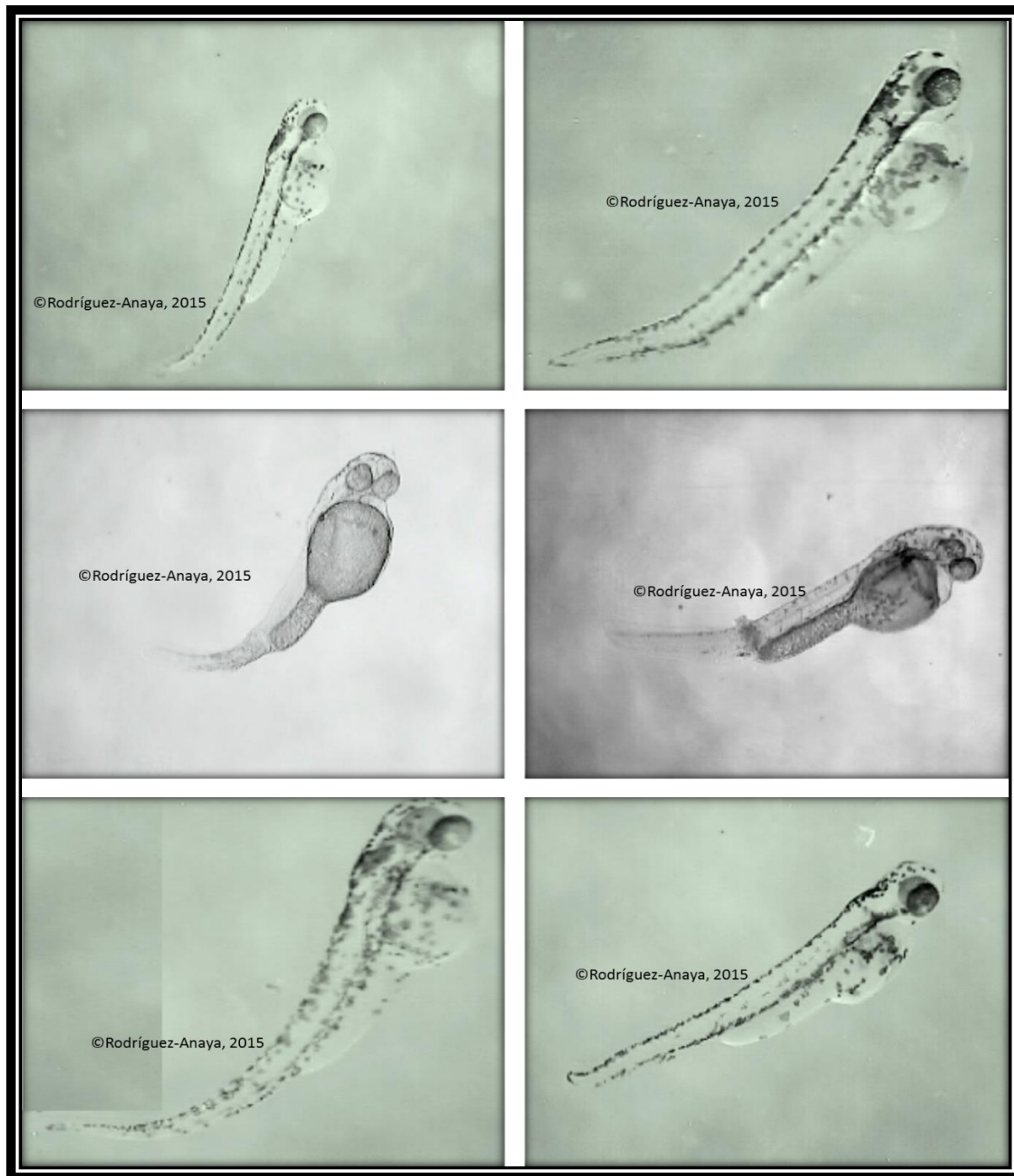


Fig. 36 Alevines con malformaciones en aleta caudal

7.3.5.8 Organismos con malformaciones en gancho

Estas estuvieron presentes en la mayoría de AINEs, con excepción del naproxeno (Fig. 37).

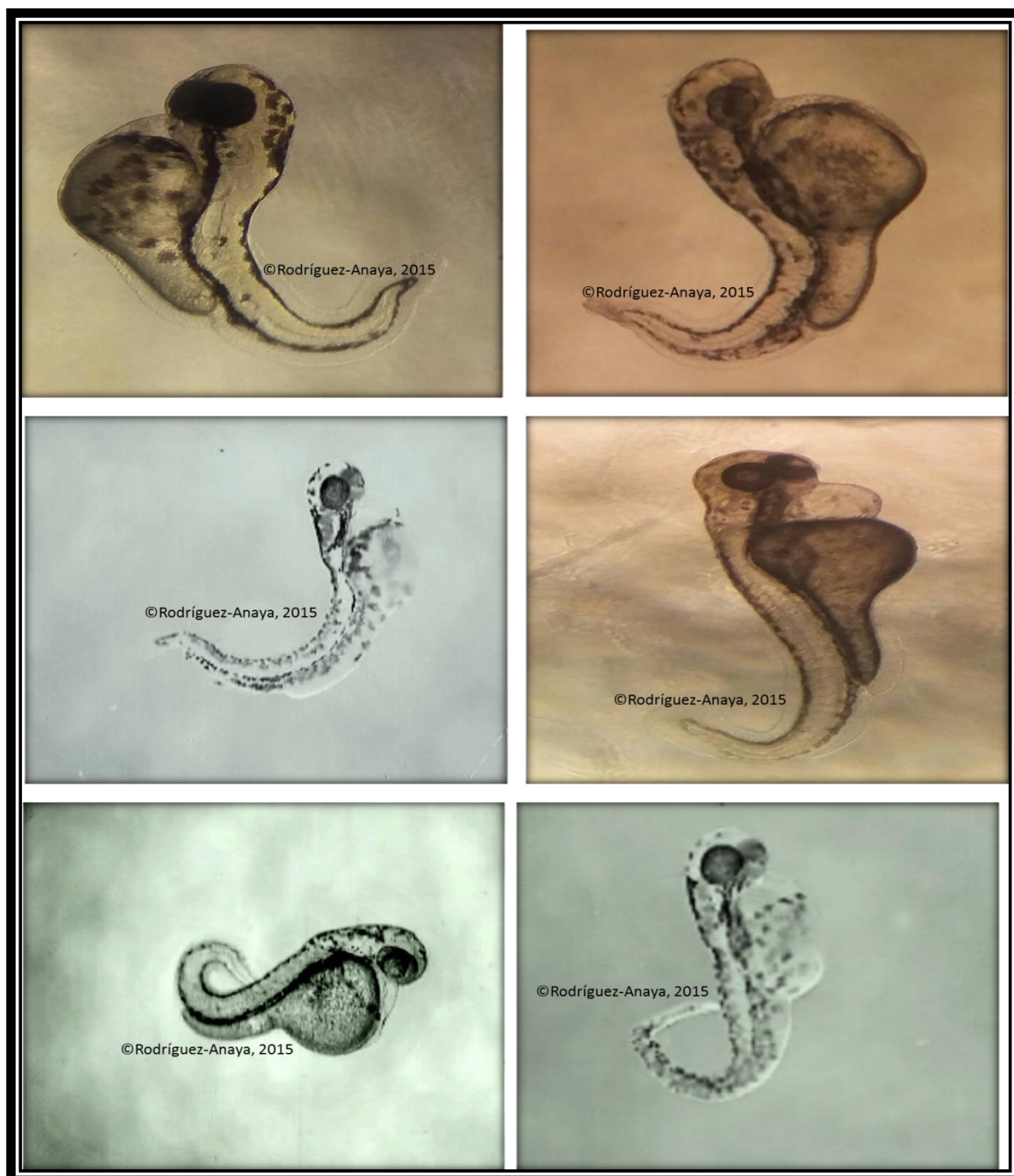


Fig. 37 Alevines con malformaciones en forma de gancho

7.3.5.9 Organismos con ausencia de cuerpo

Estas solo estuvieron presentes en ácido acetilsalicílico, paracetamol e ibuprofeno (Fig.38).

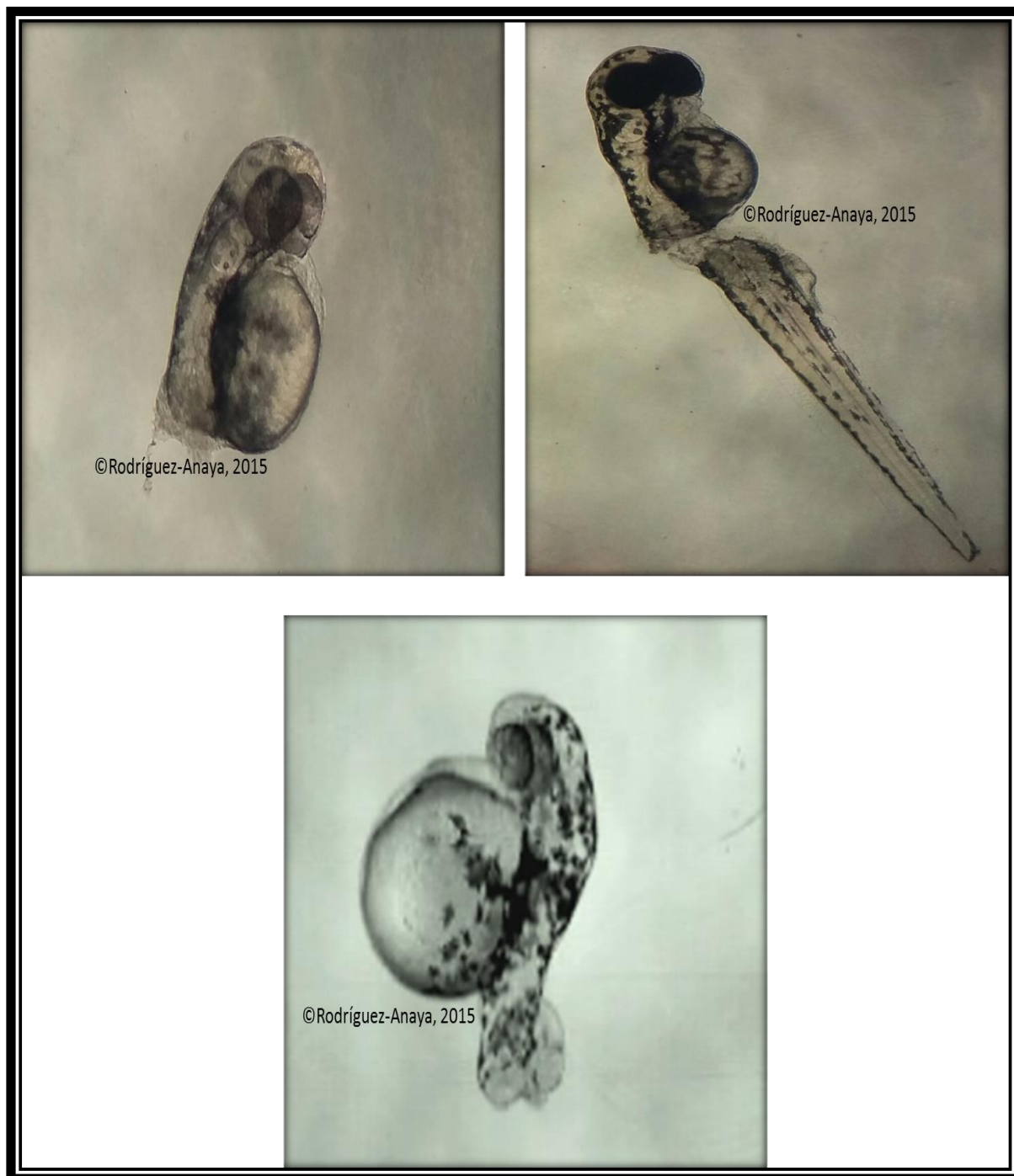


Fig. 38 Alevines con ausencia de cuerpo

7.4 Análisis químicos

7.4.1 Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica del agua residual compuesta se muestra en la tabla XXXIII. Los parámetros monitoreados se compararon con la norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales y la norma oficial mexicana NOM-067-ECOL-1994, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de los sistemas de alcantarillado o drenaje municipal. En el caso del pH, este excede el límite permisible comparado con la NOM-001-SEMARNAT-1996 que establece un límite de 6.5-8.5 y la muestra compuesta presentó un pH de 8.62; otro de los límites que excede es de sólidos suspendidos totales, cuantificando un total de 882 mg/L parámetro obtenido de la muestra y comparado con la NOM-001-SEMARNAT-1996 que tiene un límite 60 mg/L y NOM-067-ECOL-1994 con un límite de 80 mg/L.

Tabla XXXIII. Caracterización fisicoquímica del agua residual de la zona de Pachuca-Hidalgo

Características Fisicoquímicas	Muestra compuesta	NOM-001- SEMARNAT-1996	NOM-067- ECOL-1994
Temperatura (°C)	22.72 °C	40	40
Oxígeno disuelto (mg/L)	0.00	No incluye	No incluye
pH	8.62	6.5-8.5	6-9
Dureza (mg CaCO ₃ /L)	101.0	Máxima 500	No incluye
Presión atmosférica (mbar)	775	No incluye	No incluye
Resistencia MΩ*cm	0.0006	No incluye	No incluye
Conductividad (µs/cm)	1765	No incluye	No incluye
Sólidos suspendidos totales (TDS en mg/L)	882	60	80
Salinidad (%)	0.89	No incluye	No incluye
Oxígeno disuelto (%)	0.0	No incluye	No incluye

7.4.2 Curvas de calibración de los cinco fármacos y cromatogramas obtenidos

Las curvas de calibración deben cumplir con una $r \geq 0.99$, está r^2 reportada es para en ella interpolar las concentraciones de la muestra. Las seis concentraciones de comprobación y los puntos controles: bajo, medio y alto son concentraciones conocidas que interpoladas en la curva de calibración no deben desviarse en exactitud respecto a su concentración nominal más del 15% con ello se asegura que las concentraciones determinadas para cada fármaco en la muestra sea veraz; en primera instancia se muestra

7.4.2.1 Análisis químicos ácido acetilsalicílico

La curva de calibración del fármaco ácido acetilsalicílico en donde se observan los tiempos de retención; el tiempo de retención aproximado es de 1.06 min así como, la concentración de exposición, concentración cuantificada y porcentaje de desviación, este último parámetro para todos los controles no excede ni disminuye del 15%; el volumen de inyección fue de 2 μL (Fig. 39).

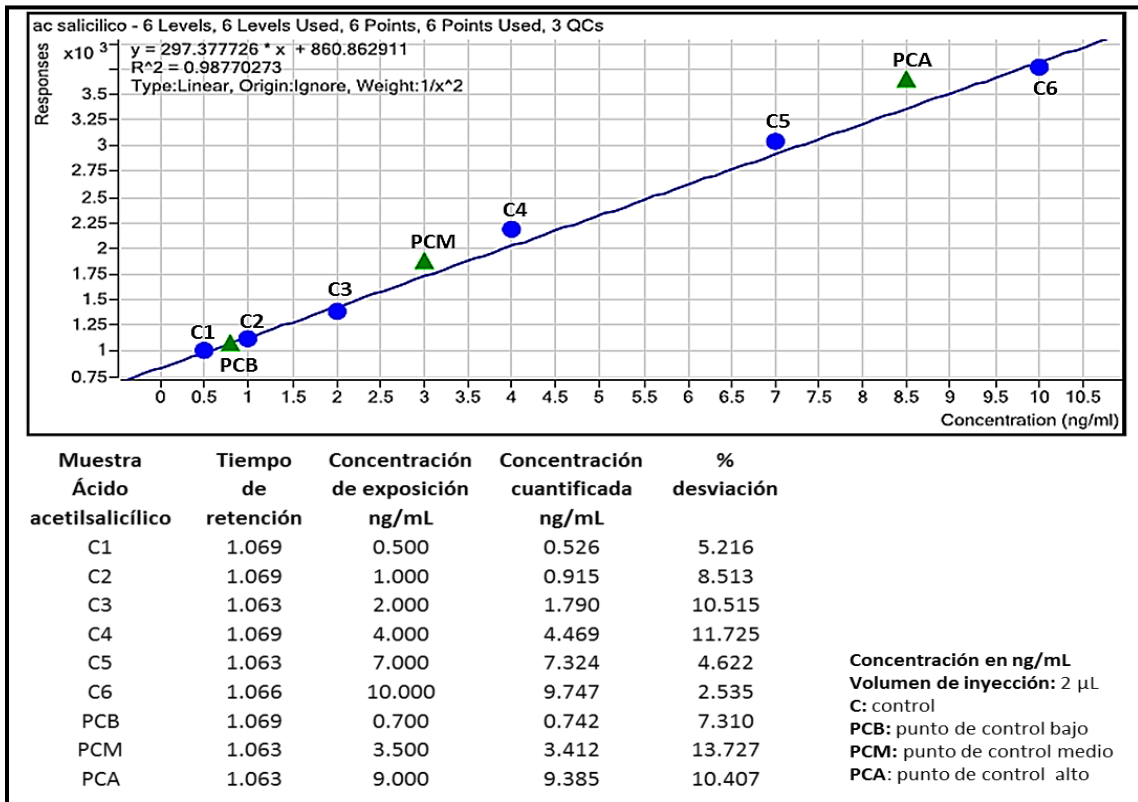


Fig. 39 Curva de calibración de ácido acetilsalicílico

Algunos de los cromatogramas de ácido acetilsalicílico obtenidos por medio de la metodología antes mencionada; se observa la inyección del blanco reactivo, esta para determinar que no existieran respuestas que pudieran sumarse a las concentración final del fármaco, también se visualiza la inyección del punto de control: bajo, medio y alto, se observa que el tiempo de retención aproximado es de 1.06 min; la señal y el tiempo de retención afirma que el fármaco está presente en los puntos de control; en la muestra 1 y muestra 2 se observa una mínima señal del fármaco pero sin poder lograr cuantificarlo, como más adelante se mostrará en las concentraciones cuantificadas; la muestra 3 presenta el mismo tiempo de retención que los controles en donde se observa la señal a 1.06 min, lo cual permite afirmar que en la muestra compuesta de agua residual el fármaco se encuentra presente (Fig. 40).

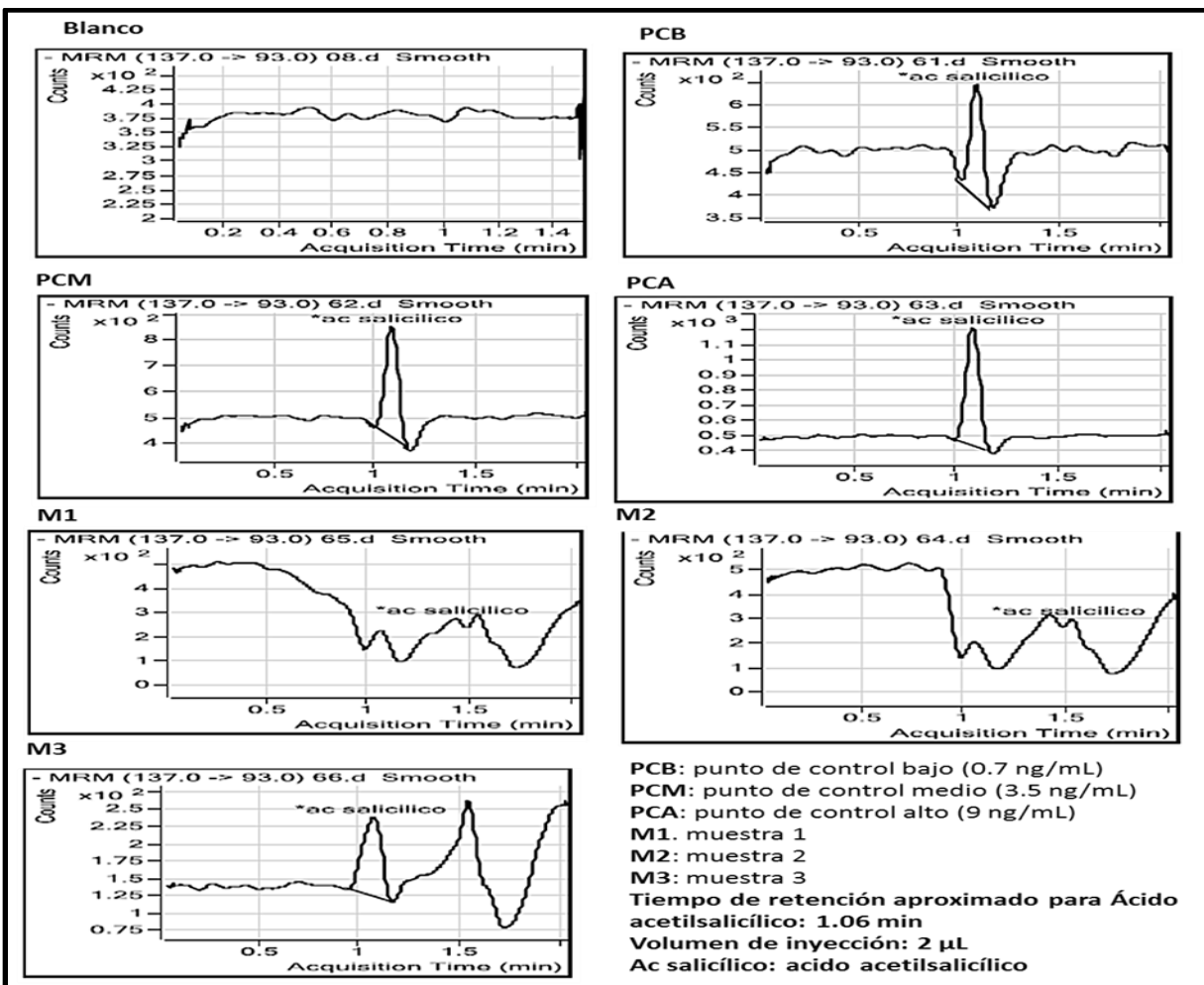


Fig. 40 Cromatogramas de ácido acetilsalicílico

7.4.2.2 Análisis químicos ibuprofeno

En la curva de calibración del fármaco ibuprofeno, se observan los tiempos de retención (aproximado de 2.08 min). Se muestra la concentración de exposición, concentración cuantificada y porcentaje de desviación, este último parámetro para todos los controles no excede al 15% con respecto a la concentración nominal; el volumen de inyección fue de 10 µL (Fig. 41).

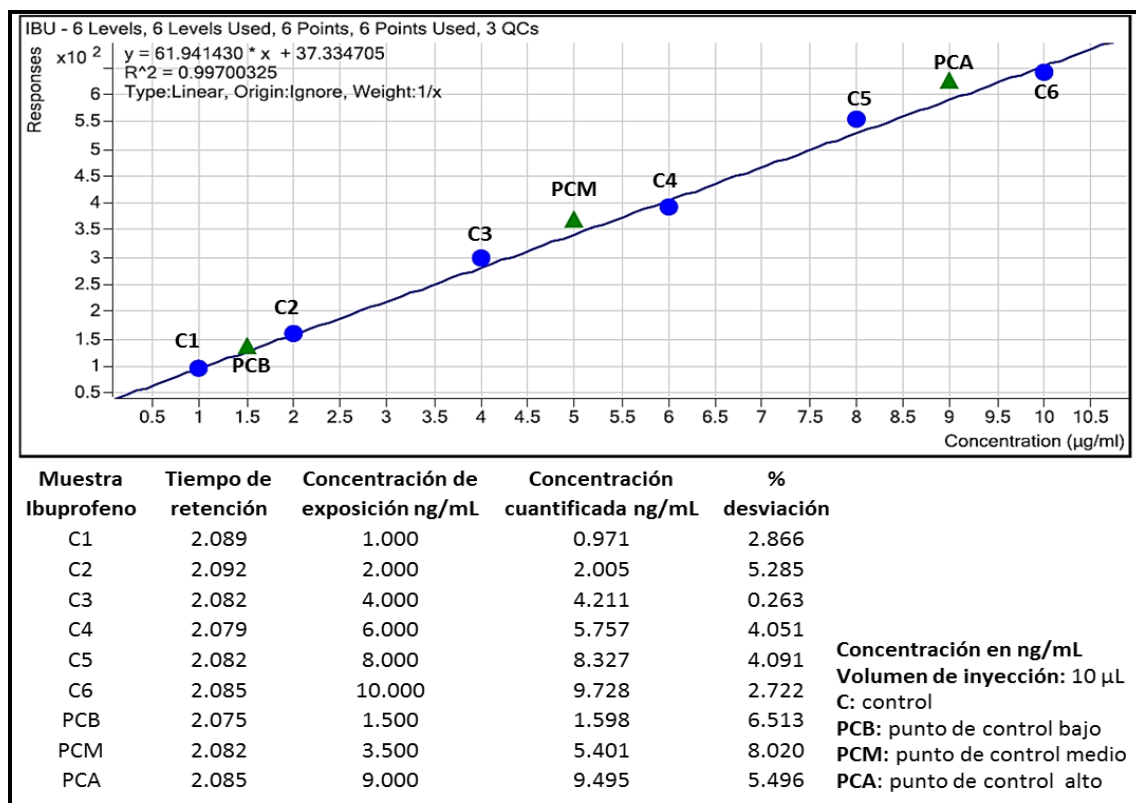


Fig. 41 Curva de calibración de ibuprofeno

Se perciben algunos de los cromatogramas obtenidos de ibuprofeno por medio de la metodología mencionada; se observa la inyección del blanco reactivo, para determinar que no existen respuestas que pudiera sumarse a la concentración final del fármaco, también se visualiza la inyección del punto de control: bajo, medio y alto en el cual el tiempo de retención aproximado es de 2.08 min, la señal y el tiempo de retención indica que el fármaco está presente en los puntos de control; en la muestra 1, 2 y 3 se observa que el tiempo de retención

concuenda con el observado en los controles, esto permite afirmar que el fármaco ibuprofeno está presente en la muestra compuesta de agua residual (Fig.42).

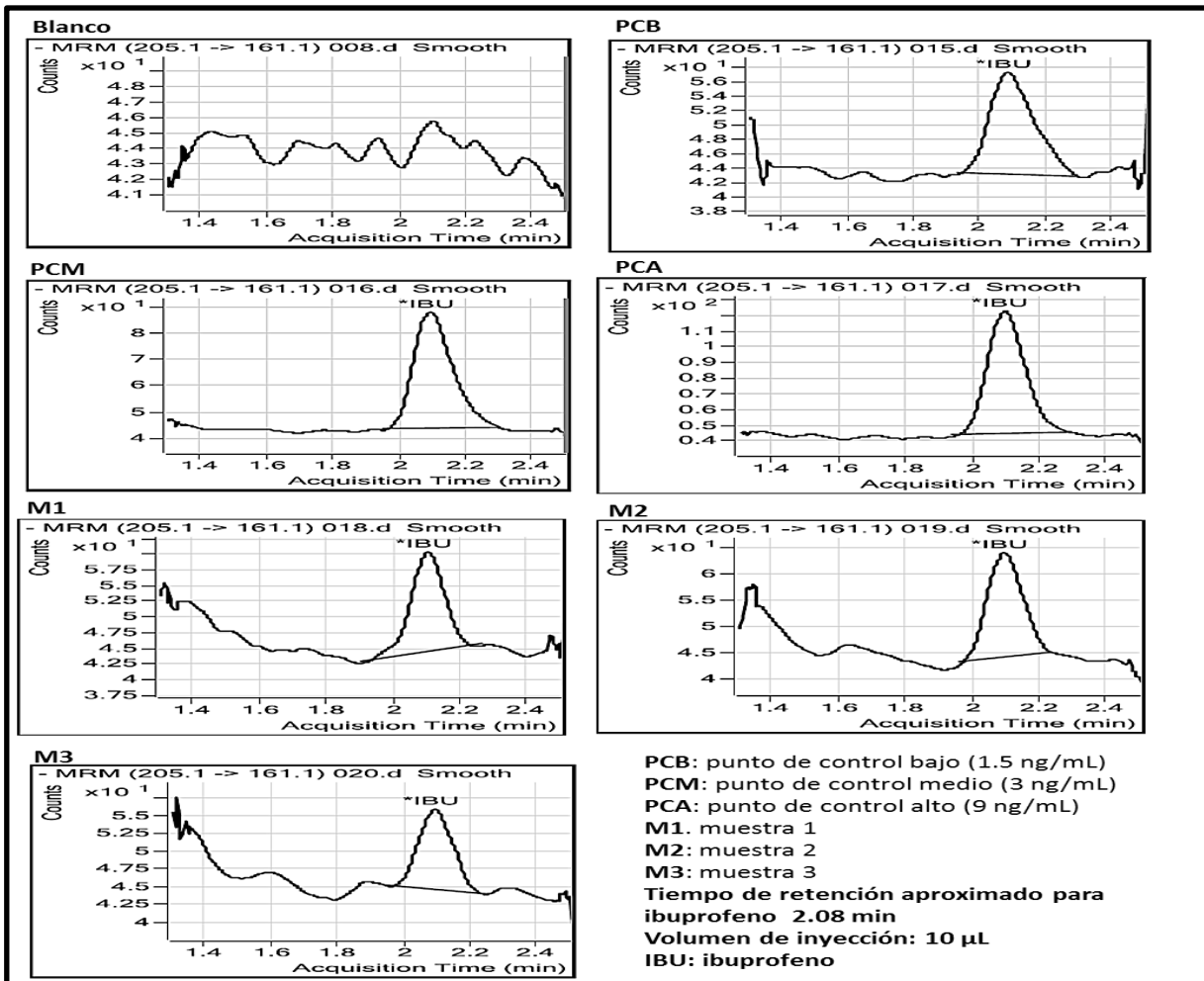


Fig. 42 Cromatogramas de ibuprofeno

7.4.2.3 Análisis químicos naproxeno

En la curva de calibración de naproxeno se observa que los tiempos de retención para este fármaco es aproximadamente de 1.45 min; se muestra la concentración de exposición, la concentración cuantificada y el porcentaje de desviación, este último parámetro para todos los controles no excede al 15% de la concentración nominal; el volumen de inyección fue de 5 µL (Fig.43).

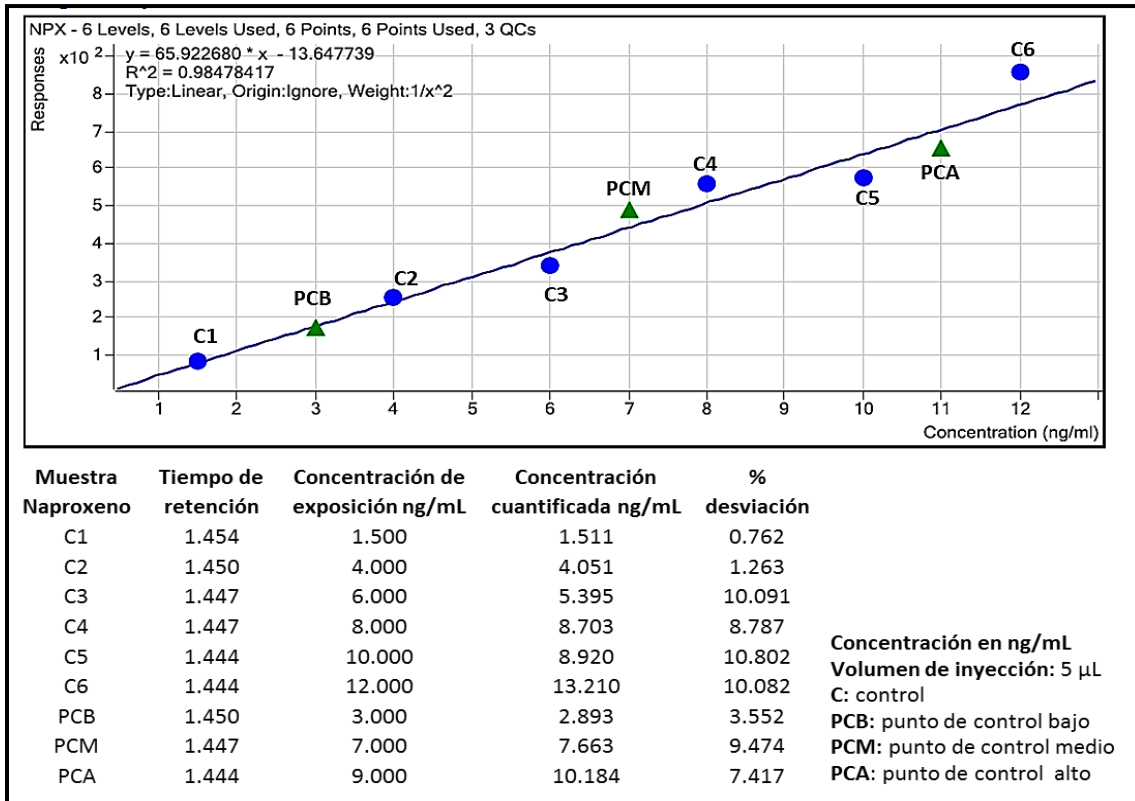


Fig. 43 Curva de calibración de naproxeno

Se perciben algunos de los cromatogramas de naproxeno adquiridos por medio de la metodología ya mencionada; se observa la inyección del blanco reactivo, esta para determinar que no existiera una respuesta que pudiera sumarse a las concentración final del fármaco también se visualiza la inyección del punto de control: bajo, medio y; el tiempo de retención aproximado es de 1.45 min; la señal y los tiempos de retención indican que el fármaco está presente en los puntos de control; en la muestra 1, 2 y 3 se observa que el tiempo de retención concuerda con el aproximado; las señales observadas y el tiempo de retención de las muestras de agua compuesta corresponden al fármaco naproxeno (Fig. 44).

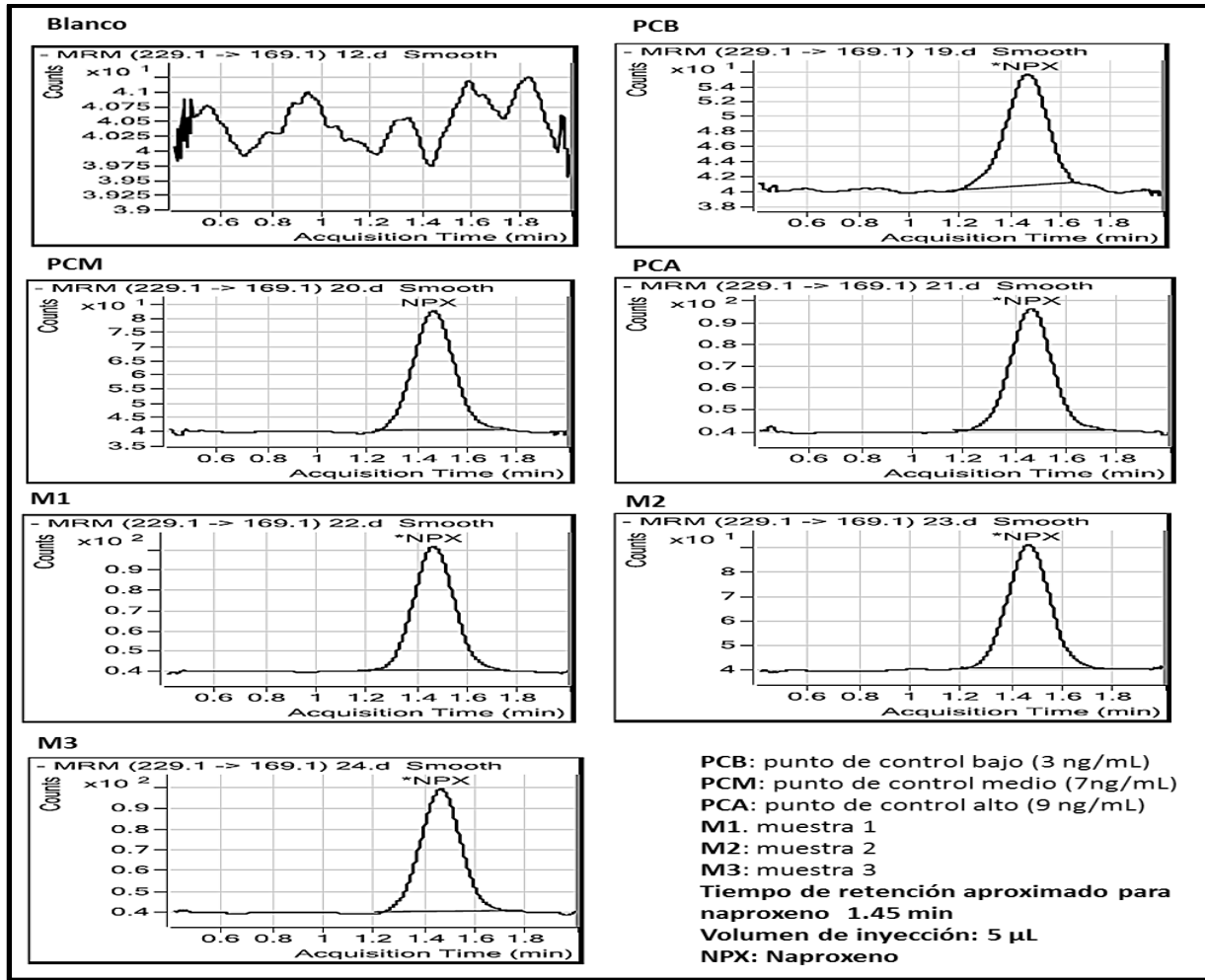


Fig. 44 Cromatogramas de naproxeno

7.4.2.4 Análisis químicos paracetamol

En la curva de calibración se observan los tiempos de retención para este fármaco (tiempo de retención aproximado 1.18 min); la figura muestra la concentración de exposición, concentración cuantificada y porcentaje de desviación, este último parámetro para todos los controles no excede el 15% de la concentración nominal; el volumen de inyección fue de 5 µL (Fig.45).

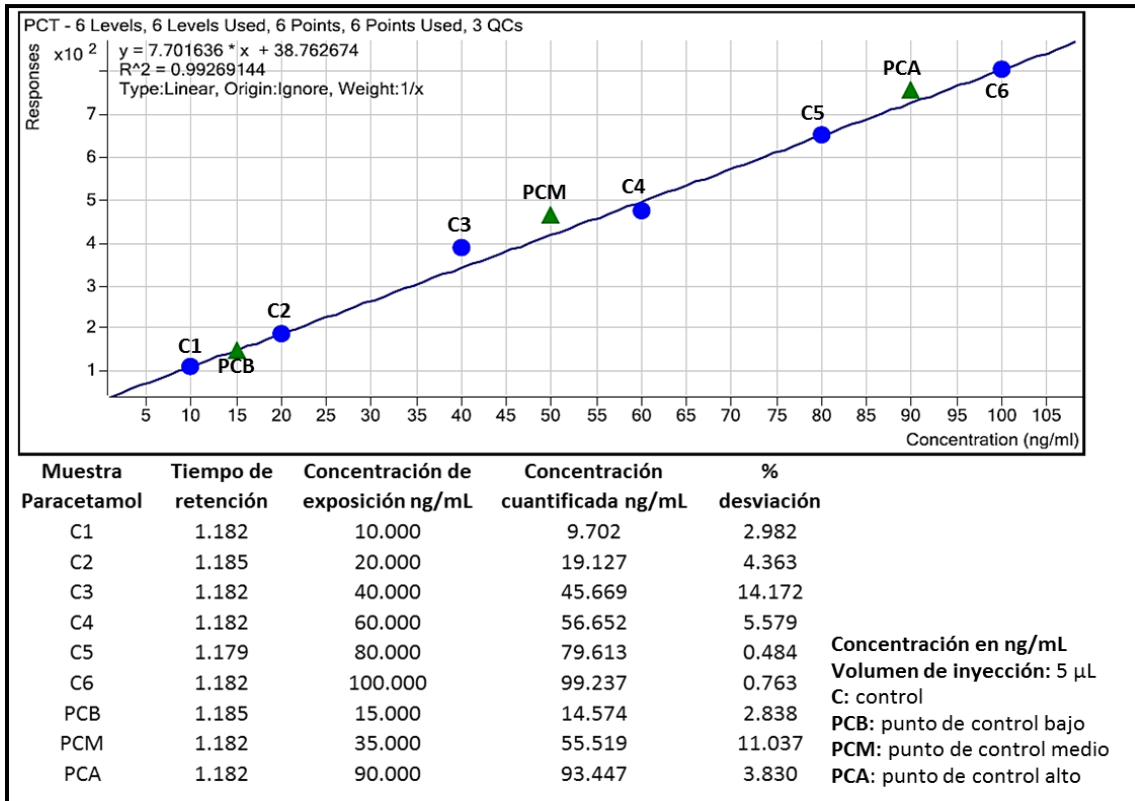


Fig. 45 Curva de calibración de paracetamol

Se perciben algunos de los cromatogramas obtenidos de paracetamol por medio de la metodología antes mencionada; se observa la inyección del blanco reactivo, esta para determinar que no existiera una respuestas que pudiera sumarse a las concentración final del fármaco, se observa la inyección del punto de control: bajo, medio y alto donde el tiempo de retención aproximado es de 1.18 min, la señal indica que el fármaco está presente en los puntos de control; en la muestra 1, 2 y 3 el tiempo de retención concuerda con el tiempo de retención aproximado de los controles, lo cual indica que la señal de la muestras de agua compuesta corresponden al fármaco paracetamol indicando que está presente en este tipo de aguas (Fig. 46).

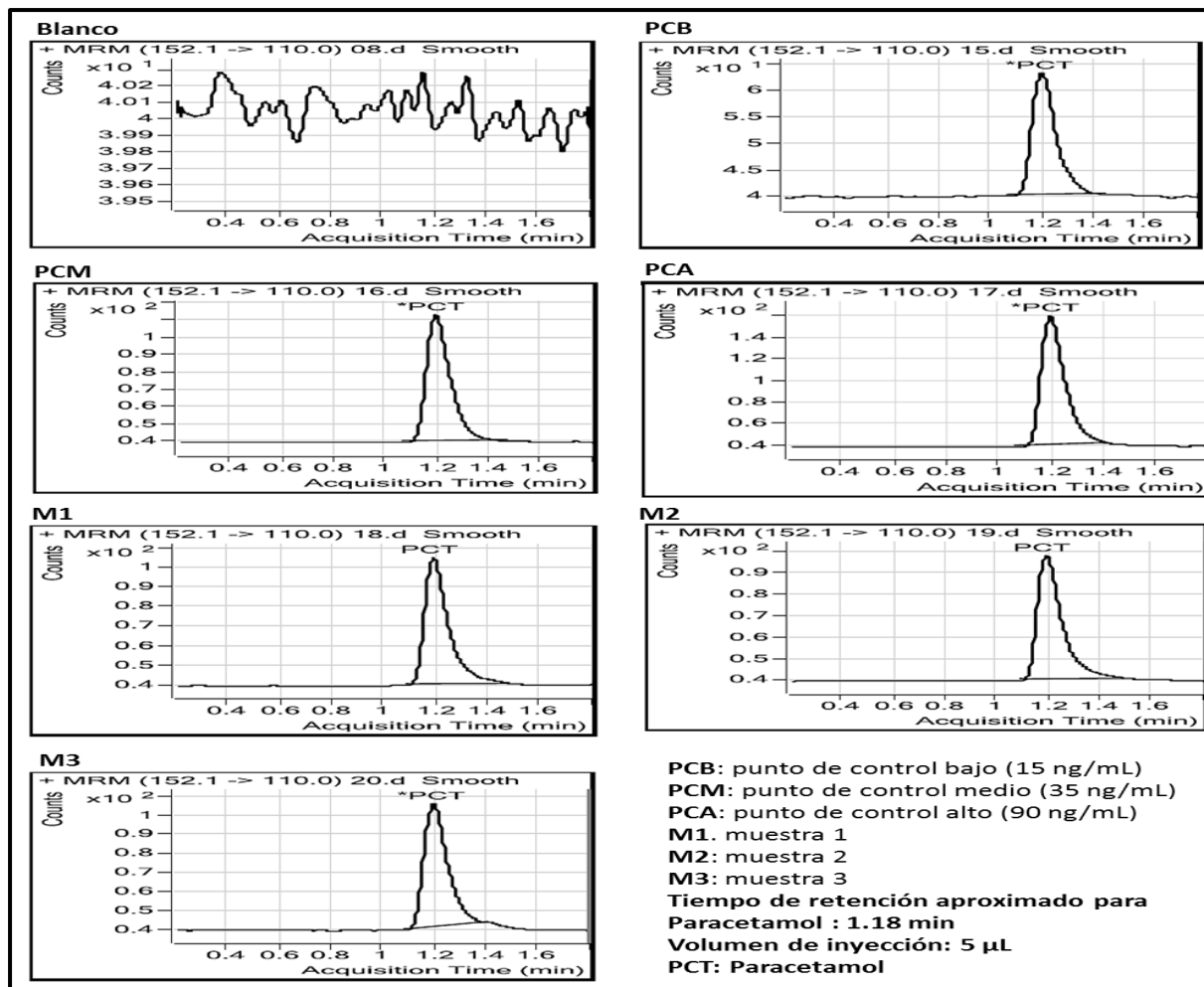


Fig. 46 Cromatogramas paracetamol

7.4.3 Cuantificación

El software MassHunter Optimizer de Agilent determina automáticamente las transiciones de los analitos y los parámetros instrumentales óptimos para conseguir la máxima sensibilidad. La innovadora monitorización de reacciones múltiples (MRM) programada simplifica adicionalmente el desarrollo de métodos y garantiza la obtención de estadísticas iónicas consistentes que permitan obtener datos cuantitativos de la máxima calidad posible. En cuanto a las concentraciones de fármacos AINEs cuantificadas en la muestra compleja de agua residual se observan en la tabla XVII; para cada fármaco la cuantificación se realizó por triplicado. Para ácido acetilsalicílico los valores cuantificados van desde 0.000 a 0.387 ng/mL, el promedio es de 0.129 ng/mL en el caso de la muestra 1 y 2 no se obtienen valores de cuantificación debido a que los valores están muy por debajo de los límites de detección y cuantificación; el fármaco

ibuprofeno presenta concentraciones de 0.72 a 1.83 ng/mL, con un promedio de 1.27 ng/mL, el siguiente fármaco en cuantificar fue el naproxeno en concentraciones de 9.38 a 10.98 ng/mL, con una media de 10.28 ng/mL y finalmente el paracetamol con valores de 45.71 a 49.83 ng/mL, con una media de 48.37 ng/mL. Como se muestra en la tabla XXXIV el tiempo de retención aproximado para los cuatro fármacos antes mencionados corresponden a los tiempos de retención encontrados en las muestras inyectadas, lo cual propicia la correcta cuantificación. En caso de que el tiempo de retención de las muestras problema estén muy alejados del tiempo de retención aproximado, indica que el fármaco no está presente o la concentración es muy baja con respecto a la curva de calibración, en la misma tabla se observa la conversión a $\mu\text{g/mL}$ y $\mu\text{g/L}$.

Tabla XXXIV. Cuantificación de AINEs de agua residual de Pachuca-Mineral de la Reforma

Fármacos	Tiempo de retención aprox. Min.	Tiempo de retención muestra Min.	Concentración ng/mL	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Concentración $\mu\text{g/L}$
Ácido acetilsalicílico	1.06	1.509	----	----	----
		1.408	----	----	----
		1.053	0.387	0.000387	0.387
		----	X=0.387	0.000387	0.387
Ibuprofeno	2.08	2.092	1.27	0.00127	1.27
		2.082	1.83	0.00183	1.83
		2.082	0.72	0.00072	0.72
		----	X=1.27	X=0.00127	X=1.27
Naproxeno	1.45	1.447	10.98	0.01098	10.98
		1.450	9.38	0.00938	9.38
		1.447	10.47	0.1047	10.47
		----	X= 10.28	X=0.1028	X= 10.28
Paracetamol	1.18	1.179	49.57	0.04957	49.57
		1.179	45.71	0.04571	45.71
		1.185	49.83	0.04983	49.83
		----	X=48.37	X=0.04837	X=48.37

7.5 Matriz de colorimetría

La suma de la totalidad de las variables, muestra al naproxeno con 28 puntos y paracetamol 24 puntos, como fármacos de preocupación prioritaria (Tabla XXXV).

La suma de la totalidad de las variables, muestra diclofenaco con 19 puntos e ibuprofeno con 23 puntos como fármacos de preocupación alta (Tabla XXXV).

La suma de la totalidad de las variables, muestra al ácido acetilsalicílico con 19 puntos como un fármaco de preocupación intermedia (Tabla XXXV).

Tabla XXXV. Matriz de colorimetría

- 5 Preocupación prioritaria 30-24 puntos
- 4 Preocupación alta 23-18 puntos
- 3 Preocupación intermedia 17-12 puntos
- 2 Preocupación baja 11-6 puntos
- 1 Preocupación mínima <6 puntos
- ¿? Desconocido

Variables	Ácido acetilsalicílico	Paracetamol	Diclofenaco	Naproxeno	Ibuprofeno
Potencial de Riesgo	3	5	5	5	5
Ventas	3	4	2	5	4
Prescripción médica	2	5	2	4	1
Concentración cuantificada	2	5	¿?	4	3
Toxicidad	2	2	5	5	5
Teratogénesis	3	3	5	5	5
TOTAL	15	24	19	28	23

8. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio de diagnóstico acerca la presencia indirecta de cinco AINEs en el ambiente en la zona de Pachuca-Mineral de la Reforma, además del problema de automedicación. Las ventas de productos farmacéuticos aumentan cada año en un 5-7% aproximadamente; en 2012 la venta mundial de fármacos dejó una cifra total de ganancia de 962 billones de dólares (Corcoran et al., 2010; IMS, 2013). Los fármacos son contaminantes emergentes de aguas superficiales, subterráneas y potables (Santos et al., 2010). Se ha demostrado que los AINEs analizados tienen efectos genotóxicos, tóxicos y crónicos (Rodríguez-Anaya et al., 2014), el presente trabajo muestra evidencias de efecto tóxico y teratogénico de: ácido acetilsalicílico, paracetamol, naproxeno, ibuprofeno y diclofenaco. Es evidente que estas sustancias al ser de alto consumo, llegan al ambiente al ser excretados después de la ingesta, además de la mala disposición de estos al concluir un tratamiento; estos se introducen en diferentes ambientes acuáticos que son utilizados de manera directa como consumo humano (agua potable) y de manera indirecta en zonas de riego de cultivos (agua residual), además que los diferentes cuerpos de agua albergan biodiversidad y son de vital importancia para la prevalencia de los ecosistemas.

Los centros de salud en donde se prescribe mayor cantidad de fármacos es en lugares que cuentan con una mejor infraestructura, es decir, instalaciones nuevas y grandes, mayor cantidad de personal, mayores insumos etc., por lo tanto, atienden a la población de un mayor número de colonias de la zona de estudio. Las ventas de fármacos son altas y es la principal vía de adquisición de estos, debido a que estos cinco AINEs se pueden comprar sin contar con una receta médica, además de que alivian malestares comunes en la población como: cualquier tipo de dolor, inflamación y disminuir temperatura, además son de bajo costo, de hasta cinco pesos mexicanos, por una presentación de 30 tabletas en diferentes gramajes.

La población de la zona de Pachuca-Mineral de la Reforma prefiere adquirir estos medicamentos a través de las farmacias particulares, ya que en los centros de salud pequeños y arraigados, los fármacos analizados son de poca existencia o a veces nula, en centros de salud de mejor infraestructura la problemática no radica en la disponibilidad de los fármacos, sino en

el tiempo de espera exagerado para la atención médica; las ventajas de las farmacias es que están disponibles en horarios más amplios y se encuentran cerca de la población, ya que, por lo general existe una o más por colonia y muchas de estas cuentan con un médico con costos accesibles, la espera para la atención es breve y en la mayoría de los casos con mejor calidad humana. Es necesario realizar un monitoreo en donde se tomen en cuenta variables socioeconómicas, afecciones particulares, distribuidores de fármacos, horarios laborales, fármacos con diferentes compuestos activos, comparación entre marcas, comparación en diferentes sitios de Hidalgo para así poder determinar un perfil más detallado de venta y prescripciones médicas en la población de estudio.

Este estudio sirve para dar una perspectiva del actual del problema ambiental y de automedicación, por la alta venta de medicamentos en farmacias de Pachuca-Mineral de la Reforma observando cifras de 5 kg/día de diclofenaco, 15 kg/día ácido acetilsalicílico, 23 kg/día de ibuprofeno, 25 kg /día de paracetamol y 27 kg/día de naproxeno; los elevados consumos y prescripción de AINEs incrementan el potencial de riesgo en la salud humana y deterioro ambiental, incluyendo flora y fauna silvestre por presencia del compuesto activo y metabolitos.

EPRAS “Evaluación de Potencial de Riesgos Ambientales y a la Salud”, es una metodología alternativa para la toma de decisiones rápidas, en este caso de los fármacos (AINEs), la cual es una herramienta que permite identificar situaciones de potencial de riesgo biológico y ambiental, basada en el análisis sistemático de reportes bibliográficos y observaciones simples, para determinar cualitativamente el impacto de variables ambientales, biológicas y situacionales de manera clara, rápida y resumida. Esta metodología está basada en diferentes metodologías que la sustentan (Tambutti et al., 2001; Sánchez et al., 2007; Gaytán et al., 2012; Quiterio-Pérez en el 2012), pero con diferencias tangibles en el cuestionario. Tiene la flexibilidad de aplicarse en otros contaminantes emergentes, como lo aplicó Reyes-Silva en el 2016 con antibióticos, obteniendo resultados de potencial de riesgo comparables con la parte experimental.

En cuestiones gubernamentales se requiere de toma de decisiones rápidas por el tiempo corto de entrega de los proyectos, como también reiteradamente no se cuenta con el presupuesto

para análisis químicos costosos y pruebas biológicas, por lo general se requiere de una perspectiva general para priorizar sobre un contaminante o en su caso una cuestión ambiental urgente a evaluar, con los aspectos anteriormente descritos, en lo personal esta metodología es una alternativa confiable, porque se basa en resultados experimentales reportados en el presente trabajo; esta metodología sitúa a: naproxeno, paracetamol, ibuprofeno y diclofenaco en la categoría de alto potencial de riesgo, estos resultados se equiparan con la revisión bibliográfica en donde, diversos autores como: Murray y colaboradores en el 2010, Almeida y colaboradores en el 2013 así como Grenni y colaboradores en el 2013, indican que el naproxeno, diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol son fármacos frecuentemente detectados en el medio ambiente acuático, incluyendo agua potable, los datos sobre su destino ambiental son muy escasos. Estos fármacos son alta prioridad en base a su alto consumo, propiedades físico-químicas, toxicidad, persistencia y presencia de agua.

Este trabajo, confirma a EPRAS como una metodología fácil de usar, con la capacidad de identificar el potencial de riesgo de AINEs de manera anticipada a análisis químicos y biológicos, a través de su cinética ambiental, cuestiones situacionales, exposición, biodisponibilidad, sectores expuestos, finalmente efectos potenciales y efectos reportados; tiene adaptabilidad para alguna cuestión en particular que se quiera analizar, por lo tanto, es una nueva metodología para las ciencias ambientales, que puede ser modificada para su constante actualización y mejoramiento para determinar el potencial de riesgo de diferentes contaminantes o en su caso de otros AINEs, dándole un valor agregado.

Diferentes fármacos producen efectos tóxicos crónicos (estrogénicos, genotóxicos, cancerígenos y teratogénicos entre otros) y tóxicos agudos durante su exposición, debido a que un gran número de especies son mucho más sensible a los efectos de un fármaco en comparación con la de los seres humanos o animales de crianza (Corcoran et al., 2010). Los cinco fármacos analizados mostraron efectos tóxicos.

Ácido acetilsalicílico es el fármaco de menor toxicidad con un incremento de muerte de embriones del 0.13% por cada ppm; este es el fármaco con la concentración más alta entorno a la CL_{50} , establecida en 350 mg/L, debajo de esta concentración, se localizan las concentraciones

subtóxicas y concentraciones superiores a la CL_{50} son tóxicas; se establece que es un fármaco de acción de corto plazo (24 horas) con respecto al ciclo de vida de este organismo, el tiempo de exposición y concentración actúan de manera independiente en la muerte de embriones

Con respecto a la toxicidad de paracetamol, es consecutivo del ácido acetilsalicílico, mostrando un incremento de muerte de embriones del 0.34% por cada ppm del fármaco; este es el fármaco consecutivo del ácido acetilsalicílico con la concentración más alta entorno a la CL_{50} , establecida en 150 mg/L, debajo de esta concentración, se localizan las concentraciones subtóxicas y concentraciones superiores a la CL_{50} , son tóxicas; se considera un fármaco de toxicidad a corto plazo (24 horas) con respecto al ciclo del vida del organismo, en donde el tiempo de exposición y concentración actúan de manera dependiente en la muerte de embriones, esta dependencia también se observa en: diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno.

Las concentraciones que presentaron toxicidad de ácido acetilsalicílico y paracetamol son muy similares a las presentaciones disponibles para el consumo humano. Para naproxeno, diclofenaco, e ibuprofeno, las concentraciones tóxicas están por debajo de las presentaciones que están en venta libre y de prescripción médica, por lo tanto, se eleva el potencial de riesgo al ser concentraciones más bajas que las que se están en el mercado farmacéutico.

En naproxeno, es un en donde el mayor efecto tóxico se observa en las primeras 48 horas, pasado este tiempo de exposición, la mortalidad disminuye gradualmente, este es el segundo fármaco más agresivo de los cinco probados, debido a que incrementan las muertes de embriones en 2.51% por cada ppm del fármaco, es el segundo con la concentración más baja entorno a la CL_{50} , establecida en 19.4 mg/L, debajo de esta concentración se localizan las concentraciones subtóxicas.

El diclofenaco es considerado un fármaco de toxicidad a largo plazo (72 horas) con respecto al ciclo de vida de *Danio rerio*, mostrando mayor toxicidad a las 72 horas; es el tercer fármaco más agresivo de los cinco probados, ya que incrementan las muertes de embriones en 2.09% por cada ppm del fármaco, además es el tercer fármaco con la concentración más baja entorno a la CL_{50} , establecida en 22 mg/L, debajo de esta concentración, se localizan las concentraciones subtóxicas.

El ibuprofeno posee variabilidad en la mortalidad, considerado altamente agresivo, ya que se observaron diferentes picos de incremento de mortalidad a diferentes tiempos de exposición; este es el fármaco más tóxico de los cinco analizados, en donde hay un 2.86% en el incremento de muertes de embriones por cada ppm del fármaco. Además de los cinco fármacos analizados, es el de la concentración más baja entorno a la CL_{50} , establecida en 16.8 mg/L, debajo de esta concentración, se localizan las concentraciones subtóxicas.

Con estos datos se establecen las curvas de dosis-respuesta en embriones de *Danio rerio* para este tipo de fármacos, siendo un aporte de este trabajo.

La variable que eleva el potencial de riesgo es la concentración; para futuras investigaciones con otros fármacos o con los mismos AINEs es necesario realizar pruebas estadísticas que demuestren la independencia de las variables de tiempo y concentración de exposición o en su caso la dependencia de estas, ya que los fármacos tienen un accionar diferente, recordando que para cuatro de los fármacos analizados con excepción del ácido acetilsalicílico las variables de tiempo y concentración dependen una de la otra.

El presente trabajo es el primer registro de efecto teratogénico en columna vertebral, por acción de estos fármacos de manera individual en embriones de pez cebra, en condiciones controladas, el efecto se observó en los cinco fármacos; se tenía registro de retraso en la eclosión sin malformaciones, anomalías cardíacas, alteraciones en aleta pectoral en embriones, reducción de longitud de cola y cambios en presión arterial media en las primeras etapas de alevín, muerte elevada de ovocitos y alteraciones histológicas en riñones por exposición de: diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol y la mezcla de estos con otros fármacos (Hallare et al., 2004; David y Pancharatna, 2009; Madureira et al., 2011; Galus et al., 2013).

En ácido acetilsalicílico, el daño teratogénico se presentó en 50, 100, 200 y 400 mg/L; el mayor efecto se presentó de igual manera en 400 y 200 mg/L seguido de 50 y 100 mg/L en un mismo grado de efecto teratogénico; las malformaciones con mayor frecuencia fueron las sencillas seguidos de aleta caudal y curvas.

El efecto teratogénico de paracetamol se observó en 37.5, 75 y 150 mg/L en estas concentraciones el grado de efecto teratogénico fue el mismo y las malformaciones con mayor frecuencia fueron las sencillas seguidos de aleta caudal y gancho.

El efecto teratogénico de ibuprofeno, se observó a partir de 6 y 12 mg/L con un mismo grado de efecto teratogénico en ambas concentraciones; las malformaciones con mayor frecuencia son las sencillas seguidas de las de aleta caudal y curvas.

En naproxeno y diclofenaco se muestra el mismo grado de efecto teratogénico en 5, 10 y 20 mg/L, para naproxeno las malformaciones de mayor frecuencia son las sencillas seguidas de aleta caudal y tipo curva; en el caso de diclofenaco las malformaciones de mayor frecuencia son las sencillas seguidas de las curvas y tipo gancho.

El tipo de malformaciones en el caso de ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y naproxeno sigue la misma tendencia, presentando malformaciones sencillas seguidas de las de aleta caudal y finalmente curvas. Para diclofenaco se observa que la tendencia es malformaciones sencillas, curvas y gancho, finalmente paracetamol la tendencia de frecuencias de malformaciones, es sencillas seguidos de aleta caudal y gancho. En el caso de los cinco fármacos las malformaciones de mayor frecuencia son las sencillas y en ningún fármaco se observó malformaciones en espiral, para cuatro fármacos con excepción del diclofenaco la tendencia es malformaciones sencillas seguida de malformaciones en aleta caudal. La frecuencia del tipo de malformaciones puede inferir en un análisis de efecto teratogénico en muestras ambientales complejas la presencia de fármacos AINEs, el obtener con mayor frecuencia malformaciones sencillas seguidas de las de aleta caudal y curvas, además de la ausencia de malformaciones en espiral, infiere que el efecto teratogénico se debe a la posible presencia de los AINEs anteriormente mencionados.

Se demuestra que el biomarcador de columna vertebral es fácil de identificar y muestra ventajas considerables sobre otro tipo de biomarcadores. Es necesario mantener las condiciones fisicoquímicas adecuadas para obtener un número adecuado de embriones para la experimentación, ya que el no cumplir con estos simples requisitos, la conducta reproductiva se ve afectada además del incremento de la tasa de mortalidad de los embriones.

De manera de menor a mayor concentración de exposición de mg/L del fármaco en cuestión, en donde se observa efecto teratogénico, el ibuprofeno es el fármaco en donde se observa efecto teratogénico a menores concentraciones, seguido de naproxeno y diclofenaco, continuando con paracetamol y finalmente ácido acetilsalicílico

Las concentraciones cuantificadas de ácido acetilsalicílico fueron las más bajas en comparación con los demás fármacos; la cuantificación se realizó en una muestra compleja de agua residual de la zona de Pachuca-Hidalgo en donde se cuantificó 0.38 µg/L de este fármaco, este es el primer registro a nivel nacional, por lo tanto, no se puede comparar con alguna concentración encontrada, pero a nivel internacional, están por debajo del rango cuantificado 0.030 y 19.4 µg/L por Moldovan en el 2006 y Nakada en el 2006.

El promedio cuantificado de ibuprofeno fue de 1.27 µg/L, concentración consecutiva al promedio de ácido acetilsalicílico, esta se encuentra dentro del rango cuantificado por diferentes autores de 0.015-100.40 µg/L en diferentes cuerpos de agua en México, desde aguas residuales hasta agua potable (Siemens et al., 2008; Gibson et al., 2010; Félix-Cañedo, 2013; González-González et al., 2014; SanJuan-Reyes et al., 2015).

El promedio cuantificado de naproxeno es de 10 µg/L, promedio sucesivo al ibuprofeno, esta concentración se encuentra en el rango cuantificado por diferentes autores de 0.0052-1717.31 µg/L en diferentes cuerpos de agua en México, desde aguas residuales hasta agua potable (Siemens et al., 2008; Gibson et al., 2010; Félix-Cañedo, 2013; González-González et al., 2014; SanJuan-Reyes et al., 2015).

El promedio cuantificado de paracetamol 48.37 µg/L, promedio más alto de los fármacos cuantificados, esta concentración se encuentra debajo del 698.30-3034.41 µg/L, cuantificado por SanJuan-Reyes y colaboradores en el 2015, este rango alto se debe a que proceden de un efluente de planta de manufactura de AINEs en Toluca, México.

El diclofenaco no se logró cuantificar debido a la disponibilidad del equipo, ya que este es ajeno a la UAEH y seguían los lineamientos de la unidad especializada de análisis farmacológicos con sede en la ciudad de México. Se tenía presupuestado la disponibilidad del equipo hasta agosto-

septiembre del 2016, esta problemática se reflejaría en la viabilidad de la muestra afectando los resultados. No se descarta la presencia del diclofenaco en la muestra, ya que se infiere, que de manera indirecta este presente por su consumo en ventas y prescripciones médicas en la zona de estudio, además de que ha sido detectado en diferentes cuerpos de agua en México, desde aguas residuales hasta agua potable en un rango de 0.028-104.63 µg/L (Siemens et al., 2008; Gibson et al., 2010; Félix-Cañedo, 2013; González-González et al., 2014; SanJuan-Reyes et al., 2015), se recomienda realizar análisis de este fármaco en futuras investigaciones.

Es necesario llevar a cabo una revisión bibliográfica acerca de la técnica analítica a utilizar para la cuantificación y detección de AINEs en el ambiente; la técnica de química analítica de HPLC-MS/MS utilizada en este trabajo para la evaluación de fármacos como contaminantes emergentes es eficiente para muestras complejas de aguas residuales, debido a que el límite de detección se puede situar hasta los fentogramos (1×10^{-15} g) con suficiente especificidad para distinguir y cuantificar a cada uno los contaminantes emergentes; aunque es necesario innovar en nuevas técnicas analíticas de bajo costo, ya que la técnica antes mencionada tiene costos elevados y la accesibilidad es limitada.

Las concentraciones que presentan toxicidad y teratogénesis están por debajo de las concentraciones cuantificadas en este trabajo, además de cuantificaciones en diferentes cuerpos de agua de México (Siemens et al., 2008; Gibson et al., 2010; Félix-Cañedo, 2013; González-González et al., 2014; SanJuan-Reyes et al., 2015) pero aún se desconoce en su totalidad los efectos secundarios de estos fármacos, al interactuar con poblaciones silvestres de flora, así como de fauna, además de los posibles efectos de sinergia y/o antagonismo al tener interacción con otros contaminantes.

El cuantificar concentraciones bajas en el ambiente no significa que se deba descartar a estos fármacos como contaminantes emergentes, la metodología propuesta con el nombre de EPRAS de alta confiabilidad demostrada, sitúa a diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y paracetamol con un alto potencial de riesgo, el caso del ácido acetilsalicílico con un potencial de riesgo intermedio, estas categorías se deben a su cinética ambiental, exposición, biodisponibilidad, sector poblacional expuesto, efectos potencial y efectos reportados del fármaco en cuestión.

La matriz de colorimetría con las variables experimentales probadas en el presente trabajo que fueron: potencial de riesgo, ventas, prescripción médica, concentración cuantificada, toxicidad y teratogénesis, en conjunto para cada fármaco, sitúa a naproxeno así como paracetamol en preocupación prioritaria, ibuprofeno como también diclofenaco, en preocupación alta y ácido acetilsalicílico como preocupación intermedia; por lo tanto con estos fundamentos se insiste que estos fármacos son contaminantes emergentes, por lo tanto, no se deben de descartar solo por las cuantificaciones bajas encontradas, en un muestreo puntual, existen otras variables que los sitúan con una preocupación de intermedia hasta prioritaria para el ambiente y la salud, además que es necesario incrementar los horizontes realizando monitoreos mensuales en diferentes cuerpos de agua, principalmente en cuerpos receptores de aguas residuales municipales como hospitalarias, igualmente de monitoreos en ecosistemas sensibles como arrecifes, sistemas lagunares, manglares entre otros, para tener cifras más cercanas a la cantidad real de fármacos en el ambiente, asimismo del daño biológico que estas concentraciones pudieran estar ocasionando, ya que la percepción general de pérdida de biodiversidad se debe a contaminantes conocidos como metales pesados y plaguicidas, pero los fármacos están diseñados para ocasionar un efecto, el estar presentes en ambientes puede ser factor de la disminución de la población de algunas especies, por los diferentes daños como: efectos en la conducta reproductiva, muerte de embriones, daños en estructuras internas-externas que afecten el funcionamiento normal en el ciclo de vida, bioacumulación y genotoxicidad que pudieran estar ocasionado.

9. CONCLUSIONES

Encuestas en la zona de estudio

- El presente estudio representa el primer trabajo a nivel estatal relacionado cuantitativamente con la prescripción y venta de AINEs.
- El fármaco de mayor prescripción en el sector salud es el paracetamol seguido del naproxeno, ácido acetilsalicílico y diclofenaco.
- El fármaco de mayor venta en las farmacias particulares es el: naproxeno, sucesivo del paracetamol, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico y diclofenaco.
- La vía de mayor interacción entre la población y estos compuestos es a través de la venta en farmacias debido al acceso libre.
- Los altos niveles de prescripción médica y ventas identificados en el presente trabajo, permiten evidenciar el posible potencial de riesgo a la salud y el ambiente.

Análisis químicos

- La cuantificación de AINEs en aguas residuales de Pachuca-Mineral de la Reforma es el primero de su tipo a nivel municipal.
- A nivel nacional es el primer reporte de detección y cuantificación para ácido acetilsalicílico, el segundo de paracetamol y el sexto para ibuprofeno y naproxeno.
- El fármaco de mayor concentración cuantificada en la zona es el paracetamol, seguido del naproxeno, ibuprofeno y ácido acetilsalicílico; el diclofenaco no se logró cuantificar.

Efecto biológico

- Se validó el etanol absoluto al 0.5% como un control negativo, para evaluar el efectos tóxicos y teratogénicos en columna vertebral en embriones de pez cebra.
- En los cinco AINEs analizados con embriones de *Danio rerio*, permite establecer la CL₅₀ y sus concentraciones subtóxicas respectivas.
- El fármaco que presentó mayor efecto tóxico fue el ibuprofeno seguido del diclofenaco, naproxeno, paracetamol y ácido acetilsalicílico.
- La toxicidad de los cinco AINEs evaluados mostró una relación lineal entre concentración y efecto.
- Los cinco AINEs evaluados con embriones de *Danio rerio*, son positivos para el efecto teratogénico con el biomarcador de columna vertebral.
- El fármaco que presentó mayor efecto teratogénico fue el ibuprofeno, seguido de, naproxeno y diclofenaco, paracetamol y finalmente ácido acetilsalicílico.
- La malformación que presentó mayor frecuencia de aparición en los cinco fármacos fue la malformación sencilla, expresándose todas las malformaciones a excepción de la de espiral.
- Los resultados de los efectos tóxicos y teratogénicos de esta investigación justifican la actual preocupación acerca de los posibles efectos biológicos negativos de los fármacos en el ambiente acuático como contaminantes emergentes, aunado al alto consumo, ventas y a las diferentes vías de entrada de estos contaminantes al ambiente.

Potencial riesgo EPRAS

- El modelo tripartita, fundamenta la metodología EPRAS con indicadores endógenos, en un sistema que permite identificar el potencial de riesgo para AINEs.
- La “Evaluación de Potencial de Riesgos Ambientales y Efectos a la Salud (EPRAS)” propuesta en el presente trabajo, es una alternativa para la toma de decisiones rápidas en estudios ecotoxicológicos de fármacos, basada en metodologías similares pero con mejoras en las variables de identificación, de manera específica para AINEs, pero con la capacidad de adecuarse a otros fármacos, los resultados experimentales de este trabajo son equiparables con EPRAS por lo tanto le da un valor agregado de confiabilidad.
- Esta metodología clasifica a cuatro de los cinco fármacos analizados con un alto potencial de riesgo (diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y paracetamol) y ácido acetilsalicílico con un potencial de riesgo intermedio.

Perspectiva general

- A pesar de las concentraciones bajas encontradas aún se desconoce en su totalidad los efectos secundarios de estos fármacos, al interactuar con poblaciones silvestres de flora y fauna, además de los posibles efectos de sinergia y/o antagonismo al tener interacción con otros contaminantes.
- El tener evidencia cuantitativa de concentraciones en ambientes acuáticos, manifiesta la importancia de este trabajo.
- El total de las variables analizadas indica al naproxeno y paracetamol de preocupación prioritaria, ibuprofeno y diclofenaco preocupación alta y ácido acetilsalicílico preocupación intermedia.
- Este trabajo abre nuevas líneas de investigación, es necesario medir otros biomarcadores como: efectos en la conducta reproductiva, daños en estructuras internas y externas que afecten el funcionamiento normal en el ciclo de vida, bioacumulación, mutagénesis, daño genotóxico, cambios etológicos y daño teratogénico

en algún otro biomarcador como: opérculo, ojo, aleta entre otros, en los cuales el pez debe de desarrollarse hasta una etapa juvenil-adulta para poder determinar si el daño está presente, además de realizar muestras complejas de las concentraciones máximas encontradas.

10. BIBLIOGRAFÍA

Agilent Technologies, inc. (2010). Disponible en: www.agilent.com/chem/qqq

Almeida, B., Oehmen, A., Marques, R., Brito, D., Carvalho, G. y Barreto Crespo, M. T. (2013). Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture. *Bioresource Technology*, 133, 31-37.

Amatruda, J. F., Shepard, J. L., Stern, H. M. y Zon, L. I. (2002). Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell*, 1(3), 229-231.

Badii-Zabeh, M.H., Garza-Cuevas, R., Garza-Almanza, V. y Landeros- Flores, J. (2005). Los Indicadores Biológicos en la Evaluación de la Contaminación por Agroquímicos en Ecosistemas Acuáticos y Asociados. *Cultura Científica y Tecnológica*, 6, 4-20.

Barceló, D. (2003). Emerging pollutants in water analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), XIV-XVI.

Barnes, K. K., Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., Meyer, M. T y Barber, L. B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — I) Groundwater. *Science of The Total Environment*, 402(2–3), 192-200.

Bendz, D., Paxéus, N. A., Ginn, T. R. y Loge, F. J. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), 195-204.

Bilotta, J., Barnetta, J.A., Hancock, L. y Saszika, S. (2004). Ethanol exposure alters zebrafish development: A novel model of fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology and Teratology*, 26, 737–743.

Bouissou-Schurtz, C., Houeto, P., Guerbet, M., Bachelot, M., Casellas, C., Mauclair, A.-C., Panetier, P., Delval, C. y Masset, D. (2014). Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(3), 296-303.

Brambilla, G. y Martelli, A. (2009). Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. *Pharmacological Research*, 60(1), 1-17.

- Brandmayr, C., Kerber, H., Winker, M. y Schramm, E. (2015). Impact assessment of emission management strategies of the pharmaceuticals Metformin and Metoprolol to the aquatic environment using Bayesian networks. *Science of The Total Environment*, 532, 605-616.
- Brox, S., Ritter, A. P., Küster, E. y Reemtsma, T. (2014). Influence of the perivitelline space on the quantification of internal concentrations of chemicals in eggs of zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 157, 134-140.
- Carlsson, C., Johansson, A. K., Alvan, G., Bergman, K. y Kühler, T. (2006). Are pharmaceuticals potent environmental pollutants?. Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of the Total Environment*, 364(1-3), 67-87
- Chen, F., Ying, G.-G., Kong, L.-X., Wang, L., Zhao, J.-L., Zhou, L.-J. y Zhang, L.-J. (2011). Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei, China. *Environmental Pollution*, 159(6), 1490-1498.
- Chen, M., Chen, S., Du, M., Tang, S., Chen, M., Wang, W., Yang, H., Chen, Q. y Chen, J. (2015). Toxic effect of palladium on embryonic development of zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 159(0), 208-216.
- Choi, V. W. Y. y Yu, K. N. (2015). Embryos of the zebrafish *Danio rerio* in studies of non-targeted effects of ionizing radiation. *Cancer Letters*, 356(1), 91-104.
- Clemente, Z., Castro, V. L. S. S., Moura, M. A. M., Jonsson, C. M. y Fraceto, L. F. (2014). Toxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in zebrafish embryos under different exposure conditions. *Aquatic Toxicology*, 147(0), 129-139.
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142(3), 185-194.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(3), 309-315.
- CONAGUA, Comisión Nacional de Agua. (2011). Estadísticas del agua en México. SEMARNAT, México, pp. 185.
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W. y Wiegand, C. (2011). Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4), 428-437.

- Corcoran, E., Nellemann C., Baker, E., Bos, R., Osborn D. y Savelli, H. (2010). Sick Water? The central role of wastewater management in sustainable development. A Rapid Response Assessment. United Nations Environment Programme, UN-HABITAT, GRID-Arendal. Nairobi, Kenia, pp. 88.
- Crane, M., Watts, C. y Boucard, T. (2006). Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of The Total Environment*, 367(1), 23-41.
- Cunningham, V. L., Binks, S. P. y Olson, M. J. (2009). Human health risk assessment from the presence of human pharmaceuticals in the aquatic environment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 53(1), 39-45.
- Daniel, W.W. (2011). Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. 4a edición. México: Limusa Wiley, pp. 915.
- Daughton, C. G. y Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect*, 107 Suppl 6, 907-38.
- David, A. y Pancharatna, K. (2009). Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27(3), 390-395.
- de Esch, C., Slieker, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R. y de Groot, D. (2012). Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: A mini review. *Neurotoxicology and Teratology*, 34(6), 545-553.
- de la Lanza-Espino G. 2000. Organismos Indicadores de la Calidad Del Agua y de la Contaminación (Bioindicadores), Ed. Science, México pp. 20,21.
- Díaz-Cruz, M. S., García-Galán, M. J., Guerra, P., Jelic, A., Postigo, C., Eljarrat, E., Farré, M., López de Alda, M. J., Petrovic, M. y Barceló, D. (2009). Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(11), 1263-1275.
- Dietrich, D. R., Prietz, A. y Kiamos, M. A. (1998). *Danio rerio* embryotoxicity and teratogenicity assay (DRETA) for detecting waterborne embryo-toxicants and teratogens. *Toxicological Sciences*, 48(1-S), 259.
- DRUGBANK, Drug & Drug Target Data Base. (2014). Disponible en: <http://www.drugbank.ca/>
- EPA, Environmental Protection Agency. (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. Disponible en: http://www.epa.gov/region6/water/npdes/wet/wet_methods_manuals/atx.pdf

- FACMED-UNAM, Facultad de Medicina-Universidad Nacional Autónoma de México. (2014). Disponible en <http://www.facmed.unam.mx/bmnd/>
- Fatta-Kassinos, D., Meric, S. y Nikolaou, A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal Bioanal Chem*, 399(1), 251-75.
- Feng, L., van Hullebusch, E. D., Rodrigo, M. A., Esposito, G. y Oturan, M. A. (2013). Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review. *Chemical Engineering Journal*, 228(0), 944-964.
- Fent, K., Weston, A. A. y Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 122-159.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R. L., Pollio, A. y Garric, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(3), 359-370.
- Félix-Cañedo, T. E., Durán-Álvarez, J. C. y Jiménez-Cisneros, B. (2013). The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Science of The Total Environment*, 454-455, 109-118.
- Galus, M., Jeyaranjan, J., Smith, E., Li, H., Metcalfe, C. y Wilson, J. Y. (2013). Chronic effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 132-133, 212-222.
- García-Bonilla, L., Rosell, A., Torregrosa, G., Salom, J. B., Alborch, E., Gutiérrez, M., Díez-Tejedor, E., Martínez-Murillo, R., Agulla, J., Ramos-Cabrera, P., Castillo, J., Gasull, T. y Montaner, J. (2011). Recommendations guide for experimental animal models in stroke research. *Neurología (English Edition)*, 26(2), 105-110.
- Gaytán, J.C. (2006). Evaluación ecotoxicológica del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente, a través de la actividad ganadera Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hgo. México. pp. 82.
- Gaytán-Oyarzún, J. C., González-Ledesma, L., Pulido-Flores, G., Moks, S. W., Gordillo-Martínez, A. J., Cabrera-Cruz, R. y Pérez-Cruz, E. (2008). Evaluación de la calidad del agua en la reserva de la biosfera Barranca de Metztlán, Hidalgo, México a través de la inducción de malformaciones en columna vertebral en pez cebra (*Danio rerio* Hamilton, 1822) en Libro estudios biológicos en las áreas naturales del Estado de Hidalgo, México, UAEH p. 117-124.

- Gaytán-Oyarzun, J.C., Pulido-Flores, G., Scott-Monks, W., López-Escamilla, A.L., López-Herrera M., Romero-Bautista, L., Villavicencio-Nieto, M. y Pérez-Escandon, B. Evaluación rápida de biodiversidad para estimar prioridad biológica (ERP BIO). (2012). En Samperio-Rosas, L. y J. González-González. Calidad Ambiental y desarrollo sustentable Indicadores TOMO II. Ed. Universidad Autónoma del Estado de Guerrero. México. pp. 29-42.
- Gibson, R., Durán-Álvarez, J. C., Estrada, K. L., Chávez, A. y Jiménez-Cisneros, B. (2010). Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere*, 81(11), 1437-1445.
- Giménez-Pérez, A. (2012). Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía líquida de alta eficacia con detección por espectrometría de masas para la determinación de antiinflamatorios no esteroideos en leche y tejido muscular de origen animal. Tesis de maestría en producción animal. Universidad Politécnica de Valencia, España. pp. 113.
- Gómez, M. J., Petrović, M., Fernández-Alba, A. R. y Barceló, D. (2006). Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1114(2), 224-233.
- Gómez, M. J., Martínez Bueno, M. J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A. R. y Agüera, A. (2007). Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 66(6), 993-1002.
- Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., García-Medina, S. y SanJuan-Reyes, N. (2014). DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 164(0), 21-26.
- González-González, E. D., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Razo-Estrada, C. y Pérez-Pastén, R. (2014). Metals and Nonsteroidal Anti-inflammatory Pharmaceuticals Drugs Present in Water from Madín Reservoir (Mexico) Induce Oxidative Stress in Gill, Blood, and Muscle of Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Arch Environ Contam Toxicol*, 67, 281–295.
- González, L. L. (2005). Evaluación del efecto del cloruro de mercurio (HgCl₂) en la inducción de malformaciones de columna vertebral del pez cebra (*Danio rerio* Hamilton 1822) durante diferentes etapas del desarrollo embrionario. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hgo. México. pp. 94.
- Gonzalez-Rey, M. y Bebianno, M. J. (2014). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 148(0), 221-230.

- Green, R. E., Newton, I. A. N., Shultz, S., Cunningham, A. A., Gilbert, M., Pain, D. J. y Prakash, V. (2004). Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian subcontinent. *Journal of Applied Ecology*, 41(5), 793-800.
- Grenni, P., Patrolecco, L., Ademollo, N., Tolomei, A. y Barra Caracciolo, A. (2013). Degradation of Gemfibrozil and Naproxen in a river water ecosystem. *Microchemical Journal*, 107(0), 158-164.
- Grimalt-Brea, S. (2009). Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal. Tesis de doctoral. Área de Química Analítica, en el Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas, Departamento de Química Física y Analítica de la Universitat Jaume I de Castellón, España. pp. 493.
- Grunwald, D. J. y Eisen, J. S. (2002). Headwaters of the zebrafish [mdash] emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet*, 3(9), 717-724.
- Hallare, A. V., Köhler, H. R. y Triebkorn, R. (2004). Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere*, 56(7), 659-666.
- Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., Yun, J., Khim, J. S., Zhang, X. y Giesy, J. P. (2010). Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquatic Toxicology*, 98(3), 256-264.
- Henschel, K. P., Wenzel, A., Diedrich, M. y Fliedner, A. (1997). Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Regul Toxicol Pharmacol*, 25(3), 220-225.
- Hermsen, S. A. B., van den Brandhof, E.-J., van der Ven, L. T. M. y Piersma, A. H. (2011). Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their *in vivo* potencies. *Toxicology in Vitro*, 25(3), 745-753.
- Hernando, M. D., Heath, E., Petrovic, M. y Barcelo, D. (2006). Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study. *Anal Bioanal Chem*, 385(6), 985-991.
- Hoeger, B., Köllner, B., Dietrich, D. R. y Hitzfeld, B. (2005). Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic Toxicology*, 75(1), 53-64.
- IMSS, Instituto Mexicano del Seguro Social. (2011). Cuadro Básico de Medicamentos. IMSS. Disponible en <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/pdf/cuadros-basicos/CBM.pdf>

IMS, HEALTH. (2013).

Disponible en: <http://noticias.imshealth.com/index.php?q=6#.V37bN6JsQwE>

INE, Instituto Nacional de Ecología. (2013). Disponible en: <http://www.ine.gob.mx/sqre-temas/766-sqre-eco#3>

INECC, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2014). Disponible en: <http://www.inecc.gob.mx/>

INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2007). Anuario estadístico Hidalgo.

Aguascalientes: INEGI. Disponible en:

<http://www.inegi.org.mx/lib/buscador/bibliotecas/busqueda.aspx?Page=2&pagesize=10&textoBus=defunciones&busxMetodo=1&CveBiblioteca=KCBIB&av=1&tipoR=ReddeConsultaInterna&tipoRedIntExt=4>

INEGI. (2009). Prontuario de información geográfica. Pachuca, Hidalgo, México: INEGI.

Disponible en:

<http://www.inegi.org.mx/lib/buscador/bibliotecas/busqueda.aspx?Page=2&pagesize=10&textoBus=defunciones&busxMetodo=1&CveBiblioteca=KCBIB&av=1&tipoR=ReddeConsultaInterna&tipoRedIntExt=4>

INEGI. (2010). Disponible en:

<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=13#V>

INEGI. (2014). Consultado en marzo del 2014 Disponible en

<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mapa/denue/default.aspx>

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtiera, L. y Rubino, M. (2005). Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Science of The Total Environment*, 348(1–3), 93-101

Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Colín-Cruz, A., Neri-Cruz, N. y García-Medina, S. (2013). Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92(0), 32-38.

Jar, A. M. (2014). Bienestar animal y el uso de animales de laboratorio en la experimentación científica. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 77-79.

Jones, L. J. y Norton, W. H. (2015). Using zebrafish to uncover the genetic and neural basis of aggression, a frequent comorbid symptom of psychiatric disorders. *Behavioural Brain Research*, 276, 171-180.

- Kais, B., Schneider, K. E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C. y Braunbeck, T. (2013). DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-Implications for the fish embryo test (FET). *Aquatic Toxicology*, 140–141(0), 229-238.
- Khetan, S. K. y Collins, T. J. (2007). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to Green Chemistry. *Chemical Reviews*, 107(6), 2319-2364.
- Kim, J. W., Ishibashi, H., Yamauchi, R., Ichikawa, N., Takao, Y., Hirano, M., Koga, M. y Arizono, K. (2009). Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *Journal of Toxicological Sciences*, 227-32.
- Kim, P., Park, Y., Ji, K., Seo, J., Lee, S., Choi, K., Kho, Y. y Park, J. (2012). Effect of chronic exposure to acetaminophen and lincomycin on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*, and potential mechanisms of endocrine disruption. *Chemosphere*, 89(1), 10-18.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. y Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253-310.
- Kosjek, T., Heath, E. y Krbavčič, A. (2005). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environment International*, 31(5), 679-685.
- Kristensen, D. M., Lesné, L., Le Fol, V., Desdoits-Lethimonier, C., Dejucq-Rainsford, N., Leffers, H. y Jégou, B. (2012). Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. *International Journal of Andrology*, 35(3), 377-384.
- Kümmerer, K. (2008). Pharmaceuticals in the Environment – A Brief Summary. In K. Kümmerer (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment* (pp. 3-21): Springer Berlin Heidelberg, 3-21.
- Lahti, M., Brozinski, J. M., Jylhä, A., Kronberg, L. y Oikari, A. (2011). Uptake from water, biotransformation, and biliary excretion of pharmaceuticals by rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(6), 1403-1411.
- Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E. y Braunbeck, T. (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2), 196-209.
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1–4), 1-20.

- Lee, J. y Freeman, J. L. (2014). Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: A mini-review. *NeuroToxicology*, 43(0), 57-64.
- Li, W. C. (2014). Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution*, 187, 193-201.
- Lienert, J., Burki, T. y Escher, B. I. (2007). Reducing micropollutants with source control: substance flow analysis of 212 pharmaceuticals in faeces and urine. *Water Sci Technol*, 56(5), 87-96.
- Liu, X., Lee, J., Ji, K., Takeda, S. y Choi, K. (2012). Potentials and mechanisms of genotoxicity of six pharmaceuticals frequently detected in freshwater environment. *Toxicology Letters*, 211(1), 70-76.
- Madureira, T. V., Barreiro, J. C., Rocha, M. J., Rocha, E., Cass, Q. B. y Tiritan, M. E. (2010). Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal). *Science of The Total Environment*, 408(22), 5513-5520.
- Madureira, T. V., Cruzeiro, C., Rocha, M. J. y Rocha, E. (2011). The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal)—Experimental assessment using a zebrafish embryo test. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(2), 212-217.
- Mcintyre, N., Knowles-Yáñez, K. y Hope, D. (2000). Urban ecology as an interdisciplinary field: differences in the used of “urban” between the social and natural sciences. *Urban Ecosystems*, 4, 5-24.
- Mehinto, A. C., Hill, E. M. y Tyler, C. R. (2010). Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science and Technology*, 44(6), 2176-2182.
- Milan, M., Pauletto, M., Patarnello, T., Bargelloni, L., Marin, M. G. y Matozzo, V. (2013). Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. *Aquatic Toxicology*, 126, 17-29.
- Moldovan, Z. (2006). Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere*, 64(11), 1808-1817.
- Murray, K. E., Thomas, S. M. y Bodour, A. A. (2010). Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environmental Pollution*, 158(12), 3462-3471.

- Nagel, R. (2002). DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*-a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex*, 19 Suppl 1, 38-48.
- Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K. y Takada, H. (2006). Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Research*, 40(17), 3297-3303.
- Nasevicius, A. y Ekker, S. C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature Genet.*, 26, 216-220.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-054-ECOL-1993. (1993). Que establece el procedimiento para determinar la incompatibilidad entre dos o más residuos considerados como peligrosos. Disponible en: http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/normas/res_pel/no_054.html
- Norma Oficial Mexicana, NOM-127-SSA1-1994. (1994). Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Disponible en : <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m127ssa14.html>
- Norma Oficial Mexicana, NOM-067-ECOL-1994 (1994). Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de los sistemas de alcantarillado o drenaje municipal. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4865934&fecha=06/01/1995
- Norma Oficial Mexicana, NOM-001-SEMARNAT-1996. (1996). Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Disponible en: <http://www.itver.edu.mx/images/Imagenes/ano2015/SGA2/consumodeenergia/NOM-001-SEMARNAT-1996.pdf>
- Norma Oficial Mexicana, NOM-087-ECOL-SSA1-2002. (2002). Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
- Norma Oficial Mexicana, NOM-052-SEMARNAT-2005. (2005). Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4912592&fecha=23/06/2006
- Norma Oficial Mexicana, NOM-059-SEMARNAT-2010. (2010). Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091

Norma Oficial Mexicana NOM-165-SEMARNAT-2013. (2013). Que establece la lista de sustancias sujetas a reporte para el registro de emisiones y transferencia de contaminantes.

Disponible en:

http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5330750&fecha=24/01/2014

Oberem, A. (2000). The use of a refined zebrafish embryo bioassay for the assessment of aquatic toxicity. *Lab Animal*, 29(7), 32-40.

Orozco, B.C. (2003) Contaminación ambiental: una visión desde la química. Parafinfo S. A. Madrid, España, pp. 680.

Oviedo-Gómez, D. G. C., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Razo-Estrada, C. y Gómez-Oliván, L. M. (2010). Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29(1), 39-43.

Pal, A., Gin, K. Y.-H., Lin, A. Y.-C. y Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of The Total Environment*, 408(24), 6062-6069.

Parolini, M., Quinn, B., Binelli, A. y Provini, A. (2011). Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. *Chemosphere*, 84(1), 91-100.

Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Riva, C. y Provini, A. (2009). An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicology in Vitro*, 23(5), 935-942.

Pérez-Ruiz, A. A., López-Mantecón, A. M. y León, I. (2002). Antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Consideraciones para su uso estomatológico. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(2), Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/est/vol39_2_02/Est04202.htm.

Popovic, M., Zaja, R., Fent, K. y Smital, T. (2014). Interaction of environmental contaminants with zebrafish organic anion transporting polypeptide, Oatp1d1 (Slco1d1). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(1), 149-158.

Prieto, F. y Baéz, O. A. (2011). Concentración de arsénico en agua potable y sus implicaciones de bioacumulación y teratogénesis en el pez cebra (*Danio rerio*). *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 2(1), 37-50.

Prieto, J. (2007). Antiinflamatorios No Esteroideos (AINES). ¿Dónde estamos y hacia dónde nos dirigimos? (Primera Parte). *Cient Dent*, 4(3), 203-212.

PUBCHEM. (2014). Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Quiterio-Pérez, M. (2012) Evaluación del efecto biológico de los principales pesticidas organoclorados presentes en el agua y sedimento de la laguna de Metztlán, Hidalgo, México con base a su "Potencial de Riesgo" Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hgo. México. pp. 74.
- Reyes-Silva, J. A. (2016). Antibacterianos de plantas medicinales para contribuir al control de la contaminación por antibióticos y bacterias multirresistentes. Tesis de Doctorado en Ciencias Ambientales. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hgo. México. pp. 194.
- Rivera-Castillo, I. (2006). Determinación de la frecuencia de malformaciones en columna vertebral, opérculo y aleta en *Danio rerio* hamilton, 1822, como posibles biomarcadores en la valoración de daño teratogénico. Tesis de licenciatura. Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hgo. México. pp. 73.
- Roberts, P. H. y Thomas, K. V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of The Total Environment*, 356(1-3), 143-153.
- Rodríguez-Álvarez, T., Rodil, R., Quintana, J. B., Triñanes, S. y Cela, R. (2013). Oxidation of non-steroidal anti-inflammatory drugs with aqueous permanganate. *Water Research*, 47(9), 3220-3230.
- Rodríguez-Anaya, A, Gaytán-Oyarzún, J.C., Prieto-García, F., Gordillo-Martínez, A.J. y Marmolejo-Santillán, Y. (2014). Model for estimating the environmental risk potential per presence of drugs nonsteroidal antiinflammatory (NSAIDs) consumption high. *Ciencia e técnica vitivinícola*, 29(11), 51-76.
- Sacher, F., Lange, F. T., Brauch, H.-J. y Blankenhorn, I. (2001). Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography A*, 938(1-2), 199-210.
- Sánchez, O., Medellín, R., Aldama, A., Goettsch, B., Soberón, J. y Tambutti, M. (2007). Método de evaluación del riesgo de extinción de las especies silvestres en México (MER). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales-Instituto Nacional de Ecología, México, DF, pp. 170.
- SanJuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Islas-Flores, H., González-González, E. D., Cardoso-Vera, J. D. y Jiménez-Vargas, J. M. (2015). NSAID-manufacturing plant effluent induces geno- and cytotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*). *Science of The Total Environment*, 530-531, 1-10.

- Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C. y Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1–3), 45-95.
- Saravanan, M., Devi, K. U., Malarvizhi, A. y Ramesh, M. (2012). Effects of Ibuprofen on hematological, biochemical and enzymological parameters of blood in an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(1), 14-22.
- Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R. y Quinn, B. (2011). Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus spp.*) and their comparison with standardized toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*, 62(7), 1389-1395.
- Schriks, M., Heringa, M. B., van der Kooi, M. M. E., de Voogt, P. y van Wezel, A. P. (2010). Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. *Water Research*, 44(2), 461-476.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H. y Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68(2), 141-150.
- SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2009). El medio ambiente en México en resumen. Disponible en:
http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/resumen_2009/index.html
- SEMARNAT. (2012). Compendio de estadísticas ambientales. Disponible en:
http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/Compendio_2012/index.html
- Sharma, P., Sharma, S., Patial, V., Singh, D. y Padwad, Y. S. (2014). Zebrafish (*Danio rerio*): A potential model for nephroprotective drug screening. *Clinical Queries: Nephrology*, 3(2–4), 97-105.
- Siemens, J., Huschek, G., Siebe, C. y Kaupenjohann, M. (2008). Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City–Mezquital Valley. *Water Research*, 42(8–9), 2124-2134.
- Tambutti, M., Aldama, A., Sánchez, O., Medellín, R. y Soberón J. (2001) “La determinación del riesgo de extinción de especies silvestres en México.” *Gaceta Ecológica* 61, 11-21.
- Taxe-Wuersch, A., De Alencastro, L. F., Grandjean, D. y Tarradellas, J. (2005). Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research*, 39(9), 1761-1772.

- Tennant, R. W. y Ashby R. J. (1991). Classification according to chemical structure, mutagenicity to Salmonella and level of carcinogenicity of a further 39 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. *Mutation Research*, 25, 209-227.
- Torres-Guerra, S. y Gutiérrez, J. (2009). Mercado farmacéutico en México: tamaño, valor y concentración. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 26(1), 46-50.
- TOXNET, Toxicology data Network. (2014). Disponible en: <http://toxnet.nlm.nih.gov>
- Trevarrow, B. y Robison, B. (2004). Genetic Backgrounds, Standard Lines, and Husbandry of Zebrafish. *Methods in Cell Biology*, 77, 599-616.
- Triebkorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H. R. y Schwaiger, J. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 68(2), 151-166.
- Valcárcel, Y., Alonso, S. G., Rodríguez-Gil, J. L., Maroto, R. R., Gil, A. y Catalá, M. (2011). Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain. *Chemosphere*, 82(7), 1062-1071.
- Van den Bulck, K., Hill, A., Mesens, N., Diekman, H., De Schaepdrijver, L. y Lammens, L. (2011). Zebrafish developmental toxicity assay: A fishy solution to reproductive toxicity screening, or just a red herring? *Reproductive Toxicology*, 32(2), 213-219.
- Vera, G., Tam, J., Vera, V. y Pinto, E. (2001). Pruebas ecotoxicológicas con cadmio y cromo usando postlarvas del pejerrey *Odontesthes (Austromenidia) regia* Hildebrand. Facultad de Ciencia Biológicas, UNMSM, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 8(2):1-9.
- Verenitch, S. S., Lowe, C. J. y Mazumder, A. (2006). Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 193-203.
- Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M. y Barceló, D. (2010). Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*, 389(3-4), 416-428.
- Walker, M. B., Miller, C. T., Coffin Talbot, J., Stock, D. W. y Kimmel, C. B. (2006). Zebrafish furin mutants reveal intricacies in regulating Endothelin1 signaling in craniofacial patterning. *Developmental Biology*, 295(1), 194-205.

Westerfield, M. (1995). *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 3rd Edition. U.S.A, University of Oregon, pp. 385.

WHO, World Health Organization. (1982). Rapid assessment of sources of air, water, and land pollution. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 113.

Yokoyama, H., Horie, T. y Awazu, S. (2006). Naproxen-induced oxidative stress in the isolated perfused rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 160(2), 150-158.

Zfbiolabs, Zebra Fish biolabs. (2015). Disponible en http://zfbiolabs.com/es/why_zebrafish/

Ziylan, A. y Ince, N. H. (2011). The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: Treatability by conventional and non-conventional processes. *Journal of Hazardous Materials*, 187(1–3), 24-36.