Instituto Tecnológico de Toluca

“BIODEGRADACIÓN DE DICLOFENACO POR BACTERIAS AISLADAS DE AGUA RESIDUAL DE UN EFLUENTE HOSPITALARIO”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA:
ENRIQUE AGUIRRE MIRANDA
No. CONTROL:
M22280269

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MA. GUADALUPE MACEDO MIRANDA

CODIRECTORA DE TESIS:
M. EN C. MARIBEL VERÓNICA ALBITER LÓPEZ

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2023

Metepec, Edo. de México, 11/enero/2024
DEPI-3200-MCIA-02/2024

ENRIQUE AGUIRRE MIRANDA
ESTUDIANTE DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTE

De acuerdo con los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México y las disposiciones en este Instituto, habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado **"“Biodegradación de diclofenaco por bacterias aisladas de agua residual de un efluente hospitalario”**, la División de Estudios de Posgrado e Investigación de este Instituto, concede la Autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Agradezco su atención, me despido de usted.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
"Educación, integridad y ciencia"

EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ccp. Archivo
JLGR/RCR

Metepec, Edo. de México, 11/enero/2024
DEPI-3200-MCIA-03/2024

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE

Por este medio comunicamos a usted que la comisión Revisora designada para analizar la tesis denominada **"BIODEGRADACIÓN DE DICLOFENACO POR BACTERIAS AISLADAS DE AGUA RESIDUAL DE UN EFLUENTE HOSPITALARIO",** que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Maestro en Ciencias en Ingeniería Ambiental presenta el **Enrique Aguirre Miranda** con número de control M22280269 para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad para proceder a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE

Dra. María Guadalupe Macedo Miranda

M. en C. Maribel Verónica Albiter López

Dr. Francisco Javier Illescas Martínez

Dr. Pedro Ávila Pérez

ccp. Archivo
JLGR/RCR

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Tecnológico de Toluca por abrirme las puertas de sus instalaciones y brindarme la oportunidad de realizar la maestría.

A la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Unidad Iztapalapa, por el material, equipos e instalaciones prestadas, en especial a la Dra. Yanin Islas Barrios y al Dr. Carlos Fernández Rendón por su valioso apoyo y aporte en las pruebas de biología molecular.

Agradezco al CONAHCyT por la beca otorgada para la realización de estudios de maestría.

A mis directores de tesis, Dra. Ma. Guadalupe Macedo Miranda y M.C. Maribel Verónica Albiter López por haberme hecho partícipe del proyecto y confiar en mí para la realización de este proyecto, compartirme sus conocimientos, así como todo el apoyo en cada decisión que se tomó para el desempeño de esta investigación.

A mis revisores, Dr. Francisco Javier Illescas Martínez y Dr. Pedro Ávila Pérez por sus valiosas aportaciones que en determinado momento también fueron de contribución en mi formación.

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis lo dedico en especial a mis padres Rubén y Esther, que siempre nos han alentado a mis hermanos y a mí a ser mejores personas cada día, en el ámbito profesional y el personal.

A mi familia por sus consejos y motivación, su paciencia y comprensión, y mostrarme todo su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

A aquellas personas que sin mencionar sus nombres nos hemos acompañado en la realización de esta nueva meta.

RESUMEN

Los productos farmacéuticos están diseñados para mejorar la salud humana y animal, pero incluso los fármacos que brindan beneficios podrían traer consigo algunas inquietudes concernientes a las consecuencias de exposición indirectas a los organismos. Para ilustrar esta situación se usa al diclofenaco (DCF) como caso de estudio, su presencia en los cuerpos de agua genera situaciones no favorables para los diversos organismos expuestos a este fármaco. La exposición de organismos acuáticos a distintas concentraciones del diclofenaco causa daños irreversibles en su metabolismo y funciones orgánicas, poniendo en peligro la prevalencia de estos. En esta investigación se caracterizó un efluente hospitalario de tercer nivel y se aisló una cepa bacteriana capaz de degradar al fármaco diclofenaco.

Para este fin, primero se implementó y confirmó el método para la cuantificación del diclofenaco; el método elegido fue cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (UPLC). Un equipo de cromatografía de líquidos Waters Acquity UPLC y columna de separación Acquity UPLC BEH C18 fue empleado, con fase móvil metanol y H_3PO_4 0.01% en proporción del 65:35, flujo de 0.25 mL/min, longitud de onda de 275 nm, y tiempo de retención de 3.2 min. La curva de calibración fue lineal en un rango de 0.1 a 20 mg/L DCF en la linealidad del sistema y de 0.25 a 15 mg/L en la linealidad del método. El límite de detección y cuantificación teóricos son 0.02 y 0.065 mg/L respectivamente. La exactitud del método fue aceptable dentro del ± 20%. La precisión siendo menor al 2% el coeficiente de variación. El estudio de la confirmación del método indica que es confiable para la medición del diclofenaco en las condiciones cromatográficas establecidas previamente.

La cepa bacteriana aislada de efluente de agua residual de hospital fue identificada como *Klebsiella pneumoniae* MS14393 por la técnica PCR. La cepa tiene capacidad de degradar niveles altos de diclofenaco, degrada un 88.16 % en 192 horas una concentración de 1 280 mg/L y a 500 mg/L un 91.44% en 264 horas, mientras que a bajas concentraciones de 100 mg/L y 10 mg/L no degrada el fármaco. El empleo de glucosa como una fuente adicional de carbono permitió degradaral diclofenaco em porcentajes mayores, así como disminuir los tiempos de degradación; a 1 280 mg/L de DCF se obtuvo un porcentaje de degradación de 94.84 % desde las 48 horas y 97.49 % a las 264 horas, en nivel de concentración de 500 mg/L se alcanzó un 95.55 % desde las 24 horas, valor que se mantuvo hasta las 264 horas con 94.08 %, a 100 mg/L se degradó el 89.28 % en 24 horas, en la concentración de 10 mg/L no hubo degradación. La cepa bacteriana en conjunto con la glucosa como fuente adicional de carbono tuvo mejor capacidad de degradación desde las 24 horas de prueba.

ABSTRACT

Pharmaceuticals are designed to improve human and animal health, but even drugs that provide benefits may bring with them some concerns regarding the consequences of indirect exposure to organisms. To illustrate this situation, diclofenac (DCF) is used as a case study; its presence in water bodies generates unfavorable situations for the various organisms exposed to this drug. The exposure of aquatic organisms to different concentrations of diclofenac causes irreversible damage to their metabolism and organic functions, endangering the prevalence of these organisms. In this research, a third level hospital effluent was characterized and a bacterial strain capable of degrading the drug diclofenac was isolated.

For this purpose, the method for the quantification of diclofenac was first implemented and confirmed; the method chosen was ultraperformance liquid chromatography (UPLC). A Waters Acquity UPLC liquid chromatography equipment and Acquity UPLC BEH C18 chromatographic column was employed, with methanol and H3PO4 0.01% in a 65:35% ratio as mobile phase, flow rate of 0.25 mL/min, wavelength of 275 nm, retention time of 3.2 min. The calibration curve was linear over the range of 0.1 to 20 mg/L DCF for the linearity of the system and 0.25 to 15 mg/L DCF for the linearity of the method. Theoretical limit of detection and quantification are 0.02 and 0.065 mg/L respectively. The accuracy of the method was acceptable within ± 20%. Precision being less than 2% coefficient of variation. The confirmation study of the method indicates that it is reliable for the measurement of diclofenac under the chromatographic conditions previously established.

The bacterial strain isolated from hospital wastewater effluent was identified as Klebsiella pneumoniae MS14393 by the PCR technique. The strain can degrade high levels of diclofenac. The strain has the capacity to degrade high levels of diclofenac, degrading 88.16% in 192 hours for the concentration of 1280 mg/L and 91.44% in 264 hours for 500 mg/L, while low concentrations of 100 mg/L and 10 mg/L the drug is not degraded. The use of glucose as an additional carbon source made it possible to degrade diclofenac in higher percentages, as well as to decrease degradation times; for 1280 mg/L of DCF a degradation percentage of 94.84 % was obtained from 48 hours and 97.49 % in 264 hours, for 500 mg/L concentration level 95.55 % was reached from 24 hours, value that was maintained until 264 hours with 94.08 %, for concentration of 100 mg/L, 89.28 % was degraded in 24 hours, no degradation occurred at the 10 mg/L concentration. The bacterial strain in conjunction with glucose as an additional carbon source had better degradation capacity from 24 hours of testing.

CONTENIDO

ÍNDICE

Página

INTRODUCCIÓN…… 1

1. ANTECEDENTES…… 5

1.1. Marco teórico…… 9

1.1.1. La industria farmacéutica en México…… 9

1.1.2. Monitoreo de los residuos farmacéuticos en el medio ambiente…… 10

1.1.3. Incidencia global de los fármacos en el medio ambiente…… 12

1.1.4. Efectos ambientales de los fármacos…… 14

1.1.5. Riesgo ambiental por acumulación de farmacéuticos…… 17

1.1.6. Diclofenaco como contaminante emergente…… 17

1.1.7. Propiedades fisicoquímicas del diclofenaco…… 20

1.1.8. Persistencia, bioacumulación, bioconcentración y biomagnificación del diclofenaco…… 22

1.1.9. Metabolismo humano del diclofenaco…… 24

1.1.10. Efectos tóxicos inducidos por el diclofenaco…… 27

1.1.11. Agua residual de hospital…… 29

1.2. Métodos de cuantificación del diclofenaco…… 30

1.2.1. Espectrofotometría de UV-Vis…… 31

1.2.2. Cromatografía de líquidos…… 31

1.3. Microorganismos…… 32

1.3.1. Crecimiento y aislamiento bacteriano…… 32

1.3.2. Pruebas bioquímicas…… 34

1.3.3. Prueba PCR…….. 34

2. MÉTODO……..……... 36

2.1. Bosquejo del método…… 36

2.2. Metodología…… 37

2.2.1. Implementación del método para la cuantificación del diclofenaco por UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatograph)…..…….. 37

2.2.2. Confirmación del método para la cuantificación del diclofenaco por UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatograph)……... 38

2.2.3. Muestreo de agua residual de un efluente hospitalario …..…….. 40

2.2.4. Aislamiento de bacterias del agua residual del efluente hospitalario con capacidad de degradación del diclofenaco…….. 41

2.2.4.1. Acondicionamiento bacteriano con diclofenaco…… 41

2.2.4.2. Aislamiento de bacterias acondicionadas con diclofenaco…….. 42

2.2.5. Caracterización de cepa bacteriana aislada e identificación por prueba PCR……... 43

2.2.5.1. Caracterización de cepa bacteriana aislada…….. 43

2.2.5.2. Identificación de las bacterias aisladas empleando la técnica de PCR…….. 43

2.2.6. Ensayos de biodegradación del diclofenaco por las bacterias aisladas, en matriz acuosa……..... 44

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN……..……..…….. 45

3.1. Confirmación metrológica del método cromatográfico UPLC para determinación de diclofenaco…… 45

3.1.1. Determinación de la longitud de onda del diclofenaco por UV-Vis…… 45

3.1.2. Adecuabilidad del sistema…….. 46

3.1.3. Intervalo lineal y de trabajo……. 48

3.1.4. Límite de detección y límite de cuantificación…….. 51

3.1.5. Exactitud…….. 51

3.1.6. Precisión……... 53

3.1.6.1. Repetibilidad……... 53

3.1.6.2. Reproducibilidad……... 53

3.2. Muestreo de agua residual de efluente hospitalario…… 54

3.3. Caracterización fisicoquímica de agua residual de efluente hospitalario……. 56

3.4. Aislamiento bacteriano de agua residual de efluente de hospital…….. 57

3.5. Caracterización de cepa bacteriana aislada e identificación por prueba PCR. 59

3.5.1. Caracterización de cepa bacteriana aislada……... 59

3.5.2. Identificación de cepa bacteriana aislada por prueba PCR…… 61

3.6. Pruebas de degradación de diclofenaco por cepa bacteriana *Klebsiella pneumoniae* MS14393…… 62

3.6.1. Medición de la densidad óptica a concentraciones de 1 280, 500, 100 y 10 mg/L de diclofenaco……... 62

3.6.2. Evaluación de la degradación de diclofenaco por exposición a cepa bacteriana aislada y fuente adicional de carbono…… 68

4. CONCLUSIONES…………..…… 82

5. REFERENCIAS………….. 85

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Fármacos comercializados a nivel mundial detectados en el medio acuático……. 14

Tabla 2. Ejemplos seleccionados de productos farmacéuticos con efectos adversos en organismos no objetivo…….…… 15

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas y farmacológicas del diclofenaco……... 21

Tabla 4. Factor de bioconcentración y biocumulación en peces……... 23

Tabla 5. Efectos toxicológicos del diclofenaco sobre varias especies acuáticas…… 28

Tabla 6. Compuestos detectados en agua residual de hospital……... 30

Tabla 7. Parámetros de adecuabilidad y criterios de aceptación…….. 37

Tabla 8. Límites de detección y cuantificación……. 39

Tabla 9. Estadístico ANOVA…….. 40

Tabla 10. Acondicionamiento bacteriano a diferentes concentraciones de diclofenaco…… 42

Tabla 11. Absorbancias a distintas longitudes de onda…….. 45

Tabla 12. Resultados de evaluación de adecuabilidad en distintas fases móviles…. 46

Tabla 13. Condiciones cromatográficas de operación…… 47

Tabla 14. Condiciones óptimas de adecuabilidad……... 48

Tabla 15. Evaluación de las curvas de calibración para la linealidad del sistema…... 49

Tabla 16. Evaluación de las curvas de calibración para la linealidad del método…... 50

Tabla 17. Límite de detección y cuantificación……. 51

Tabla 18. Exactitud del día 1……... 52

Tabla 19. Exactitud del día 2……... 53

Tabla 20. Reproducibilidad……. 54

Tabla 21. Caracterización fisicoquímica del agua residual de efluente hospitalario.. 57

Tabla 22. Diferenciación de colonias bacterianas en medios de cultivo selectivo….. 60

Tabla 23. Características metabólicas de la cepa bacteriana aislada…….. 61

Tabla 24. Densidad óptica de crecimiento bacteriano en solución de 1 280 mg/L de diclofenaco……..……..... 62

Tabla 25. Densidad óptica de crecimiento bacteriano en solución de 500 mg/L de diclofenaco……..…. 64

Tabla 26. Densidad óptica de crecimiento bacteriano en solución de 100 mg/L de diclofenaco……..…. 65

Tabla 27. Densidad óptica de crecimiento bacteriano en solución de 10 mg/L de diclofenaco…… 67

Tabla 28. Prueba de degradación de diclofenaco a 1 280 mg/L por *Klebsiella pneumoniae* MS14393 y glucosa…….……. 69

Tabla 29. Prueba de degradación de diclofenaco a 500 mg/L por *Klebsiella pneumoniae* MS14393 y glucosa…….……. 72

Tabla 30. Prueba de degradación de diclofenaco a 100 mg/L por *Klebsiella pneumoniae* MS14393 y glucosa…….……. 75

Tabla 31. Prueba de degradación de diclofenaco a 10 mg/L por *Klebsiella pneumoniae* MS14393 y glucosa…….……. 78

Tabla 32. Comparativo de pruebas de degradación de diclofenaco a cuatro niveles de concentración con inóculo e inóculo con fuente adicional de carbono…… 81

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1.1. Fuentes de contaminantes emergentes y su movilidad en el agua…… 11

Figura 1.2. Detección global de los fármacos…….. 13

Figura 1.3. Concentración máxima de diclofenaco en agua superficiales en comparación con la concentración sin efectos…… 16

Figura 1.4. Estructura del diclofenaco……... 18

Figura 1.5. Movilidad del diclofenaco en la cadena trófica……. 24

Figura 1.6. Vía metabólica del diclofenaco en el cuerpo humano……. 26

Figura 1.7. Metabolitos del diclofenaco en porcentaje por dosis oral…… 27

Figura 2.1. Bosquejo del método……... 36

Figura 3.1. Espectros de barrido de 5 y 30 mg/L de diclofenaco…… 45

Figura 3.2. Cromatograma del diclofenaco…….. 47

Figura 3.3. Ubicación del sitio de muestreo…….. 55

Figura 3.4. Registro de agua residual de un centro médico de tercer nivel…..…… 55

Figura 3.5. Toma de muestras de registro de agua residual……..…… 56

Figura 3.6. Siembra en estría en TSA enriquecido a concentración de 1 280 mg/L de diclofenaco……..…… 58

Figura 3.7. Colonias bacterianas aisladas de agua residual de hospital en TSA enriquecido a 1 280 mg/L diclofenaco……..……... 58

Figura 3.8. Cepas aisladas reservadas en medio TSA con 1 280 mg/L de diclofenaco…… 59

Figura 3.9. Densidad óptica en ensayos de biodegradación de 1 280 mg/L de diclofenaco…… 63

Figura 3.10. Densidad óptica en ensayos de biodegradación de 500 mg/L de diclofenaco…… 64

Figura 3.11. Densidad óptica en ensayos de biodegradación de 100 mg/L de diclofenaco…… 66
Figura 3.12. Densidad óptica en ensayos de biodegradación de 10 mg/L de diclofenaco……..... 67
Figura 3.13. Curva de calibración de diclofenaco en intervalo de 0.10 a 20 mg/L….. 68
Figura 3.14. Prueba de degradación en concentración de 1 280 mg/L de diclofenaco……..…….. 70
Figura 3.15. Porcentaje de degradación en concentración de 1 280 mg/L de diclofenaco…… 71
Figura 3.16. Prueba de degradación en concentración de 500 mg/L de diclofenaco. 73
Figura 3.17. Porcentaje de degradación en concentración de 500 mg/L de diclofenaco…… 74
Figura 3.18. Prueba de degradación en concentración de 100 mg/L de diclofenaco. 76
Figura 3.19. Porcentaje de degradación en concentración de 100 mg/L de diclofenaco…… 77
Figura 3.20. Prueba de degradación en concentración de 10 mg/L de diclofenaco… 79
Figura 3.21. Porcentaje de degradación en concentración de 10 mg/L de diclofenaco…… 80

INTRODUCIÓN

El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente que, como resultado del crecimiento poblacional, el desarrollo urbano, económico y la industrialización, se ha dispuesto de este recurso como medio de eliminación obteniendo un deterioro alarmante (Ulvi et al., 2022). Durante décadas, toneladas de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la agricultura, la industria, la medicina, etc., han sido vertidas al medio ambiente sin considerar las posibles consecuencias. El problema de contaminación del agua comenzó a hacerse notable ya desde principios del siglo XIX, cabe añadir, que, en consecuencia, la escasez está adquiriendo proporciones cada vez mayores y más graves. (Barceló y López, 2008).

La aparición de elementos “no deseables” y tóxicos, y la variación en las concentraciones de los constituyentes comunes, tienen su origen en el denominado ciclo del agua. En alguna parte de este ciclo, en el cual convergen distintos aspectos ambientales y actividades humanas, es donde se produce la contaminación del agua o, mejor dicho, la alteración de su calidad. De acuerdo con este ciclo, las principales vías de entrada de contaminantes en el medio ambiente acuático son las aguas residuales, entre las que se incluyen las urbanas, industriales, y las de origen ganadero. La prevalencia de una u otra depende en gran medida del tipo de contaminación de que se trate y el nivel de depuración o atenuación natural (si existe) que experimentan.

Los efectos que la contaminación química del agua produce son múltiples; entre los más importantes cabe destacar la acción tóxica y cancerígena, incidencia sobre la producción de alimentos, limitación del uso del agua con fines recreativos, reducción de las posibilidades de su uso industrial y agropecuario. Los riesgos que siguen a la contaminación del agua son difíciles de precisar, ya que muchas veces las dosis tóxicas sobre las cuales se trabaja son muy pequeñas, y el problema aún se complica más por la presencia simultánea de diversos contaminantes (Barceló y López, 2008).

El inevitable crecimiento de la población, el desarrollo de la urbanización y la industrialización han promovido el incremento de la concentración de algunos contaminantes que, en consecuencia, también introducen nuevas sustancias hacia el medio ambiente (Ulvi et al., 2022). Recientemente la disponibilidad del agua está amenazada debido al incremento de contaminantes antropogénicos de sectores industriales y no industriales. Alrededor de 2 millones de toneladas de aguas residuales son descargadas a las aguas naturales cada día (Norman, 2017). Las Naciones Unidas reportan un estimado de 1 500 km^3 de aguas residuales que se generan en promedio. Este valor es cercano a seis veces las aguas de río existentes en el mundo (UNESCO, 2003). Aproximadamente el 90% de

los suministros de agua en las ciudades se encuentra contaminada, del cual el 70% proviene de los hogares y el 33% es agua residual de origen industrial que es vertida directamente hacia lagos y ríos sin tratamiento previo (Geissen et al., 2015).

Parte de los sustancias que constituyen la contaminación del agua son los contaminantes emergentes (CE), son compuestos que provienen de distinto origen y naturaleza química cuya presencia en el medio ambiente, o las posibles consecuencias de esta, han pasado en gran parte inadvertidas, algunos de estos compuestos pueden estar o no regulados legalmente, de ellos se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en ám bito ambiental y en la vida diaria del hombre que, incluso para los países más desarrollados pueden ser una amenaza para el medio ambiente y la salud humana (Olicón-Hernández et al., 2019; Li, 2014; Verlicchi et al., 2010; Esplugas et al., 2007), por esto, requieren de su investigación. La clasificación de los CE comprende diferentes compuestos tales como: productos farmacéuticos (antibióticos, drogas antiinflamatorias no esteroidales, antipsicóticos, drogas para disminuir el colesterol, antipiréticos, analgésicos) (Poirier-Larabie et al., 2016), productos de cuidado personal, medios de contraste, plastificantes, aditivos de alimentos, preservantes de madera, detergentes, surfactantes, desinfectantes, retardantes de flama, pesticidas, hormonas sintéticas y naturales, y algunos productos de desinfección, estos son compuestos que han sido descargados a diversas matrices ambientales, una de ellas es el agua, ya sea por vía urbana o industrial (Ulvi et al., 2022; Vishnu Priyan et al., 2021; Sophia y Lima, 2018; Li, 2014); siendo las medicinas o productos farmacéuticos los que representan un especial interés dentro de los contaminantes emergentes (Verlicchi et al., 2012; Escapa et al., 2018; García-Rodríguez et al., 2014).

En el ámbito farmacéutico de los contaminantes emergentes, los fármacos conforman un elemento crucial de la medicina moderna y aportan beneficios considerables para la sociedad (Patel et al., 2019). En todo el mundo se administran cerca de 4 000 ingredientes fármacos activos a través de medicamentos con prescripción, medicamentos sin prescripción y medicamentos veterinarios (Straub et al., 2016). Si bien los fármacos están sometidos a una regulación estricta en búsqueda de su eficacia y la seguridad del paciente, los efectos secundarios adversos que pueden conllevar en el medio ambiente todavía no se han estudiado lo suficiente y los acuerdos o convenios internacionales no los amparan (Acuña et al., 2015).

Este grupo de contaminantes que con su creciente uso y consumo han sido liberados a los cuerpos de agua en cantidades relevantes que pueden resultar en afectaciones al medio ambiente. Estas sustancias no son monitoreadas de forma rutinaria debido a que no están incluidas dentro de las

legislaciones, y su destino ambiental no siempre es bien entendido. Este tipo de drogas son de los grupos más relevantes de sustancias que impactan de manera significativa los ecosistemas acuáticos debido a su uso universal y sus propiedades fisicoquímicas y por su incapacidad de ser reducidas por sistemas de tratamiento de plantas de aguas residuales (Sharma et al., 2020; Zenker, et al., 2014).

En años recientes, el aumento en el consumo de drogas farmacéuticas ha llegado a ser de gran preocupación por parte de la comunidad científica, quienes han alertado acerca de los riesgos por tales sustancias químicas para la salud humana y el medio ambiente (Pereira et al., 2016). En términos generales, las drogas farmacéuticas son introducidos constantemente al medio ambiente y permanecen ahí por largos períodos de tiempo, donde pueden ejercer extremadamente distintos efectos tanto en agua superficial, agua subterránea e incluso suelo (Bartrons y Peñuelas, 2017; Nunes et al., 2020).

Entre los contaminantes emergentes se encuentran los fármacos; y uno de los más utilizados es el diclofenaco, que es una droga antiinflamatoria no esteroidal ampliamente recetado diariamente como antipirético y analgésico (Ceresa et al., 2021; Sui et al., 2016; Ben et al., 2019). Es consumido ampliamente en tabletas, como agente tópico y, es administrado también por vía intravenosa, se adquiere de forma libre ya que no requiere de prescripción médica necesaria para su venta, ya sea de consumo para uso humano o veterinario. Gran parte del fármaco consumido se excreta en orina y heces, en su forma original puede entrar en aguas naturales y residuales por la inadecuada disposición de los residuos municipales. A menudo se encuentra como un residuo tóxico persistente.

La eliminación de diclofenaco por plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales es ineficaz. Por lo tanto, se puede descargar al medio ambiente con efluentes de aguas residuales tratadas, agua reciclada y lodos de plantas de aguas residuales (Kibuye et al., 2015). El fármaco se ha detectado en varios ambientes acuáticos en todo el mundo en rangos de concentración de ng/L y µg/L. Puede transportarse a través de las cadenas alimentarias causando efectos adversos tóxicos en muchos organismos acuáticos, incluso en concentraciones ambientalmente bajas.

Debido al uso no regulado de la sustancia farmacéutica diclofenaco (DCF), se ha convertido en uno de los productos farmacéuticos de mayor uso a nivel mundial, tanto que se puede adquirir sin prescripción alguna. Es el principal analgésico y antiinflamatorio que se consume de forma muy común, y al ser desechado por el organismo después de la metabolización, éste se vuelve parte de los efluentes municipales y en gran manera por los efluentes de origen hospitalario, dichos efluentes

desembocan en cuerpos de aguas y algunos de ellos en plantas de tratamientos de aguas residuales.

Los efectos adversos que puede conllevar el DFC en cuerpos de agua, es alterar los pequeños ecosistemas que son necesarios para el sano equilibrio de estos, sin mencionar los efectos toxicológicos que esto provoca en los organismos.

Por lo tanto, es necesario investigar tratamientos alternativos para eliminación de diclofenaco de aguas residuales, que sean eficaces, económicos y amigables con el ambiente. En este trabajo se pretende estudiar el contaminante emergente (CE's), diclofenaco (DFC), un medicamento de uso muy común como anti-inflamatorio, el cual ha sido de interés debido a su uso masivo alrededor del mundo. Para este trabajo se buscará aislar e identificar bacterias capaces de degradar dicho fármaco, a partir de un efluente de aguas residuales de origen hospitalario. Se evaluará la capacidad de degradación del diclofenaco por las cepas microbianas, en una matriz acuosa y se buscarán las mejores condiciones de degradación aplicando el método biológico.

En el desarrollo de este proyecto para evaluar la biodegradación del diclofenaco en matriz acuosa por bacterias aisladas de agua residual de un efluente de hospital, se requiere de la implementación y confirmación del método para la cuantificación de diclofenaco por medio de la cromatografía líquida de ultra desempeño, así como la caracterización fisicoquímica del efluente hospitalario. Los análisis microbiológicos nos permitirán aislar e identificar las bacterias provenientes del efluente hospitalario que sean capaces de degradar el diclofenaco. Por último, se realizarán las pruebas de degradación del diclofenaco por las bacterias aisladas en matriz acuosa, se buscarán las mejores condiciones de degradación del diclofenaco en matriz acuosa, como pH, temperatura, concentración del fármaco y fuentes adicionales de carbono.

1. ANTECEDENTES.

En años recientes, el creciente consumo de drogas farmacéuticas ha tomado una gran importancia para la comunidad científica debido a la influencia de riesgos que tienen estos químicos para la salud humana y el medio ambiente (Sharma et al., 2020; Nunes, et al., 2020; Nieto et al., 2017). En la última década ha aumentado la concentración de residuos farmacéuticos, especialmente en aguas residuales, pero también en aguas freáticas, suelo, abonos, biota e incluso en el agua potable (Chen et al., 2020). Dado que los fármacos se diseñan específicamente para causar efectos farmacológicos en organismos vivos, no es de extrañar que se realicen estudios que demuestren que los fármacos tienen efectos adversos en la flora y la fauna y en la salud de los ecosistemas. Evaluar los riesgos potenciales a largo plazo representa un gran reto, sobre todo si tomamos en cuenta que en la actualidad el uso de estos fármacos sigue en aumento (Weber et al., 2014).

Los estudios que existen actualmente, respecto a la presencia de productos y subproductos farmacéuticos en el agua, se enfocan en su presencia en las aguas residuales y en las plantas de tratamiento de dichas aguas, con especial énfasis en los procesos y eficiencias de remoción de estos en las plantas. En lo que respecta a la presencia de productos y subproductos farmacéuticos en agua para consumo humano, los estudios que se han desarrollado son menos numerosos, así como en los ambientes acuáticos, pero no por ello deja de ser un riesgo menor la presencia de los contaminantes emergentes (Poirier- Larabie et al., 2016; Henríquez, 2012).

La presencia de fármacos en aguas residuales representa un grave problema para las plantas tratadoras ya que no eliminan con eficiencia este tipo de contaminantes, debido a que no fueron diseñadas para esos fines, al descargar las aguas a los sistemas acuáticos, causan un desequilibrio que apenas muestra las primeras consecuencias de su presencia, siendo una de ellas la resistencia de bacterias patógenas a los medicamentos.

En el organismo, después del efecto biológico, los ingredientes activos del fármaco son excretados en su misma forma activa, o bien como sustancia metabolizada (Zind et al., 2018). Los sistemas de aguas residuales municipales recogen una gran variedad de fármacos y sus metabolitos, administrados en hogares y hospitales. Los medicamentos sin utilizar desechados inadecuadamente en lavabos y sanitarios también desembocan en los sistemas de aguas residuales municipales. Las instalaciones de tratamiento de aguas residuales convencionales, incluyendo los procesos de fangos activados, no consiguen eliminar en su totalidad los fármacos de las aguas residuales. De hecho, el nivel de eficiencia de eliminación oscila entre el 20 y 40 % en los fármacos (Moreira et al., 2018). De

este modo, los residuos llegan a los ríos, lagos y acuíferos subterráneos. Además, se ha demostrado que las instalaciones de fabricación de productos farmacéuticos emiten ingredientes activos en corrientes de agua cercanas (Larsson et al., 2007; Weber et al., 2014).

En términos generales, el consumo de productos farmacéuticos ha ido en incremento a nivel mundial y nuevos compuestos están siendo introducidos continuamente en el mercado (Barra Caracciolo et al., 2015). La mayor parte de estos compuestos no son completamente metabolizados por el cuerpo humano y, por consiguiente, conlleva a la excreción del principio activo sin transformar y la de sus metabolitos y/o conjugados, ésta es una de las principales fuentes de residuos farmacéuticos en el medio ambiente (Rivera-Utrilla et al., 2013). Otras fuentes importantes son la inadecuada disposición de medicamentos sin uso o caducados como residuos domésticos vertidos al drenaje, así como los residuos hospitalarios (Li, 2014; Bessa et al., 2017; Sharma et al., 2020).

Los fármacos veterinarios empleados en la cría de animales pasan al entorno del suelo, donde se utilizan abonos como fertilizantes. Con el tiempo, los residuos de estos medicamentos se acumulan en el suelo o penetran en las aguas freáticas o superficiales, también pueden ser absorbidos por plantas (Carter et al., 2014). Los fármacos veterinarios empleados en la acuicultura penetran directamente en las aguas superficiales. En el medio ambiente, las reacciones de transformación y degradación alteran la movilidad, la persistencia y el destino de los residuos farmacéuticos (Weber et al., 2014; Parolini, 2020).

Los estudios que se han realizado en torno a la biodegradación de estos contaminantes emergentes han comenzado a tomar auge en el campo de la investigación con el objetivo de eliminar estos compuestos que dañan los ecosistemas, alterando ya sea la biología de las pequeñas especies en agua y suelo, proyectando su peligro a niveles superiores en la cadena trófica. El fármaco diclofenaco (DCF), bien conocido como un antiinflamatorio no esteroidal, se ha detectado en el ambiente en concentraciones que plantean una amenaza a los organismos vivos.

Bessa y colaboradores (2017), realizaron un estudio sobre el “Enriquecimiento de cepas bacterianas para la biodegradación de diclofenaco y carbamazepina de lodo activado”, el cual muestra que la carbamazepina y el diclofenaco son marcadores importantes en la contaminación del medio ambiente por el uso de productos farmacéuticos. Este estudio constó del aislamiento de cepas bacterianas capaces de degradar estos microcontaminantes de lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales. Después de enriquecimientos selectivos, se aislaron

dos cepas bacterianas capaces de degradar a la carbamazepina y una cepa bacteriana capaz de degradar al diclofenaco.

Las cepas fueron identificadas por secuencia genética 16S rRNA. La cepa *Brevibacterium* sp. D4 fue capaz de degradar 35% de 10 mg/L de diclofenaco como una sola fuente de carbono; una alimentación periódica de acetato como fuente de carbono suplementaria resultó en un aumento de la biodegradación a niveles superiores del 90%, con un simultáneo incremento del rango de biodegradación. Las cepas *Starkeya* sp. C11 y *Rhizobium* sp. C12, fueron capaces de degradar 30% de 10 mg/L de carbamazepina como una sola fuente de carbono; un suplemento con acetato no mejoró la biodegradación de carbamazepina por medio de estas cepas. En conclusión, se encontró que el lodo activado albergaba bacterias capaces de degradar los dos principales contaminantes ambientales y puede ser potencialmente útil para aplicaciones biotecnológicas (Bessa et al., 2017).

En 2018, se realizó un estudio por Moreira y colaboradores, que consistió en la biodegradación del DCF usando la cepa bacteriana *Labrys portucalensis* F11 (obtenida en Porto, Portugal). La biotransformación del 70% de DCF (1.7-3.4 µM), abastecida con una sola fuente de carbono, se logró en 30 días. La degradación completa se alcanzó vía co-metabolismo con acetato, sobre un período de 6 días para 1.7 µM y 25 días para 34 µM de DCF. La detección e identificación de metabolitos de biodegradación se realizaron por UPLC-QTOF/MS/MS. Se propuso la estructura química de los 12 metabolitos. La degradación de DCF por la cepa F11 procede principalmente por reacciones de hidroxilación; la formación de especies de imina benzoquinona para ser un paso central en el paso de biodegradación. Además, este es el primer reporte que identificó metabolitos conjugados, resultantes de reacciones de sulfatación del DCF por la bacteria. Liberación estequiométrica de cloro y la no detección de metabolitos al final de los experimentos son fuertes indicaciones de la completa degradación del DCF por cepa F11. Como aporte de investigación científica, este es el primer reporte que apunta a la completa biodegradación de DCF por una cepa bacteriana simple aislada del medio ambiente.

Algunas de las alternativas propuestas para la degradación de los contaminantes emergentes han sido el uso de algas, tal como en el año del 2019 se estudió la biodegradación del diclofenaco por dos microalgas verdes: *Picocystis sp*. y *Graesiella sp*. En este estudio se evaluó y se comparó bajo condiciones de laboratorio, los efectos y la eficiencia de remoción del DCF por medio de estas dos microalgas aisladas de dos fuentes contaminadas en Tunisia. Dos cepas de microalgas aisladas *Picocystis sp*. y *Graciella sp*. fueron cultivadas bajo diferentes concentraciones de DCF, y su crecimiento, actividad fotosintética y eficiencia de remoción del diclofenaco fueron monitoreadas.

Los resultados mostraron que el DCF tuvo escasos efectos inhibitorios sobre el crecimiento de la microalga la cual no excedió el 21% para *Picocystis* y 36% para *Graesiella* después de 5 días. Ambas especies mostraron diferentes patrones en términos de eficiencia de remoción. En presencia de *Picocystis sp*., las cantidades de DCF removido fueron superiores al 73%, 43% y 25% de 25, 50 y 100 mg/L respectivamente; mientras que solamente el 52%, 28% y 24% fueron removidos en presencia de *Graesiella* en las mismas concentraciones probadas de DCF. La remoción de DCF se garantizó principalmente por biodegradación. Para demostrar la mejora del mecanismo involucrado, se llevaron a cabo análisis de metabolitos. Dos productos de biodegradación/biotransformación se detectaron en presencia de *Picocystis*.

Este estudio indicó que *Picocystis* llevó a cabo una satisfactoria capacidad de crecimiento y eficiencia de remoción de DCF y por consiguiente se usó para tratamiento de sistemas acuosos contaminados con DCF (Ben et al*.,* 2019).

Un estudio realizado por Murshid y Dhakshinamoorthy (2019), para la degradación del DCF y el ácido Mefenámico, incluyó estudios de cinética, identificación de metabolitos y análisis de actividad enzimática, ilustra la habilidad de un consorcio bacteriano conformado de *Alcaligenes faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus haemolycitus y Proteus mirabilis,* para degradar las drogas ya mencionadas. Se obtuvieron degradaciones del 89% para el Diclofenaco de sodio y 92% de degradación de ácido Mefenámico dentro de un período de 120 h en una concentración de 150 mg/L. El máximo rango de crecimiento específico (µmax) de microorganismos fue 0.096 mg/Lh y 0.0943 mg/Lh para diclofenaco de sodio y ácido mefenámico respectivamente, mientras que el máximo rango específico (Qmax) para diclofenaco de sodio fue de 0.89 mg/Lh y 0.95 mg/Lh para ácido mefenámico. Metabolitos residuales predichos por análisis de espectroscopía fueron diclofenaco de hidroxi-sódico, ácido hidroxi-mefenámico, ácido carboxi-mefenámico y glucurónidos de acilo**.** La presencia de los productos metabólicos mencionados sugirió que la actividad enzimática de Mono-oxigenasa y Glucuronidasa catalizaron la reacción de degradación. El estudio enfatiza el potencial del consorcio microbiano en degradar dos de las drogas más perjudiciales del medio ambiente y que pueden posiblemente ser usadas en el futuro.

Olicón-Hernández y colaboradores (2019) reportaron resultados sobre la biodegradación del DCF, describe por primera vez el uso de *Penicillium oxalicum*, un hongo ascomiceto, a escala en matraz y biorreactor. En este estudio se presentó el rol de las enzimas, la ruta metabólica, análisis de toxicidad aguda y comparación entre biomasa libre y sin movimiento. Pequeñas porciones del

material *P. oxalicum* llamados pellets degradaron 100 µM de DCF en 24 horas, y la actividad de enzimas CYP450 fue clave para la eliminación del contaminante.

El escalamiento a un biorreactor se optimizó por la reducción de nutrientes, y caracterizando la actividad de los pellets libres, espuma de poliuretano y biomasa inmóvil de plástico K-1 revelaron que los pellets libres tienen la mayor eficiencia en el sistema de remoción de DCF, obteniendo la total eliminación en 36 horas. Así mismo se detectaron metabolitos hidroxilados durante el proceso, sugiriendo que una mezcla de procesos biológicos y físicos estuvieron involucrados en la eliminación de DCF. El uso de *P. oxalicum* redujo la toxicidad aguda del medio suplementado con DCF y representa una alternativa novedosa y atractiva para la eliminación de compuestos farmacéuticos.

1.1. Marco Teórico.

1.1.1. La industria farmacéutica en México.

A nivel mundial existen diversas formas de contribución a la economía de cada país, específicamente en América del Norte hay distintas actividades que contribuyen a la economía que, de acuerdo al Sistema de Clasificación de América del Norte (SCIAN) la actividad de la industria química es una de las más importantes, esta actividad comprende: 1) fabricación de productos químicos básicos; 2) fabricación de productos farmacéuticos; 3) fabricación de jabones, limpiadores y preparaciones de tocador; 4) fabricación de resinas y hules sintéticos, y fibras químicas; 5) fabricación de pinturas, recubrimientos y adhesivos; 6) fabricación de fertilizantes, pesticidas y otros agroquímicos y; 7) fabricación de otros productos químicos. Dentro de esta clasificación la fabricación de productos farmacéuticos representa el 15.4 % de establecimientos en América del Norte (INEGI, 2019; CANIFARMA, 2022).

El SCIAN junto con la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica (CANIFARMA) posicionan a la industria farmacéutica como la octava actividad más importante en México, ya que diversas actividades económicas contribuyen a su demanda. Las cuatro actividades más destacadas son la propia fabricación de productos farmacéuticos ocupando el 32.7 %, los hospitales generales con 22.6 %, los consultorios médicos con 11.7 % y los hospitales de otras especialidades médicas representando el 9.5 % y el resto de las actividades cubren 76.5 % del total de la demanda. Los productos farmacéuticos de mayor demanda son los antibióticos con el 15 %, medicamentos para el sistema digestivo y para el metabolismo con el 10.5 %, medicamentos para uso veterinario con 9.4 %, vitaminas y compuestos vitamínicos con el 87 %, medicamentos para el sistema

cardiovascular con el 6.4 %. La constante y creciente demanda por el consumo de los productos farmacéuticos se ha visto reflejada en el aumento de los establecimientos y de la industria farmacéutica y, por ende, las unidades de la fabricación de preparaciones farmacéuticas. El número de establecimientos aumentó de 408 en 2003 a 908 en 2021, este aumentó se representó como un crecimiento anual del 3.6 %. De las entidades federativas del país, son diez estados que tienen el 81.9 % de todos los establecimientos y el 96.6 % de la producción bruta. El Estado de México ocupa el tercer lugar en establecimientos con el 10.3 %, Jalisco ocupa el segundo lugar con 16.8 % y la Ciudad de México el primer lugar con 28.2 % de los establecimientos. En cuanto a la producción bruta la Ciudad de México ostenta el primer puesto con 35.8 % y el Estado de México con 20.2 %, en tercera posición el estado de Jalisco con 17.0 % (INEGI, 2019; CANAFARMA, 2022). Con los datos mencionados de esta sección, se puede observar que hay una clara tendencia en el incremento de la demanda del consumo de los productos farmacéuticos. No obstante, hay mucho que estudiar acerca de los inconvenientes que se generan al medio ambiente por el uso y disposición de este tipo de productos.

1.1.2. Monitoreo de los residuos farmacéuticos en el medio ambiente.

Por sus características intrínsecas, los productos fármacos son altamente solubles en agua, que se liberan al medio ambiente vía excreción, ya sea metabolizados o no metabolizados, por vertido de los productos no utilizados o caducados (Verlicchi et al., 2010), o bien procedentes, como residuos, de los procesos de producción, por lo que pueden estar presentes en todas las etapas de un ciclo de vida del agua puntual y referido a su uso. Si bien no se trata de compuestos persistentes, éstos sí son constantemente utilizados y vertidos, y los sistemas de tratamiento convencionales de aguas potables y aguas residuales muchas veces no son capaces de eliminarlos, conllevando a un serio problema de contaminación en los cuerpos de agua de diferentes países (Vishnu Priyan et al., 2021; Escapa et al., 2018), su concentración aumenta en el ecosistema, por lo que se requiere de nuevos sistemas de tratamiento para que sean eliminados (Zind et al., 2021; Henríquez, 2012).

El ciclo de vida del agua al que se hace referencia y que implica la presencia de contaminantes emergentes, considera las distintas actividades humanas y rubros ambientales, donde se produce la alteración de la calidad del agua producto de la presencia de estos contaminantes emergentes. (Sui et al., 2015; Patel et al., 2019; Henríquez, 2012). Las principales vías de entrada de contaminantes en el medio ambiente acuático son las aguas residuales, entre las que se incluyen las urbanas, industriales, y las de origen ganadero (Barceló y López, 2008). La figura 1.1 muestra las rutas por las que los contaminantes emergentes se introducen al ciclo del agua.

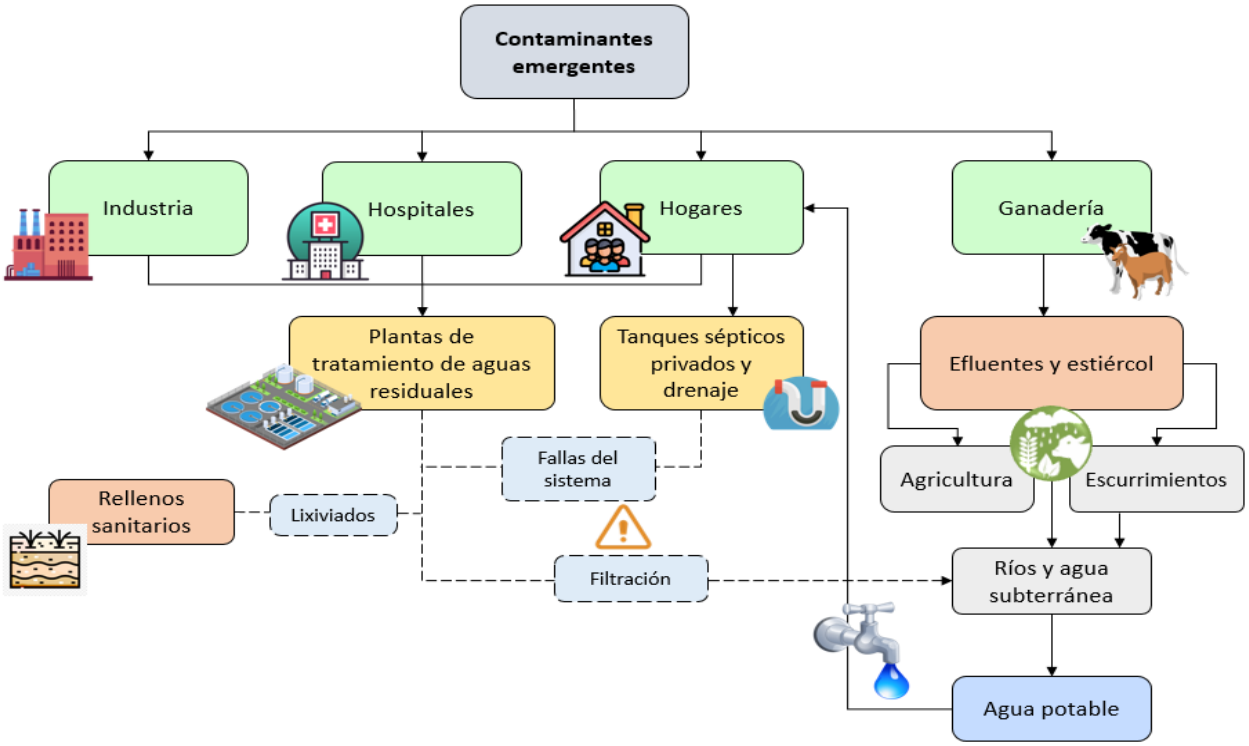


Figura 1.1. Fuentes de contaminantes emergentes y su movilidad en el agua (adaptado de Sui et al., 2015; Patel et al., 2019; Sophia y Lima, 2018; Zhang et al., 2008; Moreira et al., 2018; Vieira et al., 2021).

Estudios actuales han demostrado que la principal ruta de entrada de los compuestos farmacéuticos hacia el medio ambiente ha tomado lugar a través de las aguas residuales de origen urbano y hospitalario (Bartrons y Peñuelas, 2017; Comber et al., 2018; Nguyen et al., 2018). Aquellas fuentes de contaminación por compuestos farmacéuticos son por ejemplo los hospitales, clínicas y salas de emergencia, estos tipos de fuentes merecen tener mayor consideración, de ellos se derivan múltiples fármacos de disposición continua por las distintas actividades que se llevan a cabo dentro de estos establecimientos (Frédéric y Yves, 2014).

Los fármacos se encuentran presentes en distintas matrices medioambientales como aguas superficiales, aguas freáticas, aguas del sistema de alcantarillado municipal y el suelo, para poder monitorearlos en concentraciones relevantes se requieren de métodos que sean tan sensibles y avanzados en química analítica que puedan ser determinados, gran variedad de contaminantes emergentes presentan concentraciones tales que en algunos casos pueden llegar al orden de nanogramos por litro (ng/L) (Chen et al., 2020; Wielens-Becker et al., 2019).

Hoy en día, más de 700 contaminantes emergentes (CE), sus metabolitos y productos de transformación, están listados como presentes en el medio ambiente acuático europeo (Norman, 2022). Los contaminantes emergentes no son sustancias que comúnmente sean monitoreadas en el medio ambiente, debido a esto, son sustancias que tienen el potencial de entrar al ambiente y causar efectos ecológicos adversos conocidos o supuestos y/o efectos a la salud humana. En algunos casos, la liberación de los contaminantes emergentes al ambiente tiene comúnmente incidencia a largo plazo, y pueden no ser reconocidos o identificados sino hasta que nuevos métodos de detección sean desarrollados. Los CE's no están actualmente incluidos en los programas de seguimiento rutinario internacional, y cuyo destino, comportamiento y efectos ecotoxicológicos a menudo no están bien comprendidos del todo (Geissen et al., 2015; Schulze et al., 2010). Como se muestra en la Figura 1.1, los CE's pueden liberarse de distintas fuentes de origen, desde plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales, o de fuentes dispersas de deposición atmosférica o desde la agricultura y ganadería.

1.1.3. Incidencia global de los fármacos en el medio ambiente.

Los productos farmacéuticos han sido un hito en el desarrollo científico humano, una de sus características es que poseen un largo periodo de vida, y como beneficios se han adquirido curas para distintas enfermedades que incluso se consideran de gran mortandad, su aporte a la mejora de la calidad de vida es evidente. Este gran éxito ha traído consigo el innegable crecimiento de los contaminantes emergentes (Patel et al., 2019).

Las medidas legislativas que se han ido adoptando progresivamente para evitar la contaminación química del agua y los riesgos que se derivan de ella, han contribuido a paliar parcialmente esta situación. Sin embargo, la creciente demanda de agua y el descubrimiento continuo de nuevos contaminantes potencialmente peligrosos dejan clara la necesidad de seguir investigando en todas aquellas áreas que puedan contribuir a proteger la salud humana y la del medio ambiente, conseguir un uso sostenible del agua y atenuar los efectos de las sequías y el cambio climático (Barceló y López, 2008).

Actualmente ha ido en aumento el número de estudios en los que se ha demostrado que los fármacos están presentes en el medio ambiente a nivel mundial (IWW, 2014; Hughes et al., 2013; Weber et al., 2014). De acuerdo con una revisión efectuada en más de 1 000 publicaciones internacionales, se han detectado residuos farmacéuticos en 71 países de todo el mundo, en los cinco grupos regionales de las Naciones Unidas. Mayoritariamente se encuentran en las aguas

superficiales y efluentes sanitarios, pero también se han encontrado en aguas subterráneas, abonos, suelo y otras matrices medioambientales (Weber et al., 2014). Se han detectado más de 600 sustancias farmacéuticas activas (o sus metabolitos y productos de transformación) en el medio ambiente que pertenecen a distintos grupos terapéuticos (Poirier et al., 2019): antibióticos, analgésicos, reguladores de lípidos, beta-bloqueadores, medios de contraste de rayos X, estrógenos sintéticos, drogas para tratamientos de cáncer y enfermedades cardíacas (Ulvi et al., 2022; Challis et al., 2014; Wielens Becker et al., 2020).

A pesar de que la mayoría de los descubrimientos se han publicado en países industrializados, las campañas de monitorización están ganando protagonismo en los países en desarrollo y emergentes. Gracias a estas campañas conocemos la incidencia de fármacos en el medio ambiente a nivel mundial. Así, por ejemplo, el diclofenaco, un medicamento inflamatorio no esteroidal, ha sido detectado en entornos acuáticos en 50 países. En la figura 1.2. se muestra el número de fármacos detectados en aguas superficiales, aguas freáticas, agua corriente y/o agua potable (Weber et al., 2014).

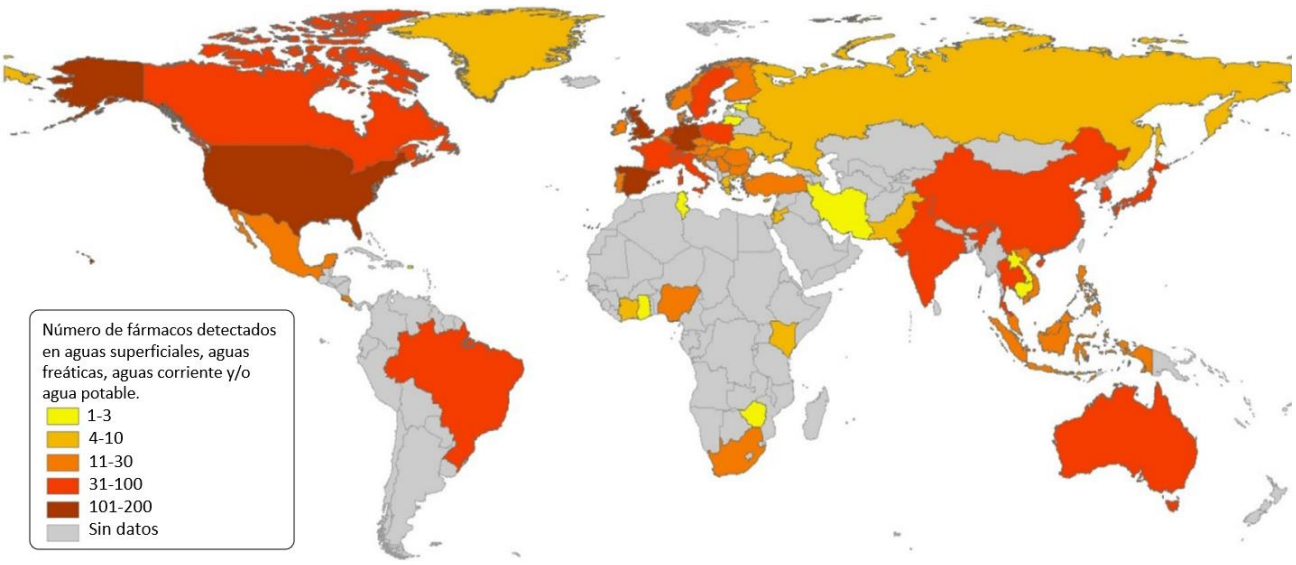


Figura 1.2. Detección global de los fármacos (aus der Beek et al., 2016; Acuña et al., 2015; Patel et al., 2019).

Tanto en países en desarrollo como industrializados se han detectado productos farmacéuticos comercializados internacionalmente (Tabla 1). Las variaciones territoriales se deben en parte a los patrones de consumo de los medicamentos, el acceso a la sanidad y el tratamiento de aguas residuales (Weber et al., 2014).

Tabla 1. Fármacos comercializados a nivel mundial detectados en el medio acuático (aus der Beek et al., 2016).

Fármaco	Grupo terapéutico	Número de países en el mundo donde se han encontrado fármacos en el medio acuático
Diclofenaco	Analgésicos	50
Carbamazepina	Medicamentos antiepilépticos	48
Ibuprofeno	Analgésicos	47
Sulfametoxazol	Antibiótico	47
Naproxeno	Analgésicos	45
Estrona	Estrógenos	35
17-β-estradiol	Estrógenos	34
17-α-etinilestradiol	Estrógenos	31
Trimetoprima	Antibiótico	29
Paracetamol	Analgésicos	29
Ácido clofíbrico	Medicamentos para la reducción de lípidos	23
Ciprofloxacino	Antibiótico	20
Ofloxacino	Antibiótico	16
Estriol	Estrógenos	15
Norfloxacino	Antibiótico	15
Ácido acetilsalicílico	Analgésicos	15

En ríos y lagos receptores de aguas residuales, la presencia de fármacos suele oscilar en concentraciones de entre 0.1 µg/L y 1.0 µg/L. Sin embargo, las concentraciones máximas en áreas densamente pobladas o en la corriente de las plantas de tratamiento de aguas residuales pueden ser notablemente mayores (Facey et al., 2018; aus der Beek et al., 2016).

1.1.4. Efectos ambientales de los fármacos.

Los productos farmacéuticos son diseñados para mejorar la calidad de la salud humana, animal y ambiental, pero incluso hasta los más benéficos productos farmacéuticos pueden ser cuestionables por su exposición a los organismos (Acuña et al., 2015). Los fármacos de uso humano y veterinario son un claro ejemplo de contaminantes que, por sus propiedades fisicoquímicas, hábitos de uso y formas de disposición (Challis et al., 2014), son sustancias biológicamente activas que afectan específicamente los mecanismos de control de organismos vivos, por ejemplo, regulando el

metabolismo, influenciando el equilibrio hormonal o mitigando la transmisión intercelular de señales (Weber et al., 2014). Cuando se liberan en el medio ambiente, la actividad biológica que involucran los fármacos puede tener consecuencias negativas para la flora y la fauna (los llamados organismos no objetivo) y afectar a la salud del ecosistema. Como un hecho, se ha confirmado que muchos fármacos pueden causar efectos dañinos al medio ambiente en manera relevante debido a su liberación voluntaria o involuntaria de éstos en concentraciones relativamente altas (ng/L, mg/L) (Richardson y Ternes, 2014). Este proceso se puede producir debido a una gran variedad de mecanismos, algunos de los cuales ya han sido demostrados en observaciones de laboratorio y de campo (Tabla 2), mientras que otros están aún por descubrir (Weber et al., 2014). La simple presencia de los ingredientes de los productos farmacéuticos no siempre está asociada con el daño a la salud humana o el medio ambiente, sino que también los problemas son mayores cuando son asociados con la resistencia microbiana que genera impactos crónicos sobre la biodiversidad incluyendo efectos de alteración endócrina en peces (Comber et al., 2018).

Tabla 2. Ejemplos seleccionados de productos farmacéuticos con efectos adversos en organismos no objetivo (Zind et al., 2021; Weber et al., 2014).

Fármaco	Grupo terapéutico	Organismo no objetivo	Efectos	Tipo de estudio	Referencia
Diclofenaco	Analgésicos	Buitre (gyps bengalensis)	Regresión de la población por insuficiencia renal	Flora y fauna	Oakes *et al*., 2004
Diclofenaco	Analgésicos	Trucha arcoíris (oncorhynchus mykiss)	Reacciones fuertes de hígado, riñón y branquias	Laboratorio	Triebskorn *et al*., 2007
17-α-etinilestradiol	Estrógenos sintéticos	Carpita cabezona (pimephales promelas)	Regresión en la población por la feminización de peces macho	Experimento en un lago entero	Kidd *et al*., 2007
Sulfonamida	Antibiótico	Maíz, mimbrera	Efectos adversos en el crecimiento de la raíz. Muerte del maíz en concentraciones altas	Invernadero	Michelini *et al*., 2012

Algunos ejemplos destacables de efectos ecotoxicológicos demostrados incluyen: 1) la casi extinción de buitres en el subcontinente indio, causada por la alimentación de estas aves a base de cadáveres de vacuno tratado con el fármaco antiinflamatorio diclofenaco (Sathishkumar et al., 2021),

2) un experimento en un lago que incluía el estrógeno sintético etinilestradiol, empleado en las píldoras anticonceptivas y que provoca peces machos feminizados y 3) los efectos de uso veterinario del parasiticida ivermectina en la descomposición de estiércol, poblaciones de insectos en el estiércol e invertebrados acuáticos.

Un claro ejemplo de contaminantes emergentes es el fármaco antiinflamatorio diclofenaco, las concentraciones encontradas de este medicamento en aguas superficiales han demostrado estar por encima de los niveles de concentraciones previstas sin efecto (PNEC por sus siglas en inglés) en 34 países (Figura 1.3.), hecho que sugiere unos efectos ecotoxicológicos adversos para los organismos que habitan estos lugares. Las concentraciones más elevadas suelen detectarse en las corrientes de las plantas de tratamiento de aguas residuales en áreas densamente pobladas (Weber et al., 2014). La estimación de un factor conocido como PNEC (Predicted No Effect Concentration) es utilizado para conocer la posible toxicidad de algún contaminante farmacéutico y/o metabolito sobre algún organismo, este factor representa el valor más bajo previsto al que se puede inducir daño a los organismos acuáticos como algas, peces y especies de *Daphnia*, entre otros (Becker et al 2019; Mansour et al., 2016).

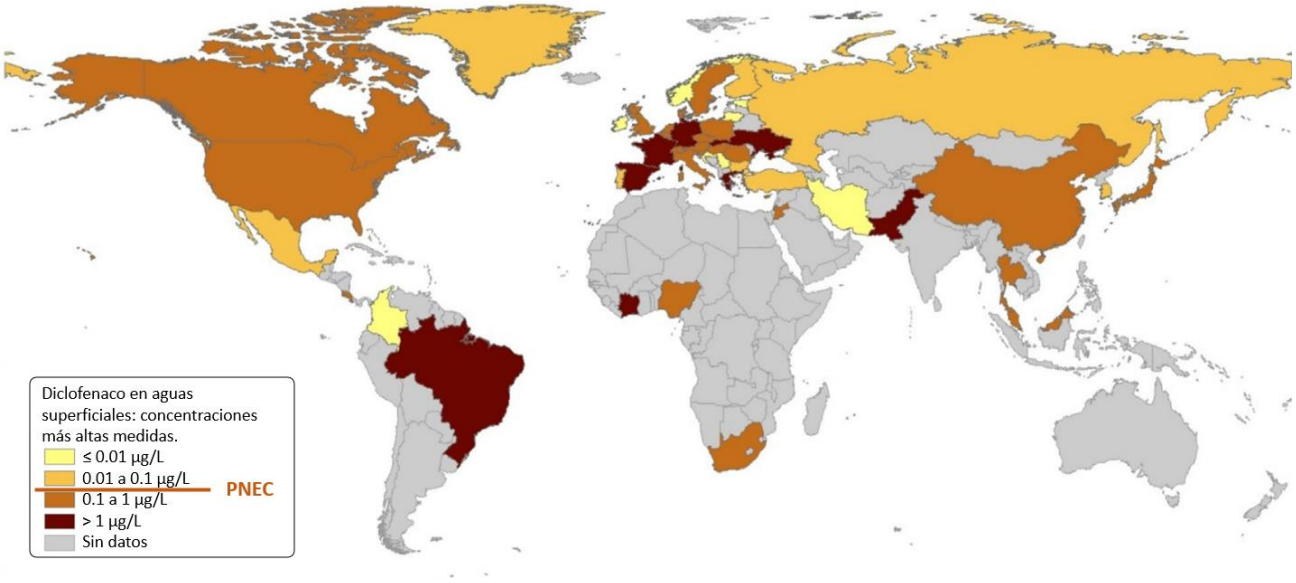


Figura 1.3. Concentración máxima de DCF en aguas superficiales en comparación con la concentración sin efectos (PNEC) de 0.1 µg/L (EU, 2013; Weber et al., 2014; Acuña et al., 2015; aus der Beek et al., 2016).

1.1.5. Riesgo ambiental por acumulación de farmacéuticos.

La acumulación de compuestos farmacéuticos en mamíferos carece de serlo en estos animales, no es el caso para los peces y demás organismos acuáticos debido a que la presencia de los contaminantes emergentes disminuye la actividad enzimática para la transformación de los xenobióticos en pequeñas cadenas alimenticias. Los fármacos tienen relativamente una forma clara de acción en organismos objetivo (como los humanos o animales de prueba para la aprobación de los productos), pero en la mayoría de los casos se desconoce qué pasa cuando especies que no son objetivo de estudio son expuestos ambientalmente a concentraciones relevantes (Huerta et al., 2015; Challis et al., 2014). Los efectos se desconocen en su mayoría, así como los riesgos potenciales hacia organismos no objetivo (invertebrados, peces y aves que se alimentan de peces) incluso en bajas exposiciones, estos efectos necesitan evaluarse desde que los compuestos activos farmacéuticamente activos y sus metabolitos han sido liberados especialmente en los ambientes acuáticos (Richardson y Ternes, 2014). Ambientalmente las dosis relevantes de DCF han conducido potencialmente a procesos de inflamación en los riñones de la trucha común (Mirzaee et al., 2021). Siendo el DCF una de las drogas AINES más detectadas, su concentración más baja con efecto observado (LOEC por sus siglas en inglés) en la que ambos, lesiones renales y alteraciones en branquias ocurren a 5 µg/L, mientras que examinaciones al microscopio óptico en el hígado, el tracto gastro intestinal y el vaso, no han revelado alguna alteración histopatológica (Barra Caracciolo et al., 2015). En estudios de exposición crónica de tres meses, se observó un gran decremento en la tendencia de éxito de eclosión de algunos organismos y retraso en la eclosión de peces a concentraciones en el rango de 0.001 - 10 mg/L de DCF (Zenker et al., 2014). Algunos de estos efectos se han estudiado y se ven reflejados estos efectos en la Tabla 5.

1.1.6. Diclofenaco como contaminante emergente.

El diclofenaco (DCF; acetado [2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil] sódico (Figura 1.4), es un inhibidor de la ciclooxigenasa ampliamente prescrito, farmacológicamente clasificado como una droga antiinflamatoria no esteroidea (NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug), con un estimado de consumo anual de 2 400 toneladas alrededor del mundo (Sathishkumar et al., 2021; Matejczyk et al., 2020; Murshid y Dhakshinamoorthy, 2019; Nkoom et al., 2019; Li, 2014). El DFC, como un producto de cuidado personal, está diseñado para ser biológicamente activo a bajas concentraciones, y debido a su creciente incidencia ambiental hay una clara posibilidad de influencia negativa sobre el estatus fisiológico, el grado de crecimiento y supervivencia de microorganismos. Debido a su amplia prevalencia en las matrices acuáticas y su natural pseudo persistencia, el DFC

es considerado un indicador de contaminación antropogénica (Kibuye et al., 2019; Bessa et al., 2017).

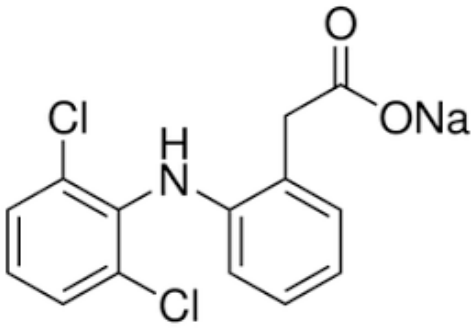


Figura 1.4. Estructura del diclofenaco (DCF; acetado [2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil] sódico (Lonappan et al., 2016).

El DFC pertenece al grupo de compuestos farmacéuticos, usado para propósitos terapéuticos en humanos y animales, representa un riesgo ambiental potencial debido al significante incremento en su uso y producción alrededor del mundo en los últimos años (Liu y Wong, 2013; Olicón-Hernández et al., 2017; Rivera-Ultrilla et al., 2013; Sui et al., 2015). El DFC es un medicamento usado para reducir inflamación y dolor asociados con artritis, osteoartritis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosa (el uso más generalizado es para el tratamiento del dolor e inflamación a nivel celular a través de la inhibición de la encima ciclooxigenasa), (Bartrons y Peñuelas, 2019; Sakat et al., 2014; Schulze et al., 2010). Como el DFC puede venderse en ambos, como droga de venta libre y como droga bajo prescripción médica, es una de las mayores drogas usadas alrededor del mundo y, consecuentemente, uno de los mayores contaminantes farmacéuticos de ecosistemas acuáticos (Parolini, 2020; Olicón-Hernández et al., 2019).

Debido a que las plantas de tratamiento de aguas residuales tienen baja eficiencia de remoción el DFC es comúnmente detectado a rangos muy bajos de µg/L e incluso ng/L. Por lo tanto, el DFC es uno de los contaminantes emergentes más comúnmente encontrado en aguas superficiales, en concentraciones del rango de ng/L y µg/L (Xu et al., 2014; Schulze et al., 2010). Resultado de su incidencia en ecosistemas acuáticos y toxicidad potencial, la Unión Europea ha incluido al DFC a la lista de la Directriz de la infraestructura del Agua (Water Framework Directive, 2013/39/EU) como una de las moléculas de mayor prioridad a ser monitoreadas en ecosistemas acuáticos (Chong et al., 2017). El DFC es la droga más usada alrededor del mundo, ocupando el primer lugar de sustancias farmacéuticas persistentes, ha sido detectado en aguas superficiales, freáticas y potables

e incluso de consumo humano de 50 países alrededor del mundo, con un promedio global y concentraciones máximas ambientales de 0.032 µg/L y 18.74 µg/L, respectivamente (aus der Beek, 2016; Parolini, 2020).

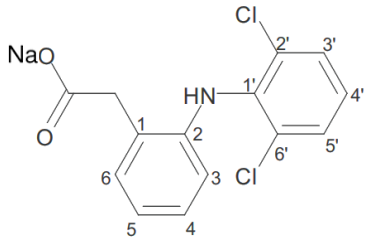
La mayoría de los reportes manifiestan que las concentraciones máximas de DFC en aguas residuales municipales varían entre 0.44 y 7.10 µg/L, con la concentración promedio entre 0.11 y 2.30 µg/L. En algunas reservas de agua para consumo, el DFC ha sido detectado en concentraciones por arriba de 35 ng/L (Moreira et al., 2018; Nkoom et al., 2019; Zur et al., 2021).

El DCF es considerado un contaminante emergente pobremente biodegradable y pseudo persistente, las eficiencias de remoción por los tratamientos de las PTAR son considerablemente bajas (Kibuye et al., 2019; Chong et al., 2017; Schulze et al., 2010). El DCF se libera continuamente de los residuos urbanos a los sistemas de alcantarillado municipales (Osorio et al., 2016), así como de los centros de salud en los que las personas se tratan con este fármaco, excretando el fármaco de forma biológica, mismos que llegan directamente a los efluentes de agua residuales (Moreira et al., 2018; Bu et al., 2016). Algunos métodos como adsorción, precipitación, filtración, flotación y floculación son los métodos tradicionales usados por las PTAR para la remoción de la mayoría de los contaminantes de los efluentes (Vishnu Priyan et al., 2021), con una eficiencia del 80 % de remoción para la mayoría de los contaminantes básicos, pero en el caso de los CE’s llegan a un rango del 20-40 % por métodos de oxidación avanzada y métodos de membrana (Moreira et al., 2018, Zhang et al., 2008), eficiencias de remediación de las PTAR para productos farmacéuticos como el diclofenaco, carbamazepina, atenolol, ácido acetilsalicílico, ácido mefenámico, propranolol, ácido clofíbrico, y lincomicina, han alcanzado el 10 % de su remoción (Patel et al., 2019). Por lo anterior, existen varias estrategias para la degradación y eliminación del DCF, incluyendo sistemas fisicoquímicos basados en reacciones foto-Fenton, adsorción y biorremediación por bacterias, hongos y comunidades microbianas (Barra Caracciolo et al., 2015; Salgado et al., 2013; Yang et al., 2013; Olicón-Hernández et al., 2019), así como otras técnicas de tratamiento avanzado de remoción como la ozonización, fotocatálisis o la oxidación por ultrasonido, técnicas que alcanzan el 80 % de eficiencia en su remoción, técnicas de utilidad limitada por su alto impacto ecológico, altos costos operacionales, y la formación de metabolitos con toxicidad y/o persistencia mayor que el DCF (Zur et al., 2021).

1.1.7. Propiedades fisicoquímicas del diclofenaco.

El diclofenaco es un derivado del ácido fenilacético, generalmente es usado como una sal de sodio o de potasio, desde 1970 ha sido utilizado como un medicamento de propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. A menudo es considerado como el analgésico más popular a nivel mundial (Lonappan et al., 2016; Mirzaee et al., 2021). En la Tabla 3 se muestran las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas del DCF, algunas de ellas son: solubilidad, constante de disociación, coeficiente de partición. La solubilidad indica a qué grado puede movilizarse una sustancia, en suelo y en agua. La constante de disociación indica la especiación en la que se encuentra la molécula, puede ser neutra, protonada o aniónica. El coeficiente de partición de una sustancia es la afinidad que tiene en n-octanol, midiendo la lipofilicidad de un químico, proporciona información sobre la liposolubilidad y distribución de una sustancia en un organismo vivo.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas y farmacológicas del DCF.

Parámetro	Valor	Referencia
Nombre	Acetato [2-[(2,6-diclorofenil) amino]fenil] sódico.	Zhang et al., 2008
Estructura química		Zhang et al., 2008
Fórmula química	$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$	Zhang et al., 2008; Vieno y Sillanpää
No. CAS	15307-86-5, 15307-79-6 (sal de sodio).	Vieno y Sillanpää, 2014; Lonappan et al., 2016
Peso molecular	318.1 g/mol.	Parolini et al., 2020
Uso	Analgésico, antiinflamatorio.	Zhang et al., 2008
Solubilidad en agua	23.73 mg/L (como ácido acético)/ Muy soluble (sal de sodio).	Zhang et al., 2008/ www.acofarma.com
Constante Ley de Henry	$4.79X10^{-7}$ Pa*m^3/mol (25 °C).	Zhang et al., 2008
Punto de fusión y ebullición	283-285 °C y 412 °C a 1 atm (predicha).	Lonappan et al., 2016
pKa	4.15	Zhang et al., 2008; Vieno y Sillanpää, 2014; Mirzaee et al., 2021
Coeficiente de partición, Log Kow	4.51	Zhang et al., 2008; Vieno y Sillanpää, 2014; Mirzaee et al., 2021
Coeficiente de adsorción, Log Koc	2.20 – 3.42	Li, 2014; Carballa et al., 2008
Coeficiente de distribución, Log Kd	1.26-2.18	Li, 2014; Carballa et al., 2008
Vida media en ambientes acuáticos	Menor a 30 días	Bu et al., 2016
Vida media de eliminación	2 h	Zhang et al., 2008;
Excreción	Excreción biliar: 65 % de dosis oral excretada en la orina.	Zhang et al., 2008
Metabolitos en la orina	Diclofenaco; 5, 4'-dihidroxidiclofenaco; 3-dihidroxidiclofenaco; 4'-dihidroximetil-diclofenaco; 3'-hidroximetil-diclofenaco; 4'-hidroxidiclofenaco y 5'-hidroxidiclofenaco.	Zhang et al., 2008; Mirzaee et al., 2021; Nunes et al., 2020.
Dosis	75-150 mg al día.	Zhang et al., 2008
Otra información	Administración: oral, oftálmica, tópica, intramuscular.	Zhang et al., 2008

Los metabolitos son sustancias derivadas de la molécula original, en la que alguna parte de su estructura ha sido modificada por medio del metabolismo. A la fecha se tienen identificados seis metabolitos producto del metabolismo humano: 5, 4'-dihidroxidiclofenaco, 3-dihidroxidiclofenaco, 4'-dihidroximetil-diclofenaco, 3'-hidroximetil-diclofenaco, 4'-hidroxidiclofenaco y 5'-hidroxidiclofenaco.

1.1.8. Persistencia, bioacumulación, bioconcentración y biomagnificación del diclofenaco.

Como se ha visto en otros reportes, es bien sabido que el DCF tiene presencia en distintos cuerpos de agua (ríos, lagos, aguas subterráneas, aguas residuales y océanos) (Di Lorenzo et al., 2021; Chen et al., 2020; Ben et al., 2019). Esta presencia se debe a otras propiedades que caracterizan la movilidad del DCF, estas son la persistencia, bioacumulación, bioconcentración y biomagnificación. La persistencia se puede definir como la habilidad de una sustancia química de ser retenida en el medio ambiente, esta comienza por la presencia continua de un químico en el medio ambiente distante desde una fuente de emisión y que es monitoreada y/o biomonitoreada a largo plazo (Bu et al., 2016). La bioacumulación se puede definir de dos maneras, por una parte, la bioacumulación es una simple absorción de sustancias desde el medio ambiente, una acumulación a través del tiempo, o la retención de una sustancia. Un criterio de bioacumulación es el uso del coeficiente de partición octanol-agua (Kow) siendo mayor a 5 para considerar una sustancia bioacumulable y mayor a 3 como tendencia a la acumulación. El proceso de biomagnificación se define como la transferencia de sustancias ajenas al sistema biológico conocidas como xenobióticas que pueden provenir desde el alimento el cual a su vez también puede ser un organismo o parte de él, hacia un organismo en el cual concentraciones más altas comparadas a la concentración de la fuente serán encontradas, es decir, es un incremento en la concentración interna de una sustancia en organismos en sucesivos niveles tróficos en una cadena alimenticia. La bioconcentración es la acumulación de una sustancia, disuelta en agua, por un organismo acuático. El factor de bioconcentración (BCF) de un compuesto se entiende como el índice de concentración del compuesto químico en el organismo y en agua en equilibrio, un factor de bioconcentración mayor a 1 000 se considera de alto grado de bioconcentración (Zenker et al, 2014).

Los factores de bioacumulación y bioconcentración en organismos acuáticos como peces, se han estudiado en pruebas en laboratorio y en campo (Tabla 4), de los cuales se ha demostrado que los peces y los invertebrados tienen mayor tendencia a la bioacumulación (Huerta et al., 2015). Los valores de BCF fueron obtenidos de pruebas realizadas a peces y presas de peces, se expusieron los organismos acuáticos a ciertas concentraciones de DCF en g/L en agua, de los cuales los

organismos acuáticos presentaron concentraciones de DCF en g/kg debido a la exposición. El factor de bioacumulación (BAF) se realizó en estudios de campo exponiendo a los organismos acuáticos a un medio a cierta concentración del DCF en agua y en la dieta del organismo.

Tabla 4. Factor de bioconcentración y bioacumulación del DCF en peces (Zenker et al., 2014).

Factor	Valor	Afinidad en el organismo
BCF	4.9	Plasma de sangre
	657, 320 – 950	Bilis
	12 – 2 732	Hígado
	5 – 971	Riñón
	3 – 763	Branquias
	0.3 – 69	Músculo
BAF	2.5 – 29	Total

La bioacumulación se presenta desde las pequeñas especies como *Daphnia magna, Moina macrocopa, Plationus patulus* por mencionar algunos ejemplos (Parolini, 2020), especies del ecosistema acuático que acumulan en su organismo sustancias xenobióticas, en este caso, el diclofenaco, y que por medio de estas especies puede ser transportado a través de la cadenas alimenticias (Ben et al., 2019). Las pequeñas especies cumplen la función de presa o alimento de organismos más grandes como peces. A su vez, los peces son alimento de aves acuáticas y animales terrestres. Y, por último, las especies mayores pueden llegar al consumo humano. De esta manera el contaminante emergente va entrando a cada nivel, desde un nivel inferior y hasta un nivel superior de la cadena trófica, provocando alteraciones en cada uno de ellos (Figura 1.5) (Huerta et al., 2015; Vieno y Sillampää, 2014; Acuña et al., 2015; Parolini, 2020; Mirzaee et al., 2021).

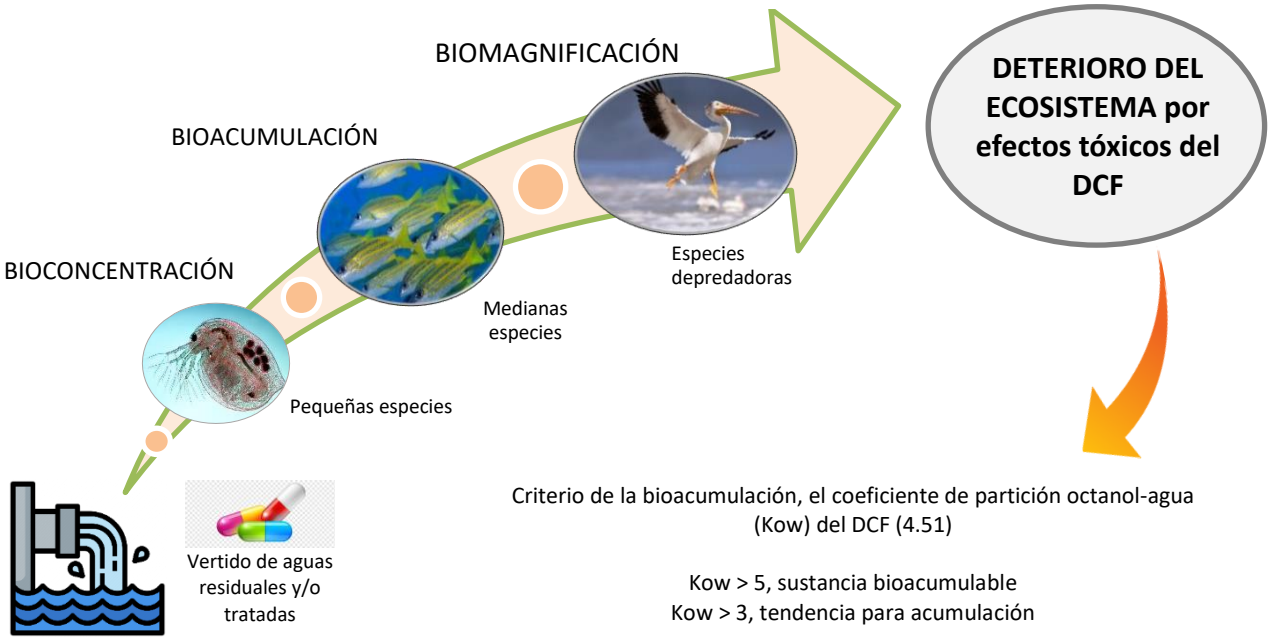


Figura 1.5. Movilidad del DCF en la cadena trófica (Adaptado de Zhang et al., 2008; Zenker et al., 2014; Bu et al., 2016; Chong et al., 2017; Vieno y Sillanpää, 2014; Acuña et al., 2015; Parolini, 2020; Mirzaee et al., 2021).

Los invertebrados (principalmente los crustáceos) son especies dominantes en las aguas freáticas de las cuales el 90 % está formado por especies endémicas, estos invertebrados cumplen con funciones importantes en el ecosistema, facilitando los procesos bioquímicos mediante el consumo y digestión de biopelículas, bacterias, virus y otros organismos patógenos potencialmente perjudiciales (Di Lorenzo et al., 2021). Estos organismos al ser afectados por la presencia de contaminantes emergentes en los ecosistemas acuáticos la calidad del cuerpo de agua decrece, la acumulación de material orgánico requerirá de mayor cantidad de oxígeno disuelto presente en el cuerpo de agua para su oxidación, la acumulación de este material promueve el aumento de la turbiedad del cuerpo del agua impidiendo el paso de la luz solar importante para los procesos fotosintéticos de la fauna y flora acuáticas, provocando ambientes anóxicos no convenientes para las funciones biológicas.

1.1.9. Metabolismo humano del diclofenaco.

El DCF tiene varias rutas por al que entra al organismo humano, puede ser por administración oral, intramuscular, intravenosa, tópica e incluso vía rectal (Di Lorenzo et al., 2021). Las moléculas no metabolizadas y algunos metabolitos son excretados del cuerpo por la orina y las heces (Sui et al.,

2015; Zind et al., 2021; Di Lorenzo et al., 2021; Zhang et al., 2008). De manera tópica se adsorbe del 6-7%, la parte remanente se pierde por el lavado de la piel o por lo desplazado en la ropa (Vieno y Sillanpää, 2014). El DCF que es administrado por vía oral se somete a casi una completa biotransformación en el cuerpo humano (Wielens Becker et al., 2020), entre el 65 y 70 % se excreta en la orina y del 20-30 % en las heces como molécula de DCF sin alterar o como metabolitos. La mayoría del DCF es metabolizado en el cuerpo humano y únicamente menos del 1% de la dosis oral administrada es excretada como DCF no metabolizado. En una segunda fase metabólica que involucra al ácido glucurónico y taurina, se forman conjugados de glucuronato y sulfato de DCF. Estos conjugados constituyen el 11% de la dosis administrada. La OMS define una dosis diaria de DCF de 100 mg, pero se permite hasta 150 mg. De esta dosis, menos de 1 mg es eliminado del cuerpo como DCF y cerca de 11 mg como conjugados de DCF, el resto de la dosis es excretada como metabolitos de DCF o sus conjugados (Facey et al., 2018; Zhang et al., 2008; Vieno y Sillanpää, 2014).

La vía metabólica del DCF se muestra en la Figura 1.6. Seis metabolitos del DCF se han detectado en humanos en plasma, orina y heces, sobre todo en estas dos últimas vías puesto que por estos medios se facilita su eliminación (Barra Caracciolo et al., 2015). El patrón de sus metabolitos en orina humana es el mismo después de una aplicación tópica, oral, oftálmica e intramuscular. Los principales metabolitos del DCF por humanos son 4’-OH-DCF y 5’-OH-DCF, ambos son excretados principalmente en forma conjugada y menos del 1% es excretado sin cambios. Otros metabolitos importantes son también 3’-hidroxi-DCF y 4’,5-dihidroxi-DCF, y los metabolitos restantes, 3’-hidroxi-4’-OCH3-DCF y 4’-OH-3’-OCH3-DCF son excretados en la orina sólo en cantidades traza (Zhang et al., 2008; Vieno y Sillanpää et al., 2014; Nunes et al., 2020).

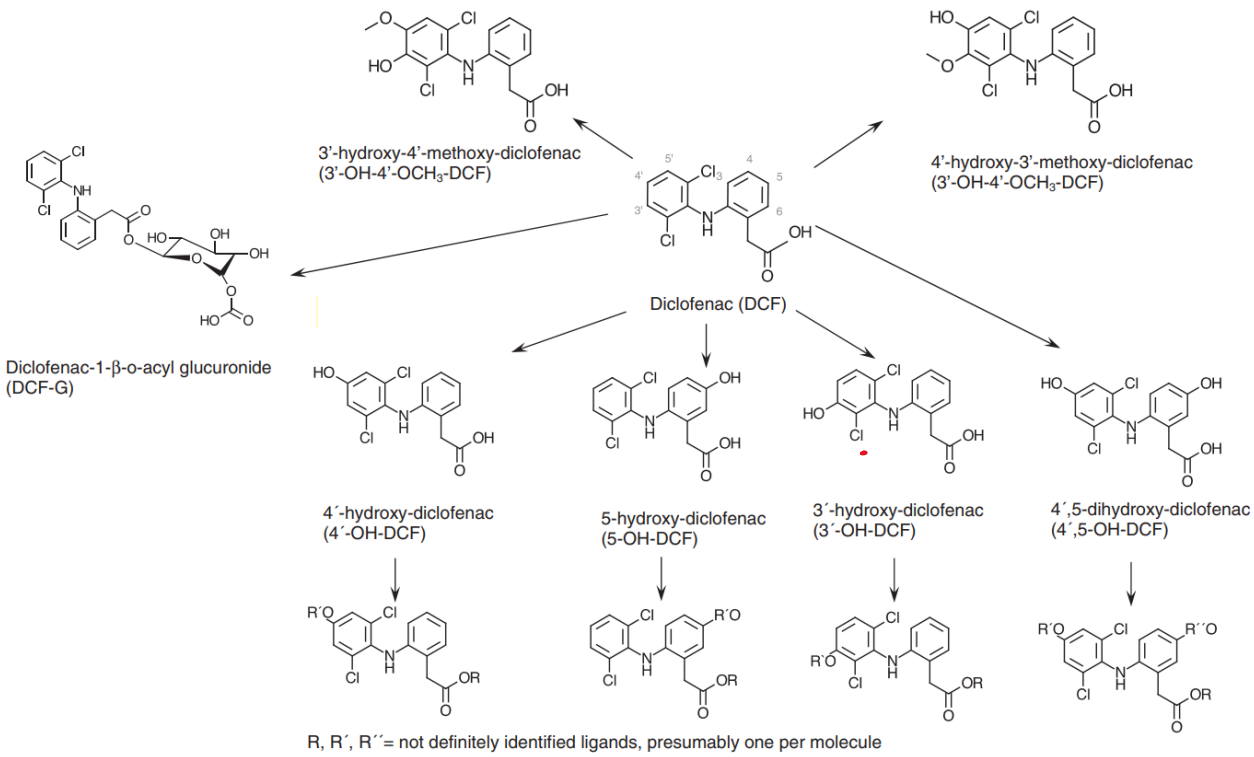


Figura 1.6. Vía metabólica del DCF en el cuerpo humano
(Vieno y Sillanpää et al., 2014; Lonappan et al., 2016; Facey et al., 2018; Nunes et al., 2020).

La cantidad de metabolitos encontrados en las heces aún no está estudiada por completo, sin embargo, se han detectado algunos de ellos. El balance de masa del metabolismo del DCF se presenta en la Figura 1.7.

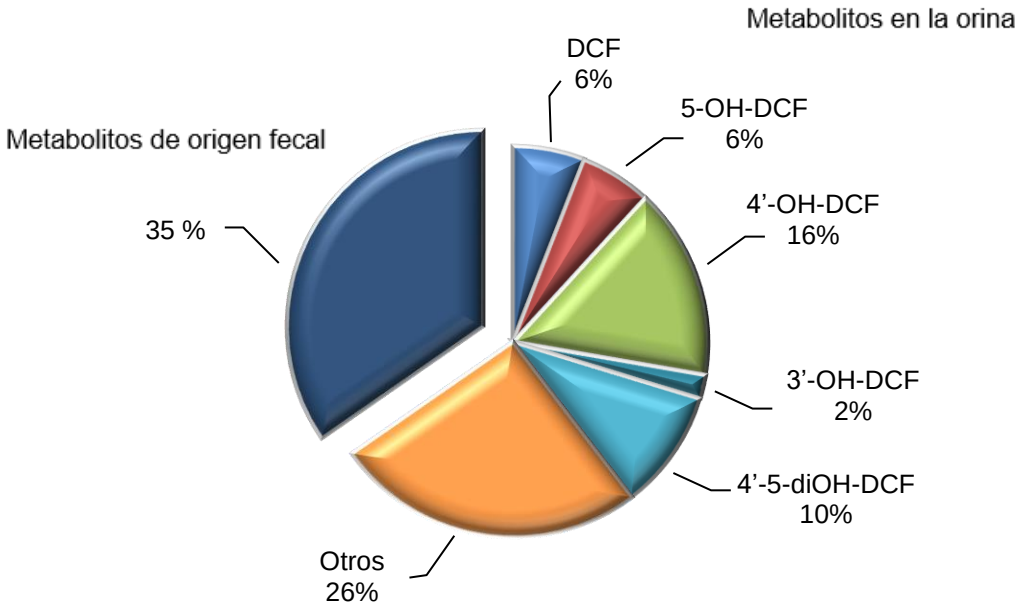


Figura 1.7. Metabolitos del DCF en porcentaje por dosis oral
(Adaptado de Zhang et al., 2008; Lonappan et al., 2016).

No sólo el DCF se puede encontrar como molécula activa en el medio ambiente, sino que también sus metabolitos ingresan al medio ambiente acuático con el consecuente impacto a este ecosistema (Patel et al., 2019; Becker et al., 2019). A su vez, ha quedado como expectativa que los metabolitos en el ecosistema a través de la magnificación podrían representar un alto riesgo por su exposición (Sathishkumar et al., 2021).

1.1.10. Efectos tóxicos inducidos por diclofenaco.

Se ha reportado que el DFC causa alteración endocrina en humanos y mamíferos, es agudamente tóxico para aves e inhibe el crecimiento de cianobacterias importantes y fotobacterias y como algas también, causando un desequilibro ambiental (Barra Caracciolo et al., 2015). Dependiendo de las especies, se ha observado que la ecotoxicidad (definida por la concentración efectiva) de DFC varía entre 1 µg/L y 80 µg/L (Vieno y Sillanpää, 2014). Hay reportes que indican que algunos de los metabolitos del DCF son más tóxicos que el DCF, sus productos de fototransformación exhibieron un aumento de 6 veces en toxicidad en pruebas de reproducción de algas (Schulze et al., 2010). Otros reportes científicos recientes indican que el DCF afecta los procesos regulares fisiológicos y bioquímicos de organismos acuáticos incluso a baja concentración, 100 ng/L (Santos et al., 2013; Sathishkumar et al., 2021).

La toxicidad crónica y aguda del DFC en relación con invertebrados de aguas naturales se ha investigado sobre algunas especies, un rotífero (*Plationus patulus*), dos crustáceos (*Daphnia magna y Moina macrocopa*), un quironómido (*Chironomus riparius*), un molusco bivalvo (*Dreissena polymorpha*) y un gastrópodo, por mencionar algunos de ellos (Parolini, 2020). El efecto toxicológico del DCF puede manifestarse por exposición a muy bajas concentraciones, del orden de µg/L o ng/L, resultando en efectos crónicos y permanentes en diferentes organismos, especialmente del ecosistema acuático, tal como se muestra en la Tabla 5 (a us der Beek et al., 2016; Stylianou et al., 2018; Parolini, 2020).

Tabla 5. Efectos toxicológicos del DCF sobre varias especies acuáticas en concentraciones ambientalmente relevantes (Vieno y Sillanpää et al., 2014; Acuña et al., 2015; Parolini, 2020; Mirzaee et al., 2021).

Especie	Tiempo de exposición	Efecto	Concentración	Referencia
Oncorhynchus mykiss	28 d	Cambios en la estructura del hígado y riñón	1 µg/L	Triebskorn et al., 2004
Carcinus maenas	--	Osmolalidad de hemolinfa	0.01 µg/L	Eades y Waring, 2010
Dreissena polymorpha	96 h	Peroxidación de lípidos	1 µg/L	Quinn et al., 2011
Mytilus edulis trossulus	8 d	Solidez del biso	1 µg/L	Ericson et al., 2010
Polystichum setiferum	48 h	Actividad mitocondrial, cuantificación de ADN	0.3 µg/L, 0.03 µg/L	Feito et al., 2012
Danio rerio embryos	90 min	Reducción de peroxidación de lípidos	0.03 µg/L	Felice et al., 2012
Daphnia magna	48 h, 21 d	Inmovilidad, reproducción	2 - 486 mg/L, 0.5 - 40.5 mg/L	Du et al., 2016
Plationus patulus	25 d	Crecimiento de la población	2 - 32 mg/L	Parolini, 2020
Moina macrocopa	10 d	Crecimiento de la población	2 - 32 mg/L	Parolini, 2020
Dreissena polymorpha	1 h	Daño al ADN	60 - 250 µg/L	Parolini et al., 2009
Lymnaea stagnalis	3 d	Densidad de hemocitos y viabilidad	100 - 1 000 µg/L	Parolini et al., 2011b
Chironomus riparius	10 d	Supervivencia, crecimiento y etapas de desarrollo	34 µg/g	Nieto et al., 2017

1.1.11. Agua residual de hospital.

Entre las diferentes fuentes de emisión de contaminantes emergentes como las aguas residuales urbanas hacia el medio ambiente (Santos et al., 2013), los hospitales son de particular interés (Frédéric y Yves, 2014). Por su naturaleza específica, es de esperarse que las aguas residuales provenientes de un hospital presenten una mezcla compleja de diversos compuestos de los que no solamente se encuentran los productos farmacéuticos y sus metabolitos, sino también agentes de diagnósticos, desinfectantes, entre otros (Santos et al., 2013). Debido a que la ocupación de estos centros de salud tiene como actividad general la administración de diferentes drogas a los pacientes para disminuir o tratar ciertos padecimientos, los fármacos al metabolizarse son excretados por las diversas áreas de atención de estos centros de salud, resultando con mayor carga de compuestos farmacéuticos en sus efluentes, estas descargas contienen parte de los fármacos no metabolizados, así como sus productos de metabolización (metabolitos). Estos efluentes contienen mayormente concentraciones superiores de fármacos a las que se pueden encontrar en aguas superficiales, aguas subterráneas y otros cuerpos de agua (Vieira et al., 2021).

En un estudio realizado por Vieira et al., (2021), se estudió un efluente hospitalario de Brasil en el cual se determinaron en un principio 16 analitos, estos analitos se muestran en la Tabla 6 junto con las concentraciones detectadas. Los resultados encontrados fueron relativamente altos (mg/L). Todos los analitos detectados fueron analizados por el método de cromatografía de líquidos de ultra eficiencia. Concentraciones mayores a ng/L, para algunas sustancias, pueden presentar un riesgo a los organismos acuáticos, resultando en impactos ecotoxicológicos. DCF y otros compuestos se encontraron en altas concentraciones más que otros compuestos. A su vez se realizó una caracterización fisicoquímica para los parámetros de carbono orgánico total, nitrógeno total, fósforo total, demanda química de oxígeno, pH y temperatura.

Generalmente, las concentraciones del DCF varían con respecto al medio en el que son estudiados. En aguas superficiales se han detectado concentraciones promedio de 80.8 ± 59.9 ng/L (Santos et al., 2013). Sin embargo, se encontró un valor de 19.82 ± 0.054 mg/L para el DCF, considerando que se tomaron muestras antes de entrar al sistema urbano municipal (Vieira et al., 2021).

Tabla 6. Compuestos detectados en agua residual de hospital (Vieira et al., 2021).

Analito	Concentración (mg/L)	Analito	Concentración (mg/L)
Atenolol	0.198 ± 0.654	Ibuprofeno	15.43 ± 0.028
Atenolol, ácido	0.845 ± 0.03	Lidocaína	1.43 ± 0.154
Benzotriazol	0.143 ± 0.06	Morfina	0.245 ± 0.125
Carbamazepina	0.05 ± 0.02	Paracetamol	5.47 ± 1.143
Ciprofloxacina	2.14 ± 0.125	Propanolol	0.05 ± 0.144
Diazepam	0.089 ± 0.021	Sulfadiazina	0.05 ± 1.236
Diclofenaco	19.82 ± 0.054	Tramadol	0.086 ± 0.551
Fluconazol	0.125 ± 0.412	Venlafaxina	0.074 ± 0.264

De los resultados obtenidos por Vieira et al., (2021), no todos los fármacos pueden ser precisamente cuantificados, sino que algunos de ellos sólo se detectan en las muestras del efluente. El diclofenaco es uno de los fármacos que pudo ser cuantificado en concentraciones relativamente mayores con respecto a los demás productos farmacéuticos del efluente.

1.2. Métodos de cuantificación del diclofenaco.

Dentro de los métodos más usuales para la cuantificación de distintas sustancias entre ellas, los compuestos organoclorados, pesticidas, herbicidas y sustancias orgánicas como los compuestos farmacéuticos, se encuentran los métodos espectrométricos y cromatográficos. Los primeros utilizan la radiación electromagnética, que es la emisión y transmisión de energía en forma de ondas electromagnéticas; la radiación electromagnética tiene distintos tipos de energía, éste se divide en ondas de radio, microondas, infrarrojo, visible, ultravioleta, rayos X y rayos gamma, de menor a mayor energía respectivamente. Los segundos pertenecen al grupo de métodos fisicoquímicos de separación de componentes con mezclas líquidas o gaseosas. La cromatografía puede dividirse en dos tipos: la cromatografía de gases (por medio de separaciones sólidos-gas y líquido-gas) y la cromatografía de líquidos (por medio de separaciones sólido-líquido y líquido-líquido). Con estas técnicas y bajo ciertas condiciones específicas se puede obtener la cantidad de analito presente en una muestra.

1.2.1. Espectrofotometría de UV-vis.

En la espectrofotometría de luz visible se hace uso de la ley de Beer-Lambert, que indica la relación que hay entre la absorbancia de radiación de una muestra con respecto a su concentración en la muestra. Para conocer la absorbancia de un átomo o una molécula, se utiliza un espectrofotómetro, equipo que determina la cantidad de radiación absorbida por una muestra, y a su vez, la que es transmitida a través de ella; en base de la radiación transmitida y medida por el espectrofotómetro se puede conocer la absorbancia de la muestra. Este comportamiento se puede observar en un gráfico denominado espectro, en el que se muestran diversas áreas bajo la curva y altura, llamados picos, y cada uno de ellos a una específica longitud de onda. La longitud de onda a la que se absorbe la mayor cantidad de luz es la característica del elemento o molécula a determinar.

1.2.2. Cromatografía de líquidos.

De todas las técnicas de cromatografía las cuales la fase móvil es líquida, la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatograph*) y la cromatografía de líquidos de ultra desempeño (UPLC, por sus siglas en inglés *Ultra Performance Liquid Chromatograph*) son las más conocidas. Estos equipos se constituyen de un sistema modular que permite la inyección de un volumen de la muestra que será acarreado por un solvente o mezcla de solventes que llevan la muestra hacia una columna dentro de un horno a temperaturas adecuadas para la separación del componente de interés, es decir, sobre la columna se dan ciertas interacciones para tres constituyentes, fase estacionaria, componente y fase móvil. La fase móvil es un solvente o mezcla de solventes y la fase estacionaria un líquido inmiscible con la fase móvil depositado en la superficie de un sólido. Además, los componentes de la mezcla con propiedades similares a la fase móvil se eluyen antes, mientras que los componentes de la mezcla con propiedades similares a la fase estacionaria se eluyen más tarde.

La respuesta que da el componente a separar se puede apreciar por medio de la transformación de una señal espectrométrica captada por un detector, esta señal se mostrará en un gráfico en el cual aparecen los componentes separados en forma de picos, se le llama cromatograma, constituye el registro final de todo el proceso de la cromatografía. En este gráfico se refleja la separación física de los componentes de una mezcla.

Para estos efectos, se requiere de un equipamiento instrumental muy específico, como la cromatografía de gases o líquidos, junto con una espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS),

este tipo de técnica resulta bastante caro ya sea por nivel de adquisición y de su mantenimiento. Si bien se han creado métodos fiables en laboratorios de todo el mundo, hoy en día no hay un protocolo analítico estandarizado a nivel internacional aplicable a los fármacos. Un protocolo que cumpla con estas características permitiría garantizar tanto la calidad como la comparabilidad de los datos (Weber et al., 2014).

1.3. Microorganismos.

La microbiología es el estudio de los microorganismos, grupo grande y diverso de formas de vida libre que existen como células aisladas o formando grupos. Así pues, las células microbianas son diferentes de las células de los animales y las plantas que son incapaces de vivir aisladas en la naturaleza, en vista de que únicamente pueden sobrevivir como parte de organismos multicelulares. Una célula microbiana individual generalmente es capaz de llevar a cabo sus propios procesos vitales de crecimiento, generación de energía y reproducción, independientemente de otras células, ya sean del mismo tipo o de otro totalmente diferente.

Cinco grupos principales se estudian en la microbiología: hongos, protozoarios, algas, bacterias y virus. Estos grupos pueden dividirse a su vez: las algas, hongos y protozoarios tienen una forma de organización celular conocida como eucarióntica (eucariótica), mientras que las bacterias están organizadas de manera diferente, la cual se conoce como procarióntica (procariótica); los virus no llegan ni siquiera a ser células. Las diferencias más importantes entre procariontes y eucariontes se encuentran en la estructura de su núcleo. Los eucariontes tienen un núcleo verdadero, o sea una estructura membranosa de separación dentro de la cual se encuentran los cromosomas de contienen el material de la herencia. Por otro lado, los procariontes no tienen núcleo verdadero y su material de herencia está contenido dentro de una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Brock et al., 1987).

1.3.1. Crecimiento y aislamiento bacteriano.

El estudio de la microbiología permite comprobar los principios de la biología, porque los microorganismos poseen muchos caracteres que los hacen sujeto ideal para la investigación de los fenómenos biológicos. Pueden cultivarse fácilmente en tubos o cajas Petri, crecen rápidamente y se reproducen a un ritmo extraordinariamente elevado.

El crecimiento microbiano se define como el aumento del número de microorganismos o de biomasa en un período de tiempo determinado. Existen diferentes métodos para detectar y medir el crecimiento de microorganismos. La forma de cuantificar células viables más utilizada en la microbiología es la de recuento en placa con medios de cultivo específicos para la población de interés. Consiste en inocular un volumen determinado de cultivo o muestra sobre un medio de cultivo sólido adecuado para el crecimiento de colonias. Cada uno de éstas deriva de una célula aislada; es decir, una unidad formadora de colonia (UFC) (Pelcsar y Reid, 1980).

Hay dos variaciones en la forma de realizar la cuantificación microbiana, la siembra en superficie o vertido en placa. En ambos casos, a la muestra a cuantificar se le aplica el método de diluciones sucesivas y cada dilución se deposita en cajas Petri estériles. El método de vertido en placa involucra realizar una serie de diluciones, que no son más que un tipo de diluciones sucesivas manteniendo constante el factor de dilución de cada paso. Una medida para determinar el crecimiento bacteriano es la turbidez y la escala McFarland. En el primero se tiene una suspensión microbiana, en el que al cantidad de microorganismos está directamente relacionada con la turbiedad o densidad óptica de la misma, e inversamente relacionada con la cantidad de luz que pasa por la misma; a mayor turbidez, mayor número de bacterias. El segundo se basa en la construcción de una curva estándar con una suspensión testigo de concentración celular conocida. Se basa en la medición de concentraciones crecientes de cloruro de bario con concentraciones decrecientes de ácido sulfúrico obteniéndose un precipitado de sulfato de bario en cantidades diferentes.

Al material en el que se cultivan los microorganismos se le llama medio de cultivo, es un sustrato o solución de nutrientes (carbono, nitrógeno y amortiguadores de pH, sodio y potasio) en los que crecen y multiplican los microorganismos, con el objeto de aislar diferentes especies bacterianas, identificarlas y realizar estudios complementarios. El mejor medio dependerá del medio de cultivo. En medios de cultivo sólidos, es posible obtener colonias de microorganismos aisladas, para la identificación del microorganismo; si el objetico es lograr la multiplicación del microorganismo para conseguir o detectar una población, conviene más el uso de un medio líquido. Los hay como los medios simples, que permiten el desarrollo bacteriano general; los enriquecidos que permiten el desarrollo de bacterias exigentes nutricionalmente; los selectivos, contienen compuestos químicos nocivos para algunas bacterias que no son de interés; y los diferenciales permiten el crecimiento particular de una especie (Brock et al., 1987).

1.3.2. Pruebas bioquímicas.

Para la identificación más detallada de los microorganismos, es necesario llevar a cabo una serie de pruebas específicas con sustratos y sustancias indicadoras para clasificar las bacterias en géneros y especies. Además, que con esto puede comprobarse la posible contaminación por otras bacterias o variaciones metabólicas. Las pruebas pueden realizarse por inoculación del microorganismo en tubo único o bien, en cámaras o panel de bioquímicas, es decir, pequeños pozos que ya contienen sustancias específicas. Después de un período de incubación adecuado, los resultados de las pruebas se leen al observar un cambio de color o alguna reacción interpretada con facilidad (Brock et al., 1987).

1.3.3. Prueba PCR.

La prueba PCR se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica empleada para la amplificación de regiones específicas de ADN como un gen, una parte de un gen o una secuencia no codificada. Esta técnica produce una cantidad útil de ADN para el análisis, ya sea con fines de análisis médico, forense o algún otro. La amplificación del ADN puede realizarse desde una sola célula, de la que una completa amplificación del genoma también es posible. El objetivo de la PCR es producir suficiente ADN de la región blanco para que pueda analizarse o usarse de alguna otra manera. El ADN amplificado por PCR se puede secuencia, visualizar por electroforesis en gel o clonar en un plásmido para otros experimentos. La PCR se utiliza en muchas áreas de la biología y la medicina, como la investigación en biología molecular, el diagnóstico médico e incluso algunas ramas de la ecología. La prueba PCR utiliza una polimerasa de ADN estable al calor (*Taq* polimerasa), nombrada de esta manera por la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*. *Taq* polimerasa es capaz de resistir las altas temperaturas requeridas para desnaturalizar el ADN durante la prueba de PCR. La temperatura óptima requerida por esta es entre 75 °C y 80 °C. Los ingredientes clave para una reacción polimerasa son *Taq* polimerasa, cebadores, ADN molde y nucleótidos (los bloques básicos del ADN), estos se colocan en un tubo, junto con los cofactores que necesite a enzima, y se someten a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis del ADN. De manera básica esta prueba consiste de tres pasos principales: 1) Desnaturalización de la doble hebra de ADN, que consiste en separar las cadenas de ADN por medio de un alto calentamiento para proporcionar los moldes de cadena sencilla para el siguiente paso; 2) Templado, aquí la muestra se enfría para que los cebadores (secuencia corta de nucleótidos que proporcionan un punto de partida para la síntesis de ADN) puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla; 3) Extensión, en este paso la temperatura de la reacción se

eleva para que la *Taq* polimerasa extienda los cebadores y sintetice así nuevas cadenas de ADN. Después de varias repeticiones, alrededor de 25-35 repeticiones de este ciclo, las reacciones pueden producir miles o millones de copias del ADN. El ADN que se produce en un ciclo puede servir como molde en el siguiente ciclo de síntesis, duplicando el número de moléculas en cada ciclo, generando una producción exponencial. Posteriormente se visualizan los fragmentos de ADN por electroforesis en gel. La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN por su tamaño y carga. Consiste en aplicar una corriente a través de un gel (agarosa) que contiene las moléculas de interés. Con base en su tamaño y carga, las moléculas se desplazarán por el gel en diferentes direcciones o a distintas velocidades, con lo que se separan unas de otras, esto se lleva a cabo por acción de una corriente eléctrica que direcciona los fragmentos hacia el electrodo positivo. Los fragmentos más cortos de ADN quedan más cerca del extremo positivo del gel, mientras que los más largos quedan más cerca de los pozos del gel. Los fragmentos de ADN que han recorrido el gel pueden visualizarse por luz UV, a lo largo del gel se presentan las líneas definidas (bandas) brillantes cuando son sometidos bajo este espectro de luz, dando como resultado un brillo en forma de líneas sobre el gel (fragmentos teñidos por un pigmento). Por último, estas bandas se comparan con una base de datos la cual da la identificación del microorganismo, identificándola por su género y especie (Madigan et al., 2022).

2. MÉTODO

2.1. Bosquejo del método.

En la Figura 2.1, se muestran los diferentes pasos a seguir en el presente trabajo de investigación.

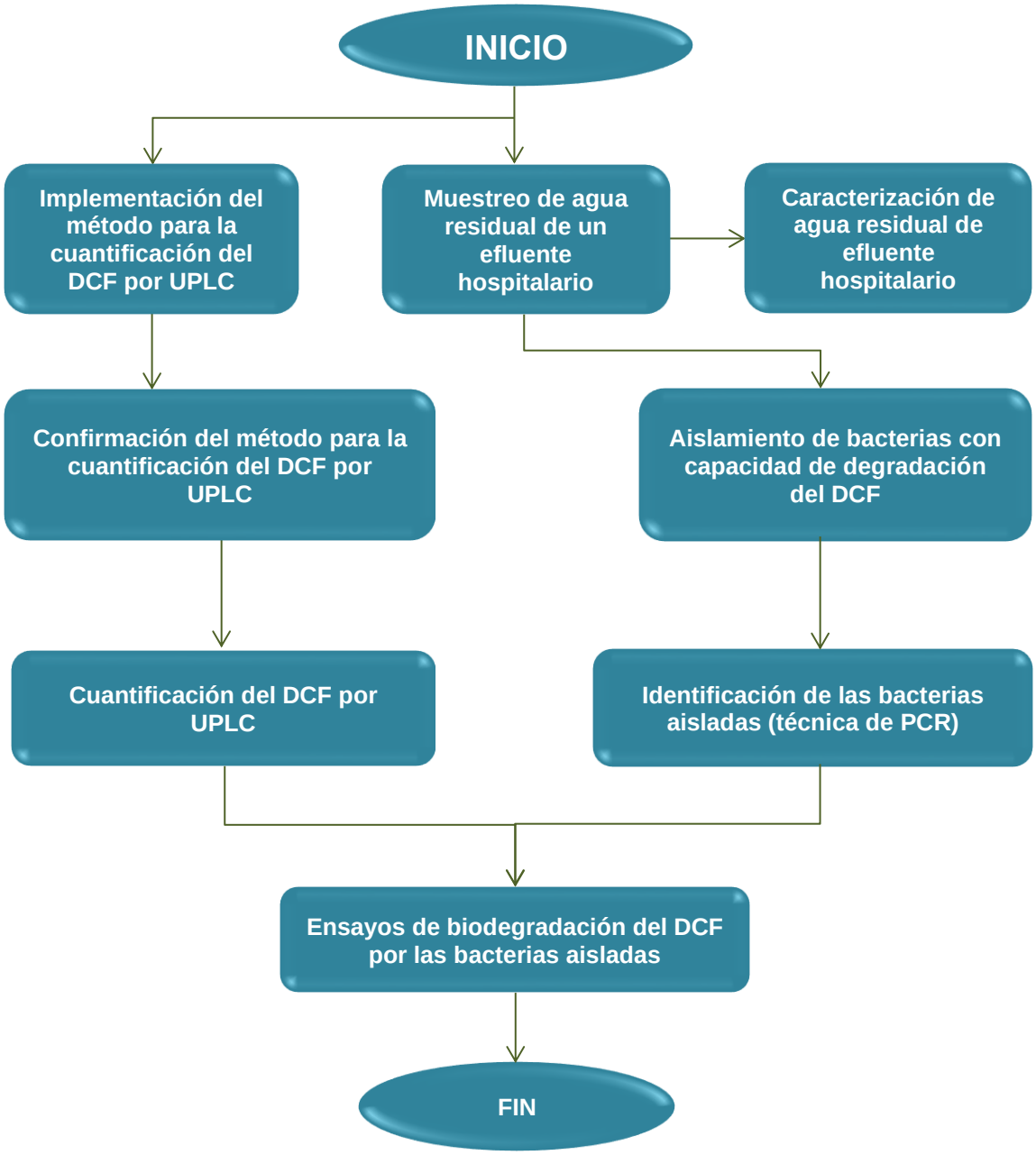


Figura 2.1. Bosquejo del método.

2.2. Metodología.

2.2.1. Implementación del método para la cuantificación de diclofenaco por UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatograph).

En la implementación del método, fue necesario establecer las condiciones cromatográficas, entre las que está la selección de la fase móvil, cada fase se somete a cambios en su composición, es decir, diferentes proporciones de los solventes para conformar la mezcla de la fase móvil, y evaluar el pico específico del DCF. La fase móvil con su composición correspondiente es aquella con la que se evaluó la adecuabilidad del sistema.

Las condiciones cromatográficas que sean óptimas para la implementación del método cromatográfico utilizando un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia (UPLC) deben cumplir con los criterios de la adecuabilidad del sistema, que se define como la verificación de que el sistema opera con base a los criterios que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico. Y cumpliendo con respecto a las fases móvil y estacionaria.

Para la adecuabilidad del sistema se eligió una concentración de 5 mg/L a partir de una solución de diclofenaco de 100 mg/L.

Se debe tener en claro la fase móvil, la composición de la fase móvil, el volumen de inyección de muestra, temperatura de la columna y de la muestra. Los parámetros a considerar para evaluar la adecuabilidad del sistema son el factor de capacidad (K'), número de platos teóricos (N), y factor de coleo (T) (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros de adecuabilidad y criterios de aceptación.

Parámetro	Nomenclatura	Valor aceptable
Factor de capacidad	K'	K' > 2
Número de platos	N	N > 2 000
Factor de coleo	T	T < 2

Así mismo como cumplir con el coeficiente de variación, que sea igual o menor al 2 % de las 5 inyecciones (CV ≤ 2 %). Una vez encontrando las condiciones óptimas de operación del

cromatógrafo a la concentración de 5 mg/L DCF para 5 réplicas de inyección, se inicia la confirmación del método. Cabe mencionar que se llevaron a cabo las instrucciones especificadas del uso del equipo recomendadas por el fabricante, tanto para el manejo del software, los reactivos y disoluciones utilizadas para esta técnica.

2.2.2. Confirmación del método para la cuantificación de diclofenaco por UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatograph).

Una vez implementado el método de identificación y cuantificación de diclofenaco por UPLC; se realiza la confirmación del método para asegurar que los resultados sean exactos y precisos. Los parámetros para evaluar en esta fase son: Límite de detección y cuantificación, intervalo lineal del método, exactitud y precisión.

Exactitud. Proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. Se evalúa con el porcentaje de recuperación. %R = (valor experimental) (100) / (valor teórico).

Linealidad. Aseguramiento de que los resultados obtenidos directamente o por una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del analito. El intervalo lineal se le conoce también como linealidad del sistema. El intervalo de trabajo se le conoce también como linealidad del método. La linealidad de una recta debe cumplir con el coeficiente de determinación, $R^2 \geq 0.98$.

Límite de detección. Concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.

Límite de cuantificación. Concentración mínima del analito que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables.

Los límites de detección y cuantificación se evalúan con los datos de las menores concentraciones de la curva de calibración y se determinarán de acuerdo con lo indicado en la Tabla 8.

Tabla 8. Límites de detección y cuantificación.

Fórmula	Descripción
$\mathrm{LD} = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1}$	Límite de detección
$\mathrm{LC} = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$	Límite de cuantificación
$b_1 = \sqrt{\frac{n\sum xy - \sum x \sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}}$	Pendiente
$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975,n-2} S_{bl}$ $S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x2 - \frac{(\sum x)2}{n}}}$ $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y2 - b_1 \sum xy - b_o \sum y}{n-2}}$ $b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$	Intervalo de confianza para la pendiente

Intervalo lineal del método. Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito (incluyendo éstas), para la cuales se ha demostrado que el método es preciso, exacto y asegurando que los resultados obtenidos directamente o por una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del analito (linealidad). Al menos cinco estándares deben ser los incluidos para la elaboración de la curva de calibración, cada nivel de concentración con tres réplicas. Este parámetro se evaluará en cumplimiento del coeficiente de determinación de $R^2 \geq 0.98$.

Precisión. Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea. La precisión engloba repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad. Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos en intervalos de tiempo cortos. Se evalúa repetibilidad mediante el coeficiente de variación,

CV = (desviación estándar de las tres réplicas) / (raíz del número de réplicas). El CV se determina para cada nivel de concentración.

Reproducibilidad. Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando se analiza diferentes porciones de una muestra, diferente analista, instrumento de medición, método, lugar, patrón de referencia. La reproducibilidad se evalúa utilizando el %CV o, el estadístico de ANOVA con un intervalo de confianza del 95% (Tabla 9). El objetivo es probar la hipótesis de igualdad de los tratamientos de respuesta (Gutiérrez y de la Vara, 2012).

Comprobación de hipótesis:

Ho: μ1 = μ2, las medias de las concentraciones de un nivel de concentración son iguales en dos días de experimentación.

Ha: μ1 ≠ μ2, las medias de las concentraciones de un nivel de concentración no son iguales en dos días de experimentación.

Tabla 9. Estadístico de ANOVA.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fo	F crítico
Tratamientos	$SC_{TRAT} = \sum_{i=1}^{k} \frac{Y_{i\bullet}^2}{n_i} - \frac{Y_{\bullet\bullet}^2}{N}$	k – 1	$CM_{TRAT} = \frac{SC_{TRAT}}{k-1}$	$\frac{CM_{TRAT}}{CM_E}$	$F_{(1-0.95,k-1,N-k)}$
Error	$SC_E = SC_T - SC_{TRAT}$	N – k	$CM_E = \frac{SC_E}{N-k}$		
Total	$SC_T = \sum_{i=1}^{k} \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij}^2 - \frac{Y_{\bullet\bullet}^2}{N}$	N – 1			

Las variables k, i, corresponden al número de tratamientos (días de experimentación). Las variables n, j, corresponden al número de datos en un tratamiento. El total de datos por todos los tratamientos se representa por N.

2.2.3. Muestreo de agua residual de un efluente hospitalario.

La muestra de agua residual se tomó de un efluente hospitalario, conforme la norma NMX-003-AA-1980, que establece el muestreo en aguas residuales. El lugar correspondió a un Centro Médico de tercer nivel. Dirección: Av. Paseo Tollocan Baja Velocidad 284 Km. 57.5, 52170 San Jerónimo

Chicahualco, Metepec, Estado de México, tomando una muestra por parámetro. Las muestras fueron tomadas de un registro que proviene de líneas de baños de los cuartos del hospital, este sitio no pertenece a líneas de agua pluvial ni efluentes del área de comedor, asimismo el efluente no proviene de tratamiento previo a su descarga. Se tomó una muestra por parámetro y bajo las condiciones de recolección de cada norma. In situ, se midieron los valores de temperatura, pH y conductividad en el agua residual del efluente hospitalario, con base en lo indicado en las normas NMX-AA-007-SCFI-2013 (Medición de la temperatura en aguas naturales, residuales y residuales tratadas), NMX-AA-008-SCFI-2016 (Medición del pH en aguas naturales, residuales y residuales tratadas) y NMX-AA-093-SCFI-2000 (determinación de la conductividad electrolítica). La completa caracterización del agua residual del efluente hospitalario se realizó en base a los métodos de análisis de parámetros fisicoquímicos como grasas y aceites (NMX-AA-005-SCFI-2013), nitrógeno total Kjeldahl (NMX-AA-026-SCFI-2010), demanda bioquímica de oxígeno (NMX-AA-028-SCFI-2001), fósforo total (NMX-AA-029-SCFI-2001), demanda química de oxígeno (NMX-AA-030/2-SCFI-2012), sólidos suspendidos totales (NMX-AA-034-SCFI-2015), turbiedad (NMX-AA-038-SCFI-2011), nitrógeno de nitratos (NMX-AA-079-SCFI-2001), nitrógeno de nitritos (NMX-AA-099-SCFI-2006).

2.2.4. Aislamiento de bacterias del agua residual del efluente hospitalario con capacidad de degradación del diclofenaco.

2.2.4.1. Acondicionamiento bacteriano con diclofenaco.

La muestra de efluente de agua residual de hospital fue cultivada en medio nutritivo TSB en una relación 1:50 en condiciones de incubación de 35 ± 1 °C por 24 horas en oscuridad. Posteriormente, se empleó esta suspensión de crecimiento bacteriano para ser acondicionado en solución de medio mineral (85 mg/L KH_2PO_4, 208 mg/L K_2HPO_4, 334 mg/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 5 mg/L NH_4Cl, 22.5 mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 27.5 mg/L $CaCl_2$, 0.25 mg/L $FeCl_3$) enriquecido con incrementos en las concentraciones de diclofenaco a partir de una solución inyectable de 75 mg/ 3 mL (AMSA Laboratorios) hasta su total adaptación en condiciones de incubación, comenzando desde 2.5 mg/L DCF y duplicando la concentración cada vez hasta el máximo de resistencia bacteriana, la cual alcanzó la concentración de 1 280 mg/L DCF. En la Tabla 10 se muestran las concentraciones de acondicionamiento para la cepa bacteriana aislada en frasco, asimismo como la siembra en placa de cada frasco con suspensión bacteriana.

Tabla 10. Acondicionamiento bacteriano a diferentes concentraciones de DCF.

Frasco medio mineral enriquecido	Concentración de DCF	Observación	Placa de TSA enriquecido	Concentración de DCF	Observación
EAM-1	2.5 mg/L	Crecimiento a 24 horas	TSA-2.5	2.5 mg/L	Crecimiento a 24 horas
EAM-2	5.0 mg/L		TSA-5	5 mg/L	
EAM-3	10 mg/L	Crecimiento a 48 horas	TSA-10	10 mg/L	
EAM-4	20 mg/L	Crecimiento a 24 horas	TSA-20	20 mg/L	
EAM-7	40 mg/L		TSA-40	40 mg/L	
EAM-8	80 mg/L		TSA-80	80 mg/L	
EAM-9	160 mg/L		TSA-160	160 mg/L	
EAM-10	320 mg/L		TSA-320	320 mg/L	
EAM-11	640 mg/L		TSA-640	640 mg/L	
EAM-12	1 280 mg/L		TSA-1280	1 280 mg/L	

Una concentración de 2 000 mg/L fue probada en el acondicionamiento de la cepa bacteriana aislada, sin embargo, el crecimiento bacteriano resultó ausente, lo que confirma que el acondicionamiento bacteriano debe ser gradual para la adaptación de las bacterias en presencia del diclofenaco. La concentración máxima de acondicionamiento queda en 1 280 mg/L DCF.

2.2.4.2. Aislamiento de bacterias acondicionadas con diclofenaco.

Una siembra en placa enriquecida con DCF se realizó para la selección de cepas bacterianas aisladas con mayor capacidad de adaptación en solución de DCF. El proceso de siembra se realizó tomando una asada de la suspensión bacteriana de 1 280 mg/L de DCF y sembrando en placa de TSA enriquecida con 1 280 mg/L de DCF, se incubó a 35 ± 1 °C por 24 horas. Posteriormente, fueron reservadas en tubos de TSA con 1 280 mg/L de DCF en pico de flauta.

2.2.5. Caracterización de cepa bacteriana aislada e identificación por prueba PCR.

2.2.5.1. Caracterización de cepa bacteriana aislada.

Las cepas bacterianas aisladas se sometieron a pruebas bioquímicas, enzimáticas y de tinción de Gram para obtener características coloniales y de morfología bacteriana. Para la diferenciación de colonias se resembraron las cepas aisladas, en los medios de cultivo: Cetrimida, Bilis Rojo Violeta, Eosina Azul de Metileno, Sal y Manitol, Biggy, Mac Conkey, Verde Brillante y Desoxicolato. Las pruebas bioquímicas empleadas para conocer el metabolismo de las bacterias fueron: Medio Basal OF, agar Citrato, agar TSI, Medio MIO. Pruebas enzimáticas fueron prueba de la oxidasa y prueba de la catalasa. Una tinción de Gram fue realizada para obtener la diferenciación de bacterias Gram positivas de las Gram negativas y mediante la observación en un microscopio óptico la forma de las bacterias.

2.2.5.2. Identificación de las bacterias aisladas empleando la técnica de PCR.

El procedimiento consistió en extraer el ADN de una suspensión de la cepa bacteriana aislada (una asada del crecimiento bacteriano en agua destilada estéril); por medio de un kit de extracción de ADN (Jena Bioscience) y de acuerdo con las instrucciones del fabricante se realizó la extracción de ADN. El análisis genómico consistió en realizar una amplificación al ADN extraído por medio de la prueba de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en la que se empleó la muestra (solución de ADN extraído) en mezcla PCR ARNr16S (Jena Bioscience). La muestra se colocó en un termociclador (T10 Thermal Cycler BIO-RAD) a condiciones de 35 ciclos de 5 min 30 s a 94 °C, 1 min a 51 °C y 1 min 30 s a 72 °C. Después la muestra fue purificada mediante una mezcla de la muestra de reacción PCR y solución Exosap (Jena Bioscience) en el termociclador a condiciones de 15 min a 37 °C y 15 min a 80 °C. En un sistema de electroforesis (BIO-RAD PowerPac) se realizó la separación de las bandas de nucleótidos, se emplearon placa de gel agarosa (Invitrogen UltraPure Agarose) al 1 %, buffer TAE 1X grado biología molecular (Applichem), buffer de carga con gel red (BIOTUM) y muestra procesada de PCR, a condiciones de 80 V por 40 min. En un equipo luminiscente UV (MINILUMI 2.0) se confirmó la separación de bandas. La muestra purificada se procesó para su secuenciación en un equipo secuenciador de ADN (Ion Torrent, Life Technologies) y software Sequencher, del que se obtuvo una longitud de nucleótidos de 1200. Finalmente, el programa BLASTN (http://ncbi.nlm.nih.gov) de la Librería Nacional de Medicina de Estados Unidos

(National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information) fue empleado para la identificación de la cepa bacteriana aislada, alimentando el programa con el archivo generado por el software Sequencher, en la que se comparó la longitud de nucleótidos con el banco de datos BLASTN.

2.2.6. Ensayos de biodegradación del diclofenaco por las bacterias aisladas, en matriz acuosa.

Una suspensión bacteriana (inóculo) fue preparada a partir de una resiembra fresca de la cepa bacteriana aislada en placa de agar TSA enriquecido a 1 280 mg/L DCF. Para el inóculo se suspendió una pequeña asada de la cepa en NaCl al 0.85 % igualando la turbiedad al estándar McFarland 0.5. Las pruebas de degradación fueron realizadas a diferentes concentraciones de prueba, 1 280, 500, 100 y 10 mg/L DCF respectivamente. En frascos se preparó medio mineral y se adicionó la concentración de prueba de DCF y 1 mL de inóculo por cada 50 mL de medio mineral, de estos frascos se dispuso de alícuotas homogéneas llevadas a tubos sellados por duplicado y se sometieron a condiciones de incubación. Otra prueba fue llevada a cabo en las mismas condiciones, con la diferencia que se agregó glucosa como fuente adicional de carbono, en una concentración de 5.88 mM (Bessa et al., 2019). Se monitoreó el crecimiento bacteriano a 600 nm como densidad óptica. Todos los tubos de cada concentración de prueba fueron incubados a 35 ± 1 °C por 24 horas en protección de la luz. La concentración de DCF de cada experimento fue medida cada 24 horas por medio de un método espectrofotométrico. La biodegradación fue monitoreada por un tiempo de 10 días. En el estudio se incluyó un control del diclofenaco, el que no fue inoculado con las bacterias para ambas pruebas (prueba con inoculo y prueba con glucosa).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Confirmación metrológica del método cromatográfico UPLC para determinación del diclofenaco.

3.1.1. Determinación de la longitud de onda del diclofenaco por UV-Vis.

Se realizó un barrido en el espectro UV-Vis para encontrar la longitud de onda de máxima absorción del DCF, utilizando disoluciones de 5 y 30 mg/L DCF respectivamente, y mediante el uso del espectrofotómetro Thermo-Scientific Evolution Array se realizaron estos barridos. Se corrió un blanco con agua desionizada. Los espectros de absorción obtenidos en esta prueba se muestran en la Figura 3.1.

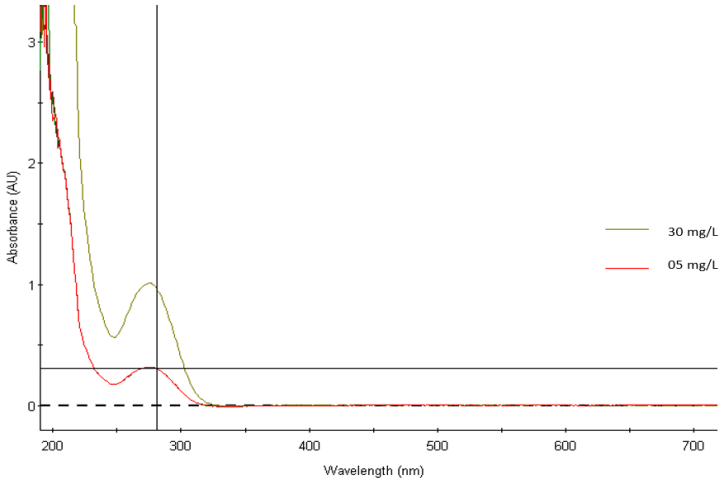


Figura 3.1. Espectros de barrido de 5 y 30 mg/L DCF.

Asimismo, en la Tabla 11 se pueden observar las absorbancias medidas a diferentes longitudes de onda cercanas a los 300 nm.

Tabla 11. Absorbancias a distintas longitudes de onda.

mg/L DCF	ABS (272 nm)	ABS (273 nm)	ABS (274 nm)	**ABS (275 nm)**	ABS (276 nm)	ABS (277 nm)	ABS (278 nm)	ABS (279 nm)	ABS (280 nm)
30	1,0012	1,0090	1,0074	**1,0096**	1,0141	1,0102	1,0014	0,9951	0,9818
5	0,3160	0,3172	0,3184	**0,3195**	0,3195	0,3193	0,3177	0,3163	0,3103
5	0,3171	0,3168	0,3180	**0,3189**	0,3186	0,3182	0,3167	0,3128	0,3092

La máxima absorción de luz para estas concentraciones es correspondiente a 275 nm y 276 nm. Con respecto a las máximas absorbancias, se eligió la longitud de 275 nm.

3.1.2. Adecuabilidad del sistema.

Las pruebas iniciales se realizaron en un equipo cromatógrafo de líquidos de ultra-alta resolución Water Acquity UPLC, con una columna de separación Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 50 mm).

A partir de una disolución estándar de 5 mg/L de DCF se comenzó a evaluar los parámetros de factor de capacidad (K), número de platos (N) y el factor de coleo (T), mediante tres fases móviles: H_2O-Metanol (Chen et al., 2020), H_2O-H_3PO_4 0.01 % y Metanol-H_3PO_4 0.01 %. Con cada fase móvil se probaron diferentes volúmenes de inyección de la muestra, proporciones y flujos de la fase móvil (Tabla 12). Se comenzó con una proporción de fase móvil de H_2O-Metanol (B-D) de 85 % agua y 15 % metanol (B:D = 85:15) con volúmenes de inyección de 7, 8 y 9 µL y variando el flujo desde 0.30 mL/min.

Tabla 12. Resultados de evaluación de adecuabilidad en distintas fases móviles.

Fase móvil	No. de Prueba	B:D	Vol. Inyección (µg)	Run time (min)	Flujo (mL/min)	Tr (min)	Adecuabilidad		
							K	**T**	**N**
Metanol-H_2O	1	85:15	7	3	0.30	0.733	0.05	1.304	2 971.12
	2	85:15	8	1.5	0.30	0.738	0.05	1.307	3 000.87
	3	85:15	9	1.5	0.30	0.743	0.06	1.310	3 013.78
	4	85:15	9	1.5	0.35	0.637	0.06	1.290	2 824.73
	5	85:15	8	1.5	0.35	0.634	0.06	1.288	2 807.88
	6	85:15	8	2	0.25	0.885	0.11	1.316	3 178.54
	7	85:15	9	2	0.25	0.891	0.11	1.318	3 182.06
	8	85:15	8	2	0.20	1.108	0.11	1.280	3 374.24
	9	80:20	8	2	0.20	1.384	0.38	1.311	4 289.64
	10	80:20	8	2	0.25	1.106	0.38	1.338	3 928.86
	11	80:20	8	2	0.30	0.922	0.32	1.316	3 667.21
	12	90:10	8	3	0.15	1.267	-0.03	1.164	2 824.88
	13	80:20	8	3	0.15	1.872	0.44	1.310	4 910.38
H_2O-H_3PO_4 0.01%	14	70:30	8	5	0.15	3.568	1.74	1.334	7 187.94
Metanol-H_3PO_4 0.01%	15	65:35	8	8	0.15	5.503	3.23	1.336	8 076.78
	16	65:35	8	7	0.20	4.083	3.08	1.277	7 359.73
	17	65:35	8	6	0.25	3.241	3.05	1.265	6 295.81
	18	**65:35**	**9**	**6**	**0.25**	**3.230**	**3.04**	**1.264**	**6 350.36**

Como se observa en la Tabla 12, de las pruebas 1 a 13 se probó con la fase móvil de H_2O-Metanol en distintas proporciones y variando el volumen de inyección, en cada una de estas pruebas se cumplió con los criterios de adecuabilidad del sistema “T<2” y “N>2 000”, únicamente no se cumple con el factor de capacidad “K”, siendo K<2. En la prueba 14 se probó con la fase móvil de H_2O-H_3PO_4 0.01%, sin embargo, se repite el rechazo del criterio del factor de capacidad, resultando menor a 2. En las pruebas 15 a 18, se utilizó una fase móvil de Metanol-H_3PO_4 0.01% y volumen de inyección de 8 y 9 µL, y flujos de 0.15, 0.20 y 0.25 mL/min respectivamente. Las condiciones cromatográficas de operación para la determinación de diclofenaco se muestran en la Tabla 13, los criterios de adecuabilidad del sistema cumplen con K>2, T<2 y N>2000 para las pruebas 15 a 18; en la prueba 18 se obtuvo mejor tiempo de retención, presentándose el pico de DCF a 3.23 minutos.

Tabla 13. Condiciones cromatográficas de operación.

Parámetro	Valor
Fase móvil	Metanol-H_3PO_4 0.01%
Proporción de la fase móvil	65:35
Flujo de fase móvil	0.25 mL/min
Volumen de inyección	9 µL

A estas condiciones de operación se encontró un tiempo de retención (tr) de 3.20 minutos para el DCF, y se muestra en la Figura 3.2.

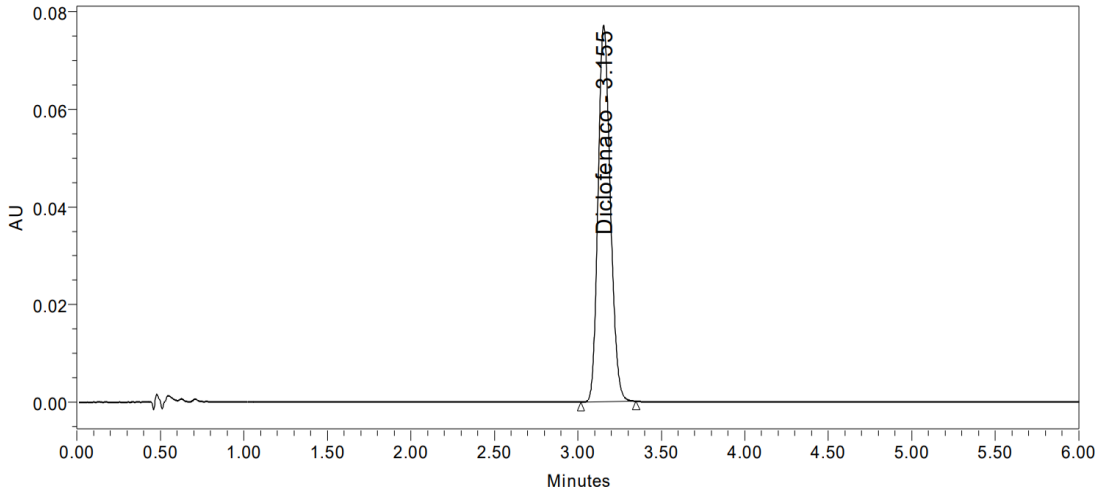


Figura 3.2. Cromatograma del diclofenaco.

En la Tabla 14 se resumen las condiciones experimentales de la adecuabilidad del sistema vs. los criterios de aceptación.

Tabla 14. Condiciones óptimas de adecuabilidad.

Parámetro	Valor	Criterio
Factor de capacidad	k = 3.04	Mayor a 2
Factor de coleo	t = 1.264	Menor a 2
Número de platos	N = 6 350.36	Mayor a 2 000

3.1.3. Intervalo lineal y de trabajo.

La linealidad del sistema se evaluó con la curva de calibración en las concentraciones de 0.1, 0.5, 2.5, 5, 10 y 20 mg/L de DCF. Los estándares se prepararon a partir de una solución de 100 mg/L. La curva de calibración se preparó por triplicado, corriendo las tres curvas el mismo día y cada estándar por triplicado. La prueba se repitió bajo las mismas condiciones en un día diferente. En la Tabla 15 se muestra que cada curva de calibración se evaluó con respecto al coeficiente de determinación "R^2", y el coeficiente de variación con respecto al área (CV) para cada estándar de la curva de calibración.

Tabla 15. Evaluación de las curvas de calibración para la linealidad del sistema.

Día	Curva	Ecuación de la recta	Coeficiente de determinación (R^2)	Estándar (mg/L)	Coeficiente de variación
1	1	y = 83771x - 8389.2	0.9997	0.1	0.912
				0.5	0.207
				2.5	0.057
				5	0.063
				10	0.072
				20	0.015
	2	y = 82985x - 7642.5	0.9996	0.1	0.642
				0.5	0.244
				2.5	0.065
				5	0.035
				10	0.037
				20	0.040
	3	y = 77400x - 571.29	0.9999	0.1	0.223
				0.5	0.180
				2.5	0.024
				5	0.037
				10	0.009
				20	0.009
2	1	y = 83622x - 7735.4	0.9997	0.1	0.438
				0.5	0.294
				2.5	0.055
				5	0.028
				10	0.017
				20	0.013
	2	y = 79917x + 403.63	0.9996	0.1	0.477
				0.5	0.065
				2.5	0.014
				5	0.021
				10	0.026
				20	0.010
	3	y = 76557x + 1781.4	0.9999	0.1	0.179
				0.5	0.334
				2.5	0.052
				5	0.010
				10	0.031
				20	0.023

La linealidad del método se evaluó preparando una curva de calibración de concentraciones de 0.25, 1, 4, 8 y 15 mg/L de DCF. Los estándares se prepararon a partir de una solución de 100 mg/L. La curva de calibración se preparó por triplicado, corriendo las tres curvas el mismo día y cada estándar por triplicado. La prueba se repitió bajo las mismas condiciones en un día diferente. En la Tabla 16 se muestra que cada curva de calibración se evaluó con respecto al coeficiente de determinación "R^2", y el coeficiente de variación con respecto al área (CV) para cada estándar de la curva de calibración.

Tabla 16. Evaluación de las curvas de calibración para la linealidad del método.

Día	Curva	Ecuación de la recta	Coeficiente de determinación (R^2)	Estándar (mg/L)	Coeficiente de variación
1	1	y = 82455x - 50.702	0.9999	0.25	0.477
				1	0.032
				4	0.107
				8	0.032
				15	0.028
	2	y = 83031x - 10890	0.9994	0.25	0.797
				1	0.100
				4	0.049
				8	0.031
				15	0.024
	3	y = 77425x - 1679	0.9997	0.25	0.180
				1	0.207
				4	0.040
				8	0.034
				15	0.033
2	1	y = 82285x - 263.70	0.9999	0.25	0.131
				1	0.037
				4	0.053
				8	0.024
				15	0.019
	2	y = 82879x - 11009	0.9994	0.25	0.154
				1	0.053
				4	0.0118
				8	0.013
				15	0.015
	3	y = 80484x - 3505.4	0.9997	0.25	0.369
				1	0.183
				4	0.058
				8	0.011
				15	0.007

Como se observa en cada una de las curvas de calibración (Tabla 15 y 16) que se corrieron en un día y que se repitieron en un segundo día, cada estándar de las seis curvas analizadas cumple con el coeficiente de variación, CV ≤ 2%. En cuanto al coeficiente de determinación, cada curva en ambos días cumple con el criterio de $R^2 \geq 0.98$. La linealidad del sistema y linealidad del método son aceptables.

3.1.4. Límite de detección y Límite de cuantificación.

El límite de detección fue determinado mediante el método de regresión lineal utilizando los datos de las concentraciones de 0.1, 0.25 y 0.5 mg/L DCF. En la Tabla 8 se muestran los modelos matemáticos empleados.

El límite de detección y el límite de cuantificación se determinaron por triplicado, un valor para cada curva de calibración en los dos días de experimentación (Tabla 17).

Tabla 17. Límite de detección y límite de cuantificación.

Día	Réplica	Pendiente (b1)	$S_{y/x}$	Límite de Detección (mg/L)	Límite de Detección promedio (mg/L)	Límite de cuantificación (mg/L)	Límite de cuantificación promedio
1	1	74120.58	536.36	0.023	0.022	0.072	0.067
	2	78760.88	636.07	0.026		0.080	
	3	83905.79	455.19	0.017		0.054	
2	1	74601.17	772.71	0.034	0.021	0.103	0.064
	2	78583.95	662.90	0.027		0.084	
	3	85088.24	377.47	0.014		0.044	

En los dos días de experimentación, se encontró que el límite de detección teórico es de 0.0215 mg/L DCF. Y el límite de cuantificación teórico es de 0.0655 mg/L DCF.

3.1.5. Exactitud.

La exactitud se evaluó mediante el parámetro del % de recuperación, que se calcula mediante la fórmula %R = (valor experimental) (100) / (valor teórico). Para determinar las concentraciones experimentales de las muestras preparadas, se utilizó las curvas de calibración de linealidad del sistema y se calculó el porcentaje de recobro.

En la Tabla 18 se muestran los datos de área, concentración, porcentaje de recobro y CV para las muestras procesadas en el primer día de análisis.

Tabla 18. Exactitud del día 1.

Réplica	Concentración teórica (mg/L)	Área promedio	Concentración experimental (mg/L)	Desviación	Promedio % R	% CV
1	1.0	79341.243	1.0464	0.00033	103.2	0.03
	4.0	335054.600	4.3491	0.00463	108.4	0.11
	8.0	663989.057	8.5976	0.00278	107.3	0.03
	15.0	1233269.537	15.9502	0.00441	106.3	0.03
2	1.0	77167.533	1.0183	0.00099	100.4	0.10
	4.0	312546.412	4.0584	0.00196	101.1	0.05
	8.0	637258.995	8.2523	0.00256	103.0	0.03
	15.0	1244981.802	16.1015	0.00385	107.3	0.02
3	1.0	81416.085	1.0732	0.00217	105.9	0.20
	4.0	295942.952	3.8440	0.00153	95.8	0.04
	8.0	620089.463	8.0306	0.00275	100.2	0.03
	15.0	1161243.240	15.0200	0.00500	100.1	0.03

La exactitud queda en el intervalo de 95.8 a 108.4 de porcentaje de recuperación, cumplen con el criterio de 80-120 % de recuperación.

En la Tabla 19 se muestran los datos de área, concentración, porcentaje de recobro y CV para las muestras procesadas en el segundo día de análisis.

Tabla 19. Exactitud en el día 2.

Réplica	Concentración teórica (mg/L)	Área promedio	Concentración experimental (mg/L)	Desviación	Promedio % R	% CV
1	1.0	79014.607	1.0088	0.00038	100.9	0.04
	4.0	333794.122	4.3368	0.00233	108.4	0.05
	8.0	662466.875	8.6300	0.00205	107.9	0.02
	15.0	1230569.941	16.0506	0.00305	107.0	0.02
2	1.0	76986.690	0.9823	0.00052	98.2	0.05
	4.0	311700.991	4.0482	0.00074	101.2	0.02
	8.0	635746.027	8.2809	0.00111	103.5	0.01
	15.0	1242717.016	16.2093	0.00246	108.1	0.01
3	1.0	81434.964	1.0404	0.00194	104.0	0.19
	4.0	295510.171	3.8367	0.00222	95.9	0.06
	8.0	619221.377	8.651	0.00093	100.8	0.01
	15.0	1165511.471	15.2008	0.00106	101.3	0.01

La exactitud queda en el intervalo de 95.8 a 108.4 de porcentaje de recuperación, cumplen con el criterio de 80-120 % de recuperación.

3.1.6. Precisión.

3.1.6.1. Repetibilidad.

De acuerdo con los datos obtenidos en las Tablas 18 y 19, el coeficiente de variación para cada nivel de concentración en cada curva, tienen valores menores a 2%, criterio establecido del coeficiente de variación.

3.1.6.2. Reproducibilidad.

La reproducibilidad del método se evaluó determinando la variación de los resultados experimentales de muestras de DCF analizadas en días diferentes. Los datos fueron tratados con el estadístico de ANOVA con un intervalo de confianza del 95% (Tabla 9). Los tratamientos son dos (k,i=2), correspondiendo a dos días de experimentación. En un día (un tratamiento) de experimentación se

analizaron tres muestras (linealidad del método) con cinco niveles de concentración, 1, 4, 8 y 15 mg/L respectivamente. De cada nivel de concentración se tienen 3 réplicas que por las tres muestras se tiene un total de 9 datos por tratamiento (n,j=9), y un total de 18 datos (N=18) por ambos tratamientos.

El valor F crítico se toma de tablas de distribución F con un intervalo de confianza del 95%, con grados de libertad (k-1) de 1 para los tratamientos y grados de libertad (N-k) de 16. El valor F crítico es de 4.49. En la Tabla 20 se muestran los resultados de cada una de las pruebas comparando el valor Fo con F crítica. El criterio de aceptación de la igualdad de los tratamientos para una concentración es que Fo<F crítica, de lo contrario se rechaza Ho (las medias son iguales) y se acepta Ha (las medias no son iguales).

Tabla 20. Resultados de Reproducibilidad.

Nivel de concentración (mg/L)	Fo	Criterio
1	3.45	Se acepta, Fo < 4.49
4	0.0008	Se acepta, Fo < 4.49
8	0.139	Se acepta, Fo < 4.49
15	0.363	Se acepta, Fo < 4.49

3.2. Muestreo de agua residual de efluente hospitalario.

El muestreo se llevó a cabo en un Centro Médico de tercer nivel. Dirección: Av. Paseo Tollocan Baja Velocidad 284 Km. 57.5, 52170, San Jerónimo Chicahualco, Metepec, Estado de México (Figura 3.3).

Figura 3.3. Ubicación del sitio de muestreo. a) Centro médico de tercer nivel. b) Ubicación por aplicación Google Maps.

El punto de muestreo correspondió a un registro que colecta las descargas que vienen de líneas de baños de los cuartos del hospital, incluyendo efluentes de limpieza en el hospital. El agua residual no se mezcló con líneas de agua pluvial, ni efluentes del área de comedor (Figura 3.4). El sitio de muestreo fue visitado previamente para la elaboración del plan de muestreo.

Figura 3.4. Registro de agua residual del Centro Médico de tercer nivel.

La toma de muestras del registro se muestra en la Figura 3.5. Las muestras fueron transportadas a las instalaciones del LIIA para su inmediato análisis. El agua se encontraba estancada y con

profundidad de 2.5 metros, debido a que en ese momento la planta de tratamiento de aguas residuales del centro médico no estaba en operación.

Figura 3.5. Toma de muestras de registro de agua residual.

3.3. Caracterización fisicoquímica de agua residual de efluente hospitalario.

Los análisis de las muestras se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Ingeniería Ambiental (LIIA) del Instituto Tecnológico de Toluca. Y de acuerdo con los métodos establecidos en las normas oficiales mexicanas mencionadas en el punto 2.2.3 de este documento.

Los parámetros *in situ* de pH y conductividad se analizaron por medio del uso de un potenciómetro Thermo-Scientific, Orion STAR A329 calibrado. La temperatura se midió con un termómetro de mercurio en intervalo de 0 a 30 °C ASTM 90C. Los parámetros de fósforo total, nitritos y nitratos fueron determinados mediante un espectrofotómetro UV-VIS Thermo Scientific VISION Evolution Array. Los parámetros de grasas y aceites y sólidos suspendidos totales se determinaron de forma gravimétrica. Demanda química de oxígeno y nitrógeno total Kjeldahl se determinaron por volumetría. Turbiedad fue determinada por medio de un colorímetro portátil HACH DR/980. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Caracterización fisicoquímica del agua residual de efluente hospitalario.

Parámetro	Resultado	Límite permisible	Unidad	Referencia
Temperatura	18.6	35	°C	NMX-AA-007-SCFI-2013
Conductividad	886.42	---	µS/cm	NMX-AA-093-SCFI-2000
pH	8.37	6 – 9	UpH	NMX-AA-007-SCFI-2013
Grasas y aceites	1 612.40	21	mg/L	NMX-AA-005-SCFI-2013
Fósforo total	25.97	21	mg/L	NMX-AA-029-SCFI-2001
Demanda química de oxígeno	2 237.92	210	mg/L	NMX-AA-030/2-SCFI-2012
Demanda bioquímica de oxígeno	586.32	---	mg/L	NMX-AA-028-SCFI-2001
Sólidos suspendidos totales	252.00	84	mg/L	NMX-AA-034-SCFI-2015
Turbiedad	510	---	NTU	NMX-AA-038-SCFI-2001
Nitrógeno total Kjeldahl	105.54	---	mg/L	NMX-AA-026-SCFI-2010
Nitratos	17.10	---	mg/L	NMX-AA-079-SCFI-2001
Nitritos	276.50	---	µg/L	NMX-AA-099-SCFI-2006
Nitrógeno Total	122.91	35	mg/L	---

La NOM-001-SEMARNAT-2021 establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación, estos valores de referencia se incluyen en la Tabla 21. Los parámetros que superan el límite permisible son grasas y aceites, fósforo total, demanda química de oxígeno, sólidos suspendidos totales y nitrógeno total. La muestra de agua residual que se tomó del efluente hospitalario no ha pasado por un tratamiento previo a su descarga al alcantarillado, por lo que es de esperarse que los valores de estos parámetros sean superiores a los límites permisibles.

3.4. Aislamiento bacteriano de agua residual de efluente de hospital.

El acondicionamiento bacteriano se logró a concentración de 1 280 mg/L DCF. Posteriormente, en una siembra en placa TSA de 1 280 mg/L DCF se obtuvieron cepas bacterianas aisladas. En la Figura 3.6 se muestra el resultado de este crecimiento.

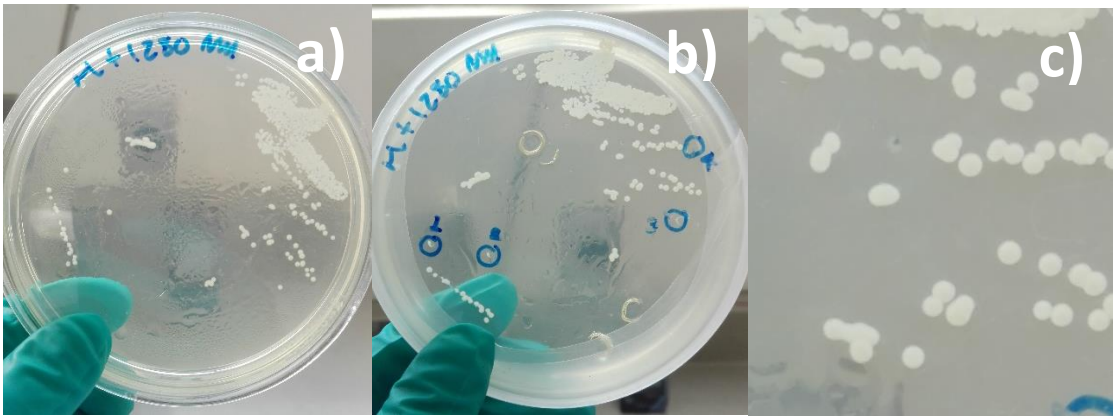


Figura 3.6. Siembra en estría en TSA enriquecido con 1 280 mg/L de DCF; a) Placa de colonias aisladas; b) Cuatro colonias seleccionadas; c) Morfología de las colonias bacterianas aisladas.

De acuerdo con la Figura 3.6, se puede observar que las colonias presentan las mismas características morfológicas. Las colonias son de color blanco, apariencia cremosa, borde entero, opaca, convexa y con brillo (Fig 3.6c). De estas colonias se seleccionaron cuatro de ellas (Fig.3.6b) que fueron sembradas por técnica de estría y crecieron aisladas en el medio TSA enriquecido de 1 280 mg/L DCF. En la Figura 3.7 se muestran las cepas bacterianas aisladas después de hacer sido incubadas a 35 ± 1 °C por 24 horas.

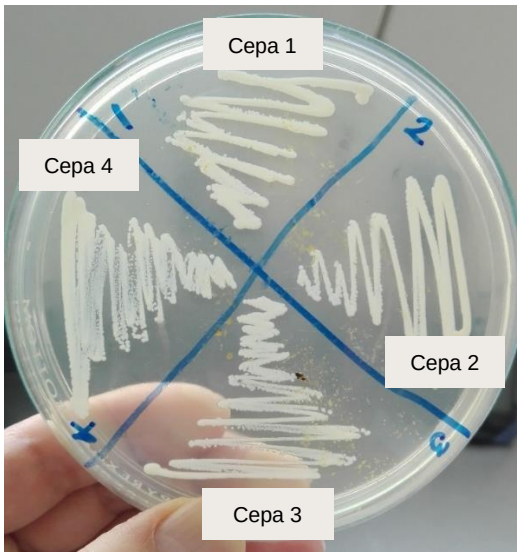


Figura 3.7. Colonias bacterianas aisladas de agua residual de hospital en TSA enriquecido con 1 280 mg/L DCF.

Cada cepa bacteriana se sembró en tubos TSA con 1 280 mg/L DCF para su preservación (Figura 3.8).

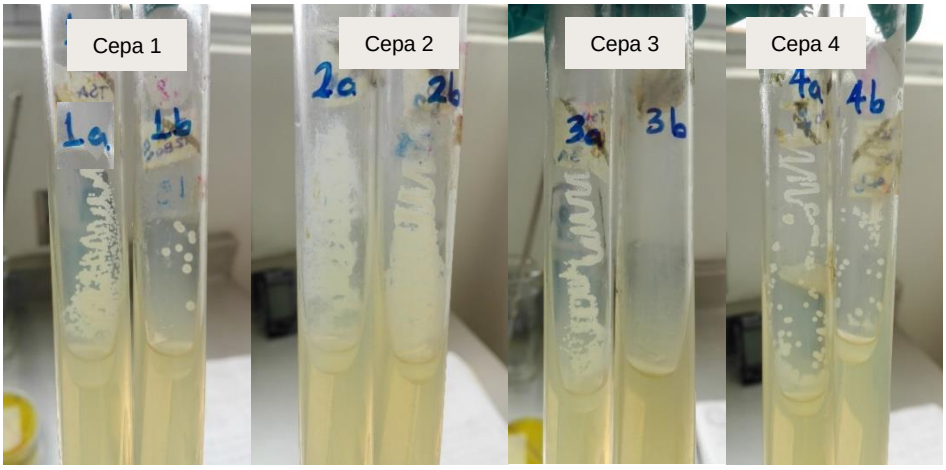


Figura 3.8. Cepas aisladas reservadas en medio TSA con 1 280 mg/L DCF.

Las cepas bacterianas aisladas (Fig. 3.8), se reservaron a 4 °C para más adelante realizar las pruebas de degradación.

3.5. Caracterización de cepa bacteriana aislada e identificación por prueba PCR.

3.5.1. Caracterización de cepa bacteriana aislada.

En la tinción de Gram se observó una cepa aislada correspondiente a un bacilo corto de color rojo (Gram negativa). Los bacilos Gram negativos son característicos de las bacterias que pertenecen a la familia de las enterobacterias. Las pruebas para la diferenciación de colonias bacterianas emplearon medios de cultivo diferenciales y selectivos. Los resultados obtenidos se concentran en la Tabla 22.

Tabla 22. Diferenciación de colonias bacterianas en medios de cultivo selectivo.

Medio de cultivo	Crecimiento	Interpretación
Agar Cetrimida	Sin crecimiento. Inhibe crecimiento de *E. coli*.	Negativo a *Pseudomona aeruginosa* (y otras especies del género) y *Escherichia coli*.
Agar Billis Rojo Violeta	Colonias rojo púrpura, rodeadas de halo de precipitación rojizo.	Bacterias que fermentan lactosa. Presuntivo a coliformes.
Agar Eosina Azul de Metileno	Colonias de color negro azulado o marrón oscuro, mucosas con centro oscuro y sin brillo metálico.	Microorganismos fermentadores de lactosa y/o sacarosa. Bacilos Gram negativos. Positivo a bacterias de familia de *Enterobacteriaceae*. Presuntiva *Klebsiella pneumoniae*.
Agar Sal y Manitol	Sin crecimiento.	Negativo a estafilococos y *E. coli*.
Agar Biggy	Sin crecimiento.	Negativo a *Candida sp*.
Agar Mac Conkey	Colonias rosadas-rojizas.	Microorganismos fermentadores de lactosa. Bacilos Gram negativos, todas las especies de *Enterobacteriaceae*.
Agar Verde Brillante	Colonias amarillo-verdosas, rodeadas por halo amarillo verdoso del medio de cultivo.	Bacterias que fermentan la lactosa y/o sacarosa. Negativo a Salmonella spp.
Agar Desoxicolato	Colonias marrón.	Microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*, presunción de *Proteus*.

La cepa bacteriana dio negativo a *Pseudomona aeruginosa*, *E. coli*, *Candida sp.*, *Salmonella spp.*, estafilococos. Por otro lado, dio positiva a crecimiento de bacterias del tipo de bacilos Gram negativos y positiva a pertenecer a la familia de *Enterobacteriaceae*, presuntiva a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* y de coliformes. Con respecto a la diferenciación de microorganismos por los diferentes medios de cultivo empleados, se puede concluir que la cepa bacteriana aislada pertenece a la familia de bacterias *Enterobacteriaceae*.

Las siguientes pruebas que se realizaron fueron las pruebas bioquímicas para conocer sus características metabólicas, los resultados se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Características metabólicas de la cepa bacteriana aislada.

Medio de cultivo	Observación	Interpretación
Medio basal OF	Color amarillo con y sin aceite.	Microorganismos oxidativos y fermentativos.
Agar Citrato	Crecimiento bacteriano de intenso color azul en pico de flauta.	Positivo a enterobacterias como *Klebsiella pneumoni*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*.
Agar TSI	Coloración amarilla en pico de flauta y capa profunda, reacción ácida. Burbujas en el medio y desdoblamiento del medio y desplazamiento del medio.	Fermentación de glucosa y lactosa. Producción de CO_2 (aerogénico).
Medio MIO	Crecimiento en la picadura.	Negativo a movilidad, no posee flagelos y pili.
Oxidasa	Sin cambio de color en la tira.	Presencia de citocromooxidasa.
Catalasa	Formación de burbujas.	Presencia de enzima catalasa, bacterias aerobias y anaerobias facultativas, a excepción de *Streptococcus*.

Las cuatro cepas bacterianas aisladas se sometieron a las pruebas en medios de cultivo y pruebas bioquímicas, de las que los resultados de observación fueron los mismos para las cuatro cepas, por lo que se concluye que se trata de la misma cepa bacteriana.

3.5.2. Identificación de cepa bacteriana aislada por prueba PCR.

A través del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de México unidad Iztapalapa del Estado de México se realizó la identificación de la cepa bacteriana aislada por prueba PCR.

La cepa bacteriana se sometió a una extracción de ADN, a la que posteriormente se le realizó una amplificación y purificación. Las muestras purificadas se mandaron a secuenciar, un equipo secuenciador de ADN desplegó un cromatograma de la muestra, en el que los pares de bases fueron acoplados de acuerdo con la secuenciación en forward y reverse. Estos resultados del acoplamiento de pares de bases fueron comparados con una base de datos del programa BLASTN en la que se toman como criterios el porcentaje de identidad y el porcentaje de cobertura, que mayores al 90 % (Al-Marri et al., 2023) pueden asegurar la identificación de la muestra. La muestra obtuvo 99.51 % de identidad y 100 % de cobertura. La cepa fue identificada como ***Klebsiella pneumoniae* MS14393**.

3.6. Pruebas de degradación de diclofenaco por cepa bacteriana *Klebsiella pneumoniae* MS14393.

3.6.1. Medición de la densidad óptica a concentraciones de 1 280, 500, 100 y 10 mg/L de diclofenaco.

En un equipo espectrofotométrico UV-Vis Thermo Scientific Evolution Array a una longitud de onda de 600 nm la densidad óptica de las muestras fue medida, registrando al menos tres mediciones por tubo.

En la concentración de 1 280 mg/L después de la incubación, se utilizó el par de tubos de cada día de medición durante el transcurso del tiempo de experimentación en intervalos de 24 horas. Los resultados para la concentración de 1 280 mg/L se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Densidad óptica de crecimiento bacteriano en solución 1 280 mg/L DCF.

Tiempo	Muestras de solución DCF inoculada (ABS)			Muestras de solución DCF inoculada + glucosa (ABS)		
	Blanco	Promedio Solución DCF	Desviación estándar	Blanco	Promedio Solución DCF	Desviación estándar
0 h	0.0100	0.0054	0.00210	0.0190	0.0285	0.00197
24 h	0.0097	0.0217	0.00367	----	1.2256	0.01148
48 h	0.0103	0.1069	0.03836	----	1.1923	0.01885
72 h	0.0098	0.2419	0.03630	0.0154	1.0826	0.02747
96 h	0.0080	0.2334	0.05326	----	0.9629	0.00887
120 h	0.0078	0.3535	0.10766	----	1.1369	0.00479
144 h	0.0100	0.6038	0.03853	0.0166	1.3530	0.01470
168 h	0.0129	0.7367	0.07840	----	1.4525	0.01486
192 h	0.0119	0.3030	0.00301	----	2.0517	0.04910
216 h	---	---	---	----	1.2912	0.01565
240 h	---	---	---	0.0120	0.5828	0.00649

Se elaboró un gráfico con los promedios de absorbancia de la solución DCF inoculada y con glucosa mostrados en la Tabla 24. El gráfico puede observarse en la Figura 3.9.

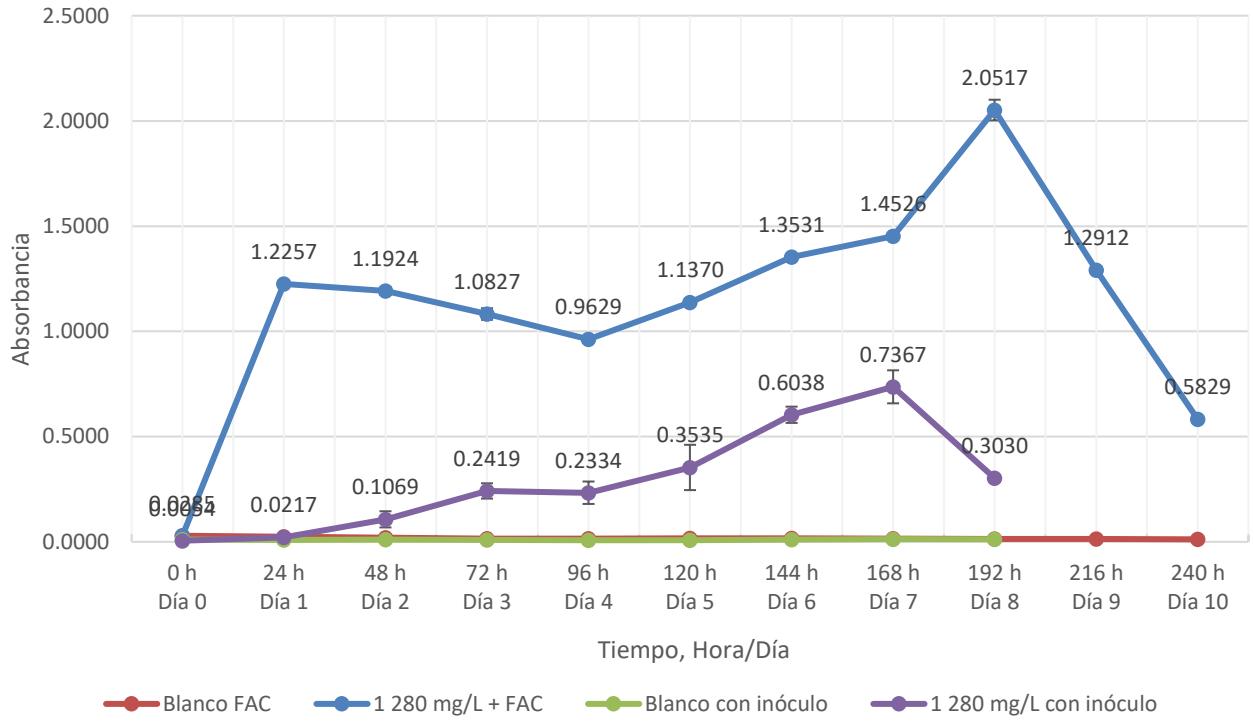


Figura 3.9. Densidad óptica en ensayos de biodegradación de 1 280 mg/L de DCF.

En el nivel de 1 280 mg/L (Fig. 3.9) se aprecia que el blanco se mantuvo sin incrementos en ambos experimentos puesto que no contiene inóculo. El experimento con sólo el inóculo de *Klebsiella pneumoniae* MS14393 muestra incrementos hasta el tiempo de 168 horas con 0.7367 ABS para después decrecer hasta las 192 horas a 0.3030 ABS. Para el experimento adicionado con glucosa, el primer punto de 24 horas muestra un aumento de absorbancia que se mantiene alrededor de 1.0 a 1.5 unidades de absorbancia hasta las 168 horas y alcanzando el punto más alto con 2.0517 obteniendo un decremento hasta las 240 horas con 0.5828 ABS.

Para la concentración de 500 mg/L, después de la incubación se utilizaron los tubos y una porción de la solución del frasco durante el transcurso del tiempo de experimentación en intervalos de 24 horas, los resultados se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Densidad óptica de crecimiento bacteriano en solución 500 mg/L DCF.

Tiempo	Muestras de solución DCF inoculada (ABS)			Muestras de solución DCF inoculada + glucosa (ABS)		
	Blanco	Promedio Solución DCF	Desviación estándar	Blanco	Promedio Solución DCF	Desviación estándar
0 h	0.0125	0.0125	0.00000	0.0177	0.0036	0.00036
24 h	----	0.0485	0.00054	----	0.2514	0.01443
48 h	----	0.0625	0.00602	----	0.2239	0.00398
72 h	----	0.1350	0.00109	----	0.2165	0.01307
96 h	----	0.3335	0.00054	----	0.2296	0.00951
120 h	0.0120	0.2402	0.08704	0.0124	0.2346	0.00678
144 h	----	0.0475	0.00116	----	0.2363	0.00372
168 h	----	0.0473	0.00714	----	0.2291	0.01454
192 h	----	0.0453	0.00602	----	0.2167	0.01464
216 h	----	0.0589	0.00484	----	0.2295	0.01519
240 h	0.0118	0.0844	0.00503	0.0111	0.2233	0.01600

En la Figura 3.10 se observa el gráfico de la densidad óptica en el nivel de 500 mg/L DCF con inóculo y con glucosa.

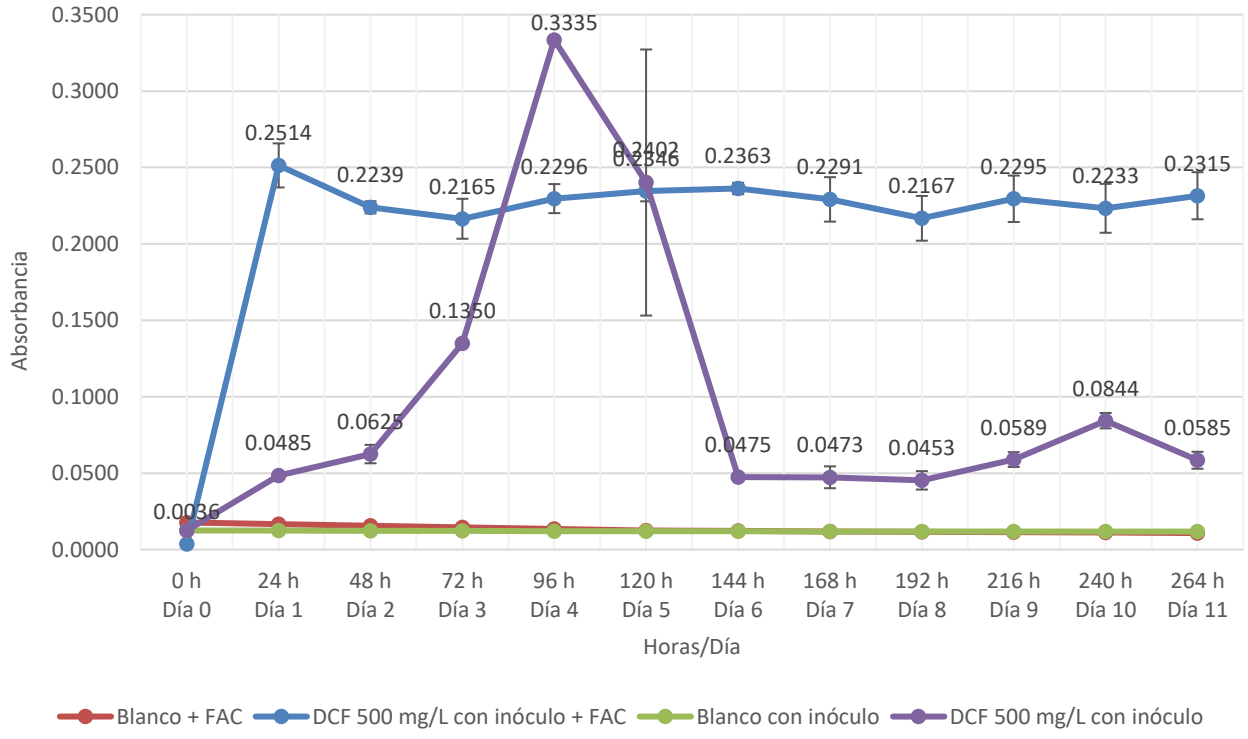


Figura 3.10. Densidad óptica en ensayos de biodegradación de 500 mg/L DCF.

El blanco para ambos experimentos no muestra incrementos en la absorbancia puesto que no contienen inóculo (Fig. 3.10). La densidad óptica para la prueba sólo con inóculo es creciente hasta las 96 horas (0.3335 ABS) para después decrecer en las 144 horas (0.0475 ABS) y mantenerse en bajas lecturas hasta las 240 horas. En la prueba con glucosa se obtuvo un incremento desde las 24 horas con 0.2514 ABS, y manteniéndose alrededor de este valor hasta las 240 horas con 0.2315.

Las mediciones de densidad óptica para la concentración de 100 mg/L se presentan en la Tabla 26 para ambas pruebas, con inóculo y adición de glucosa.

Tabla 26. Densidad óptica de crecimiento bacteriano en solución de DCF a 100 mg/L.

Tiempo	Muestras de solución DCF inoculada (ABS)			Muestras de solución DCF inoculada + glucosa (ABS)		
	Blanco	Promedio Solución DCF	Desviación estándar	Blanco	Promedio Solución DCF	Desviación estándar
0 h	0.0110	0.0135	0.00000	0.0099	0.0104	0.00005
24 h	---	0.0340	0.00000	---	0.2525	0.00814
48 h	---	0.0503	0.00301	---	0.2757	0.00755
72 h	---	0.0468	0.00635	---	0.2609	0.01868
96 h	---	0.0512	0.00422	---	0.2397	0.00406
120 h	0.0083	0.0505	0.00750	0.0051	0.2339	0.00599
144 h	---	0.0341	0.00194	---	0.1927	0.00293
168 h	---	0.0314	0.00225	---	0.2336	0.00484
192 h	---	0.0354	0.00216	---	0.2310	0.00490
216 h	---	0.0430	0.00258	---	0.2270	0.00403
240 h	0.0102	0.0784	0.00319	0.0094	0.2128	0.00367

En la Figura 3.11 se observa el gráfico de la densidad óptica en el nivel de 100 mg/L DCF con inóculo y con glucosa.

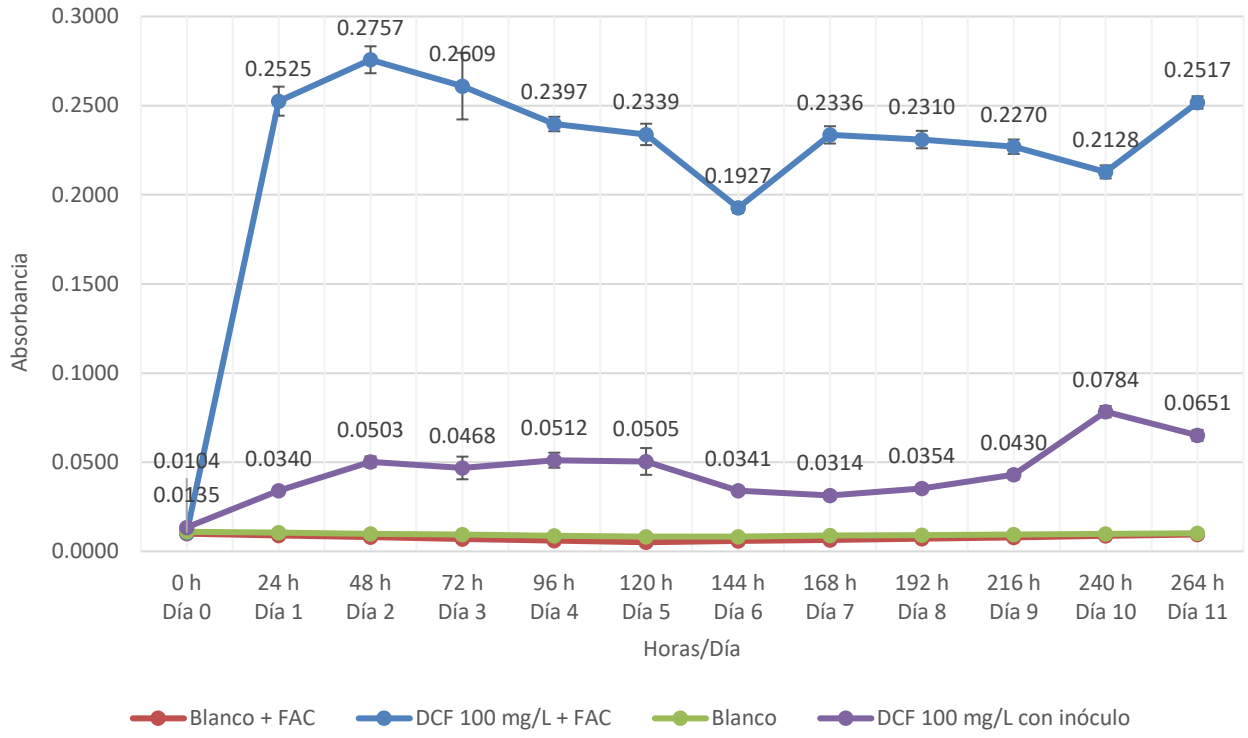


Figura 3.11. Densidad óptica en ensayos de biodegradación de 100 mg/L DCF.

Los valores de densidad óptica para la concentración de 100 mg/L DCF mostrados en el gráfico (Fig. 3.11) indican que el blanco no presentó cambios en la absorbancia debido a que no contiene inóculo. Mientras que la prueba con inóculo presenta incrementos bajos de absorbancia, variando de entre 0.0340 y 0.0651 ABS. En el caso de la prueba con glucosa, a partir de las 24 horas hay un aumento considerable de 0.2525 unidades de absorbancia y manteniéndose alrededor de este valor hasta las 240 horas con 0.2517 ABS. El aumento de absorbancia es indicación del crecimiento bacteriano.

Por último, la menor concentración evaluada para este experimento fue de 10 mg/L, en la cual se realizó la medición de la densidad óptica por medio de la absorbancia, cada 24 horas en un período de 0 y hasta 240 horas. Los resultados de esta medición se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27. Densidad óptica de crecimiento bacteriano en solución 10 mg/L DCF.

Tiempo	Muestras de solución DCF inoculada (ABS)			Muestras de solución DCF inoculada + glucosa (ABS)		
	Blanco	Promedio Solución DCF	Desviación estándar	Blanco	Promedio Solución DCF	Desviación estándar
0 h	0.0075	0.0098	0.00000	0.0051	0.0122	0.00021
24 h	----	0.0120	0.00000	----	0.2320	0.00253
48 h	----	0.0168	0.00136	----	0.2047	0.00108
72 h	----	0.0186	0.00388	----	0.1991	0.00238
96 h	----	0.0385	0.01095	----	0.2175	0.00257
120 h	0.0080	0.0246	0.00372	0.0042	0.2104	0.00211
144 h	----	0.0247	0.00476	----	0.2193	0.00331
168 h	----	0.0202	0.00361	----	0.2191	0.00550
192 h	----	0.0253	0.00292	----	0.2129	0.00560
216 h	----	0.0318	0.00294	----	0.2357	0.00514
240 h	0.0083	0.0299	0.00236	0.0063	0.2130	0.00637

Los resultados de absorbancia de ambas pruebas, con inóculo y glucosa en el nivel de 10 mg/L se ven reflejados en el gráfico de la Figura 3.12.

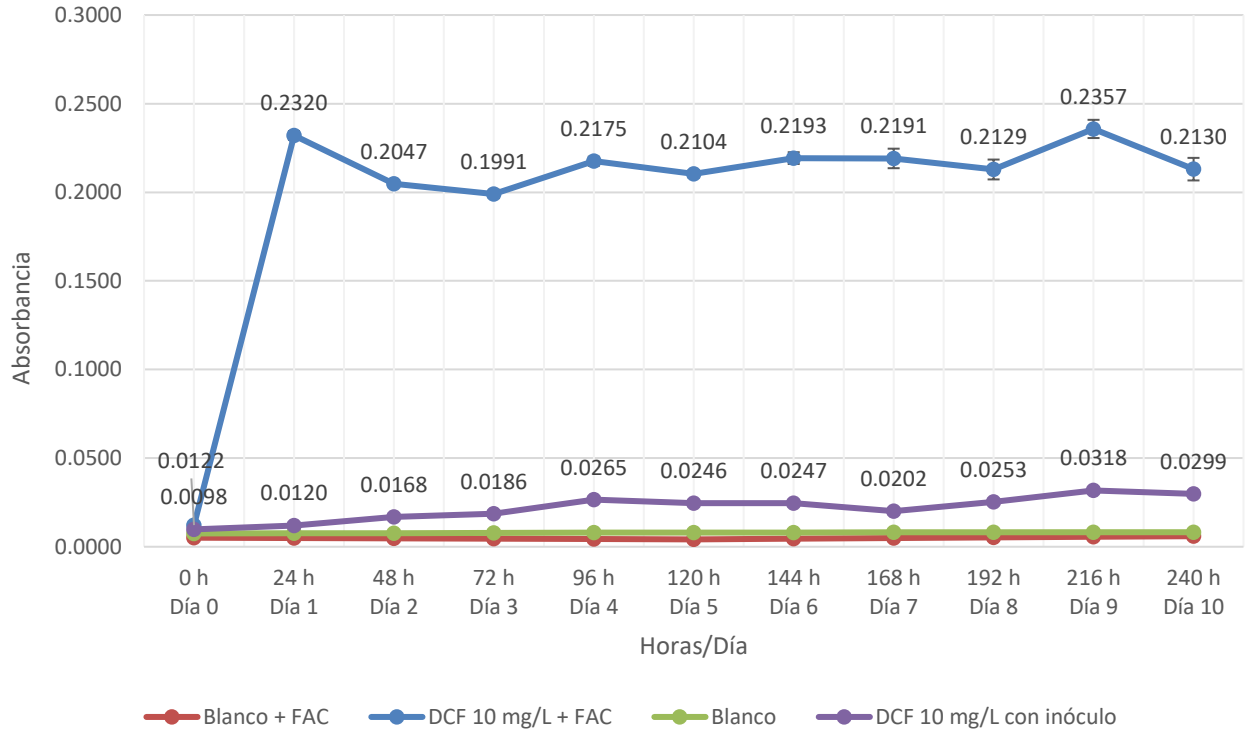


Figura 3.12. Densidad óptica en ensayos de biodegradación de 10 mg/L DCF.

En el gráfico de la densidad óptica para la solución de 10 mg/L DCF (Fig. 3.12) se presenta un aumento en la absorbancia al transcurrir los días para a prueba con inóculo, sin embargo, son valores muy bajos, siendo 0.0318 ABS el valor más alto. La prueba con glucosa tiene un aumento desde las 24 horas, de 0.2320 ABS y se mantiene alrededor de este valor hasta las 240 horas, 0.2130 ABS. Los valores de absorbancia para el blanco en ambas pruebas no cambiaron en esta concentración de estudio.

3.6.2. Evaluación de la degradación de DCF por exposición a cepa bacteriana aislada y fuente adicional de carbono.

Se elaboró una curva de calibración de diclofenaco en un intervalo de 0.1 a 20 mg/L, contando con un total de nueve estándares: 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 20.0 mg/L DCF respectivamente. La longitud de onda empleada fue de 275 nm. La curva de calibración se muestra en la Figura 3.23.

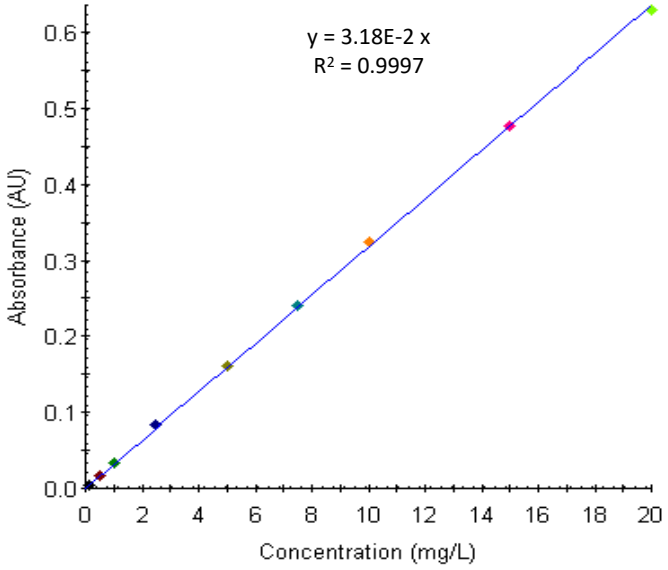


Figura 3.13. Curva de calibración de DCF en intervalo de 0.10 a 20 mg/L.

La ecuación de la recta (Fig. 3.13) fue *y = 3.18E-2 x*, y coeficiente de determinación R^2 de 0.9997. Un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Evolution Array se utilizó para esta determinación. Una vez medida la densidad óptica de las soluciones a los diferentes tiempos de monitoreo, se requirió clarificar cada una de las soluciones contenidas en los tubos. Se comenzó con centrifugación a 5 000 rpm por 5 minutos en un equipo centrifugador OHAUS Frontier 5714, seguido de una filtración por membrana de 0.45 µm (Millipore MCE Membrane) y seguido de filtración de 0.22 µm

(LUREZEN PRO2003003). Las muestras filtradas se llevaron a diferentes diluciones a 10 mL con agua ultrapura, esto dependiendo del nivel de concentración de estudio. El % de degradación se obtuvo dividiendo la concentración experimental de cada día entre la concentración inicial experimental en el tiempo 0 h y multiplicando por 100, el producto representa el diclofenaco residual en la muestra en ese día expresado en %. Para conocer el porcentaje de degradación, se resta ese producto al valor numérico de 100. La expresión es la siguiente:

$$\% \text{ Degradación} = 100 - \left(\frac{\text{concentración experimental por día en mg/L}}{\text{concentración experimiental inical en mg/L}} \right) \text{x } 100$$

Los resultados por exposición con inóculo y glucosa a concentración de 1 280 mg/L DCF se muestra en la Tabla 28, previamente se realizó dilución en el orden de un factor de dilución de 100 en 10 mL.

Tabla 28. Prueba de degradación de DCF a 1 280 mg/L por *Klebsiella pneumoniae* MS14393 y glucosa.

Tipo de prueba	Día	Tiempo	Concentración de DCF, en mg/L				**% Degradación**
			Blanco	Desviación estándar	Solución DCF inoculada	Desviación estándar	
Exposición a cepa bacteriana aislada	0	0 h	1 393.5	5.5427	**1 379.05**	8.4932	**0.00**
	1	24 h	1 355.5	12.3040	1 293.23	46.4741	**6.22**
	2	48 h	1 350.3	3.0203	1 003.05	4.7181	**27.26**
	3	72 h	1 329.6	3.1692	906.30	20.1523	**34.28**
	5	120 h	1 330.7	2.2135	708.85	45.7422	**48.59**
	6	144 h	1 340.1	4.5813	727.73	47.3768	**47.22**
	7	168 h	1 307.1	2.7264	556.25	69.6571	**59.66**
	8	192 h	1 312.3	3.4140	163.25	7.6700	**88.16**
Fuente adicional de carbono e inóculo	0	0 h	1 327.7	4.19126	**1 320.95**	19.3811	**0**
	1	24 h	----	----	550.30	53.7421	**58.34**
	2	48 h	----	----	68.20	3.1880	**94.84**
	3	72 h	1 327.1	4.12176	71.77	3.3353	**94.57**
	4	96 h	----	----	74.11	0.4266	**94.39**
	5	120 h	----	----	82.51	42.8153	**93.75**
	6	144 h	1 360.4	3.13404	39.69	3.9381	**97.00**
	7	168 h	----	----	39.81	8.4933	**96.99**
	8	192 h	----	----	33.37	5.1029	**97.47**
	9	216 h	----	----	164.41	1.4865	**87.55**
	10	240 h	1 355.2	2.97396	33.17	3.6582	**97.49**

El valor experimental inicial para ambas pruebas es el valor de mg/L DCF medido a las 0 horas. Los resultados de la Tabla 28 se muestran en el gráfico de la Figura 3.14.

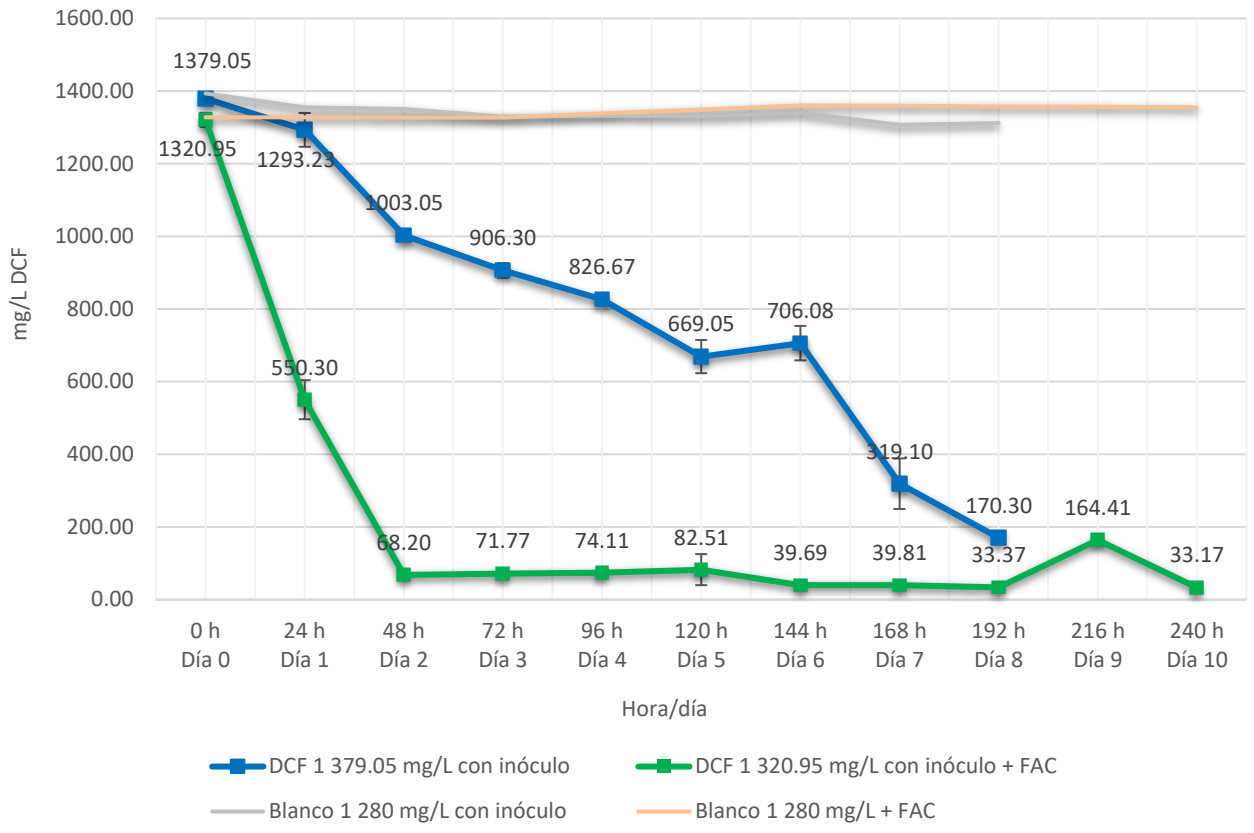


Figura 3.14. Prueba de degradación en concentración de 1 280 mg/L DCF.

La prueba con inóculo comenzó con una concentración experimental inicial de 1 379.05 ± 8.49 mg/L a las 0 horas y obteniendo a las 192 horas una concentración de 163.25 ± 7.67 mg/L. En la prueba con glucosa la concentración experimental inicial fue de 1 320.95 mg/L DCF que obtuvo un considerable decremento a partir de las 24 horas con 550.30 ± 53.74 mg/L y terminando a las 240 horas con 33.17 ± 3.65 mg/L DCF. En cuanto al porcentaje de degradación, los resultados se muestran en la Figura 3.15.

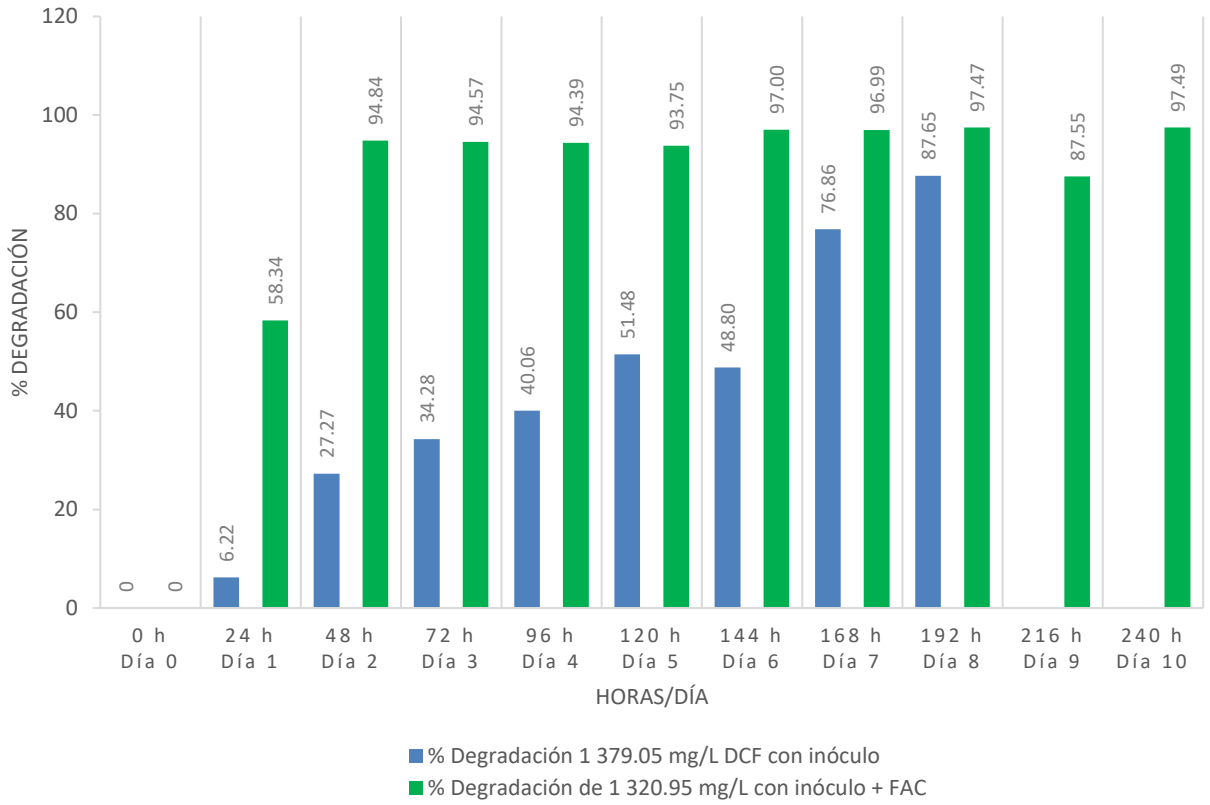


Figura 3.15. Porcentaje de degradación en concentración de 1 280 mg/L DCF.

Los porcentajes de degradación mostrados en la Figura 3.15 indican que la cepa bacteriana *Klebsiella pneumoniae* MS14393 es capaz de degradar el DCF a un tiempo de 192 horas, a este tiempo se alcanzó un 88.16 % de degradación, el cual corresponde al valor de 163.25 mg/L. En la prueba con glucosa se puede apreciar que a las 24 horas hay una disminución del 58.34 % de la concentración inicial de 1 320.95 mg/L, a las 48 horas alcanza 94.84 % con 68.20 mg/L y finalmente a las 240 horas con 97.49 % de degradación, este último equivalente a 33.17 mg/L de DCF residual.

Para la concentración de 500 mg/L DCF, las muestras filtradas se prepararon de acuerdo con un factor de dilución de 50 a un volumen de 10 mL con agua ultrapura. Los resultados para esta concentración de estudio se presentan en la Tabla 29.

Tabla 29. Prueba de degradación de DCF a 500 mg/L por *Klebsiella pneumoniae* MS14393 y glucosa.

Tipo de prueba	Día	Tiempo	Concentración de DCF, en mg/L				**% Degradación**
			Blanco	Desviación estándar	Solución DCF inoculada	Desviación estándar	
Exposición a cepa bacteriana aislada	0	0 h	518.2	1.11056	550.20	1.15166	**0**
	1	24 h	----	----	550.38	7.19809	**0.03**
	2	48 h	----	----	286.40	23.19176	**47.95**
	3	72 h	----	----	220.18	23.22956	**59.98**
	4	96 h	----	----	139.01	29.93951	**74.73**
	5	120 h	513.0	1.02740	118.45	8.31280	**78.47**
	6	144 h	----	----	106.60	2.04296	**80.63**
	7	168 h	----	----	102.48	19.66193	**81.37**
	8	192 h	----	----	112.35	24.64170	**79.58**
	9	216 h	----	----	73.80	27.16538	**86.59**
	10	240 h	----	----	66.23	6.78907	**87.96**
	11	264 h	550.0	1.03950	47.08	8.84706	**91.44**
Fuente adicional de carbono e inóculo	0	0 h	465.85	2.27364	537.80	0.76777	**0**
	1	24 h	----	----	23.93	1.11538	**95.55**
	2	48 h	----	----	32.63	4.41253	**93.93**
	3	72 h	----	----	30.38	2.32195	**94.35**
	4	96 h	----	----	27.50	0.88852	**94.89**
	5	120 h	475.45	1.09163	28.55	0.94451	**94.69**
	6	144 h	----	----	27.78	2.00968	**94.84**
	7	168 h	----	----	30.83	1.21693	**94.27**
	8	192 h	----	----	35.40	0.80459	**93.42**
	9	216 h	----	----	32.90	1.20961	**93.88**
	10	240 h	----	----	33.53	1.48213	**93.77**
	11	264 h	465.00	1.15470	31.85	2.44465	**94.08**

El valor experimental inicial es el valor de mg/L DCF medido a las 0 horas. Para el experimento de inóculo, el valor experimental inicial corresponde a 550.20 mg/L DCF; y para el experimento con glucosa, el valor experimental inicial es 537.80 mg/L DCF. La obtención de estas lecturas se realizó mediante una curva de calibración con ecuación de la recta de $y = 3.32E\text{-}02\ x$ y $R^2 = 0.9990$. Los resultados de la Tabla 29 se muestran en el gráfico de la Figura 3.16.

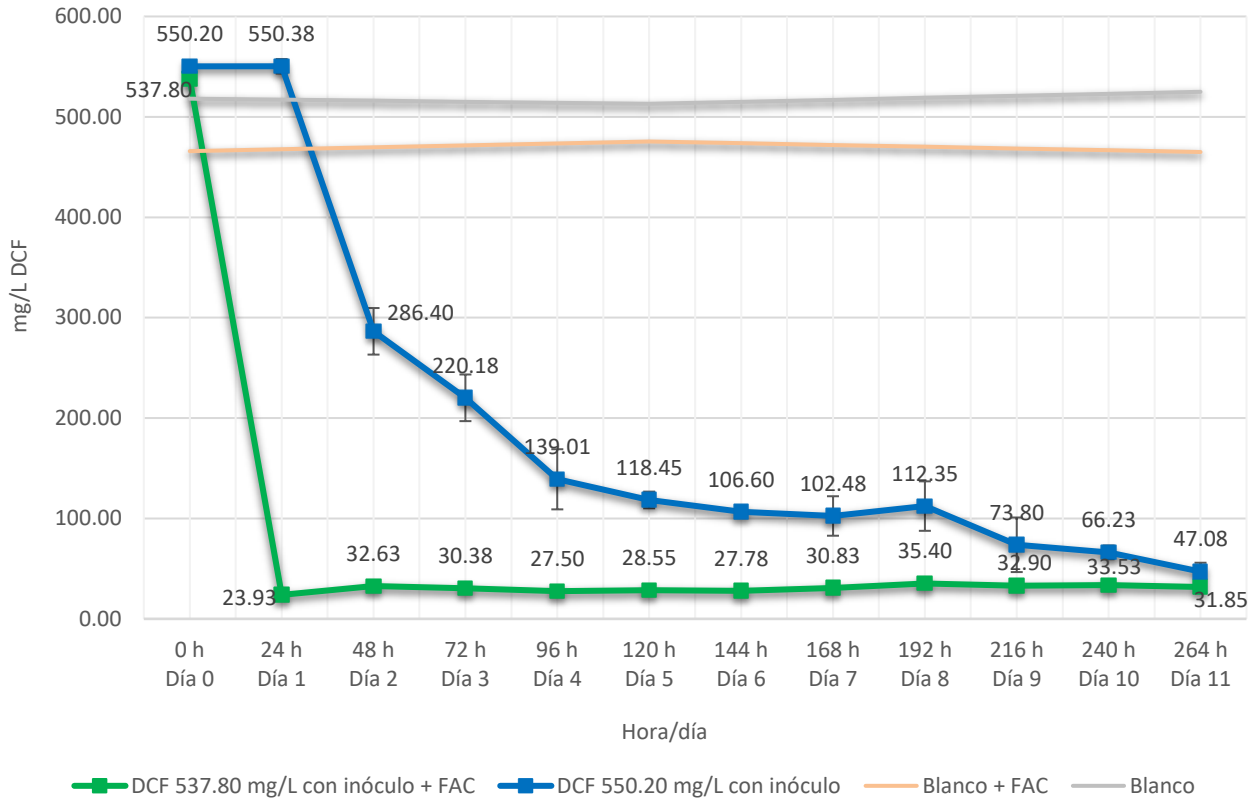


Figura 3.16. Prueba de degradación en concentración de 500 mg/L DCF.

La prueba con inóculo comenzó con una concentración experimental inicial de 550.20 ± 1.15 mg/L a las 0 horas, obteniendo a las 48 horas el primer decremento a 286.40 ± 23.19 mg/L, terminando a las 264 horas con 47.08 ± 8.84 mg/L. En la prueba con glucosa la concentración experimental inicial fue de 537.80 ± 0.77 mg/L DCF que obtuvo un considerable decremento a partir de las 24 horas con 23.93 ± 1.11 mg/L y terminando a las 264 horas con 31.85 ± 2.44 mg/L DCF. En cuanto al porcentaje de degradación, los resultados se muestran en la Figura 3.17.

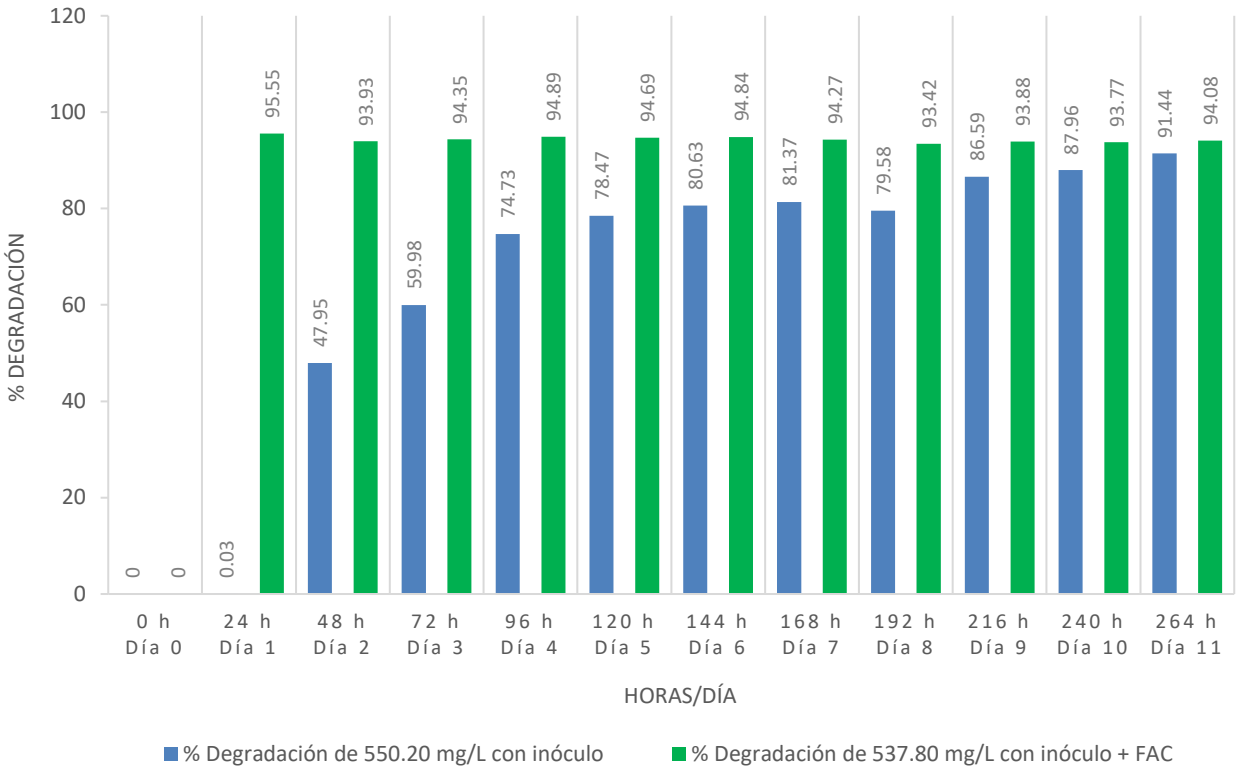


Figura 3.17. Porcentaje de degradación en concentración de 500 mg/L DCF.

Como se observa en la Figura 3.17, la mejor degradación se llevó a cabo en un tiempo de 264 horas, partiendo de una concentración experimental inicial de 550.20 mg/L de la cual se llegó a una concentración final de 47.08 mg/L, equivalentes a 91.44 % de degradación. En la prueba con glucosa partiendo de una concentración experimental de 537.80 mg/L, la degradación tuvo lugar desde las primeras 24 horas con un 95.55 % (23.93 mg/L) de degradación, 93.93 % (32.63 mg/L) de degradación a las 48 horas y al término de 264 horas se obtuvo un 94.08 % (31.85 mg/L). La cepa bacteriana aislada junto con la glucosa a este nivel de concentración logró mejores porcentajes de degradación.

A su vez, la prueba de concentración de 100 mg/L que después de medir la densidad óptica y ser filtrada, se diluyó de acuerdo con un factor de 10 a un volumen de 10 mL empleando agua ultrapura, lo anterior para determinar la cantidad de diclofenaco en mg/L posterior a la exposición de la cepa bacteriana aislada y glucosa. Los resultados se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30. Prueba de degradación de DCF a 100 mg/L por *Klebsiella pneumoniae* MS14393 y glucosa.

Tipo de prueba	Día	Tiempo	Concentración de DCF, en mg/L				**% Degradación**
			Blanco	Desviación estándar	Solución DCF inoculada	Desviación estándar	
Exposición a cepa bacteriana aislada	0	0 h	107.1	0.31623	103.60	0.50262	**0**
	1	24 h	----	----	100.42	2.10728	**3.07**
	2	48 h	----	----	103.00	0.97333	**0.58**
	3	72 h	----	----	103.35	1.56525	**0.24**
	4	96 h	----	----	103.45	0.51042	**0.14**
	5	120 h	106.9	0.31623	101.35	1.95703	**2.18**
	6	144 h	----	----	104.80	0.89443	**-1.16**
	7	168 h	----	----	106.45	1.31689	**-2.75**
	8	192 h	----	----	105.45	2.79991	**-1.79**
	9	216 h	----	----	107.40	1.27321	**-3.67**
	10	240 h	----	----	103.40	1.31389	**0.19**
	11	264 h	107.4	0.51640	105.90	3.66922	**-2.22**
Fuente adicional de carbono e inóculo	0	0 h	95.74	0.18974	103.77	0.35851	**0**
	1	24 h	----	----	11.12	0.32541	**89.28**
	2	48 h	----	----	11.02	0.46634	**89.38**
	3	72 h	----	----	11.45	0.42237	**88.97**
	4	96 h	----	----	11.17	0.27357	**89.24**
	5	120 h	98.78	0.43410	10.64	0.42846	**89.75**
	6	144 h	----	----	9.66	0.28557	**90.70**
	7	168 h	----	----	11.63	1.78646	**88.80**
	8	192 h	----	----	11.68	0.82773	**88.75**
	9	216 h	----	----	10.38	0.20926	**90.00**
	10	240 h	----	----	11.09	0.18890	**89.31**
	11	264 h	95.41	0.36953	11.52	0.90181	**88.90**

A este nivel de concentración teórica de 100 mg/L (Tabla 30), el blanco no tuvo cambios considerables para ambos estudios. En el caso de la prueba de 100 mg/L DCF con inóculo no se aprecia decremento en la concentración, teniendo en promedio 104.05 ± 2.64 mg/L DCF. Fue empleada una curva de calibración con ecuación de la recta $y = 0.0322x + 0.006$ y $R^2 = 0.9998$. Para la prueba con glucosa se obtuvo una concentración experimental inicial de 103.77 mg/L se presentó

una evidente disminución a partir de las primeras 24 horas. En la Figura 3.35 se muestra un gráfico del comportamiento de estas dos pruebas.

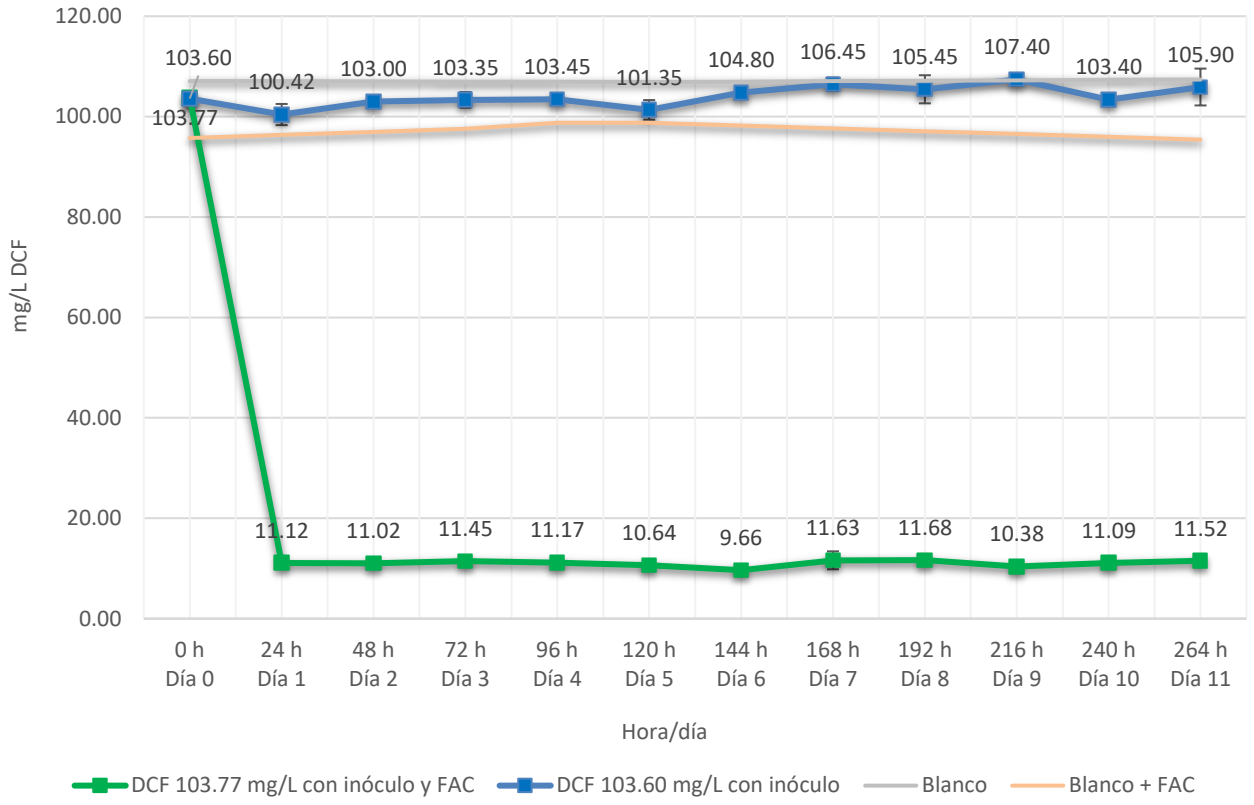


Figura 3.18. Prueba de degradación en concentración de 100 mg/L DCF.

En el gráfico de la Figura 3.18 se puede apreciar que el blanco se mantuvo sin cambios como se describió antes para ambas pruebas. La concentración experimental inicial en la prueba sólo con inóculo fue de 103.60 ± 0.50 mg/L DCF y la cual no se obtuvieron cambios, siendo que a las 264 horas resultó una concentración de 105.90 ± 3.66 mg/L DCF, la concentración promedio cuantificada en este nivel de estudio fue de 104.25 ± 2.04 mg/L y coeficiente de variación de 1.96 %. En la prueba con glucosa el blanco no tuvo cambios, ya que resultó en promedio de 96.64 ± 1.85 mg/L y coeficiente de variación de 1.92 %; se obtuvo una concentración experimental inicial de 103.77 ± 0.36 mg/L de DCF, de la que a partir de las primeras 24 horas la concentración resultó en 11.12 ± 0.32 mg/L, manteniéndose este valor hasta las 264 horas con 11.52 ± 0.90 mg/L. En la Figura 3.19 se muestra un gráfico del porcentaje de degradación.

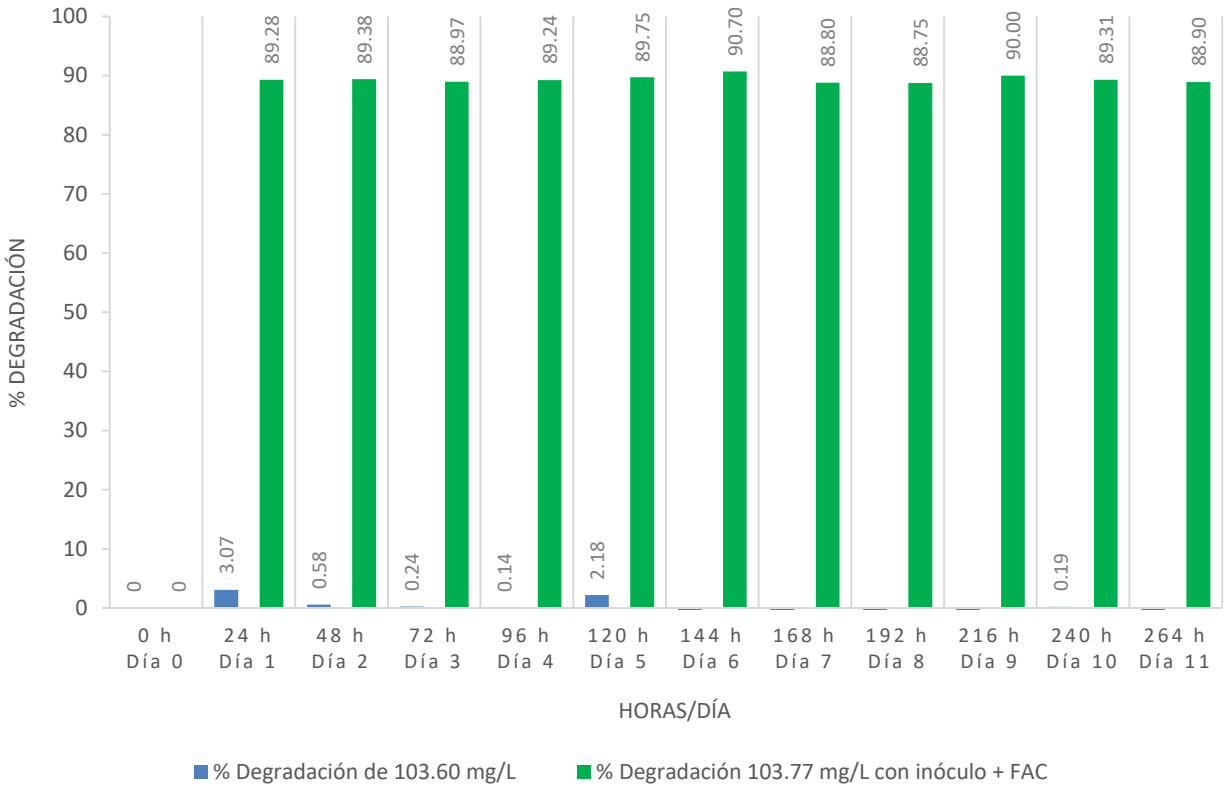


Figura 3.19. Porcentaje de degradación en concentración de 100 mg/L DCF.

El porcentaje de degradación (Fig. 3.19) para la prueba con inóculo de concentración experimental inicial de 103.60 mg/L muestra que no hubo degradación, ya que los porcentajes determinados son cercanos al 0 % para todos los tiempos de prueba. Los porcentajes de degradación en la prueba con glucosa indican que hubo un decremento a partir de las 24 horas, obteniendo una concentración de 11.12 mg/L equivalente a 89.28 % de degradación y a las 264 horas una concentración de 11.52 mg/L equivalente a 88.90 % de degradación, estos valores en relación con la concentración experimental inicial de 103.77 mg/L.

Como últimos experimentos se estudió un nivel de concentración de 10 mg/L DCF, con inóculo y glucosa respectivamente, que después de realizar la medición de la densidad óptica y ser filtrada, se obtuvieron los valores en mg/L DCF, así como para el blanco. Una curva de calibración con ecuación de la recta $y = 0.0324x + 0.003$ y $R^2 = 0.9999$ fue empleada para esta determinación. Los valores se encuentran indicados en la Tabla 31.

Tabla 31. Prueba de degradación de DCF a 10 mg/L por *Klebsiella pneumoniae* MS14393 y glucosa.

Tipo de prueba	Día	Tiempo	Concentración de DCF, en mg/L				**% Degradación**
			Blanco	Desviación estándar	Solución DCF inoculada	Desviación estándar	
Exposición a cepa bacteriana aislada	0	0 h	12.2	0.06667	13.11	0.05671	**0**
	1	24 h	----	----	12.96	0.05073	**1.18**
	2	48 h	----	----	12.70	0.16490	**3.17**
	3	72 h	----	----	12.66	0.29667	**3.47**
	4	96 h	----	----	12.65	0.06967	**3.51**
	5	120 h	12.35	0.05270	13.20	0.38624	**-0.65**
	6	144 h	----	----	12.99	0.22230	**0.95**
	7	168 h	----	----	13.10	0.47357	**0.11**
	8	192 h	----	----	13.52	0.04189	**-3.13**
	9	216 h	----	----	13.08	0.55314	**0.27**
	10	240 h	----	----	13.64	0.08307	**-4.00**
	11	264 h	11.79	0.05676	13.10	0.10260	**0.08**
Fuente adicional de carbono e inóculo	0	0 h	11.13	0.02708	10.65	0.02395	**0.0**
	1	24 h	----	----	9.79	0.06312	**8.1**
	2	48 h	----	----	11.09	0.43471	**-4.5**
	3	72 h	----	----	11.13	0.19995	**-4.5**
	4	96 h	----	----	10.75	0.35364	**-1.0**
	5	120 h	11.01	0.02869	11.08	0.56680	**-4.1**
	6	144 h	----	----	11.13	0.32833	**-4.6**
	7	168 h	----	----	11.18	0.23878	**-5.0**
	8	192 h	----	----	11.21	0.15508	**-5.3**
	9	216 h	----	----	11.36	0.03614	**-6.7**
	10	240 h	----	----	11.34	0.07501	**-6.5**
	11	264 h	10.87	0.03020	10.75	0.09164	**-1.0**

En la Tabla 31 se observa que en la prueba con inóculo la concentración experimental inicial fue de 13.11 ± 0.05 mg/L, el blanco en promedio de 12.11 ± 0.28 mg/L y % CV de 2.39. En la prueba con glucosa la concentración experimental inicial fue de 10.65 ± 0.02 mg/L, no se observan decrementos considerables a excepción de la medición a las 24 horas que resultó en 9.79 mg/L, valor que puede deberse a un error ya que los demás valores se mantienen alrededor de 10.65 mg/L y el blanco en

promedio de 11.00 ± 0.13 mg/L y 1.16 % CV. Para ejemplificar mejor este comportamiento se muestra un gráfico (Figura 3.20) de las concentraciones medidas en mg/L.

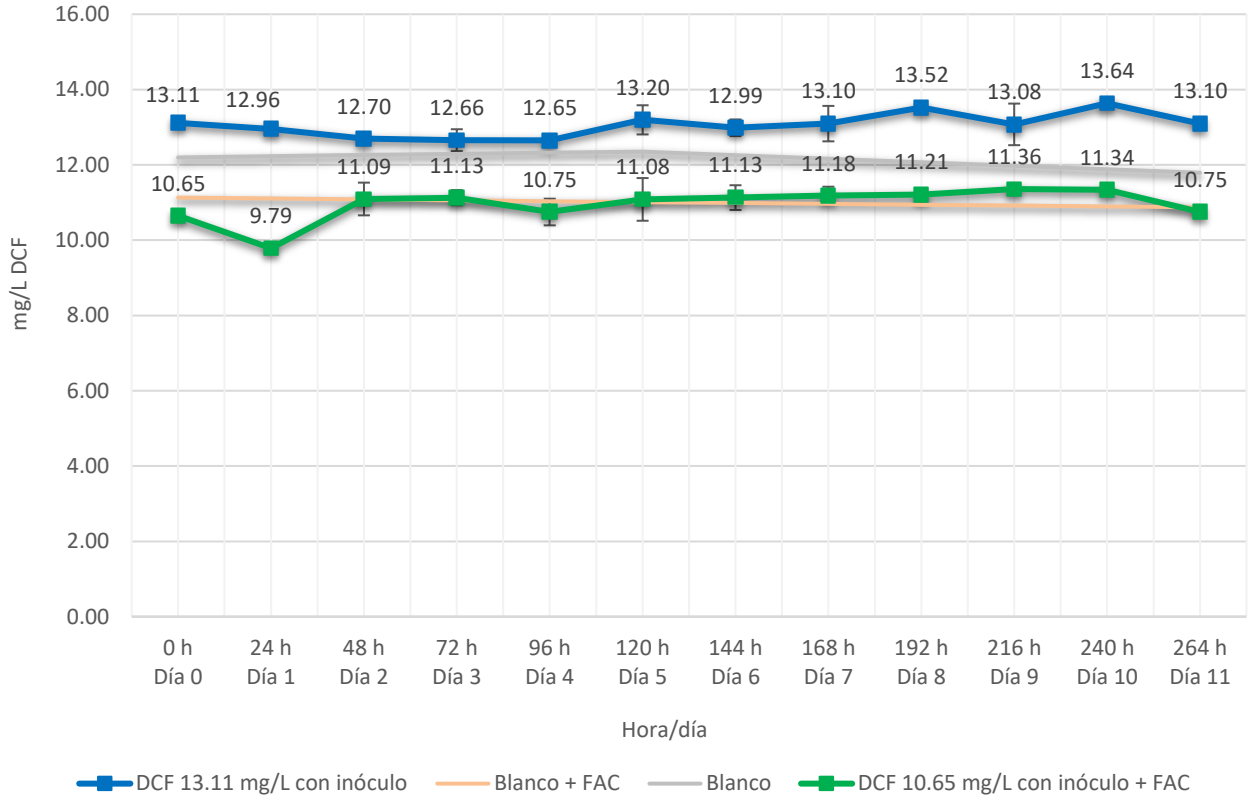


Figura 3.20. Prueba de degradación en concentración de 10 mg/L DCF.

Los resultados de las pruebas con inóculo y glucosa (Fig. 3.20), muestran que no hubo cambios considerables en las concentraciones estudiadas. La prueba con inóculo comenzó con un valor de 13.11 ± 0.05 mg/L, valor que terminó a las 264 horas con 13.10 ± 0.10 mg/L, permanece sin cambios. La prueba con glucosa de concentración experimental inicial de 10.65 ± 0.02 mg/L no presentó cambios en su concentración, la última medición a las 264 horas fue de 10.75 ± 0.09 mg/L, una diferencia de 0.10 mg/L entre la concentración inicial y la final. Estos resultados se encuentran expresados en porcentaje de degradación en la Figura 3.21.

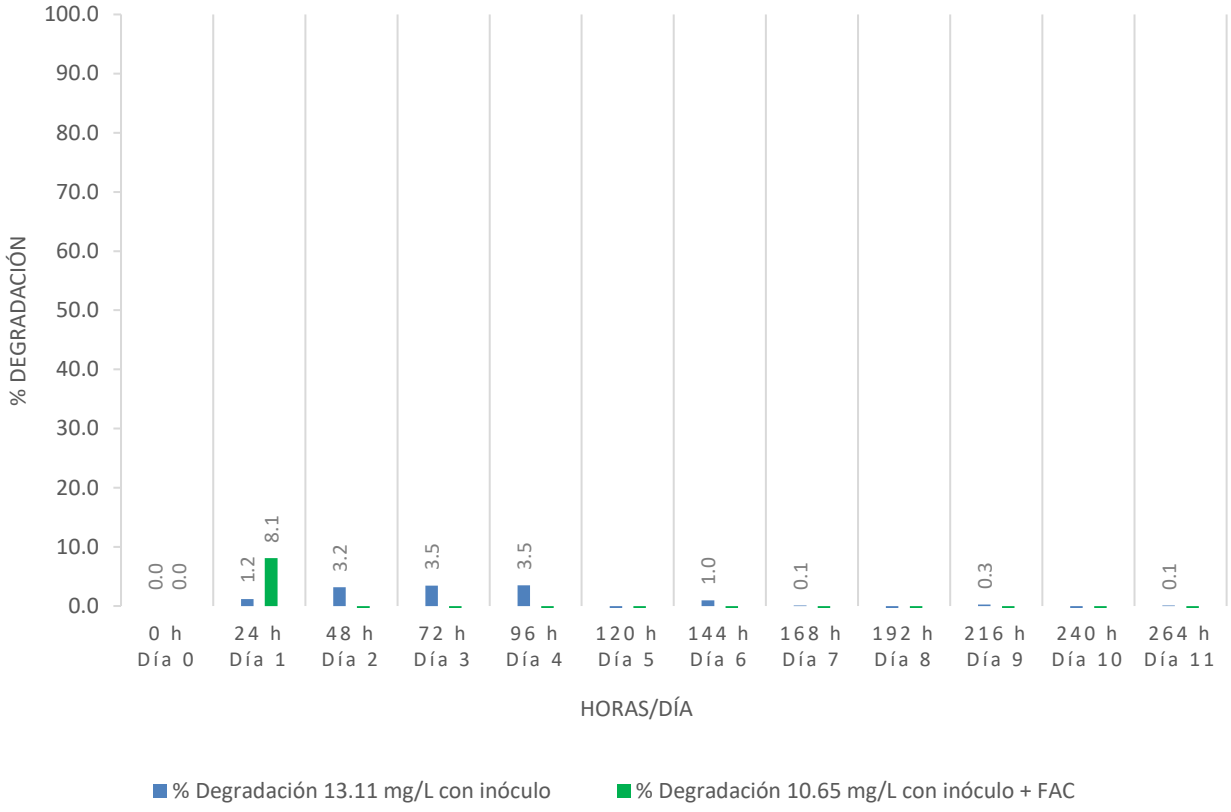


Figura 3.21. Porcentaje de degradación en concentración de 10 mg/L DCF.

De acuerdo con gráfico presentado en la Figura 3.21, los porcentajes de degradación fueron cercanos a 0 % al final de la prueba. El valor de 8.1 % corresponde a la prueba con glucosa, como se describió antes, este valor se atribuye a un error puesto que los siguientes valores son del 0 % de degradación.

A continuación, se muestra un resumen de los resultados de degradación (Tabla 48), un experimento por exposición a cepa bacteriana aislada sin fuente adicional de carbono y el segundo experimento por exposición a la cepa bacteriana aislada junto con fuente adicional de carbono. Ambos experimentos a los niveles de prueba de concentración de DCF.

Tabla 32. Comparativo de pruebas de degradación de DCF a cuatro niveles de concentración con inóculo e inóculo con fuente adicional de carbono.

Nivel de concentración teórica mg/L	Experimento 1			Experimento 2		
	Exposición a *Klebsiella pneumoniae* MS14393			Exposición a *Klebsiella pneumoniae* MS14393 y glucosa		
	Concentración experimental inicial	Concentración experimental final	**% Degradación**	Concentración experimental inicial	Concentración experimental final	**% Degradación**
1 280	1 379.05 ± 8.49 mg/L	163.25 ± 7.67 mg/L	**88.16**	1 320.95 ± 19.38 mg/L	33.17 ± 3.65 mg/L	**97.49**
500	550.20 ± 1.15 mg/L	47.08 ± 8.84 mg/L	**91.44**	537.80 ± 0.76 mg/L	31.85 ± 2.44 mg/L	**94.08**
100	103.60 ± 0.50 mg/L	105.90 ± 3.67 mg/L	**0.00**	103.77 ± 0.35 mg/L	11.52 ± 0.90 mg/L	**88.90**
10	13.11 ± 0.05 mg/L	13.10 ± 0.10 mg/L	**0.00**	10.65 ± 0.02 mg/L	10.75 ± 0.09 mg/L	**0.00**

Tal como se aprecia en la Tabla 32, la degradación por exposición únicamente por cepa bacteriana aislada *Klebsiella pneumoniae* MS14393 tiene lugar para los niveles de concentración teóricos de 1 280 mg/L y 500 mg/L, pero no a 100 mg/L y 10 mg/L. Mientras que la degradación con exposición a cepa bacteriana aislada *Klebsiella pneumoniae* MS14393 junto con fuente adicional de carbono tiene lugar en los niveles de 1 280, 500 y 100 mg/L respectivamente, pero no al nivel más bajo de 10 mg/L.

4. CONCLUSIONES.

La adecuabilidad del sistema se estableció con una fase móvil de Metanol-H_3PO_4 0.01% a una proporción de 65% metanol y 35% H_3PO_4 0.01% (65:35), con un volumen de inyección de 9 µL y un flujo de 0.25 mL/min, el tiempo de retención del pico de DCF de 3.23 minutos. Los criterios de factor de capacidad, factor de coleo y número de platos cumplen con los criterios establecidos de $k>2$, $t<2$ y $N>2000$ respectivamente. La repetibilidad es aceptable para cada nivel de concentración estudiada, cumpliendo con %CV menor al 2%. El parámetro de exactitud que se representa por el porcentaje de recuperación, %R, queda en un intervalo de 81.5 - 108.4 %, cumpliendo con el criterio de ±20%. En cuanto a la reproducibilidad, las variaciones son aceptables, es decir, no existe diferencia significativa en cada nivel de concentración. Los límites de detección teóricos son de 0.021 y 0.065 mg/L respectivamente. La confirmación del método para la cuantificación de DCF por UPLC indica que es confiable en las condiciones cromatográficas establecidas.

En cuento a la caracterización fisicoquímica del efluente hospitalario, los parámetros que superan el límite permisible son grasas y aceites, fósforo total, demanda química de oxígeno, sólidos suspendidos totales y nitrógeno total. Resultados esperados puesto que la toma de muestra se requería sin tratamiento previo.

Se aisló una cepa bacteriana de un efluente hospitalario de tercer nivel, con resistencia a 1 280 mg/L de diclofenaco. Por medio de cultivos en medios diferenciales y selectivos, así como pruebas enzimáticas y de tinción de Gram, se determinó que la cepa bacteriana aislada pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Mediante la prueba PCR ARNr16S se identificó como *Klebsiella pneumoniae* MS14393.

La degradación por exposición únicamente a la cepa bacteriana *Klebsiella pneumoniae* MS14393 tiene lugar en los niveles de concentración experimental de 1 379.05 ± 8.49 mg/L y 550.20 ± 1.15 mg/L. A 1 379.05 ± 19.38 mg/L la mayor degradación se obtuvo a las 192 horas alcanzando el 88.16 %. En el nivel de 550.20 ± 1.15 mg/L la degradación comenzó a las 48 horas con 47.95 % y finalmente a las 264 horas con el 91.44 %. A una concentración experimental de 103.60 mg/L no hubo degradación, puesto que terminó a las 264 horas con una concentración final de 105.90 mg/L, obteniendo para esta prueba y los distintos tiempos de monitoreo una concentración promedio de 104.05 ± 2.04 mg/L. Y al nivel de concentración inicial de 13.11 ± 0.05 mg/L se obtuvo una concentración final de 13.10 ± 0.10 mg/L, que a su vez a los diferentes tiempos de monitoreo se obtuvo un promedio de 13.06 ± 0.06 mg/L; por lo que tampoco hay degradación a esta concentración.

Para el experimento de degradación por la cepa bacteriana aislada *Klebsiella pneumoniae* MS14393 con glucosa como fuente adicional de carbono se probaron los mismos niveles de concentración teórica de diclofenaco que en el experimento anterior. A la concentración experimental de 1 320.95 mg/L la degradación tuvo lugar desde las primeras 24 horas con un 58.34 %, a las 48 horas se obtuvo un 94.84 %, valor que se mantuvo con un porcentaje de degradación a las 264 horas con 97.49 %. En la concentración experimental de 537.80 mg/L a las 24 horas de prueba se obtuvo un 95.5 % de degradación y, finalmente a las 264 horas un porcentaje de degradación del 94.08 %, con estos resultados la degradación se puede considerar desde las primeras 24 horas de prueba. En la prueba de 103.77 mg/L experimentales se obtuvo la degradación desde las 24 horas con un valor de 89.28 %, manteniéndose este valor hasta las 264 horas con un porcentaje final del 88.90 %, a este nivel de concentración se puede considerar la degradación a las 24 horas al igual que en el nivel de 537.80 mg/L. Al nivel de concentración experimental de 10.65 mg/L la degradación no se llevó a cabo, siendo que el valor inicial y final fueron de 10.65 ± 0.02 mg/L y 10.75 ± 0.09 mg/L respectivamente.

La cepa bacteriana aislada *Klebsiella pneumoniae* MS14393 tiene capacidad de degradación a niveles altos de diclofenaco de 1 280 mg/L y 500 mg/L y no a bajos niveles como 100 mg/L y 10 mg/L. En cambio, la exposición *Klebsiella pneumoniae* MS14393 en conjunto con fuente adicional de carbono como la glucosa, aumentan la capacidad de degradación desde las 24 horas y manteniéndose hasta las 264 horas para los niveles de 1 280 mg/L, 500 mg/L y 100 mg/L desde las primeras 24 horas, al contrario del nivel bajo de 10 mg/L en el que no hubo degradación.

Estudios realizados por Bessa et al., (2017), muestran que utilizando una cepa bacteriana identificada como Brevibacterium sp D4 degradó el 35 % de una concentración de 10 mg/L DCF, empleando una fuente adicional de carbono llegó a degradar el 90 % de esta concentración, en un tiempo de 30 días para ambos casos. Moreira et al., (2018), utilizó una bacteria de suelo Labrys portucalensis F11 para degradar concentraciones de diclofenaco de 0.54 mg/L (1.7 µM) y 10.81 mg/L (34 µM), biodegradando el 70 % de estas concentraciones únicamente por medio de la bacteria, y alcanzó el 100 % de degradación con acetato de sodio como fuente adicional de carbono, igualmente en un tiempo de 30 días. En 2019 Murshid y Dhakshinamoorthy sometieron a degradación una concentración de 150 mg/L de DCF utilizando un consorcio bacteriano (*Alcaligenes faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylacoccus haemolyticus* y *Proteus mirabilis*) alcanzando un 89 % de degradación en 120 horas. En este estudio, la cepa bacteriana *Klebsiella pneumoniae* MS14393 en comparación con las anteriores investigaciones de Bessa et al., (2017) y Moreira et al.,

(2018), no degradó la concentración de 10 mg/L aun contando con la glucosa como segunda fuente adicional de carbono, pero sí en la concentración de 100 mg/L con glucosa como fuente adicional de carbono, llegando a un 89.28 % a las 24 horas, que en comparación con Murshid y Dhakshinamoorthy (2019) que alcanzaron el 89 % en 120 horas para 150 mg/L, la degradación fue cinco veces más eficiente en tiempo.

Esta cepa bacteriana aislada de un efluente de agua residual de hospital, *Klebsiella pneumoniae* MS14393, puede utilizarse en aplicaciones biotecnológicas para la degradación de diclofenaco. Asimismo, esta cepa puede ser empleada en pruebas de degradación para productos farmacéuticos del grupo de sustancias antiinflamatorias no esteroidales.

5. REFERENCIAS.

Acuña, V., Ginebreda, A., Mor, J.R., Petrovic, M., Sabater, S., Sumpter, J., Barceló, D. (2015). Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environmental International*. 85, 327-333.

Al-Marri, S., Eldos, H.I., Ashfaq, M.Y., Saeed, S., Skariah, S., Varghese, L., Mohamoud, Y.A., Sultan, A.A., Raja, M.M. (2023). Isolation, identification, and screening of biosurfactant-producing and hydrocarbon-degrading bacteria from oil and gas industrial waste. *Biotechnology Reports*. 39, e00804.

aus der Beek, T., Weber, F.A., Bergman, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the Environment – Global Occurrences and Perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 35, 823-835.

Barceló y López. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes.

Barra Caracciolo, A., Topp, E., Grenni, P. (2015). Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. *Journal of Pharmaceutical and Biomdical Analysis.*106, 25-36.

Bartrons, M., Peñuelas, J. (2017). Pharmaceuticals and Personal-Care Products in Plants. *Trenda in Plant Science*. 22(3), 194-203.

Ben, S., Ben, R., Cimetiere, N., Leboulanger, C., Ben, H., Sayadi, S. (2019). Biodegradation of diclofenac by two green microalgae: *Picocystis* sp. and *Grasiella* sp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 186, 109769.

Bessa, V.S., Moreira, I.S., Tiritan, M.E., Castro, P.M.L. (2017). Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 120, 135-142.

Brock, Thomas D., Smith, David W., Madigan, Michael T. Microbiología. Cuarta edición. Prentice Hall. México. 1987.

Bu, Q., Shi, X., Yu, G., Huang, J., Wang, B. (2016). Assessing the persistence of pharmaceuticals in the aquatic environment: Challenges and needs. *Emerging contaminants*. 2, 145-147.

CANAFARMA. Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica. (2022).

Carballa, M., Fink, G., Omil, F., Lema, J.M., Ternes, T. (2008). Determination of the solid-water distribution coefficient (Kd) for pharmaceuticals, strogens and musk fragances in digested sludge. *Water Research*. 42, 287-295.

Ceresa, L., Guadagnini, A., Porta, G.M., Riva, Monica. (2021). Formulation and probabilistic assessment of reversible biodegradation pathway of Diclofenac in groundwater. *Water Research*. 204, 117466.

Challis, J.K., Hanson, M.L., Friesen, K.J., Wong, C.S. (2014). A critical assessment of the photodegradation of pharmaceuticals in aquatic environments: defining our current understanding and identifying knowledge gaps. *Environmental Science: Processes and impacts*. 16, 672.

Chen, L., Li, Y., Lin, L., Tian, X., Cui, H., Zhao, F. (2020). Degradation of diclofenac by *B. subtilis* through a cytochrome P450-dependent pathway. *Environmental Technology & Innovation*. 20, 101160.

Chong, S., Zhang, G., Zhang, N., Liu, Y., Huang, T., Chang, Huazhen. (2017). Diclofenac degradation in water by FeCeOx catalyzed H2O2: Influencing factors, mechanism and pathways. *Journal Hazardous Materials*. 334, 150-159.

Comber, S., Gardner, M., Sörme, P., Leverett, D., Ellor, B. (2018). Active pharmaceuticals ingredients entering the aquatic environment from wastewater treatment works: A cause for concern? *Science of the Total Environment*. 613-614, 538-547.

Di Lorenzo, T., Cifoni, M., Baratti, M., Pieraccini, G., Di Marzio, W.D., Galassi, D.M.P. (2021). Four scenarios of environmental risk of diclofenac in European groundwater ecosystems. *Environmental Pollution*. 287, 117315.

Du, J., Mei, C.F., Ying, G.G., Xu, M.Y. (2016). Toxicity thresholds for diclofenac, acetaminophen and ibuprofen in the water flea Daphnia magna. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 97(1), 84 -90.

Ericson, H., Thorsén, G., Kumblad, L. (2010). Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquatic Toxicology*. 99, 223-231.

Escapa, C., Torres, T., Neuparth, T., Coimbra, R.N., García, A.I., Santos, M.M., Otero, M. Zebrafish embryo bioassays for a comprehensive evaluation of microalgae efficiency in the removal of diclofenac from water. *Science of the Total Environment*. 640-641, 1024-1033.

EU, (2013). European Union Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as Regards Priority Substances in the Field of Water Policy.

Facey, S.J., Nebel, B.A., Konty, L., Allgaier, M., Hauer, B. (2018). Rapid and complete degradation of diclofenac by native soil microorganisms. *Environmental Technology and Innovation*. 10, 55-61.

Feito, R., Valcárcel, Y., Catalá, M. (2012) Biomarker assessment of toxicity with miniaturised bioassays: declofenac as a case study. *Ecotoxicology*. 21, 289–96.

Felice, B.D., Copia, L., Guida, M. (2012). Gene expression profiling in zebrafish embryos exposed to diclofenac, an environmental toxicant. *Molecular Biology Reports*. 39, 2119–2128.

Frédéric, O., Yves, P. (2014). Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. *Chemosphere*. 115, 31-39.

García-Rodríguez, A; Matamoros, V., Fontàs, C., Salvadó, V. (2014). The ability of biologically based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants-a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 21(20), 11708-11728.

Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., van der Ploeg, M., van de Zee, S., Ritsema, C.J. (2015). Emerging pullutants in the environment: A challenge for wáter resource management. *International Soil and Water Conservation Research*. 3 (2), 57-65.

Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. https://colegioqfb.org.mx. (accesed marzo 2022).

Gutiérrez, H., de la Vara, R. Análisis y diseño de experimentos. Tercera edición. Mc Graw Hill. 2012.

Huerta, B., Jakimska, A., Llorca, M., Ruhí, A., Margoutidis, G., Acuña, V., Sabater, S., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D. (2015). Development of an extraction and purification method for the determination of multi-class pharmaceuticals and endocrine disruptors in freshwater invertebrates. *Talanta*. 132, 373-381.

IWW Water Center, Department of Water Resources Managment (2014). Pharmaceuticals in the environment: Occurrence, effects, and options for action. Research project funded by the German Federal Environment Agency (UBA). https://www.umweltbundesamt.de/en/database-pharmaceutical-in-the-environment. (accesed 27 abril 2022).

Khan Academy. https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr. (accessed 12 noviembre 2023).

Kibuye, F.A., Gall, H.E., Elkin, K.R., Ayers, B., Veith, T.L., Miller, M., Jacob, S., Hayden, K.R., Watson, J.E., Elliott, H.A. (2019). Fate of pharmaceuticals in spray-irrigation system: From wastewater to groundwater. *Science of the Total Environment*. 654, 197-208.

Li, W.C. (2014). Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution*. 187, 193-201.

Liu, J.L., Wong, M.H. (2013). Pharmaceuticals and personal care products (PPCP): A review on environmental contamination in China. *Environment International*. 59, 208-224.

Lonappan, L., Kaur, S., Kumar, R., Verma, M., Surampalli, R.Y. (2016). Diclofenac and its transformation products: Environmental Occurrence and toxicity – A review. *Environment International*. 96, 127-138.

Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M., Stahl, D.A. Brock Biology of Microorganisms. Sixteenth edition. Pearson. United Kingdom. 2022.

Mansour, F., Al-Hindi, M., Saad, W., Salam, D. (2016). Environmental risk analysis and prioritization of pharmaceuticals in a developing world context. *Science of the Total Environment*. 557-558, 31-43.

Matejczyk, M., Ofman, P., Dabrowska, K., Swilocka, R., Lewandowski, W. (2020). Synergistic interaction of diclofenac and its metabolites with selected antibiotics and amygdalin in wastewaters. *Environmental Research*. 186, 109511.

Mizraee, S.A., Noorimotlagh, Z., Ahmadi, M., Rahim, F., Silva, S., Nourmohammadi, A., Jaafarzadeh, N. (2021). The posible oxidative stress and DNA damage induced in Diclofenac-exposed Non-target organisms in the aquatic environment: A systematic review. *Ecological indicators*. 131, 108172.

Moreira, Irina S., Bessa, V., Murgolo, S., Piccirillo, C., Mascolo, G., Castro, P. (2018). Biodegradation of Diclofenac by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 152, 104-113.

Murshid, S., Dhakshinamoorthy, G.P. (2019). Biodegradation of Sodium Diclofenac and Mefenamic Acid: Kinetic studies, identification of metabolites and analysis of enzime activity. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 144, 104756.

Nguyen, H.T., Thai, P.K., Kaserzon, S.L., O'Brien, J.W., Eaglesham, G., Mueller, J.F. (2018). Assessment of drugs and personal care products biomarkers in the influent and effluent of two wastewater treatment plants in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Science of the Total Environment*. 631-632, 469-475.

Nieto, E., Corada-Fernández, C., Hampel, M., Lara-Martín, P.A., Sánchez-Argüello, P., Blasco, J. (2017). Effects of exposure to pharmaceuticals (diclofenac and carbamazepine) spiked sediments in the midge, *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomiade). *Science of the Total Environment*. 609, 715-723.

Nkoom, M., Lu, G., Liu, J., Dong, H., Yang, H. (2019). Bioconcentration, behavioral, and biochemical effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in *Daphnia magna*. *Environmen International*. 96, 127-138.

NMX-AA-005-SCFI-2013. Análisis de agua. Medición de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-007-SCFI-2013. Análisis de agua. Medición de temperatura en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-008-SCFI-2016. Análisis de agua. Medición del pH en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-026-SCFI-2010. Análisis de agua. Medición de nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-028-SCFI-2001. Análisis de agua. Medición de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-029-SCFI-2001. Análisis de agua. Medición de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-030/2-SCFI-2011. Análisis de agua. Determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba. Parte 2.

Determinación del índice de la demanda química de oxígeno. Método de tubo sellado a pequeña escala.

NMX-AA-034-SCFI-2015. Medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

NMX-AA-082-1986. Contaminación del agua. Determinación de nitrógeno de nitrato. Método espectrofotométrico ultravioleta.

NMX-AA-099-SCFI-2006. Análisis de agua. Medición de nitrógeno de nitritos en aguas naturales, residuales, residuales tratadas y marinas. Método de prueba.

NOM-001-SEMARNAT-2021. Que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación.

NORMAN, Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances. http://www.norman-network.net/, 2022 (accesed 27 abril 2022).

Nunes, B., Daniel, D., Goçalves, G., Barros, J., Teodorico, A. (2020). Toxic effects of environmentally realistic concentrations of diclofenac in organisms from two distinct trophic levels, *Hediste diversicolor* and *Solea senegalensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology,* Part C. 231, 108722.

Olicón-Hernández, D.R., González-López, J., Aranda, E. (2017). Overview on the Biochemical Potential of Filamentous Fungi to Degrade Pharmaceutical Compounds. *Frontiers in Microbiology*. 8, 1792.

Olicón-Hernández, D., Camacho-Morales, R., Pozo, C., González-López, J., Aranda, E. (2019). Evaluation of diclofenac biodegradation by the ascomycete fungus *Penicillium oxalicum* at flask and bench bioreactor scales. *Science of the Total Environment*. 662, 607-614.

Osorio, V., Sanchís, J., Abad, J.L., Ginebreda, A., Farré, M., Pérez, S., Barceló, D. (2016). Investigating the formation and toxicity of nitrogen transformation products of diclofenac and sulfamethoxazole in wastewater treatment plants. *Journal of Hazardous Materials*. 309, 157-164.

Parolini, M. (2020). Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. *Science of The Total Environment*. 740, 140043.

Parolini, M., Binelli, A., Provini, A., 2011b. Assessment of the potential cyto –genotoxicity of the nonsteroidal anti -inflammatory drug (NSAID) diclofenac on the zebra mussel (Dreissena polymorpha). *Water, Air, & Soil Pollution*. 217, 589-601.

Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Riva, C., 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, 935-942.

Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C.U., Mohan, D. (2019). Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chemical Reviews*. 119(6), 3510-3673.

Pelczar, M.J., Reid, R.D., Microbiología. Segunda edición. McGraw-Hill. México. 1980.

Quinn, B., Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R. (2011). Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity effects. *Chemosphere*. 84, 657-663.

Poirier-Larabie, S., Segura, P.A., Gagnon, C. (2016). Degradation of the pharmaceuticals diclofenac and sulfamethoxazole and their transformation products under controlled environmental conditions. *Science oh the Total Environment*. 557-558, 257-267.

Richardson, S.D., Ternes, T. (2014). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 86, 2813-48.

Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M.Á., Prados-Joya, G., Ocampo-Pérez, R. (2013). Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere*. 93 (7), 1268-1287.

Sakat, S.S., Mani, K., Demidchenko, Y.O., Gorbunov, E.A., Tarasov, S.A., Mathur, A., Epstein, O.I. (2014). Release-Active Dilutions of Diclofenac Enhance Anti-Inflammatory Effect of Diclofenac in Carrageenan-Induced Rat Paw Edema Model. *Inflammation*. 37, 1-9.

Salgado, R., Pereira, V.J., Carvalho, G., Soeiro, R., Gaffney, V., Almeida, C., Cardoso, V.V., Ferreira, E., Benoliel, M.J., Ternes, T.A., Oehmen, A., Reis, M.A.M., Noronha, J.P. (2013). Photodegradation kinetics and transformation products of ketoprofen, diclofenac and atenolol in pure water and treated wastewater. *Journal of Hazardous Materials*. 244-245, 516-527.

Santos, L., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., Montenegro, M. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*. 461-462, 202-316.

Sathishkumar, P., Mohan, K., Alias Mena, R.A., Balasubramanian, M., Chitra, L., Ganesan, A.R., Palvannan, T., Brar, S.K., Gu, F.L. (2021). Hazardous impact of diclofenac on mammalian system: Mitigation strategy through green remediation approach. *Journal of Hazardous Materials*. 419, 126135.

Schulze, T., Weiss, S., Schymanski, E., von der Ohe, P.C., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., Streck, G., Brack, W. (2010). Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis. *Environmental Pollution*. 158, 1461-1466.

Sophia, C., Lima E. (2018). Removal of emerging contaminants from the environment by adsorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 150, 1-17.

Straub, Jürg Oliver. (2016). Reduction in the environmental exposure of pharmaceuticals through diagnostics, Personalised Healthcare and other approaches. A mini review and discussion paper. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 3, 1-7.

Stylianou, K., Hapeshi, E., Vasquez, M., Fatta-Kassinos, D., Vyrides, I. (2018). Diclofenac biodegradation by newly isolated *Klebsiella* sp. KSC: Microbial intermediates and ecotoxicological assessment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 6, 3242-3248.

Sui, Q., Cao, X., Lu, S., Zhao, W., Qiu, Z., Yu, G. (2015). Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. *Emerging Contaminants*. 1, 14-24.

Triebskorn, R., Casper, H., Scheil, V., Schwaiger, J. (2007). Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, 1405-1416.

Ulvi, A., Aydin, S., Aydin, M.E. (2022). Fate of selected pharmaceuticals in hospital and municipal wastewater effluent: occurrence, removal, and environmental risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*. 29, 75609-75625.

Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D. (2010). Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*. 389, 416-428.

Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D. (2012). Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*. 430, 109-118.

Vieira, Y., Pereira, H.A., Leichtweis, J., Mistura, C.M., Foletto, E.L., Oliveira, L.F.S., Dotto, G.L. (2021). Effective treatment of hospital wastewater with high concentration diclofenac and ibuprofen using promising technology based on degradation reaction catalyzed by Fe^0 under microwave irradiation. *Science of the Total Environment*. 783, 146991.

Vieno, N., Sillanpää, M. (2014). Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant – A review. *Environment International*. 69, 28-39.

Vishnu Priyan, V., Shahnaz, T., Suganya, E., Sivaprakasam, S., Narayanasamy, S. (2021). Ecotoxicological assessment of micropullatant Diclofenac biosprption on magnetic sawdust: Phyto, Microbial and Fish toxicity studies. *Journal of Hazardous Materials*. 403, 123532.

Weber, F., aus der Beek, T., Bergmann, A. (2014). Fármacos en el medio ambiente – la perspectiva global. Incidencia, efectos y acción cooperativa potencial bajo el SAICM. *Federal Ministery for the Environment, Nature Conservation, Building and Nuclear Safety*. 3-9.

Wielens Becker, R., Ibáñez, M., Cuervo Lumbaque, E., Wilde, M.L., Flores da Rosa, T., Hernández, F., Sirtori, C. (2020). Investigation of pharmaceuticals and their metabolites in Brazilian hospital wastewater by LC-QTOF MS screening combined with a preliminary exposure and *in silico* risk assessment. *Science of The Total Environment*. 699, 134218.

Xu, R., Tang, R., Zhou, Q., Li, F., Zhang, B. (2014). Enhancement of catalytic activity of immobilized laccase for diclofenac biodegradation by carbon nanotubes. *Chemical Engineering Journal*. 262, 88-95.

Yang, S., Hai, F.I., Nghiem, L.D., Nguyen, L.N., Roddick, F., Price, W.E. (2013). Removal of bisphenol A and diclofenac by a novel fungal membrane bioreactor operated under non-sterile conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 85, 483-490.

Zenker, A., Cicero, M.R., Prestinaci, F., Bottoni, P., Carere, M. (2014). Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *Journal of Environmental Management*. 133, 378-387.

Zhang, Y., GeiBen, S., Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*. 73, 1151-1161.

Zind, H., Mondamert, L., Blancart Remaury, Q., Cleon, A., Karpel Vel Leitner, N., Labanowski, J. (2021). Occurrence of carbamazepine, diclofenac, and their related metabolites and transformation products in a Frech aquatic environment and preliminary risk assessment. *Water Research*. 196, 117052.

Zur, J., Marchlewicz, A., Pinski, A., Guzik, U., Wojcieszynska, D. (2021). Degradation of diclofenac by new bacterial strains and its influence on the physiological status of cells. *Journal of Hazardous Materials*. 403, 124000.