

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
SANTIAGO, CHILE



**“ESTUDIO DE TOXICIDAD DE COMPUESTOS
FARMACOLÓGICOS EN SOLUCIONES MONO Y
MULTICOMPONENTES MEDIANTE LA TÉCNICA
MICROTOX”**

ARACELY ANDREA VALDIVIA YÁÑEZ

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA CIVIL QUÍMICA

PROFESORA GUÍA: DRA. ANDREA CARVAJAL
PROFESORA CORREFERENTE: DRA. CAROLYN PALMA

DICIEMBRE - 2024



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): Memoria o trabajo de título; Tesis de Postgrado;

Título del trabajo: Estudio de toxicidad de compuestos farmacológicos en soluciones mono y multicomponentes mediante la técnica Microtox

Nombre del candidato(a): Aracely Andrea Valdivia Yáñez

Carrera / Grado: Ingeniería Civil Química

Campus: Santiago San Joaquín ; **Departamento:** Ingeniería Química y Ambiental

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Andrea Carvajal Guevara, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL

El trabajo **NO contiene información que amerite confidencialidad** y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (embargo) por:

6 meses; 12 meses; 2 años; 3 años; 5 años; 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: 26/08/2025

Firma:

Signed by:

881A7574C7F7492...

Estudiante o Candidato(a):

Fecha: 25/08/2025

Firma:

Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi mamá, María Yáñez del Pino, a mi papá, Pedro Valdivia Zorrilla, y a mi hermana, Barbará Lacourt Yáñez.

Mi familia ha sido un pilar fundamental durante toda mi vida. Sin ustedes, nada de esto hubiera sido posible. Su apoyo incondicional y el amor que me han demostrado en cada paso de mi vida me ha impulsado no solo a lograr esto, sino también a convertirme en la persona que soy hoy. Gracias por confiar en mí cuando ni yo misma lo hacía, celebrando cada pequeño logro conmigo e impulsándome a conseguir cada vez más, por enseñarme a nunca darme por vencido cuando yo siempre decía que no lo iba a lograr, por sus innumerables consejos que aunque a veces no los pidiera siempre fueron por mi bien y solo pensando en mí y lo más importante por su infinita paciencia.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a mis amigos ya que sin ustedes este camino de 6 años no hubiera tan ameno. Cada risa compartida, cada consejo y cada gesto de apoyo ha sido lo que necesitaba muchas veces para seguir adelante. Gracias por estar presentes en mis momentos de crisis existenciales y también por su infinito apoyo y paciencia debido a mi negatividad. Termine este camino feliz por haber conocido a un montón de personas maravillosas que espero que sigan en mi vida en esta siguiente etapa llena de retos y desafíos, además de que espero haberles demostrado también todo el cariño, amor y apoyo que yo sentí de ustedes.

Quiero hacer una mención especial a una de las personas mas maravillosas y lindas que la universidad y la vida puso en mi camino, a mi mejor amiga y confidente en todo este camino Gabriela Reyes Cambiaso en verdad no tengo palabras para agradecer todos los momentos que hemos pasado juntas, desde las pijamadas hasta las salidas simplemente para seguir hablando por horas como si no nos hubiéramos visto en semanas. Simplemente me queda decirte gracias, gracias por todo lo que me has dado, por todos los consejos y ese apoyo incondicional que solo tú puedes demostrar.

También, quiero dedicar esta memoria a mi abuelo, Aníbal Yáñez Cepeda la persona más especial en mi vida, que a pesar de que no pudo ver este momento y estar conmigo se que donde quiera que este, está celebrándome y apoyándome en cada paso que dé. Gracias por darme ese amor que solo un abuelo puede dar.

También me gustaría agradecer al proyecto ANID (FONDEF ID22I10011).

RESUMEN EJECUTIVO

En las últimas décadas, el desarrollo de técnicas analíticas avanzadas ha permitido detectar nuevos contaminantes que representan una amenaza tanto para la salud humana como para el medio ambiente: los llamados contaminantes emergentes. Estos compuestos son especialmente problemáticos debido a que las plantas de tratamiento de aguas residuales no están diseñadas para eliminarlos por completo, ya que suelen encontrarse en concentraciones muy bajas. Un ejemplo de contaminantes emergentes son los productos farmacéuticos. Aunque existe información sobre los valores de toxicidad de fármacos individuales en diversos organismos, los estudios que analizan la toxicidad de las mezclas de estos compuestos son limitados. El objetivo de este trabajo busca evaluar la toxicidad de compuestos farmacológicos en soluciones acuosas, considerando tanto sistemas de un solo componente como sistemas con múltiples componentes.

El procedimiento consistió en realizar una revisión bibliográfica para establecer las concentraciones iniciales en las soluciones. Luego se realizó un diseño experimental Simplex lattice a través del programa Minitab para buscar las soluciones mono y multicomponentes significativas y establecer un orden de experimentación, una vez definido este orden se realizó la medición de toxicidad con el equipo Microtox M500 a través del parámetro de la concentración efectiva media (EC_{50}). Para ello se preparó soluciones acuosas con la bacteria *Vibrio fischeri* y se midió la luminiscencia inicial, luego se expuso esta bacteria al fármaco de estudio y se midió la luminiscencia luego de 5 y 15 min.

Entre los 7 fármacos estudiados (paracetamol, ibuprofeno, cafeína, naproxeno, carbamazepina, metformina y diclofenaco), el ibuprofeno (EC_{50} de 8,9 mg/L) y diclofenaco (EC_{50} de 9,3 mg/L) se clasificaron como tóxicos para los organismos acuáticos, mientras que el naproxeno (EC_{50} de 44,4 mg/L) se consideró nocivo. En cuanto a la interacción significativa que mostro una interacción sinérgica (toxicidad potenciada) fue la metformina – diclofenaco. Mientras que para el ibuprofeno – metformina, cafeína – metformina y carbamazepina – metformina resultaron en una interacción antagónica (toxicidad reducida).

En conclusión, los resultados destacan a la metformina como el principal compuesto que disminuye la toxicidad en sistemas multicomponentes. Este estudio también resalta la importancia de evaluar las interacciones entre fármacos en el medio ambiente para comprender su impacto real y promover estrategias de gestión ambiental más efectivas.

ÍNDICE

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	1
Antecedentes generales.....	1
1.1. Contaminantes emergentes	2
1.2. Productos farmacéuticos.....	2
1.3. Toxicidad	12
1.4. Técnicas de cuantificación de toxicidad.....	14
1.5. Métodos estadísticos.....	18
CAPÍTULO II OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo general	20
2.2. Objetivos específicos	20
CAPÍTULO III METODOLOGÍA.....	21
3.1. Materiales	21
3.2. Metodología.....	22
3.2.1. Procedimiento de toxicidad con Microtox M500	22
3.2.2. Diseño experimental.....	23
CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
CAPITULO V CONCLUSIONES	42
CAPITULO VI BIBLIOGRAFÍA	43
CAPITULO VII ANEXOS.....	48
ANEXO A “Procedimiento para las disoluciones”.....	48
ANEXO B “Formulas para el cálculo de la concentración efectiva media <i>EC50</i> ”	51
ANEXO C “Tabla de diseño aleatorizada”.....	53
ANEXO D “Curvas de calibración”	55
ANEXO E “Resultado del diseño experimental para soluciones mono y multicomponentes”.....	63
ANEXO F “Conceptos básicos para la comprensión del análisis estadístico”.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación ATC. Fuente: adaptación de (OMS, 2024)	6
Tabla 2: Propiedades y/o características fisicoquímicas.....	8
Tabla 3: Propiedades y/o características farmacocinéticas.....	9
Tabla 4: Unidades anuales vendidas (ISP, 2024).....	10
Tabla 5: Frecuencia de detección en sistemas acuosos a nivel mundial. Fuente: (Wilkinson, 2022).....	11
Tabla 6: Concentración en sistemas hídricos a nivel nacional.	12
Tabla 7: Clasificación para las sustancias tóxicas Fuente: (Cartagena, 2011).....	13
Tabla 8: Concentración efectiva media medida en la bacteria <i>Vibrio fischeri</i>	14
Tabla 9: Protocolos internacionales para pruebas de toxicidad Fuente: (Agudelo et al., 2018).....	15
Tabla 10: Caracterización de compuestos farmacológicos.....	21
Tabla 11: Concentración de viales para el experimento con el equipo Microtox M500.	23
Tabla 12: Comparación de toxicidad entre valores experimentales y de literatura.	25
Tabla 13: Coeficientes de regresión estimados para EC_{50} 5 min.	27
Tabla 14: Coeficientes de regresión estimados para EC_{50} 15 min.	29
Tabla 15: Resumen del modelo a los 5 min.....	30
Tabla 16: Análisis de varianza para 5 min.	31
Tabla 17: Ajuste y diagnóstico de cada observación a los 5 min.	33
Tabla 18: Resumen del modelo a los 15 min.....	35
Tabla 19: Análisis de varianza para 15 min.	36
Tabla 20: Ajuste y diagnóstico de cada observación a los 15 min.	38
Tabla 21: Concentraciones iniciales para las soluciones monocomponentes y multicomponentes.....	48
Tabla 22: Toxicidad de diluyentes utilizados en los fármacos.....	49
Tabla 23: diseño experimental aleatorizado para 7 componentes.	53
Tabla 24: Resultados de la curva de calibración.....	62
Tabla 25: EC_{50} del diseño experimental a los 5 y 15 min.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Reacciones de transformación de compuestos farmacológicos. Fuente: adaptación de (Correia & Marcano, 2015)	3
Figura 2: Origen y rutas de difusión de productos farmacéuticos en el ambiente. Fuente: adaptación de (Correia & Marcano, 2015)	4
Figura 3: Gráficas de residuos para <i>EC</i> 50 a los 5 min.	34
Figura 4: Gráficas de residuos para <i>EC</i> 50 a los 15 min.	39
Figura 5: Diseño de la región experimental ampliado. Fuente: adaptación de (Minitab, 2024b).....	54
Figura 6: Absorbancia vs longitud de onda del paracetamol.....	55
Figura 7: Absorbancia vs concentración del paracetamol.	55
Figura 8: Absorbancia vs longitud de onda del ibuprofeno.....	56
Figura 9: Absorbancia vs concentración del ibuprofeno.	56
Figura 10: Absorbancia vs longitud de onda de la cafeína.....	57
Figura 11: Absorbancia vs concentración de la cafeína.....	57
Figura 12: Absorbancia vs longitud de onda de la claritromicina.	58
Figura 13: Absorbancia vs concentración de la claritromicina.....	58
Figura 14: Absorbancia vs longitud de onda del naproxeno.	59
Figura 15: Absorbancia vs concentración del naproxeno.....	59
Figura 16: Absorbancia vs longitud de onda de la carbamazepina.....	60
Figura 17: Absorbancia vs concentración de la carbamazepina.....	60
Figura 18: Absorbancia vs longitud de onda de la metformina.....	61
Figura 19: Absorbancia vs concentración de la metformina.	61
Figura 20: Absorbancia vs longitud de onda del diclofenaco.....	62
Figura 21: Absorbancia vs concentración del diclofenaco.....	62

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

Antecedentes generales

Aproximadamente 3.6 mil millones de personas viven a menos de 60 kilómetros de las costas, lo que resulta alarmante dado que entre el 70% y el 75% de la contaminación marina proviene de actividades humanas, ya sea de manera directa o indirecta. Gran parte de estos contaminantes son transportados desde los ríos hacia el océano, contribuyendo a que hasta el 90% de la contaminación sea generada en el interior de los países (J. Escobar, 2002).

Entre los principales contaminantes que afectan la calidad del agua se encuentran los contaminantes orgánicos, nutrientes, metales pesados, microorganismos patógenos, compuestos tóxicos orgánicos, químicos traza, compuestos farmacéuticos, partículas suspendidas, desechos nucleares, además de procesos como la salinización y acidificación. Estas sustancias provienen de diversas fuentes, incluidas actividades industriales, domésticas, asentamientos humanos, escorrentías agrícolas, operaciones mineras, farmacéuticas y fuentes municipales (J. Escobar, 2002).

El monitoreo y la detección temprana de los contaminantes son esenciales para la protección de la salud humana y la preservación del medio ambiente. Actualmente, el 37% de las especies de peces de agua dulce, el 67% de los moluscos, el 52% de los crustáceos y el 40% de los anfibios enfrentan serias amenazas debido a la contaminación. Asimismo, se estima que el 50% de los humedales y el 27% de los arrecifes de coral han desaparecido. La salud humana también está en riesgo: el consumo de agua contaminada ha causado 2.5 millones de casos de hepatitis infecciosa en todo el mundo, resultando en aproximadamente 25,000 muertes (J. Escobar, 2002).

En las últimas décadas, el avance en técnicas analíticas de detección ha permitido identificar nuevos contaminantes que representan una amenaza tanto para la salud humana como para el medio ambiente: los llamados “contaminantes emergentes”. Estos compuestos son especialmente problemáticos debido a que las plantas de tratamiento de aguas residuales no están diseñadas para eliminarlos por completo, ya que suelen encontrarse en concentraciones muy bajas. Sin embargo, el interés científico en estos contaminantes ha crecido significativamente, con aproximadamente 4000 estudios publicados entre 2008 y 2012 que reportan su presencia, impacto, mecanismos de transporte, entre otros aspectos críticos (M. Escobar & García-Calvo, 2019).

1.1. Contaminantes emergentes

Según la Real Academia Española (RAE), un contaminante se define como una *“sustancia que produce contaminación en el recurso en el que es vertida o emitida”* (RAE, 2024). A partir de esta definición, los contaminantes emergentes, también conocidos como contaminantes de preocupación emergente, pueden describirse como sustancias presentes en sistemas acuosos en concentraciones muy bajas que, pese a su escasa cantidad, tienen el potencial de causar daño o riesgo tanto para la salud humana como para el medio ambiente, afectando la flora y fauna cercana al área donde se vierten o emiten estos compuestos.

Los contaminantes emergentes pueden clasificarse en diversas categorías, entre las que se incluyen: pesticidas o plaguicidas, drogas ilícitas, hormonas esteroides, compuestos “estilo de vida”, cuidado personal, surfactantes, productos para tratamientos de aguas, aditivos industriales y sus subproductos, retardantes de llamas o fuegos, aditivos alimentarios y productos farmacéuticos. Este trabajo se centrará en los productos farmacéuticos como principal objeto de estudio (Janet et al., 2012).

1.2. Productos farmacéuticos

Según el Decreto 3/2010, Artículo 7º, se define como producto farmacéutico o medicamento a: *“cualquier sustancia, natural o sintética, o mezcla de ellas, que se destine al ser humano con fines de curación, atenuación, tratamiento, prevención o diagnóstico de las enfermedades o sus síntomas, para modificar sistemas fisiológicos o el estado mental en beneficio de la persona a quien le es administrado”* (MINSAL, 2015). El creciente número de publicaciones relacionadas con este tipo de contaminantes refleja la preocupación por su impacto ambiental y en la salud. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha aprobado más de veinte mil medicamentos hasta la fecha (FDA, 2024), incluidos 37 nuevos medicamentos en 2022 (Cavazzoni, 2023) y 55 en 2023, la cifra más alta desde 2016 (Cavazzoni, 2024). Este incremento en el desarrollo y comercialización de medicamentos podría estar directamente relacionado con la frecuencia de su detección en el medio ambiente, especialmente si no se implementan procedimientos adecuados para su manejo, disposición y tecnologías eficientes para su eliminación.

Para entender cómo estos compuestos farmacéuticos llegan a los ecosistemas acuáticos y se dispersan en el medio ambiente, es esencial analizar las fuentes de emisión y los mecanismos de difusión que facilitan su presencia. Cuando un paciente de hospital o la

población general consume un medicamento, este es metabolizado por el cuerpo humano y posteriormente excretado. En la Figura 1, se presenta un diagrama más detallado de este proceso, desde la administración del compuesto farmacéutico hasta la excreción del compuesto o excreción del metabolito, según corresponda (Correia & Marcano, 2015).

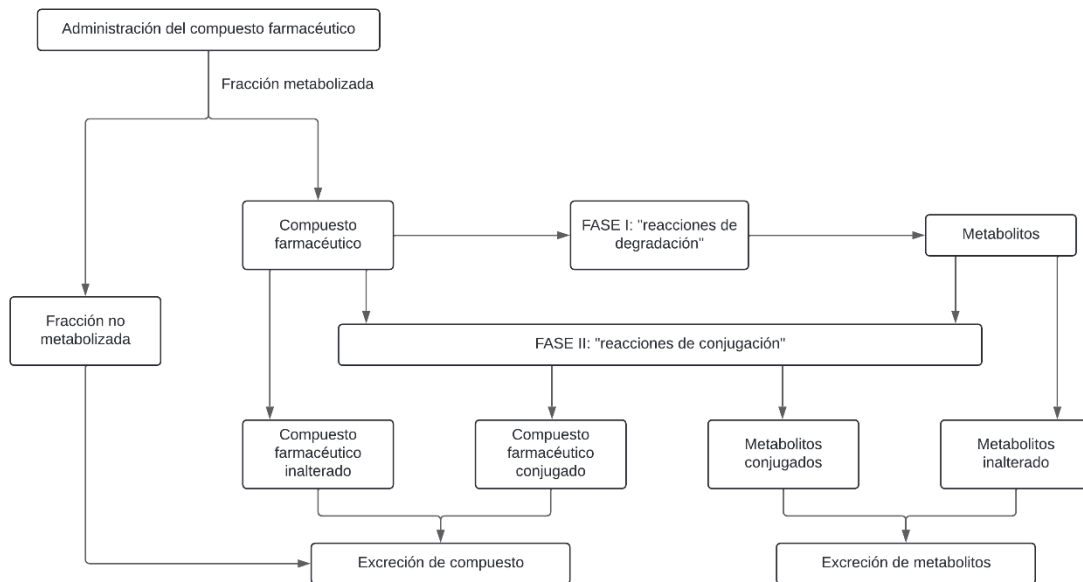


Figura 1: Reacciones de transformación de compuestos farmacológicos. Fuente: adaptación de (Correia & Marcano, 2015)

El proceso de metabolización de los compuestos farmacéuticos comienza con la administración de un medicamento, ya sea vía oral u intravenosa. Una fracción de este medicamento no es adsorbida por el tracto digestivo y se excreta en su forma original. Mientras tanto, la fracción que si se adsorbe debe ser transformada en compuestos más polares e hidrosolubles para facilitar su eliminación a través de la vía renal o hepática (Le, 2022). Para lograr esto, el compuesto puede pasar por una o ambas de las siguientes fases, que se describirán a continuación:

1. En la Fase I, conocida como “reacciones de degradación” o “reacciones no sintéticas”, el compuesto experimenta modificaciones mediante procesos como la oxidación (el más común), la reducción o la hidrólisis de grupos funcionales. Durante esta etapa, se añaden grupos funcionales como $(-OH, -COOH, -NH_2)$, lo que incrementa las características hidrófilas del compuesto (Alvariza et al., 2010).
2. En la Fase II, denominada como “reacciones de conjugación” o “reacciones sintéticas”, el compuesto farmacéutico adsorbido por el tracto digestivo o

metabolitos electrófilos (producidos en la Fase I) se combinan con ácido glucurónico, sulfato o glicina, generando compuestos de mayor peso molecular y más hidrosolubles (Alvariza et al., 2010).

A partir de lo anterior, se observa que la fracción metabolizada por el sistema digestivo puede pasar por la fase I para formar metabolitos, los cuales pueden ser excretados sin cambios o pueden pasar a la fase II para formar metabolitos conjugados (ambos casos, se trata de la excreción de metabolitos). Por otro lado, la fracción metabolizada puede pasar directamente a la fase II, donde se formará un compuesto farmacéutico conjugado, o, a pesar de la absorción, puede ser excretada en su forma original (en ambos casos, se trata de la excreción del compuesto). Una vez excretados ya sea de forma conjugada o inalterada, estos compuestos alcanzan los distintos medios acuáticos a través de diversas formas, como se ilustra en la Figura 2.

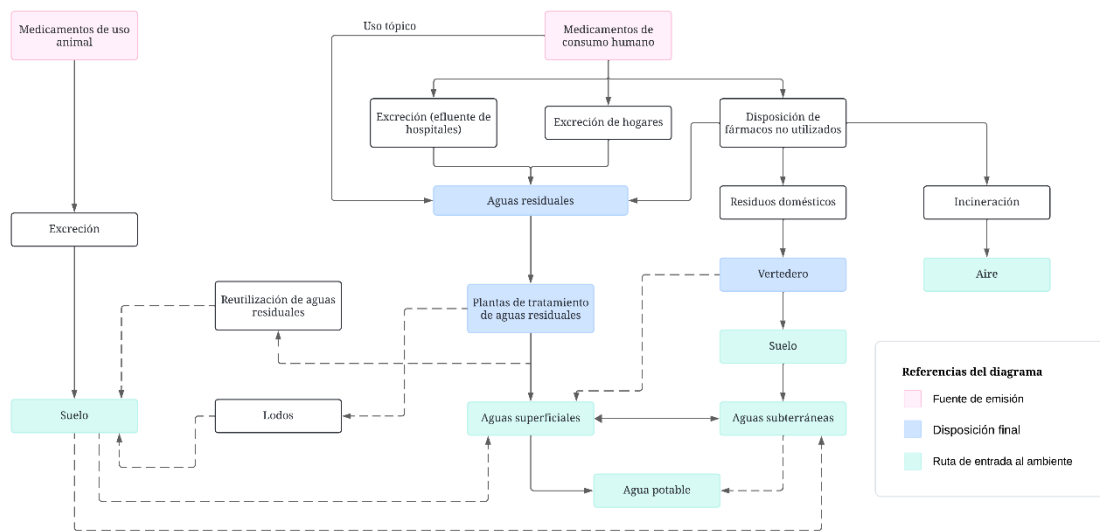


Figura 2: Origen y rutas de difusión de productos farmacéuticos en el ambiente. Fuente: adaptación de (Correia & Marcano, 2015)

Las principales fuentes de emisión de los contaminantes emergentes, como productos farmacéuticos, son los medicamentos de uso animal y medicamentos de consumo humano. Mientras que, para el primero, estos son excretados al suelo, desde donde pueden alcanzar aguas superficiales y/o subterráneas, lo que representa una ruta de entrada al medio ambiente (Correia & Marcano, 2015). Los medicamentos de consumo humano tienen cuatro subfuentes principales:

1. Medicamentos de uso tópico (a nivel dérmico): estos medicamentos son aplicados directamente sobre la piel y pueden alcanzar las aguas residuales cuando el paciente se lava las manos o durante el baño.
2. Excreción de pacientes en los efluentes de hospitales: los medicamentos administrados a pacientes hospitalizados son metabolizados por el cuerpo humano y luego excretados, ya sea a través de la orina o las heces llegando a los sistemas de alcantarillado de los hospitales, lo que los lleva a las aguas residuales.
3. Excreción en los hogares: los medicamentos consumidos en los hogares por la población general son metabolizados por el cuerpo humano y luego excretados, ya sea a través de la orina o las heces, donde eventualmente llegaran a las aguas residuales domésticas.
4. Disposición de fármacos no utilizados: cuando los medicamentos no se consumen en su totalidad, ya sea porque han expirado (a nivel doméstico) o porque un lote no tiene las condiciones óptimas para su comercialización (a nivel industrial). A menudo, estos medicamentos son desechados por el fregadero o el inodoro, lo que los lleva a las aguas residuales. Otra opción de disposición es a través de los residuos domésticos (basura), que terminan en vertederos donde pueden infiltrarse en el suelo, y alcanzar aguas subterráneas. Finalmente, algunos medicamentos pueden ser incinerados, lo que los introduce al ambiente a través del aire.

Las primeras tres subfuentes de medicamentos de consumo humano tienen como disposición final las aguas residuales, donde pasan por un proceso de tratamiento en plantas de aguas. Estas plantas producen dos productos principales: los lodos, que pueden utilizarse como fertilizantes o ser dispuestos de forma adecuada, y las aguas tratadas, que pueden ser devueltas a cuerpos de agua superficiales como ríos o ser utilizadas para el riego (Correia & Marcano, 2015).

Después de analizar las principales fuentes de emisión y los mecanismos de difusión de los productos farmacéuticos en el medio ambiente, resulta necesario profundizar en la clasificación de los compuestos seleccionados en este estudio para entender no solo sus propiedades comunes, sino también su comportamiento en sistemas acuosos y su potencial impacto ambiental.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) divide las distintas sustancias activas clasificándolas según el órgano o sistema en el que actúen y sus propiedades terapéuticas,

farmacológicas y químicas. Este sistema se conoce como clasificación química terapéutica anatómica (ATC) (OMS, 2024). A continuación, se presenta la tabla 1 de este sistema de clasificación.

Tabla 1: Clasificación ATC. Fuente: adaptación de (OMS, 2024)

Primer Nivel			
Grupo anatómico principal			
A Sistema digestivo y metabólico	L antineoplásicos y agentes inmunomoduladores		
B Sangre y hematopoyesis	M Sistema musculo – esquelético		
C Sistema cardiovascular	N Sistema nervioso		
D Dermatológicos	P Agentes antiparasitarios, insecticidas y repelentes		
G Sistema genitourinario y hormonas sexuales	R Sistema respiratorio		
H Preparación hormonales sistémicas	S Órganos de los sentidos		
J Antiinfecciosos para uso sistémico	V Varios		
Segundo Nivel	Tercer Nivel	Cuarto Nivel	Quinto Nivel
Subgrupo terapéutico	Subgrupo farmacológico	Subgrupo químico	Sustancias químicas

Tras establecer una clasificación general de los fármacos en función de sus familias y propiedades comunes, es fundamental centrarse en los compuestos específicos seleccionados para este estudio, siendo estos algunos de los más consumidos en Chile.

El paracetamol (acetaminofeno) bioequivalente es un analgésico y antipirético utilizado para el tratamiento de dolores leves a moderados y estados febriles. Su dosis recomendada es de 1 a 2 comprimidos cada 6 a 8 h (Laboratorio Chile, 2024a).

El ibuprofeno bioequivalente es un antiinflamatorio no esteroideo utilizado para el tratamiento de dolores inflamatorios leves a moderados, estados febriles, artritis reumatoidea y osteoartritis. Su dosis recomendada es de 1 comprimido cada 4 a 6 h (Laboratorio Chile, 2024b).

La cafeína es un psicoestimulante utilizado como alimentos para deportistas o durante la mañana. Su dosis diaria es un comprimido al día (VitaminLife, 2024).

La claritromicina bioequivalente es un antibacterial de uso sistémico utilizado para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio superior e inferior, piel y tejidos blandos. Su dosis depende del tratamiento el cual varía entre 250 a 500 por 10 a 14 d (Chemopharma, 2024).

El naproxeno sódico bioequivalente es un antiinflamatorio y un antirreumático no esteroideo utilizado para el tratamiento de dolores leve a moderado, para inflamación de tejidos musculares esqueléticos y blandos. Su dosis es de dos comprimidos al día (Milab, 2024).

La carbamazepina bioequivalente es un antiepiléptico, neurotrópico y psicotrópico utilizado para el tratamiento de epilepsias, manías, trastornos maniacodepresivos y abstinencia al alcohol. Su dosis es de 100 a 200 mg una o dos veces al día.

La metformina bioequivalente es un hipoglucémico oral utilizado para disminuir la glicemia en pacientes con diabetes tipo II. La dosis es un comprimido de una a dos veces al día (Laboratorio Chile, 2024c).

El diclofenaco sódico bioequivalente es un antiinflamatorio y antirreumático no esteroideo utilizado para el tratamiento de dolor e inflamaciones de enfermedades reumáticas y desordenes musculoesqueléticos, cirugías menores, dentales u ortopédicas. La dosis es un comprimido al día.

Una vez descritos los fármacos seleccionados para este trabajo, es crucial examinar sus características fisicoquímicas, ya que estas determinan su comportamiento en el medio ambiente y en sistemas acuosos. Estas propiedades son fundamentales para comprender su persistencia, movilidad y capacidad de interacción con otros compuestos en el entorno. A continuación, en la Tabla 2 se detallan estas características.

Tabla 2: Propiedades y/o características fisicoquímicas

Compuesto	Código ATC	Formula química	Peso molecular <i>g/mol</i>	pKa Constante de disociación	Referencia
Acetaminofén / paracetamol	N02BE01	$C_8H_9NO_2$	151,16	9,5	(Banco de medicamentos en línea, 2024a)
Ibuprofeno	M01AE01	$C_{13}H_{18}O_2$	206,28	5,3	(Banco de medicamentos en línea, 2024b)
Cafeína	N06BC01	$C_8H_{10}N_4O_2$	194,19	14	(Banco de medicamentos en línea, 2024c)
Claritromicina	J01FA09	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	747,95	8,99	(Banco de medicamentos en línea, 2024d)
Naproxeno	M01AE02	$C_{14}H_{14}O_3$	230,26	4,15	(Banco de medicamentos en línea, 2024e)
Carbamazepina	N03AF01	$C_{15}H_{12}N_2O$	236,27	15,96	(Banco de medicamentos en línea, 2024f)
Metformina	A10BA02	$C_4H_{11}N_5$	129,16	12,4	(Banco de medicamentos en línea, 2024g)
Diclofenaco	M01AB05	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	296,15	4,15	(Banco de medicamentos en línea, 2024h)

Después de presentar las propiedades fisicoquímicas de los fármacos seleccionados, es igualmente importante examinar sus propiedades farmacocinéticas, ya que estas permiten entender los procesos de metabolización, excreción y tiempo de vida media en los seres humanos, así como su influencia en los ecosistemas acuáticos.

La administración de un fármaco implica dos fases principales: la biotransformación o metabolización, y la excreción. El proceso de metabolización tiene como objetivo transformar un compuesto en metabolitos hidrosolubles, facilitando así su eliminación del organismo. Por otro lado, la excreción es el mecanismo mediante el cual el cuerpo elimina estos metabolitos o el compuesto en su forma inalterada (Maya, 2007).

La vida media de un fármaco se define como el tiempo necesario para que su concentración plasmática disminuya al 50% (Maya, 2007). Este parámetro, junto con la tasa de metabolización y excreción, son indicadores clave para evaluar el comportamiento farmacocinético de un compuesto.

En la Tabla 3, se presentan las propiedades farmacocinéticas de los compuestos de interés para este trabajo, detallando la tasa de metabolización y/o excreción, así como el tiempo de vida media de cada uno.

Tabla 3: Propiedades y/o características farmacocinéticas

Compuesto	Tasa de excreción	Tiempo de vida media h	Referencias
Acetaminofén / paracetamol	<5%	2,5	(Banco de medicamentos en línea, 2024a)
Ibuprofeno	10%	1,2 a 2	(Banco de medicamentos en línea, 2024b)
Cafeína	0,5 a 2%	5	(Banco de medicamentos en línea, 2024c)
Claritromicina	20 a 30%	3 a 4	(Banco de medicamentos en línea, 2024d)
Naproxeno	95%	12 a 17	(Banco de medicamentos en línea, 2024e)
Carbamazepina	72%	12 a 17	(Banco de medicamentos en línea, 2024f)
Metformina	90%	6,2	(Banco de medicamentos en línea, 2024g)
Diclofenaco	60 a 70%	2	(Banco de medicamentos en línea, 2024h)

Además, resulta fundamental comprender su nivel de consumo, ya que este factor influye directamente en su presencia en el medio ambiente.

El Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) tiene como misión promover y proteger la salud de la población, fortaleciendo el control sanitario mediante la vigilancia, fiscalización e investigación. En la Tabla 4, se presenta información proporcionada por el ISP, que detalla el total de unidades vendidas por molécula o principio activo en las tres principales cadenas farmacéuticas del país: Ahumada, Cruz Verde y Salcobrand, correspondientes a los años 2021, 2022, 2023 y los primeros tres meses de 2024.

Tabla 4: Unidades anuales vendidas (ISP, 2024).

Compuesto	Año 2021	Año 2022	Año 2023	Año 2024		
				Enero 2024	Febrero 2024	Marzo 2024
Acetaminofén / paracetamol	14.113.207	15.041.778	12.823.076	1.038.713	844.997	1.111.252
Ibuprofeno	9.190.643	11.459.156	11.208.446	710.344	736.164	1.034.710
Cafeína	71	247	599	22	15	28
Claritromicina	188.589	279.914	291.491	17.162	13.111	21.022
Naproxeno	3.626.887	3.750.203	3.566.874	296.166	226.247	371.584
Carbamazepina	261.750	260.996	251.588	22.947	19.758	19.337
Metformina	4.063.373	3.697.401	3.318.869	267.137	258.593	250.435
Diclofenaco	6.468.140	6.582.497	5.846.077	460.084	366.243	461.568
Total	43.614.379	46.300.162	41.612.164	3.073.385	2.778.284	3.640.142

El nivel de consumo de medicamentos proporciona una perspectiva clara sobre su uso y distribución en la población, pero su impacto ambiental solo puede ser comprendido plenamente al examinar su presencia en sistemas acuáticos. Estudios realizados a nivel mundial y nacional han reportado la detección de diversos fármacos en concentraciones que, aunque bajas, representan un riesgo potencial para los ecosistemas y la salud humana. A continuación, se presentan datos que permiten relacionar el consumo de estos compuestos con su concentración y frecuencia de detección en cuerpos de agua.

Se realizó un estudio global sobre la presencia de ingredientes farmacéuticos activos (API) en 258 ríos alrededor del mundo, abarcando la influencia de 471,4 millones de personas en 137 regiones geográficas. Este análisis incluyó 104 países, evaluando 61 API en 37 países de Europa, 24 de África, 24 de Asia, 9 de América del Sur, 6 de América del Norte, 3 de Oceanía y la Antártida (Wilkinson et al., 2022). De los 61 API analizados, se detectaron 48 en Asia, 45 en Europa, 41 en África, 39 en América del Norte, 35 en América del Sur, 21 en Oceanía y 4 en la Antártida. Entre ellos, cuatro ingredientes farmacéuticos activos se encontraron en todos los continentes: cafeína, nicotina, acetaminofén o paracetamol y cotinina (metabolito de la nicotina). Estos compuestos, clasificados como “relacionados con el estilo de vida o de venta libre”, destacan por su alta presencia en diversos ecosistemas acuáticos (Wilkinson, 2022).

A continuación, se presenta la Tabla 5, extraída del mismo estudio, que muestra la concentración media en *ng/L* y la frecuencia de detección en % de los compuestos emergentes de interés relacionados con la presente memoria.

Tabla 5: Frecuencia de detección en sistemas acuosos a nivel mundial. Fuente: (Wilkinson, 2022)

Compuesto	África		Asia		Europa		América del Norte	
	\bar{C} ng/L	f_D %	\bar{C} ng/L	f_D %	\bar{C} ng/L	f_D %	\bar{C} ng/L	f_D %
Acetaminofén / paracetamol	5660	39,5	2790	45,4	394	30,5	291	26,1
Ibuprofeno	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Cafeína	4020	43,8	4080	69,2	683	54,3	1740	55,6
Claritromicina	241	6,03	177	16,6	186	11	857	0,98
Naproxeno	404	8,25	667	25,8	347	18	525	20,2
Carbamazepina	92,3	51,8	132	61	113	78,5	54,7	46,2
Metformina	2860	48	3330	76,8	1060	67,2	1600	57,7
Diclofenaco	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

\bar{C} es la concentración media

f_D es la frecuencia de detección

Continuación Tabla 5.

Compuesto	Oceanía		América del Sur		Mundial	
	\bar{C} ng/L	f_D %	\bar{C} ng/L	f_D %	\bar{C} ng/L	f_D %
Acetaminofén / paracetamol	63,1	23,2	7580	47,2	3100	36,2
Ibuprofeno	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Cafeína	282	32,7	3170	61,8	2500	62
Claritromicina	N.D	N.D	427	6,41	242	9,01
Naproxeno	34,3	4,76	348	31,3	452	18,6
Carbamazepina	31,4	33,3	120	59,5	106	61,4
Metformina	37,9	39,6	5140	55,2	2360	61,6
Diclofenaco	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

\bar{C} es la concentración media

f_D es la frecuencia de detección

Los estudios a nivel mundial han proporcionado una visión integral sobre la concentración y frecuencia de detección de compuestos emergentes en diversos ecosistemas acuáticos. No obstante, para contextualizar estos hallazgos en el marco de este trabajo, resulta fundamental examinar cómo se manifiestan estos compuestos en el entorno acuático nacional.

Se presentan tres estudios sobre sistemas hídricos a nivel nacional. El primero corresponde al Río Biobío, el segundo al Río Mapocho y, finalmente, al Río Maipo.

Para el primer estudio, se utilizó el volumen 59 de la revista “Gestión ambiental”, titulado “evaluación de la contaminación del río Biobío (Chile): priorización de sustancias

preocupantes bajo un enfoque ecotoxicológico”. La cuenca del Río Biobío, ubicada en el centro-sur de Chile (VIII región), con 24260 km de longitud en su curso principal, posee importantes fuentes de contaminación provenientes de la industria de papel y celulosa, plantas de refinación de petróleo y producción de azúcar. El estudio reveló la presencia de 16 contaminantes emergentes en los efluentes del río, incluyendo ibuprofeno, triclosán, cafeína y carbamazepina (Alonso et al., 2017).

Para el segundo estudio, se empleó el Artículo de la revista “Actas de la Academia Nacional de Ciencias” (PNAS) titulado “Contaminación farmacéutica de los ríos del mundo”, el mismo estudio presentado en la sección 1.5.1 “sistemas acuosos a nivel mundial” (Wilkinson, 2022).

Finalmente, para el último estudio se utilizó un Artículo de la Universidad de Chile titulado “Determinación de fármacos antiinflamatorios no esteroides en muestras de agua mediante HPLC-DAD en condiciones isocráticas”. Este estudio empleó la cromatografía líquida de alta eficiencia con detección por arreglo de diodos (HPLC-DAD), donde se evidenció la presencia de ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y ketoprofeno (Ascar et al., 2013).

A continuación, se presenta la Tabla 6, donde se resume los resultados extraídos de los tres estudios mencionados anteriormente para los compuestos emergentes de interés relacionados con la presente tesis.

Tabla 6: Concentración en sistemas hídricos a nivel nacional.

Compuesto	Río Biobío	Río Mapocho	Río Maipo
	[] media <i>ng/L</i>	[] media <i>ng/L</i>	[] media <i>ng/L</i>
Acetaminofén / paracetamol	N.D	58	N.D
Ibuprofeno	3800	N.D	572,6
Cafeína	1395	1433,75	N.D
Claritromicina	N.D	177	N.D
Naproxeno	N.D	243,75	401,4
Carbamazepina	1345	663,75	N.D
Metformina	N.D	4307,5	N.D
Diclofenaco	1945	N.D	874,1
Referencias	(Alonso et al., 2017)	(Wilkinson, 2022)	(Ascar et al., 2013)

1.3. Toxicidad

La toxicidad se define como el grado en que una sustancia puede ser nociva o dañina, tanto para la salud humana como para el medio ambiente. Este concepto permite evaluar el impacto potencial de diversas sustancias en los organismos y ecosistemas, y clasificar

en efectos crónicos y efectos agudos. Los efectos crónicos corresponden al daño causado tras una exposición prolongada, que puede durar meses o incluso años, y cuyos efectos persisten aun después de que la exposición ha cesado. En cambio, los efectos agudos son aquellos que se manifiestan tras una breve exposición, como h o d, y suelen estar asociadas a concentraciones más altas de la sustancia (UNICE, 2024).

El estudio de la toxicidad de compuestos farmacéuticos en organismos acuáticos es crucial para comprender su impacto en la biodiversidad y en las cadenas tróficas. Estos compuestos, diseñados para interactuar con sistemas biológicos humanos, pueden generar efectos adversos en concentraciones bajas, afectando organismos sensibles y alterando la dinámica de los ecosistemas. Algunos ejemplos de los efectos tóxicos en organismos acuáticos incluyen problemas en la reproducción, inhibición del crecimiento, alteraciones histológicas, efectos en la germinación, cambios morfológicos, interrupción de la metamorfosis, y en casos más graves, mortalidad de las especies (Zaira, 2016). La toxicidad se cuantifica mediante la concentración efectiva media (EC_{50}), que representa la concentración necesaria para que una sustancia pueda causar un efecto específico en el 50% de la población evaluada (Cartagena, 2011).

En la Tabla 7, se presenta la clasificación de sustancias tóxicas según sus valores de EC_{50} , aplicada a organismos acuáticos. Esta clasificación es un estándar importante para identificar el nivel de peligro de distintas sustancias químicas y evaluar sus riesgos ambientales

Tabla 7: Clasificación para las sustancias toxicas Fuente: (Cartagena, 2011).

Clasificación	Valor mg/L
Muy tóxicas para los organismos acuáticos	< 1
Tóxicas para los organismos acuáticos	1 – 10
Nocivas para los organismos acuáticos	10 – 100
No toxica	>100

Se han realizado diversos estudios sobre la toxicidad para compuestos farmacológicos, los cuales se presentan en la tabla 8.

Tabla 8: Concentración efectiva media medida en la bacteria *Vibrio fischeri*.

Compuesto	EC_{50}	Tiempo	Referencia
Paracetamol	310,7	5 min	(Ortiz et al., 2011)
	363,3	15 min	
Ibuprofeno	13,87	5 min	(Ortiz et al., 2011)
	16,49	15 min	
Cafeína	317	5 min	(Jenning & Rayner, 2001)
Claritromicina	N.D	N.D	N.D
Naproxeno	14,2	5 min	(Ortiz et al., 2011)
	17,92	15 min	
Carbamazepina	52,5	5 min	(Kim et al., 2007)
	52,2	15 min	
Metformina	N.D	N.D	N.D
Diclofenaco	18,08	5 min	(Ortiz et al., 2011)
	14,31	15 min	

A pesar de la información disponible sobre los valores de toxicidad (EC_{50}) para fármacos individuales en diferentes organismos, los estudios que evalúan la toxicidad de mezclas de estos compuestos son escasos. Esta falta de datos representa una importante brecha en el conocimiento, ya que en el ambiente los compuestos farmacéuticos no actúan de manera aislada, sino que coexisten en complejas combinaciones que pueden generar efectos sinérgicos o antagónicos. Por esta razón, uno de los enfoques principales de este trabajo es analizar la toxicidad de mezclas de fármacos en organismos acuáticos.

1.4. Técnicas de cuantificación de toxicidad

Existen diversas técnicas para medir toxicidad, las cuales son reguladas por organizaciones internacionales como la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), Organización Internacional de Normalización (ISO) y Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM). Estas organizaciones establecen normas y procedimientos estandarizados que son aceptados por sus miembros permitiendo realizar comparaciones entre estudios de diferentes regiones al garantizar que las metodologías empleadas son uniformes. A continuación, en la Tabla 9, se presentan ejemplos de protocolos aceptados a nivel internacional, los cuales emplean organismos de diferentes niveles tróficos, desde bacterias hasta animales de mayor tamaño, como peces (Agudelo et al., 2018).

Tabla 9: Protocolos internacionales para pruebas de toxicidad Fuente: (Agudelo et al., 2018).

Organismo	Norma / procedimiento / protocolo
OCDE	Directriz prueba No. 201: Algas y cianobacterias de agua dulce, Prueba de inhibición del crecimiento.
OCDE	Directriz prueba No. 202: <i>Daphnia sp.</i> , prueba de inmovilización inmediata.
OCDE	Directriz prueba No. 203: Peces, prueba de toxicidad aguda.
ISO	ISO 11348 Determinación del efecto inhibitor de muestras de agua sobre la emisión de luz de <i>Vibrio Fischeri</i> , prueba de bacterias luminiscentes.
ISO	ISO 12890 Determinación de la toxicidad para embriones y larvas de peces de agua dulce, método semiestático.
ISO	ISO 14669 Determinación de la toxicidad letal aguda para copépodos marinos (copépoda, crustácea).
ASTM	ASTM E729-96 Guía estándar para realizar pruebas de toxicidad aguda en materiales de prueba con peces, macroinvertebrados y anfibios.
ASTM	ASTM E1218-04 Guía estándar para la realización de pruebas de toxicidad estática con microalgas.
ASTM	ASTM E1193-97 Guía estándar para realizar pruebas de toxicidad del ciclo de vida de <i>Daphnia magna</i> .

Tras presentar las técnicas aceptadas internacionalmente, se describen brevemente las metodologías más reconocidas por su aplicación en toxicología ambiental.

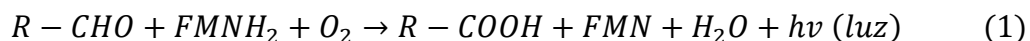
El protocolo “algas de agua dulce y cianobacterias, prueba de inhibición del crecimiento” (OECD Test No. 201) tiene como objetivo evaluar la toxicidad de sustancias químicas en microalgas de agua dulce y cianobacterias, determinando su efecto sobre el crecimiento durante un período estándar de 72 h. Este ensayo permite medir los efectos tóxicos a través de varias generaciones, gracias al crecimiento exponencial de los organismos en condiciones óptimas de luz y nutrientes. Los organismos de prueba recomendados incluyen especies como *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Desmodesmus subspicatus* y *Navicula pelliculosa*. Durante este ensayo se determina EC_{50} , es decir, la concentración que causa un 50% de inhibición en la tasa específica de crecimiento y concentración que produce un 50% de reducción en el rendimiento del crecimiento, además del NOEC y LOEC, es decir, concentraciones más bajas sin efecto observado y con efecto observado respectivamente. Para validar el test, los cultivos de control deben mostrar un crecimiento exponencial con un aumento de biomasa de al menos 16 veces durante las 72 h. Además, el coeficiente de variación de la tasa de crecimiento promedio en los controles no debe exceder el 7% para las especies más comunes (OCDE, 2006).

El protocolo "*Daphnia sp.* Prueba de inmovilización aguda" (OECD Test No. 202) tiene como objetivo evaluar la toxicidad aguda de sustancias químicas en organismos acuáticos, determinando la concentración efectiva media (EC_{50}) tras 48 h de exposición. Este ensayo se realiza utilizando organismos del género *Daphnia*, principalmente *Daphnia magna*, seleccionando individuos menores de 24 h. La exposición se lleva a cabo en sistemas controlados con agua reconstituida o natural, manteniendo un Ph entre 6.0 y 9.0, oxígeno disuelto superior a 3 mg/L y una temperatura constante entre 18 °C y 22 °C. Durante el ensayo, se evalúa la inmovilización de los organismos, considerándose inmovilizados aquellos que no puedan nadar tras 15 segundos de agitación suave. Para validar el ensayo, la inmovilización en los grupos control no debe superar el 10%, y las condiciones ambientales deben mantenerse dentro de los límites establecidos (OCDE, 2004).

El protocolo "Peces, prueba de toxicidad aguda" (OECD Test No. 203) tiene como objetivo evaluar la toxicidad aguda de compuestos químicos en peces, determinando la concentración efectiva media EC_{50} tras 96 h de exposición. Este ensayo se realiza utilizando especies de peces de agua dulce o marina, como *Danio rerio* (pez cebra) y *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris). La exposición puede llevarse a cabo en sistemas estáticos, semi-estáticos o de flujo continuo, bajo condiciones controladas. Se utiliza agua reconstituida con niveles de oxígeno disuelto superiores al 60% de saturación, un Ph entre 6.0 y 8.5 y una temperatura constante dentro del rango óptimo para la especie utilizada. Durante el ensayo, se monitorean parámetros como mortalidad, anomalías visibles (en comportamiento o apariencia) y otros signos subletales. Para validar el test, es indispensable que la mortalidad en los grupos control no supere el 10%, que las concentraciones químicas sean verificadas analíticamente y que las condiciones ambientales, como temperatura y oxígeno, se mantengan dentro de los límites establecidos (OCDE, 2019).

Tras revisar técnicas experimentales con peces, crustáceos y algas, se destaca también el uso de bacterias bioluminiscentes como *Vibrio fischeri*, una metodología rápida y sensible para evaluar toxicidad en medios acuáticos, la cual será empleada en este trabajo. La bacteria *Allivibrio fischeri*, también conocida como *Vibrio fischeri*, es un microorganismo marino capaz de emitir bioluminiscencia de forma natural gracias a su metabolismo, especialmente cuando se encuentra en su habitat. Esta bioluminiscencia resulta de una

serie de reacciones químicas catalizadas por la enzima luciferasa, la cual está asociada al mononucleótido de flavina FMN. La luciferasa actúa como la principal responsable de la emisión de luz en este proceso. Esta reacción bioquímica utiliza oxígeno molecular, un aldehído alifático de cadena larga y flavina mononucleótido reducida $FMNH_2$ como principales reactivos. Durante el proceso, la luciferasa cataliza la oxidación del aldehído a ácido carboxílico, mientras el $FMNH_2$ se oxida a FMN (flavina oxidada), liberando un fotón de luz (Brodl et al., 2018). La reacción puede representarse mediante la ecuación 1:



La intensidad de la bioluminiscencia está directamente relacionada con la actividad metabólica de la bacteria. En presencia de sustancias tóxicas, el metabolismo de *Vibrio fischeri* se ve afectado, lo que se traduce en una disminución de la emisión de luz. Este efecto puede deberse a la inhibición directa de la luciferasa, a la alteración en la disponibilidad de $FMNH_2$ o aldehídos, o al estrés celular generado por las sustancias presentes en el medio (Brodl et al., 2018).

Este ensayo sigue la Norma ISO 11348, titulada “Determinación del efecto inhibitorio de muestras de agua sobre la emisión de luz de *Vibrio fischeri* (pruebas de bacterias luminiscentes)”, la cual permite el uso de bacterias recién preparadas, secadas en líquido o liofilizadas. El alcance de esta norma abarca la evaluación de la toxicidad en aguas residuales, extractos y lixiviados acuosos, agua dulce, agua de mar, agua salobre y sustancias individuales diluidas en agua. Este ensayo mide la inhibición de la emisión de luz en muestra de prueba registrando la luminiscentes en intervalos de tiempos de 0, 5 y 15 min. Los resultados se corrigen con base en cambios de intensidad en las muestras de control durante el tiempo de exposición, y la inhibición se cuantifica mediante la concentración efectiva media EC_{50} , que representa la concentración de sustancias requerida para inhibir el 50% de la bioluminiscencia (ISO, 2019).

Para garantizar la validez del ensayo, se deben considerar factores que puedan alterar los resultados, como: sustancias que reaccionen con el agua de dilución, muestras coloreadas o turbias, muestras con alta demanda de oxígeno, nutrientes fácilmente biodegradables, muestras salinas o con concentraciones de sal que excedan la osmolaridad de una solución de $NaCl$ de 35 g/L (ISO, 2019).

Si bien las técnicas analíticas experimentales, como las que emplean peces, crustáceos, algas y bacterias, permiten evaluar la toxicidad de compuestos individuales, es necesario adoptar enfoques más complejos, como el diseño experimental de mezclas, para estudiar los efectos combinados de múltiples compuestos y sus interacciones.

1.5. Métodos estadísticos

El diseño simplex lattice, también conocido como diseño reticular, se utiliza en experimentos de mezclas para estudiar cómo las proporciones relativas de los componentes influyen en la respuesta del sistema. Este diseño distribuye los puntos experimentales de manera uniforme sobre un simplex (región experimental), la cual está definido por las proporciones de los componentes de la mezcla. Los puntos se generan dividiendo cada lado del simplex en intervalos iguales y calculando todas las combinaciones posibles de estos puntos. Esta metodología es particularmente adecuada para construir modelos polinomiales completos de un orden específico, ya que permite capturar las interacciones entre los diferentes componentes de la mezcla. Una de las principales ventajas del diseño simplex lattice es su simplicidad y su capacidad para proporcionar una representación detallada del comportamiento de la mezcla en función de sus proporciones (Gutiérrez & de la Vara, 2008).

El diseño simplex con centroide se caracteriza por seleccionar puntos clave dentro del simplex, como los vértices, los puntos medios de las aristas, los centroides de las caras y el centroide global, con el objetivo de capturar las interacciones principales entre los componentes de la mezcla. Aunque estos puntos están distribuidos de manera uniforme dentro del espacio experimental, a diferencia del diseño simplex lattice, no busca generar una malla completa que cubra exhaustivamente todas las combinaciones posibles. En su lugar, se enfoca en un subconjunto de puntos estratégicamente representativos, lo que lo hace ideal para modelos polinomiales de menor orden o cuando se desea reducir el número de experimentos manteniendo la calidad de la información obtenida (Gutiérrez & de la Vara, 2008).

El diseño de vértice extremo es utilizado cuando existen restricciones en las proporciones de los componentes de la mezcla, lo que reduce el tamaño del simplex inicial. En este diseño, los puntos experimentales se concentran en los vértices extremos definidos por las restricciones del diseño. Esta característica lo hace especialmente útil para sistemas

en los que no todas las combinaciones posibles son factibles debido a limitaciones químicas, físicas o prácticas (Gutiérrez & de la Vara, 2008).

Para propósitos de este trabajo, el diseño simplex lattice se considera más adecuado debido a que este método ofrece una cobertura uniforme y detallada del espacio experimental. Este diseño permite construir modelos polinomiales completos, incluyendo los puntos necesarios para analizar los efectos principales y las interacciones entre los componentes de la mezcla.

En contraste, el diseño simplex con centroide, aunque más eficiente en cuanto al número de experimentos requeridos, no ofrece una respuesta suficiente para considerar todas las interacciones relevantes en sistemas complejos, ya que este método es útil cuando se trabaja con modelos polinomiales de menor orden o con restricciones de tiempo y recursos, no garantiza una respuesta adecuada para sistemas con múltiples componentes presentes. Asimismo, el diseño de vértice extremo queda descartado, ya que está orientado a casos con restricciones en las proporciones de los componentes, lo cual no se aplica en este caso.

CAPÍTULO II OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la toxicidad de compuestos farmacológicos en soluciones acuosas sintéticas, tanto en sistemas monocomponentes como en sistemas multicomponentes.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar la toxicidad de los fármacos seleccionados en soluciones monocomponentes, estableciendo comparaciones con los valores reportados.
- Realizar un análisis estadístico para analizar el efecto de las mezclas multicomponentes sobre la toxicidad, buscando efectos significativos.
- Determinar la toxicidad de los fármacos en sistemas multicomponentes significativos, identificando posibles interacciones, efectos sinérgicos o antagónicos.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1. Materiales

- Equipo Microtox M500 modelo Modern Water
- Software MicrotoxOmni
- Software Minitab Statistical
- Solución de ajuste osmótico (OAS), solución de cloruro de sodio *NaCl* al 22%
- Diluyente, solución de cloruro de sodio *NaCl* al 2%
- Solución de reconstitución (RS), agua ultrapura tipo I
- Vial con bacteria *Vibrio fischeri* (reactivo)
- Cubetas
- Micropipetas 1000 μL , 500 μL , 250 μL y 10 μL
- Compuestos farmacológicos (Tabla 10)

Tabla 10: Caracterización de compuestos farmacológicos.

Principio activo	Contenido del principio activo mg	Fabricante utilizado	Excipientes
Paracetamol	500	Laboratorio Chile	Almidón pregelatinizado, polividona y ácido esteárico
Ibuprofeno	600	Laboratorio Chile	Almidón de maíz, almidón pregelatinizado, sodio almidón glicolato y ácido esteárico
Cafeína	200	VitaminLife	Celulosa microcristalina, estearato de magnesio y dióxido de silicio
Claritromicina	500	Chemopharma	Croscarmelosa sódica, polivinilpirrolidona, dióxido de silicio coloidal, estearato de magnesio y polisorbato 80
Naproxeno	550	Milab	Celulosa microcristalina, povidona K-30 y glicolato sódico de almidón de maíz tipo A
Carbamazepina	200	Andrómaco	Celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, carmelosa sódica y dióxido de silicio coloidal
Metformina	800	Laboratorio Chile	Povidona, crospovidona, celulosa microcristalina y ácido esteárico
Diclofenaco	100	CuraeSpring	Hipromelosa, lactosa monohidrato, almidón de maíz, povidona y dióxido de silicio coloidal

En el Anexo A “Procedimiento para las disoluciones” se presenta el paso a paso para preparar las tabletas de los compuestos farmacológicos para el procedimiento experimental con el equipo Microtox M500. Además, de que se indican las concentraciones iniciales para las soluciones mono y multicomponentes.

3.2. Metodología

La metodología de este trabajo se estructuró en dos secciones principales. La primera sección se centró en el análisis de la toxicidad para las soluciones monocomponentes, utilizando el equipo Microtox M500 y el software MicrotoxOmni, para determinar la concentración efectiva media (EC_{50}) de los fármacos individuales y de sus mezclas. Estos resultados se compararon con los valores reportados por la literatura. La segunda sección abordó el diseño de mezclas, en el que se describió el procedimiento llevado a cabo con el software Minitab Statistical, para establecer un orden estadístico para el diseño experimental, definir las proporciones de los componentes y analizar los puntos evaluados en el estudio. Además, en esta etapa se identificó posibles interacciones a través de efectos sinérgicos o antagónicos.

3.2.1. Procedimiento de toxicidad con Microtox M500

Una vez abierto el software MicrotoxOmni, se seleccionó la configuración de análisis básico y protocolo estándar, dado que estas opciones son adecuadas para aguas residuales y muestras con toxicidad desconocida. Luego, en la ventana emergente se configuró el número de muestras y las unidades en las que se trabajó. A continuación, se describen los pasos para llevar a cabo el análisis de una sola muestra:

1. Se colocaron las cubetas en las celdas: A1 a A5; B1 a B5; celda de reactivo (Reagent).
2. Se constituyó el reactivo agregando 1000 μL de RS al vial con reactivo, agitar vigorosamente y verter en la cubeta de reactivo (Reagent).
3. Se agregaron 500 μL de diluyente a las cubetas de B1 a B5.
4. Se agregaron 1000 μL de diluyente a las cubetas de A1 a A4.
5. Se agregaron 250 μL de OAS, 2500 de muestra (solución a estudiar) y descarte 750 μL de la cubeta A5.
6. Se transfirieron 1000 μL de A5 a A4; de A4 a A3; de A3 a A2 y descartar 1000 μL de la cubeta A2. Esperar 5 min.
7. Se reconstituyó el reactivo mezclando la cubeta con una pipeta de 500 μL .

8. Se transfirieron 10 μL de bacteria (cubeta Reagent) a las cubetas de B1 a B5, agitar y esperar 15 min.
9. Se colocó la cubeta B1 en la celda de lectura (Read) y presionar el botón “Set”. Una vez que el equipo indique luz verde, presionar Start en el software.
10. Se leyeron las cubetas B1 a B5.
11. Se transfirieron 500 μL de A1 a B1; A2 a B2; A3 a B3; A4 a B4; A5 a B5.
12. Se presionó Start en el software para iniciar el temporizador y leer nuevamente las cubetas de B1 a B5. Repetir el paso 12

En el Anexo B “Formulas para el cálculo de la concentración efectiva media (EC_{50})” se presentan los cálculos realizados para el obtener la toxicidad de cada mezcla. Además, debido a las diluciones realizadas en el paso 6, las cubetas quedaron con el siguiente porcentaje de las concentraciones iniciales: A5 (45%), A4 (22,5%), A3 (11,25%), A2 (5,63%) y A1, que correspondió a la muestra de control (0%). A continuación, en la Tabla 11 se presenta una tabla resumen con las concentraciones de cada vial.

Tabla 11: Concentración de viales para el experimento con el equipo Microtox M500.

Compuestos	Soluciones iniciales monocomponentes	A5 45%	A4 22,5%	A3 11,25%	A2 5,63%
Paracetamol	1000	450,0	225,0	112,5	56,3
Ibuprofeno	10	4,5	2,3	1,1	0,6
Cafeína	420	189,0	94,5	47,3	23,6
Naproxeno	40	18,0	9,0	4,5	2,3
Carbamazepina	100	45,0	22,5	11,3	5,6
Metformina	9500	4275,0	2137,5	1068,8	534,9
Diclofenaco	40	18,0	9,0	4,5	2,3

3.2.2. Diseño experimental

Para iniciar un diseño experimental en el programa, primero se accedió al menú principal y se seleccionaron las opciones **Estadísticas > DOE > Mezcla > Crear diseño de mezcla**. Al realizar esta acción, se abrió una ventana emergente que permitió configurar los parámetros del diseño.

En esta ventana emergente, se seleccionó el tipo de diseño (reticular simplex, centroide simplex o vértices extremo), el número de componentes, el grado del retículo, así como la opción de ampliar el diseño mediante puntos centrales o axiales. Además, se especificó el número de réplicas del diseño.

Para este trabajo, se seleccionó el diseño reticular simplex con 7 componentes y un grado de retículo de 2, lo que implicó que solo se estudiaron mezclas dobles. Por otra parte, se

amplió el diseño incluyendo puntos centrales y axiales, y las réplicas se realizó en los vértices y en el punto central. Con estos parámetros, se obtuvieron un total de 44 puntos experimentales, donde el programa generó una tabla de diseño aleatorizada. En este caso, las composiciones se expresaron como el porcentaje de cada una de las variables. En el Anexo C “Tabla de diseño aleatorizada” se presentó el diseño experimental a seguir, obtenido a través del programa.

Se seleccionó un grado de retículo de 2 para estudiar las mezclas dobles, debido a limitaciones de tiempo y recursos. De haberse optado por estudiar mezclas triples, el número de puntos experimentales habría incrementado a 100. Además, se decidió incluir puntos centrales y axiales, junto con réplicas en los vértices y punto central. Esta elección se basó en que el software utiliza estos puntos para evaluar la falta de ajuste de un modelo, lo que permitió una mejor precisión en los resultados obtenidos (Minitab, 2024a).

Una vez definido el diseño experimental, se debe realizar nuevamente el procedimiento del equipo Microtox M500, pero esta vez para las soluciones multicomponentes. En el Anexo D “curvas de calibración”, se presentaron las curvas obtenidas para cada fármaco, junto con una tabla resumen de los resultados correspondientes a estas curvas.

Por otro lado, para estudiar las posibles mezclas significativas, se analizó la tabla de coeficientes de regresión estimados, la cual se obtuvo a través del programa Minitab. Esta tabla incluyó un valor P, que permitió determinar cuáles mezclas eran significativas y cuáles no. Tras este análisis, para estudiar las posibles interacciones sinérgicas o antagónicas, se investigaron interacciones farmacodinámicas y farmacocinéticas. Aunque estas corresponden al cuerpo humano, sirvieron como referencia para explicar lo que ocurrió con la bacteria al exponerla a estas sustancias estudiadas.

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de medir la toxicidad de las soluciones monocomponentes, se presenta la Tabla 12.

Tabla 12: Comparación de toxicidad entre valores experimentales y de literatura.

Compuestos	EC_{50} 5 min	EC_{50} 15 min	EC_{50} 5 min Tabla 8	EC_{50} 15 min Tabla 8	Clasificación toxicológica
Paracetamol	360,9	402,9	310,7	363,3	No tóxico
Ibuprofeno	8,9	9,0	13,9	16,49	Tóxico
Cafeína	582,8	904,1	317	-	No tóxico
Naproxeno	44,4	44,9	14,2	17,92	Nocivo
Carbamazepina	138,4	106,0	52,5	52,2	No tóxico
Metformina	10869,9	7001,5	-	-	No tóxico
Diclofenaco	9,3	9,4	18,1	14,31	Tóxico

El paracetamol fue el único compuesto que mostró resultados consistentes con los valores reportados en la literatura. Los valores de EC_{50} obtenidos para el paracetamol a los 5 y 15 min (360,9 y 402,9 mg/L, respectivamente) se encuentran dentro del rango reportado de 310,7 – 363,3 mg/L, con diferencias de 16% y 11%, respectivamente. Estos resultados confirman que la toxicidad del paracetamol bajo las condiciones experimentales de este estudio fue similar a los valores previamente establecidos. En cuanto al ibuprofeno, los valores de EC_{50} obtenidos a los 5 y 15 min (8,9 y 9,0 mg/L, respectivamente) fueron inferiores a los valores reportados en la literatura (13,9 – 16,49 mg/L), con una reducción de 36% y 45%, respectivamente. Estos resultados indican una mayor toxicidad del ibuprofeno en las condiciones evaluadas, lo que puede deberse a las características específicas del sistema experimental y la sensibilidad de la cepa bacteriana utilizada. La cafeína presentó valores de EC_{50} a los 5 min (582,8 mg/L) y a los 15 min (904,1 mg/L), los que fueron significativamente más altos que el valor reportado de 317 mg/L en la literatura a los 5 min, mostrando un incremento de 84%. Sin embargo, debido a que no se dispone de un valor reportado en la literatura para cafeína a los 15 min y a la poca información reportada a los 5 min, la comparación es limitada. Para el naproxeno, los valores de EC_{50} obtenidos fueron 44,4 y 44,9 mg/L a los 5 y 15 min respectivamente, significativamente superiores al rango reportado de 14,2 a 17,92 mg/L, con incrementos de 213% a los 5 min y 151% a los 15 min evidencian que, bajo las condiciones de este estudio, el naproxeno manifestó una menor toxicidad que la reportada previamente. La carbamazepina, por otro lado, presentó valores de EC_{50} a los 5 y 15 min (138,4 y 106,0 mg/L) superando los valores reportados en la literatura (52,5 mg/L a 5 min y 52,2 mg/L a 15 min), con incrementos de 164% y 103%, respectivamente. Esta discrepancia puede

estar relacionada con el diluyente utilizado, ya que a pesar de que el metanol no se encontraba en una concentración tóxica, de igual forma pudo haber influido en el resultado. En el caso de metformina, no se dispone de datos comparativos en la literatura. Sin embargo, los valores obtenidos en este estudio para EC_{50} a los 5 y 15 min (10869,9 mg/L y 7001,5 mg/L, respectivamente) reflejaron una baja toxicidad en las condiciones evaluadas. Por último, el diclofenaco presentó valores de EC_{50} a los 5 y 15 min (9,3 y 9,4 mg/L, respectivamente) que fueron inferiores a los valores reportados en la literatura (18,1 – 14,31 mg/L), con una disminución de 49% y 34%. Este comportamiento indicó una mayor toxicidad del diclofenaco bajo las condiciones experimentales empleadas.

A pesar de la creciente cantidad de estudios sobre los contaminantes emergentes y la toxicidad de los fármacos en el medio ambiente, la información disponible sigue siendo limitada y las diferencias en las metodologías experimentales contribuyen a la variabilidad en los resultados. Las técnicas utilizadas, que incluyen bacterias recién preparadas, secadas en líquido o liofilizadas, junto con las variaciones en la preparación de muestras, su procedencia y las condiciones experimentales, explican en parte las discrepancias entre los datos obtenidos en este estudio y los reportados en la literatura. Esta variabilidad enfatiza la necesidad de estandarizar aún más los procedimientos experimentales y de seguir investigando las interacciones y efectos combinados de estos contaminantes y su impacto en el medio ambiente.

Finalmente, a partir de los resultados de EC_{50} obtenidos en esta investigación y según la Tabla 7 “clasificación para las sustancias tóxicas”, las sustancias se clasifican de la siguiente manera: el ibuprofeno y diclofenaco se consideran tóxicas para los organismos acuáticos, mientras que el naproxeno se clasifica como nocivo. Por otro lado, el paracetamol, cafeína, carbamazepina y metformina se considerarían no tóxicas, es decir, no se espera que tengan efectos adversos sobre los organismos acuáticos.

Una vez presentados los resultados obtenidos para las soluciones monocomponentes, es necesario expandir el análisis a las soluciones multicomponentes, que fueron evaluadas mediante el diseño experimental realizado. Este diseño permite observar las interacciones entre los diferentes fármacos y su efecto combinado en la toxicidad, lo cual permite visualizar el impacto de las mezclas en los organismos acuáticos. En el Anexo E “Resultado del diseño experimental para soluciones mono y multicomponentes” se presentaron los resultados correspondientes al diseño experimental.

A continuación, se comenzará con el análisis de los resultados obtenidos de los coeficientes de regresión del modelo para la toxicidad a los 5 min. Para el siguiente análisis tener en consideración que A corresponde a paracetamol, B corresponde a ibuprofeno, C corresponde a cafeína, D corresponde a naproxeno, E corresponde a carbamazepina, F corresponde a metformina y G corresponde a diclofenaco. Adicionalmente, en el Anexo F “Conceptos básicos para la comprensión del análisis estadístico” se presenta una definición detallada de los conceptos y parámetros que se verán a continuación.

Tabla 13: Coeficientes de regresión estimados para EC_{50} 5 min.

Término	Coefficiente	Error estándar del coeficiente	Valor T	Valor p	FIV
A	751	1058	*	*	1,92
B	182	1058	*	*	1,92
C	941	1058	*	*	1,92
D	406	1058	*	*	1,92
E	433	1058	*	*	1,92
F	11213	1058	*	*	1,92
G	405	1058	*	*	1,92
A*B	-4250	6591	-0,64	0,528	1,27
A*C	-5141	6591	-0,78	0,447	1,27
A*D	-3524	6591	-0,53	0,600	1,27
A*E	-4237	6591	-0,64	0,529	1,27
A*F	-12166	6591	-1,85	0,084	1,27
A*G	-3395	6591	-0,52	0,614	1,27
B*C	-5837	6591	-0,89	0,389	1,27
B*D	-4839	6591	-0,73	0,473	1,27
B*E	-5485	6591	-0,83	0,418	1,27
B*F	102753	6591	15,59	0,000	1,27
B*G	-4698	6591	-0,71	0,486	1,27
C*D	-4349	6591	-0,66	0,519	1,27
C*E	-4134	6591	-0,63	0,539	1,27
C*F	2574	6591	0,39	0,701	1,27
C*G	-3713	6591	-0,56	0,581	1,27
D*E	-4129	6591	-0,63	0,540	1,27
D*F	4357	6591	0,66	0,518	1,27
D*G	-3613	6591	-0,55	0,591	1,27
E*F	30838	6591	4,68	0,000	1,27
E*G	-4180	6591	-0,63	0,535	1,27
F*G	-16803	6591	-2,55	0,021	1,27

A partir de la Tabla 13, se puede inferir que las combinaciones de fármacos significativas son: ibuprofeno + metformina, carbamazepina + metformina y metformina + diclofenaco.

La combinación de ibuprofeno ($EC_{50} = 8,9 \text{ mg/L}$) y metformina ($EC_{50} = 10869,9 \text{ mg/L}$) puede resultar en una interacción antagónica en el medio ambiente ($EC_{50} = 32381,6 \text{ mg/L}$). El ibuprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), contiene un grupo ácido carboxílico ($-\text{COOH}$) y un anillo bencénico. En cambio, la metformina es un agente antidiabético de la clase de las biguanidas. En el medio ambiente, la combinación de ibuprofeno y metformina resultaría en una interacción que probablemente no aumentaría la toxicidad global, ya que la metformina no es tóxica ni nociva para los organismos acuáticos o terrestres, y el ibuprofeno podría alterar su metabolismo al disminuir su excreción. Esto podría llevar a una mayor concentración de metformina en los organismos expuestos, pero sin efectos tóxicos adicionales. Por tanto, aunque ambos compuestos interactúan en términos de metabolismo, la falta de toxicidad ambiental de la metformina implica que la combinación de estos fármacos no produciría un efecto tóxico combinado significativo (NIH, 2024).

A pesar de que no se han registrado interacciones farmacocinéticas ni farmacodinámicas significativas entre carbamazepina ($EC_{50} = 138,4 \text{ mg/L}$) y metformina ($EC_{50} = 10869,9 \text{ mg/L}$) en la literatura científica, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la combinación de estos dos compuestos resulta en una interacción antagónica ($EC_{50} = 14284,8 \text{ mg/L}$), es decir, una reducción de la toxicidad combinada en comparación con los efectos de cada fármaco por separado. Esto podría explicarse por el hecho de que, ambos fármacos tienen mecanismos de acción distintos, sus efectos antiinflamatorios e hipoglucemiantes respectivamente no se potencian mutuamente.

La combinación de metformina ($EC_{50} = 10869,9 \text{ mg/L}$) y diclofenaco ($EC_{50} = 9,3 \text{ mg/L}$) puede resultar en una interacción sinérgica en el medio ambiente ($EC_{50} = 2157,9 \text{ mg/L}$), ya que a pesar de que no se han registrado interacciones farmacocinéticas ni farmacodinámicas significativas entre ambos compuestos, además de que el valor de la mezcla aún está por encima del umbral para ser considerado como tóxico o nocivo para los organismos acuáticos, es decir, que la mezcla se considera como no tóxica para el medio ambiente, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la combinación de estos dos compuestos resulta en un aumento de la toxicidad en comparación con el EC_{50} de la metformina.

Por último, dado que el Factor de Inflación de la Varianza (FIV) es 1,27, se concluye que el modelo está moderadamente correlacionado. Esto significa que no hay indicios de multicolinealidad significativa entre los términos del modelo, lo que sugiere que los coeficientes son estables y confiables para la interpretación de los efectos de las mezclas.

Por otro lado, tenemos el análisis de los resultados obtenidos de los coeficientes de regresión del modelo para la toxicidad a los 15 min. Para el siguiente análisis tener en consideración que A corresponde a paracetamol, B corresponde a ibuprofeno, C corresponde a cafeína, D corresponde a naproxeno, E corresponde a carbamazepina, F corresponde a metformina y G corresponde a diclofenaco.

Tabla 14: Coeficientes de regresión estimados para EC_{50} 15 min.

Término	Coefficiente	Error estándar del coeficiente	Valor T	Valor p	FIV
A	636	718	*	*	1,92
B	87	718	*	*	1,92
C	1097	718	*	*	1,92
D	259	718	*	*	1,92
E	322	718	*	*	1,92
F	7235	718	*	*	1,92
G	248	718	*	*	1,92
A*B	-2562	4471	-0,57	0,575	1,27
A*C	-4625	4471	-1,03	0,316	1,27
A*D	-2288	4471	-0,51	0,616	1,27
A*E	-2493	4471	-0,56	0,585	1,27
A*F	-5156	4471	-1,15	0,266	1,27
A*G	-2144	4471	-0,48	0,638	1,27
B*C	-4803	4471	-1,07	0,299	1,27
B*D	-3103	4471	-0,69	0,498	1,27
B*E	-3252	4471	-0,73	0,478	1,27
B*F	74703	4471	16,71	0,000	1,27
B*G	-3008	4471	-0,67	0,511	1,27
C*D	-3586	4471	-0,80	0,434	1,27
C*E	-3035	4471	-0,68	0,507	1,27
C*F	10616	4471	2,37	0,030	1,27
C*G	-3228	4471	-0,72	0,481	1,27
D*E	-2256	4471	-0,50	0,621	1,27
D*F	5368	4471	1,20	0,247	1,27
D*G	-2248	4471	-0,50	0,622	1,27
E*F	2582	4471	0,58	0,572	1,27
E*G	-2343	4471	-0,52	0,607	1,27
F*G	-9935	4471	-2,22	0,041	1,27

A partir de la Tabla 14, se puede inferir que las combinaciones de fármacos significativas son: ibuprofeno + metformina, cafeína + metformina y metformina + diclofenaco.

Para los casos de ibuprofeno + metformina y metformina + diclofenaco, las interacciones sinérgicas o antagónicas de las mezclas se mantienen consistentes tanto a los 5 min como a los 15 min de estudio. Esto sugiere que los efectos de la combinación de estos compuestos no son significativamente alterados por el tiempo de exposición. Además, la explicación de dichas interacciones también se mantiene válida en ambos intervalos de tiempo.

Mientras que, la combinación de cafeína ($EC_{50} = 582,8 \text{ mg/L}$) y metformina ($EC_{50} = 10869,9 \text{ mg/L}$) podría resultar en una interacción antagónica en el medio ambiente ($EC_{50} = 7345,3 \text{ mg/L}$). Ya que a pesar de que no se han registrado interacciones farmacocinéticas ni farmacodinámicas significativas entre ambos compuestos, además de que el valor de la mezcla aún está por encima del umbral para ser considerado como tóxico o nocivo para los organismos acuáticos, es decir, que la mezcla se considera como no tóxica para el medio ambiente, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que aunque la toxicidad de la mezcla aumenta, dicha variación no es lo suficientemente marcada como para considerarla como una interacción sinérgica.

Una vez identificados y evaluados los efectos significativos de las mezclas a través de los coeficientes de regresión, es necesario realizar un análisis más detallado para comprender la calidad y validez del modelo ajustado. En este sentido, se procederá con el análisis del resumen del modelo, el análisis de varianza (ANOVA), y el ajuste y diagnóstico de las observaciones, los cuales permiten evaluar la capacidad predictiva del modelo y su adecuación a los datos experimentales. A través de estos métodos, se puede obtener una visión más profunda de la precisión de los coeficientes estimados y la confiabilidad de las predicciones realizadas, así como identificar posibles desviaciones o valores atípicos que puedan influir en la interpretación de los resultados. Además, se examinarán los gráficos diagnósticos correspondientes para asegurar que los supuestos del modelo se cumplan adecuadamente y que los resultados sean consistentes. A continuación, vamos a analizar el modelo de toxicidad a los 5 min.

Tabla 15: Resumen del modelo a los 5 min.

Desviación estándar S	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)	PRESS	R-cuadrado (pronosticado)
1508,80	97,51%	93,30%	5150324752	0,00%

A partir de los resultados presentados en la Tabla 15, podemos observar que tanto el R-cuadrado como el R-cuadrado ajustado son altos, lo que indica que el modelo es capaz de

explicar una porción significativa de la variabilidad en la respuesta. El R-cuadrado ajustado, al tener en cuenta el número de predictores en el modelo, muestra un valor ligeramente inferior, pero sigue siendo lo suficientemente alto, lo que sugiere que el modelo es adecuado para describir los datos experimentales. Es importante destacar que, aunque el R-cuadrado ajustado disminuye al considerar la cantidad de predictores, la reducción no es considerable, lo que indica una buena capacidad de explicación por parte del modelo. Por otro lado, el valor de la suma de cuadrados de error de predicción (PRESS), junto con el R-cuadrado pronosticado, sugiere que el modelo tiene limitaciones para predecir nuevos datos que no están incluidos en el conjunto inicial. Un R-cuadrado pronosticado de 0,00% y un PRESS alto indican que el modelo podría no ser lo suficientemente robusto para generalizarse a nuevos conjuntos de datos.

Finalmente, al analizar el valor de la desviación estándar (S) de 1508,80, se puede observar que aunque el modelo tiene un buen ajuste general, los errores de predicción tienen una variabilidad significativa. Esto implica que, aunque el modelo es adecuado para describir la variabilidad en los datos experimentales, los errores de predicción no son completamente consistentes, lo que podría reflejar ciertas desviaciones en los datos que no están completamente explicadas por el modelo.

Tabla 16: Análisis de varianza para 5 min.

Fuente	Grados de libertad	Suma secuencial de cuadrados	Suma ajustada de cuadrados	Cuadrados medios ajustados	Valor F	Valor p
Regresión	27	1424152402	1424152402	52746385	23,17	0,000
Lineal	6	753390790	198598285	33099714	14,54	0,000
Cuadrático	21	670761611	670761611	31941029	14,03	0,000
A*B	1	2950228	946350	946350	0,42	0,528
A*C	1	19989	1384867	1384867	0,61	0,447
A*D	1	38066	650561	650561	0,29	0,600
A*E	1	218823	940618	940618	0,41	0,529
A*F	1	21609137	7755502	7755502	3,41	0,084
A*G	1	74792	604039	604039	0,27	0,614
B*C	1	5687243	1784904	1784904	0,78	0,389
B*D	1	5393982	1226902	1226902	0,54	0,473
B*E	1	10144665	1576367	1576367	0,69	0,418
B*F	1	548771387	553208433	553208433	243,01	0,000
B*G	1	300673	1156459	1156459	0,51	0,486
C*D	1	640225	991226	991226	0,44	0,519
C*E	1	1943027	895552	895552	0,39	0,539
C*F	1	71037	347252	347252	0,15	0,701
C*G	1	77622	722173	722173	0,32	0,581

Continuación Tabla 16.

Fuente	Grados de libertad	Suma secuencial de cuadrados	Suma ajustada de cuadrados	Cuadrados medios ajustados	Valor F	Valor p
D*E	1	2342254	893395	893395	0,39	0,540
D*F	1	602940	994675	994675	0,44	0,518
D*G	1	60524	683850	683850	0,30	0,591
E*F	1	54522590	49826882	49826882	21,89	0,000
E*G	1	499097	915712	915712	0,40	0,535
F*G	1	14793310	14793310	14793310	6,50	0,021
Error residual	16	36423534	36423534	2276471		
Falta de ajuste	8	33268111	33268111	4158514	10,54	0,002
Error puro	8	3155423	3155423	394428		
Total	43	1460575936				

A partir de los resultados presentados en la Tabla 16, se puede inferir que el valor p global para la regresión es extremadamente bajo ($p = 0,000$), lo que confirma que el modelo tiene una buena capacidad de ajuste en general. En cuanto a los efectos lineales, se observó que los factores principales tienen un impacto significativo en la respuesta ($p = 0,000$), lo que implica que estos factores son importantes para modelar el EC_{50} . Los efectos cuadráticos también mostraron una alta significancia ($p = 0,000$), lo que sugiere que las interacciones no lineales entre los factores son esenciales para describir adecuadamente la variabilidad observada. El análisis de las interacciones entre los factores revela que varias combinaciones tienen un impacto significativo en la respuesta. En particular, las interacciones B*F ($p = 0,000$), E*F ($p = 0,000$) y F*G ($p=0,021$) son estadísticamente significativas, lo que implica que estas combinaciones de factores afectan de manera importante la toxicidad medida por el EC_{50} a los 5 min. Mientras que las que no son significativas, no tienen un efecto relevante en la respuesta y podrían no ser necesarias en el modelo. En términos de la falta de ajuste del modelo presenta un valor p de 0,002, lo que sugiere que el modelo presenta una falta de ajuste significativa, es decir, que las discrepancias entre los datos observados y los valores predichos no son atribuibles únicamente al error aleatorio, por lo que el modelo actual podría no ser completamente adecuado para describir los datos, esto podría estar relacionado con que el modelo solo describe las interacciones dobles, dejando afuera las interacciones triples en adelante, por lo que el modelo no está considerando términos o interacciones importantes.

Tabla 17: Ajuste y diagnóstico de cada observación a los 5 min.

Observación	Orden Estadístico	EC50 5 min	Ajuste	Error estándar de ajuste	Residuo	Residuo estandarizado	
1	42	9624	11213	1058	-1589	-1,48	
2	31	1035	4122	545	-3088	-2,19	R
3	9	67	-898	1473	965	2,96	R
4	26	12116	11213	1058	904	0,84	
5	22	15	-498	1473	513	1,57	
6	28	10	405	1058	-396	-0,37	
7	44	829	2987	459	-2157	-1,50	
8	41	107	433	1058	-326	-0,30	
9	12	32382	31385	1473	996	3,06	R
10	3	91	-439	1473	530	1,63	
11	36	200	161	545	39	0,03	
12	29	1105	2987	459	-1882	-1,31	
13	14	617	941	1058	-325	-0,30	
14	15	174	-414	1473	588	1,80	
15	18	264	-255	1473	518	1,59	
16	10	43	-916	1473	959	2,94	R
17	7	184	-271	1473	455	1,40	
18	38	11	182	1058	-170	-0,16	
19	21	7518	6899	1473	619	1,90	
20	16	375	-347	1473	721	2,21	R
21	23	170	433	1058	-263	-0,24	
22	34	403	1785	545	-1382	-0,98	
23	19	35	406	1058	-371	-0,34	
24	20	103	-613	1473	716	2,20	R
25	33	439	886	545	-447	-0,32	
26	2	306	-596	1473	902	2,77	R
27	8	6	182	1058	-175	-0,16	
28	40	54	406	1058	-352	-0,33	
29	35	10144	10849	545	-705	-0,50	
30	39	549	941	1058	-392	-0,36	
31	37	416	751	1058	-335	-0,31	
32	11	29	-1064	1473	1093	3,35	R
33	17	7345	6721	1473	625	1,92	
34	30	422	466	545	-44	-0,03	
35	24	14285	13532	1473	753	2,31	R
36	32	507	993	545	-487	-0,35	
37	5	191	-467	1473	658	2,02	R
38	4	222	-303	1473	525	1,61	
39	27	2158	1608	1473	550	1,69	
40	6	3502	2940	1473	561	1,72	
41	25	20	-626	1473	646	1,98	
42	1	306	751	1058	-445	-0,41	
43	43	9	405	1058	-396	-0,37	
44	13	9	-881	1473	890	2,73	R

R corresponde a los valores con residuos estandarizados superiores a 2 o inferiores a -2.

A partir de los resultados presentados en la Tabla 17, se pueden observar valores con residuos estandarizados superiores a 2 o inferiores a -2, como se observa en varios ensayos de la tabla, los cuales pueden indicar valores atípicos. Sin embargo, es importante recalcar que no se tiene certeza que estos puntos sean efectivamente atípicos, ya que la identificación de este valor depende del contexto y de la naturaleza de los datos, para ello se corroborara con gráficos de probabilidad normal y grafico de residuos vs valor ajustado. Estos residuos estandarizados elevados podrían ser el resultado de errores experimentales, tales como fallos en la medición, problemas en el procedimiento experimental o incluso errores de transcripción en los datos. Por otro lado, también es posible que estos residuos elevados reflejen valores atípicos genuinos, es decir, observaciones que no siguen el patrón general del modelo pero que representan fenómenos reales dentro del sistema estudiado. Al no realizar triplicado de las muestras debido a la limitación de tiempo y recursos no es posible eliminarlos para corroborar con certeza si corresponden a errores experimentales o datos atípicos genuinos. A continuación se mencionarán las soluciones mono o multicomponentes que presentan estos residuos estandarizados atípicos: punto axial en ibuprofeno (obs.2), ibuprofeno + cafeína (obs.3), ibuprofeno + metformina (obs.9), ibuprofeno + naproxeno (obs.16), cafeína + carbamazepina (obs.20), naproxeno + carbamazepina (obs.24), paracetamol + ibuprofeno (obs.26), ibuprofeno + carbamazepina (obs.32), carbamazepina + metformina (obs.35), paracetamol + carbamazepina (obs.37) y ibuprofeno + diclofenaco (obs.44).

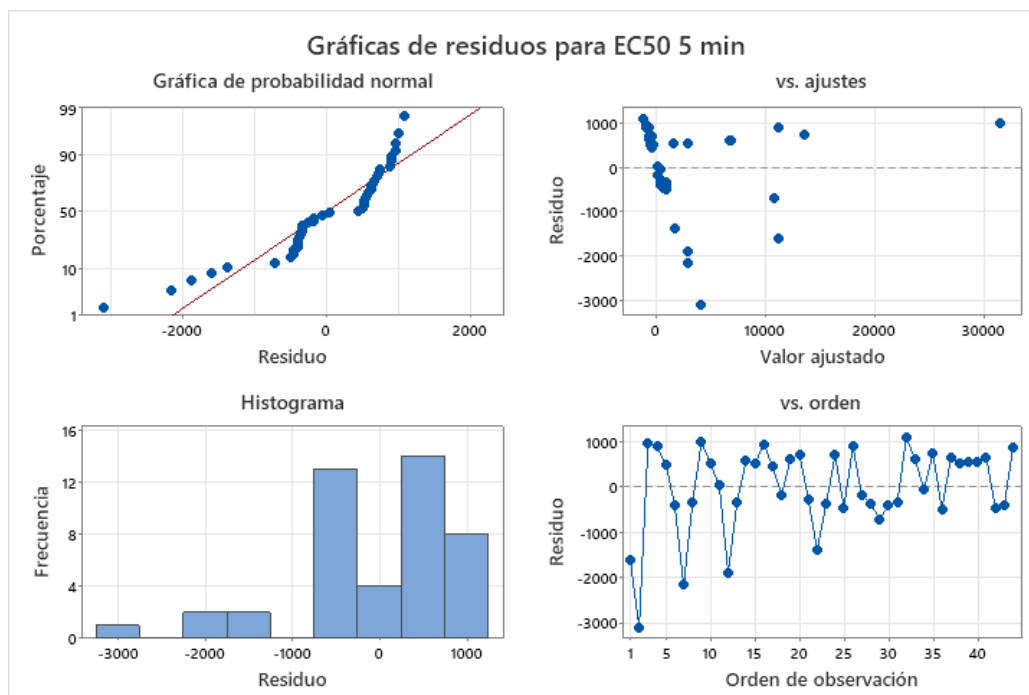


Figura 3: Graficas de residuos para EC_{50} a los 5 min.

A partir de los resultados mostrados en la figura 3, se observa que la gráfica de probabilidad normal se encuentra relativamente cerca de la línea roja, lo que sugiere que, en su mayoría, los residuos siguen una distribución normal. Sin embargo, el punto inferior izquierdo está ligeramente sesgado, lo que podría indicar que no todos los puntos siguen una distribución normal de manera perfecta, sugiriendo una ligera asimetría en los datos, a pesar de esto la aproximación a la normalidad es suficientemente adecuada asegurando la validez de los resultados obtenidos.

En el histograma de residuos, se observa un ligero sesgo hacia la derecha, lo que indica una asimetría en los datos. Este tipo de sesgo puede sugerir que hay una mayor concentración de residuos negativos, lo cual debe ser considerado al evaluar la validez de los supuestos del modelo. La presencia de asimetría podría afectar la distribución de los errores y, por ende, la precisión de las predicciones del modelo.

En el gráfico de residuos vs valor ajustado, los puntos se distribuyen de manera aleatoria a ambos lados del cero y no presentan patrones evidentes, lo que indica que los residuos están distribuidos aleatoriamente y cumplen con el supuesto de varianza constante (homocedasticidad). Sin embargo, se observan varios puntos con un residuo menor -1000 los cuales podrían corresponder a valores atípicos. Además, el punto correspondiente a la observación 9 (Ibuprofeno + Metformina) se encuentra relativamente alejado de las demás observaciones, lo que podría indicar que es un punto influyente, es decir, que tiene un impacto significativo en la estimación de los parámetros del modelo.

Finalmente, en la gráfica de residuos vs orden de observación, no se observan tendencias ni patrones claros, lo que sugiere que los residuos son independientes entre sí, cumpliendo con el supuesto de independencia.

Por otro lado, se analizará el modelo de toxicidad a los 15 min.

Tabla 18: Resumen del modelo a los 15 min.

Desviación estándar S	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)	PRESS	R-cuadrado (pronosticado)
1023,39	97,50%	93,29%	1916118674	0,00%

A partir de los resultados presentados en la Tabla 18, podemos observar que el R-cuadrado es de 97,50%, lo que indica que el modelo es capaz de explicar una gran proporción de la variabilidad en la respuesta. Sin embargo, al considerar el número de predictores en el modelo, el R-cuadrado ajustado disminuye a 93,29%, lo que sugiere que, aunque el

modelo sigue siendo bueno, la explicación de la variabilidad disminuye un poco al ajustarse por el número de variables.

En cuanto a la suma de cuadrados de error de predicción (PRESS), cuyo valor es 1916118674, junto con el R-cuadrado pronosticado de 0,00%, podemos observar que el modelo tiene limitaciones importantes para predecir nuevos datos fuera del conjunto original. Esto implica que el modelo es capaz de describir bien los datos que ha visto, pero no necesariamente se comportará bien con datos nuevos o con condiciones no observadas.

Finalmente, el valor de la desviación estándar (S) de 1023,39 sugiere que, aunque el modelo tiene un buen ajuste general, los errores de predicción tienen una variabilidad considerable. Este valor relativamente alto indica que, a pesar de la buena capacidad explicativa del modelo, las predicciones individuales no son completamente consistentes. Esto podría reflejar ciertas desviaciones en los datos o factores adicionales que el modelo no está capturando completamente, lo que limita su capacidad para hacer predicciones exactas.

Tabla 19: Análisis de varianza para 15 min.

Fuente	Grados de libertad	Suma secuencial de cuadrados	Suma ajustada de cuadrados	Cuadrados medios ajustados	Valor F	Valor p
Regresión	27	654076187	654076187	24225044	23,13	0,000
Lineal	6	325952734	81221518	13536920	12,93	0,000
Cuadrático	21	328123453	328123453	15624926	14,92	0,000
A*B	1	1505375	343799	343799	0,33	0,575
A*C	1	304086	1121009	1121009	1,07	0,316
A*D	1	895	274232	274232	0,26	0,616
A*E	1	859	325620	325620	0,31	0,585
A*F	1	5896978	1393068	1393068	1,33	0,266
A*G	1	35091	240796	240796	0,23	0,638
B*C	1	4374793	1208509	1208509	1,15	0,299
B*D	1	2973748	504590	504590	0,48	0,498
B*E	1	3324454	554039	554039	0,53	0,478
B*F	1	293235408	292400699	292400699	279,19	0,000
B*G	1	158264	474230	474230	0,45	0,511
C*D	1	983321	673718	673718	0,64	0,434
C*E	1	725589	482531	482531	0,46	0,507
C*F	1	6079246	5905396	5905396	5,64	0,030
C*G	1	248015	545810	545810	0,52	0,481
D*E	1	458498	266634	266634	0,25	0,621
D*F	1	1810406	1509859	1509859	1,44	0,247
D*G	1	98249	264742	264742	0,25	0,622

Continuación Tabla 19.

Fuente	Grados de libertad	Suma secuencial de cuadrados	Suma ajustada de cuadrados	Cuadrados medios ajustados	Valor F	Valor p
E*F	1	588110	349265	349265	0,33	0,572
E*G	1	150739	287723	287723	0,27	0,607
F*G	1	5171328	5171328	5171328	4,94	0,041
Error residual	16	16757359	16757359	1047335		
Falta de ajuste	8	13405824	13405824	1675728	4,00	0,033
Error puro	8	3351536	3351536	418942		
Total	43	670833546				

A partir de los resultados obtenidos en la Tabla 19, se observa que el valor p global para la regresión es extremadamente bajo ($p = 0,000$), lo que indica que el modelo tiene una buena capacidad de ajuste en general. En cuanto a los efectos lineales, el valor p de $0,000$ indica que los factores principales tienen un efecto significativo en la respuesta, lo que significa que estos factores son esenciales para modelar la toxicidad observada. Además, los efectos cuadráticos también muestran una alta significancia ($p = 0,000$), lo que sugiere que las interacciones no lineales entre los factores son cruciales para explicar adecuadamente la variabilidad de los EC_{50} a los 15 min.

Al analizar las interacciones entre los factores, se puede ver que varias combinaciones tienen un impacto significativo en la respuesta. En particular, las interacciones B * F ($p = 0,000$), C*F ($p = 0,048$) y F*G ($p = 0,041$) son estadísticamente significativas, lo que indica que estas combinaciones de factores tienen un efecto importante sobre la toxicidad medida. Mientras que las que no son significativas, no tienen un efecto relevante en la respuesta y podrían no ser necesarias en el modelo. En términos de la falta de ajuste del modelo presenta un valor p de $0,033$, lo que sugiere que el modelo presenta una falta de ajuste significativa, es decir, que las discrepancias entre los datos observados y los valores predichos no son atribuibles únicamente al error aleatorio, por lo que el modelo actual podría no ser completamente adecuado para describir los datos, esto podría estar relacionado con que el modelo solo describe las interacciones dobles, dejando afuera las interacciones triples en adelante, por lo que el modelo no está considerando términos o interacciones importantes.

Tabla 20: Ajuste y diagnóstico de cada observación a los 15 min.

Observaciones	Orden estadístico	EC50 15 min	Ajuste	Error estadístico de ajuste	Residuo	Residuo estandarizado	
1	42	5773	7235	718	-1462	-2,00	R
2	31	769	2990	370	-2220	-2,33	R
3	9	74	-608	999	683	3,09	R
4	26	8230	7235	718	995	1,36	
5	22	12	-309	999	320	1,45	
6	28	9	248	718	-239	-0,33	
7	44	734	2090	311	-1356	-1,39	
8	41	99	322	718	-222	-0,30	
9	12	22939	22337	999	602	2,72	R
10	3	83	-290	999	373	1,69	
11	36	202	181	370	21	0,02	
12	29	919	2090	311	-1170	-1,20	
13	14	1298	1097	718	201	0,27	
14	15	192	-218	999	410	1,86	
15	18	228	-135	999	362	1,64	
16	10	38	-603	999	640	2,90	R
17	7	189	-94	999	283	1,28	
18	38	12	87	718	-76	-0,10	
19	21	5419	5089	999	330	1,49	
20	16	358	-49	999	408	1,84	
21	23	113	322	718	-209	-0,29	
22	34	355	651	370	-295	-0,31	
23	19	32	259	718	-227	-0,31	
24	20	92	-274	999	365	1,65	
25	33	400	715	370	-316	-0,33	
26	2	324	-279	999	603	2,73	R
27	8	6	87	718	-81	-0,11	
28	40	58	259	718	-201	-0,28	
29	35	7239	7285	370	-45	-0,05	
30	39	510	1097	718	-587	-0,80	
31	37	458	636	718	-178	-0,24	
32	11	29	-609	999	637	2,88	R
33	17	7192	6820	999	372	1,68	
34	30	448	505	370	-57	-0,06	
35	24	4751	4424	999	327	1,48	
36	32	504	1115	370	-611	-0,64	
37	5	184	-145	999	328	1,49	
38	4	207	-125	999	331	1,50	
39	27	1539	1258	999	282	1,27	
40	6	2939	2646	999	293	1,32	
41	25	16	-301	999	317	1,44	
42	1	348	636	718	-288	-0,39	
43	43	10	248	718	-238	-0,33	
44	13	8	-585	999	592	2,68	R

R corresponde a los valores con residuos estandarizados superiores a 2 o inferiores a -2.

A partir de los resultados presentados en la Tabla 20, se observa que ocho valores tienen residuos estandarizados mayores que 2 o menores que -2 (denotados por una R a la derecha de la tabla), lo que puede ser indicativo de valores atípicos. Sin embargo, es importante destacar que, aunque estos puntos pueden parecer atípicos, no es posible asegurar con certeza que sean valores atípicos genuinos, ya que la identificación de tales puntos depende del contexto experimental y de la naturaleza de los datos. Por ello, es esencial corroborar estos resultados con gráficos de probabilidad normal y gráfico de residuos vs valor ajustado para obtener una mejor comprensión de la distribución de los residuos. Los residuos elevados podrían ser causados por errores experimentales, como fallos en la medición, problemas en el procedimiento experimental o incluso errores de transcripción en los datos. Sin embargo, también es posible que estos residuos elevados reflejen valores atípicos genuinos, lo que significa que representan observaciones que no siguen el patrón general del modelo, pero que son representativas de fenómenos reales dentro del sistema estudiado. Al no realizar triplicado de las muestras debido a la limitación de tiempo y recursos no es posible eliminarlos para corroborar con certeza si corresponden a errores experimentales o datos atípicos genuinos. A continuación se mencionarán las soluciones mono o multicomponentes que presentan estos residuos estandarizados atípicos: metformina (obs.1), punto axial en ibuprofeno (obs.2), ibuprofeno + cafeína (obs.3), ibuprofeno + metformina (obs.9), ibuprofeno + naproxeno (obs.16), paracetamol + ibuprofeno (obs.26), ibuprofeno + carbamazepina (obs.32) e ibuprofeno + diclofenaco (obs.44).

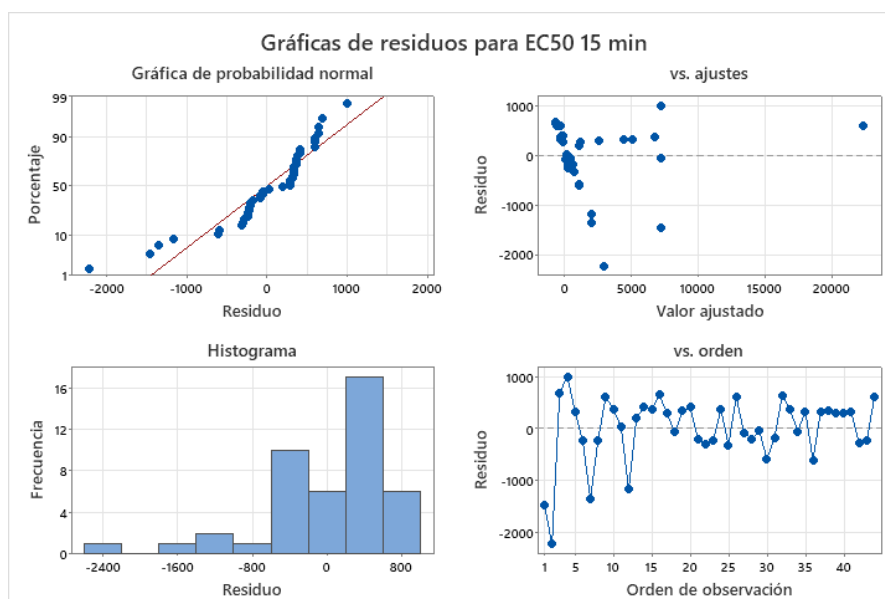


Figura 4: Gráficas de residuos para EC_{50} a los 15 min.

A partir de los resultados mostrados en la figura 4, se observa que la gráfica de probabilidad normal presenta los residuos relativamente cercanos a la línea roja, lo que sugiere que, en su mayoría, los residuos siguen una distribución normal. Sin embargo, se puede identificar que el punto inferior izquierdo está considerablemente alejado de la línea, lo que indica que no todos los puntos siguen una distribución normal de manera perfecta. Esta ligera desviación podría sugerir la presencia de una asimetría en los datos que podría afectar la precisión de las predicciones y la validación del modelo, a pesar de esto la aproximación a la normalidad es suficientemente adecuada asegurando la validez de los resultados obtenidos.

En el histograma de residuos, se observa un ligero sesgo hacia la derecha, lo que indica una asimetría en los datos. Este tipo de sesgo puede sugerir que hay una mayor concentración de residuos negativos, lo cual debe ser considerado al evaluar la validez de los supuestos del modelo. La presencia de asimetría podría afectar la distribución de los errores y, por ende, la precisión de las predicciones del modelo.

En el gráfico de residuos vs valor ajustado, los puntos se distribuyen de manera aleatoria a ambos lados del cero, sin mostrar patrones evidentes, lo que sugiere que los residuos están distribuidos aleatoriamente y cumplen con el supuesto de varianza constante (homocedasticidad). Sin embargo, se observan varios puntos con un residuo menor a -1000 los cuales podrían corresponder a valores atípicos. Además, el punto correspondiente a la observación 9 (Ibuprofeno + Metformina) se encuentra relativamente alejado de las demás observaciones, lo que podría indicar que es un punto influyente, es decir, que tiene un impacto significativo en la estimación de los parámetros del modelo.

Finalmente, en la gráfica de residuos vs orden de observación, no se observan tendencias ni patrones claros, lo que sugiere que los residuos son independientes entre sí, cumpliendo con el supuesto de independencia. Este es un buen indicador de que el modelo no está siendo afectado por dependencias temporales o secuenciales en las observaciones, lo que mejora la validez del modelo y la fiabilidad de las conclusiones extraídas.

A partir de los resultados obtenidos para los modelos a los 5 min y a los 15 min, se pueden identificar tanto similitudes como diferencias clave. Ambos modelos muestran un buen ajuste global con R-cuadrado altos (97,51% para los 5 min y 97,50% para los 15 min), lo que indica que la mayoría de la variabilidad de la respuesta está explicada por los factores incluidos. Además, en ambos casos se observa que los efectos lineales y cuadráticos son

estadísticamente significativos, lo que resalta la importancia de las interacciones no lineales para describir la variabilidad de la toxicidad. Sin embargo, ambos modelos tienen limitaciones predictivas, ya que el R-cuadrado pronosticado es bajo (0%) y el PRESS es alto, lo que sugiere que los modelos no son lo suficientemente robustos para predecir datos nuevos fuera del conjunto original, además podemos observar que el modelo a los 5 min tiene un R-cuadrado ajustado de 93,30%, mientras que el modelo a los 15 min muestra un R-cuadrado ajustado de 93,29%, lo que indica que ambos modelos tienen una buena capacidad explicativa al ajustarse por el número de predictores. Además, la desviación estándar del modelo a los 15 min es menor con un valor de 1023,39 frente a 1508,80 a los 5 min, lo que sugiere que los errores de predicción son más variables en el modelo a los 5 min. En conclusión, aunque ambos modelos muestran una buena capacidad explicativa de la variabilidad observada, el modelo a los 15 min tiene una mayor robustez en términos de ajuste y predicción, mientras que el modelo a los 5 min presenta más problemas de generalización y variabilidad en los errores de predicción.

CAPITULO V CONCLUSIONES

La recopilación y análisis de la información disponible en la literatura científica sobre los niveles de toxicidad de fármacos son fundamentales para establecer las concentraciones iniciales de este trabajo. A partir de los resultados obtenidos en este estudio, los compuestos farmacológicos más tóxicos para los ecosistemas acuáticos son el ibuprofeno (EC_{50} promedio de 8,9 mg/L) y el diclofenaco (EC_{50} promedio de 9,2 mg/L). mientras que el naproxeno (EC_{50} promedio de 44,4 mg/L) se considera como nocivo para estos ecosistemas. Además, se identifica una clara necesidad de realizar más estudios para abordar los efectos a largo plazo de estas sustancias en el medio ambiente, especialmente en soluciones multicomponentes.

La comparación de la toxicidad de los fármacos seleccionados en soluciones monocomponentes con los valores reportados refleja en su mayoría una similitud, ya que presentan el mismo orden de magnitud. Sin embargo, también se identifican valores que no son tan cercanos a la literatura, como la cafeína (EC_{50} DE 582 mg/L, reportado de 317 mg/L) y la carbamazepina (EC_{50} de 138 mg/L, reportado de 53 mg/L) los cuales puede deberse a diferencias en la cepa de la bacteria utilizada, la metodología o en las condiciones experimentales.

El desarrollo de un diseño experimental permite encontrar las interacciones significativas del modelo, ibuprofeno - metformina, carbamazepina - metformina, cafeína - metformina y metformina - diclofenaco. Además, se concluye que los modelos tienen un buen ajuste global y predicciones, respetando los supuestos de normalidad, varianza constante, aleatoriedad e independencia.

Finalmente, la interacción significativa que muestra un efecto sinérgico es metformina - diclofenaco. Mientras que para ibuprofeno - metformina, cafeína - metformina y carbamazepina - metformina se observa una interacción antagónica. A partir de estos resultados, se nota que en su mayoría la metformina disminuye la toxicidad de los fármacos con los que tiene algún tipo de interacción.

CAPITULO VI BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo, E., Gaviria, L., Barrios, L., & Cardona, S. (2018). Técnicas para determinar la toxicidad en aguas residuales industriales contaminadas con colorantes y pigmentos. *DYNA (Colombia)*, 85(207), 316–327. <https://doi.org/10.15446/dyna.v85n207.71915>
- Alonso, Á., Figueroa, R., & Castro, P. (2017). Evaluación de la contaminación del río Biobío (Chile): priorización de sustancias de interés bajo un enfoque ecotoxicológico. *Gestión Ambiental*, 59(5), 856–869. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0824-5>
- Alvariza, S., Bentancur, C., Eiraldi, R., & Fagiolino, P. (2010). *Guía de farmacocinética*. https://www.cse.udelar.edu.uy/wp-content/uploads/2017/11/001_CSE_alvariza_eiraldi_bentancur_fagiolino-1.pdf
- Ascar, L., Ahumada, I., López, A., Quintanilla, F., & Leiva, K. (2013). Determinación de fármacos antiinflamatorios no esteroideos en muestras de agua mediante HPLC-DAD en condiciones isocráticas. *Revista de La Sociedad Brasileña de Química*, 24(7), 1160–1166. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130150>
- Banco de medicamentos en línea. (2024a). *Banco de medicamentos*. Acetaminofeno. Recuperado 14 de noviembre de 2024, de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00316>
- Banco de medicamentos en línea. (2024b). *Banco de medicamentos*. Ibuprofeno. Recuperado 14 de noviembre de 2024, de <https://go.drugbank.com/drugs/DB01050>
- Banco de medicamentos en línea. (2024c). *Banco de medicamentos*. Cafeína. Recuperado 14 de noviembre de 2024, de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00201>
- Banco de medicamentos en línea. (2024d). *Banco de medicamentos*. Claritromicina. Recuperado 14 de noviembre de 2024, de <https://go.drugbank.com/drugs/DB01211>
- Banco de medicamentos en línea. (2024e). *Banco de medicamentos*. Naproxeno. Recuperado 14 de noviembre de 2024, de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00788>
- Banco de medicamentos en línea. (2024f). *Banco de medicamentos*. Carbamazepina. Recuperado 14 de noviembre de 2024, de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00564>
- Banco de medicamentos en línea. (2024g). *Banco de medicamentos*. Metformina. Recuperado 14 de noviembre de 2024, de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00331>

- Banco de medicamentos en línea. (2024h). *Banco de medicamentos*. Diclofenaco. Recuperado 14 de noviembre de 2024, de <https://go.drugbank.com/drugs/DB00586>
- Brodl, E., Winkler, A., & Macheroux, P. (2018). Mecanismos moleculares de la bioluminiscencia bacteriana. In *Revista de Biotecnología Computacional y Estructural* (Vol. 16, pp. 551–564). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.003>
- Cartagena, C. (2011). *Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos* (Vol. 8, Issue 2). http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-44492011000200016&script=sci_arttext
- Cavazzoni, P. (2023). *Centro de evaluación e investigación de medicamentos. Nuevas aprobaciones de terapias farmacológicas 2022*. <https://www.fda.gov/media/164429/download?attachment>
- Cavazzoni, P. (2024). *Centro de evaluación e investigación de medicamentos. Nuevas aprobaciones de terapias farmacológicas 2023*. <https://www.fda.gov/media/175253/download?attachment>
- Chemopharma. (2024). *Chemopharma*. Bioequivalente: Claritromicina. Recuperado 20 de noviembre de 2024, de <https://chemopharma.cl/producto/claritromicina-500-mg/>
- Correia, A., & Marcano, L. (2015). *Presencia y eliminación de compuestos farmacéuticos en plantas de tratamientos de aguas residuales. Revisión a nivel mundial y perspectiva nacional.*: Vol. LV (Issue 1). https://www.researchgate.net/publication/285599120_Presencia_y_eliminacion_de_compuestos_farmacuticos_en_plantas_de_tratamientos_de_aguas_residuales_Revision_a_nivel_mundial_y_perspectiva_nacional
- Escobar, J. (2002). *La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar*. CEPAL, División de Recursos Naturales e Infraestructura. <https://repositorio.cepal.org/entities/publication/457595f8-9384-4046-92c7-afbab7f351f6>
- Escobar, M., & García-Calvo, E. (2019). *Contaminantes emergentes: origen y destino*. https://ebuah.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/41874/TFM_Martin_Escobar_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- FDA. (2024). *Administración de Alimentos y Medicamentos*. FDA En Un Vistazo. Recuperado 26 de noviembre de 2024, de <https://www.fda.gov/about-fda/economics-staff/fda-glance>
- Gutiérrez, H., & de la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*.
- ISO. (2019). *Determinación del efecto inhibidor de muestras de agua sobre la emisión de luz de Vibrio fischeri (prueba de bacterias luminiscentes)*.
- ISP. (2024). *Unidades anuales vendidas*.
- Janet, M., Soto, A., Usma, J., & Gutiérrez, O. (2012). *Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos* (Vol. 7, Issue 2). <http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v7n2/v7n2a05.pdf>
- Jenning, V., & Rayner, M. (2001). *Evaluación de la toxicidad química con la fotobacteria bioluminiscente (Vibrio fischeri) : una comparación de tres sistemas comerciales*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135401000677>
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P. G., & Park, J. (2007). Toxicidad acuática del acetaminofeno, la carbamazepina, la cimetidina, el diltiazem y seis sulfonamidas principales y sus posibles riesgos ecológicos en Corea. *Medio Ambiente Internacional*, 33(3), 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.017>
- Laboratorio Chile. (2024a). *Laboratorio Chile*. Productos: Paracetamol. Recuperado 25 de noviembre de 2024, de <https://www.laboratoriochile.cl/producto/paracetamol-500-mg/>
- Laboratorio Chile. (2024b). *Laboratorio Chile*. Productos: Ibuprofeno. Recuperado 25 de noviembre de 2024, de <https://www.laboratoriochile.cl/producto/ibuprofeno-600-mg/#>
- Laboratorio Chile. (2024c). *Laboratorio Chile*. Productos: Metformina. Recuperado 25 de noviembre de 2024, de <https://www.laboratoriochile.cl/producto/metformina-850-mg/#>
- Le, J. (2022). *Manual MSD*. Metabolismo de Los Fármacos. <https://www.msmanuals.com/es/professional/farmacolog%C3%ADa-cl%C3%ADnica/farmacocin%C3%A9tica/metabolismo-de-los-f%C3%A1rmacos>

- Maya, D. (2007). *MEDWAVE*. Farmacocinética: Eliminación. <https://doi.org/http://doi.org/10.5867/medwave.2007.05.3450>
- Milab. (2024). *Milab*. Productos: Naproxeno Sódico. Recuperado 25 de noviembre de 2024, de <https://milab.cl/producto/naproxeno-na-550mg-rec-10-be/>
- Minitab. (2024a). *Diseño de mezclas agregando puntos centrales y axiales*. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/supporting-topics/mixture-designs/how-minitab-augments-designs/>
- Minitab. (2024b). *Sistema triangular de coordenadas*. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/supporting-topics/mixture-designs/triangular-coordinate-system/>
- MINSAL. (2015). *Ministerio de Salud*. Medicamentos. <https://www.minsal.cl/medicamentos/#:~:text=Producto%20farmac%C3%A9utico%20o%20medicamento%20es,en%20beneficio%20de%20la%20persona>
- Modern Water. (2024). *Microtox, manual de toxicidad aguda*.
- NIH. (2024). *Química pública: metformina*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4091>
- OCDE. (2004). *Directriz de ensayo N°202: “Daphnia sp. prueba de inmovilización aguda.”* https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test_9789264069947-en
- OCDE. (2006). *Directriz de ensayo N°201: “algas de agua dulce y cianobacterias, prueba de inhibición del crecimiento.”* https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test_9789264069923-en
- OCDE. (2019). *Directriz de ensayo N°203: “prueba de toxicidad aguda en peces.”* https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-203-fish-acute-toxicity-test_9789264069961-en
- OMS. (2024). *Organización Mundial de la Salud*. Clasificación Química Terapéutica Anatómica (ATC). <https://www.who.int/tools/atc-ddd-toolkit/atc-classification>

- Ortiz, S., Pinto, G., & García, P. (2011). *Evaluación ecotoxicológica de productos farmacéuticos y de higiene personal como medida para la prevención de la contaminación en ambientes acuáticos*.
https://www.researchgate.net/publication/302871928_Evaluacion_ecotoxicologica_de_productos_farmaceuticos_y_de_higiene_personal_PPCPs_como_medida_para_la_preencion_de_la_contaminacion_en_ambientes_acuaticos
- RAE. (2024). *Real Academia Española*. Contaminante.
<https://dpej.rae.es/lema/contaminante>
- Roth. (2024). *Ficha de datos de seguridad, Agua destilada*.
- ThermoFisher. (2023a). *Ficha de datos de seguridad, Acetona*.
- ThermoFisher. (2023b). *Ficha de datos de seguridad, Metanol*.
- UNICE. (2024). *Peligros para el medio ambiente*.
https://unece.org/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/Spanish/04-parte4-sp.pdf
- VitaminLife. (2024). *VitaminLife. Cafeína 200 Mg x 60 Capsulas*.
<https://www.vitaminlife.cl/productos/caffeine-60caps/>
- Wilkinson, J. (2022). *Contaminación farmacéutica de los ríos del mundo*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119/-/DCSupplemental>
- Zaira, C. (2016). *Ensayos de ecotoxicidad de los fármacos y efectos tóxicos en el medio ambiente*. <https://www.redalyc.org/pdf/919/91949104007.pdf>

CAPITULO VII ANEXOS

ANEXO A “Procedimiento para las disoluciones”

Primero se definieron las concentraciones iniciales de las soluciones monocomponentes, las cuales se utilizaron como base para preparar las mezclas. Estas concentraciones se determinaron a partir de datos bibliográficos, específicamente los valores de concentración efectiva media (EC_{50}) que se encuentran en la Tabla 8. A continuación, se presentan las concentraciones iniciales utilizadas en este trabajo:

Tabla 21: Concentraciones iniciales para las soluciones monocomponentes y multicomponentes.

Compuestos	Soluciones monocomponentes	Soluciones multicomponentes
Paracetamol	1000	500
Ibuprofeno	10	5
Cafeína	420	210
Claritromicina	10	5
Naproxeno	40	20
Carbamazepina	100	50
Metformina	9500	4750
Diclofenaco	40	20

Una vez definidas las concentraciones, se calculó la masa de la tableta necesaria para preparar las disoluciones, considerando tanto el compuesto activo como los excipientes presentes en cada pastilla. Es importante hacer la distinción entre los subíndices utilizados: el subíndice “pastilla” hace referencia al compuesto activo más los excipientes presentes en el comprimido, mientras que el subíndice “compuesto” corresponde únicamente al compuesto activo.

$$M_{tableta} = \frac{M_{pastilla} \cdot (C_{compuesto} \cdot V)}{M_{compuesto}} \quad (2)$$

Donde $M_{pastilla}$ es la masa de pastilla en miligramos (mg), $C_{compuesto}$ es la concentración del compuesto activo deseada en las soluciones monocomponentes, en miligramo por litro (mg/L), V es el volumen en litros (L) en el que se realizara la dilución y $M_{compuesto}$ es la masa del compuesto activo por pastilla en miligramos (mg).

Una vez obtenida la masa necesaria de la tableta para cada pastilla, se realizó el siguiente procedimiento:

1. **Pesado de la tableta:** Se pesó la tableta empleando los resultados de la ecuación
- 2.

2. **Trituración y transferencia:** Se trituró la pastilla en un mortero y se transfirió a un matraz aforado de 100 mL.
3. **Aforado del matraz:** Se aforó el matraz con el diluyente correspondiente, indicado en la Tabla 24.
4. **Sonicación:** El matraz aforado se colocó en un sonicador durante 30 minutos.
5. **Preparación del sistema de filtración:** Se ensambló un sistema de filtración que incluía un matraz Kitasato, un tapón de silicona, una bomba y un embudo con papel filtro.
6. **Filtración:** Se filtró la disolución obtenida del sonicador utilizando el sistema preparado.

A continuación, se presenta el diluyente utilizado para cada fármaco, junto con su respectivo EC_{50} . El objetivo de este análisis es corroborar que se está midiendo únicamente la toxicidad del compuesto activo y no la del diluyente.

Tabla 22: Toxicidad de diluyentes utilizados en los fármacos.

Compuestos	Diluyente	EC_{50} mg/L	Referencia
Paracetamol	Agua	No toxico	(Roth, 2024)
Ibuprofeno	Metanol	40000 15 min 43000 5 min	(ThermoFisher, 2023b)
Cafeína	Agua	No toxico	(Roth, 2024)
Claritromicina	Acetona	14500 15 min	(ThermoFisher, 2023a)
Naproxeno	Agua	No toxico	(Roth, 2024)
Carbamazepina	Metanol	40000 15 min 43000 5 min	(ThermoFisher, 2023b)
Metformina	Agua	No toxico	(Roth, 2024)
Diclofenaco	Agua	No toxico	(Roth, 2024)

Como se puede ver en la Tabla 22, tanto el metanol como la acetona son diluyentes tóxicos. Para evitar que la toxicidad de estos diluyentes afecte los resultados, se preparará una solución madre con una alta concentración del diluyente. Al diluir esta solución madre a la concentración requerida de compuesto activo para los experimentos, la concentración final del diluyente será lo suficientemente baja como para que su toxicidad no influya en la medición de la toxicidad de los fármacos.

En el caso del ibuprofeno y la carbamazepina, resulto la propuesta de hacer una solución madre. Sin embargo, la claritromicina no es lo suficientemente soluble en acetona para

lograr la concentración requerida. Debido a esto, se decidió eliminarla del trabajo, ya que la acetona era el disolvente más adecuado para alcanzar la solubilidad necesaria, y en caso de dejarla los resultados se verían alterados debido a la toxicidad de la acetona.

Una vez obtenida la disolución, es necesario verificar que la concentración sea correcta. Para ello, se utilizará la Ley de Beer-Lambert, que describe la relación entre la absorbancia de una sustancia y su concentración. Se medirán las absorbancias en 4 o 5 concentraciones distintas, asegurándose de que las absorbancias sean menores a 1, ya que la ley Beer-Lambert es válida solo en este rango debido a limitaciones en la relación lineal entre absorbancia y concentración. Luego, se seleccionará el punto máximo de absorbancia, conocido como la longitud de onda del compuesto, y se utilizaran estos valores para calcular la ecuación de la recta.

ANEXO B “Formulas para el cálculo de la concentración efectiva media (EC_{50})”

A continuación, se detallarán las fórmulas utilizadas para el cálculo de concentración inicial en la cubeta B5. Donde C_{B5} es la concentración de cubeta B5 y C_{A5} es la concentración en la cubeta A5.

$$C_{B5} = \frac{500 \cdot C_{A5}}{500 + 500 + 10} = 0,495 \cdot C_{A5} \quad (3)$$

Considerando C_m la concentración de la muestra.

$$C_{A5} = \frac{2500 \cdot C_m}{2500 + 250} = 0,91 \cdot C_m \quad (4)$$

Reemplazando C_{A5} en C_{B5}

$$C_{B5} = 0,495 \cdot 0,91 \cdot C_m = 0,45 \cdot C_m \text{ mg/L} \quad (5)$$

Por lo que la concentración en la cubeta B5 es un 45% de las concentraciones que se muestran en la Tabla 10 “Concentración iniciales para las soluciones monocomponentes”.

Por otro lado, en el paso 10 del procedimiento experimental se obtienen los valores de I_0 y en el 12 se obtienen los de I_t . Estos valores representan la intensidad lumínica sin la presencia de una sustancia toxica (I_0) y la intensidad lumínica 5 y 15 min después de someter al organismo de estudio a una sustancia toxica (I_t).

Con estos valores se calcula (Modern Water, 2024). El factor de corrección como:

$$R_t = \frac{I_t}{I_0} \quad (6)$$

Luego, el gamma se calcula como:

$$\Gamma = \left(\frac{R_t \cdot I_0}{I_t} \right) - 1 \quad (7)$$

Sucesivamente, el porcentaje del efecto se calcula como:

$$E = \left(\frac{\Gamma}{1 + \Gamma} \right) \cdot 100 (\%) \quad (8)$$

Después, se utiliza la teoría de la velocidad de inhibición biológica que predice la relación entre la concentración de una sustancia toxica y la respuesta de un organismo susceptible cuando la respuesta se mide en términos de valores gamma:

$$\Gamma = k \cdot C \cdot P \quad (9)$$

Donde k es la relación entre la energía libre y los cambios de volumen de la reacción, C es la concentración y P es el número de moléculas tóxicas por sitio objetivo.

A través de una regresión estadística:

$$\log C = b \cdot \log \Gamma + a \quad (10)$$

Ya que, el EC_{50} se representa cuando el valor de Γ es 1:

$$C = 10^{-a} \quad (11)$$

Entonces, una vez calculado el gamma se calcula el $\log C$ y el $\log \Gamma$ donde se realiza un gráfico $\log C$ vs $\log \Gamma$, ocupando la ecuación de la recta se puede obtener el valor de a y finalmente calcular el valor de la concentración efectiva media (EC_{50}) de cada fármaco.

ANEXO C “Tabla de diseño aleatorizada”

Tabla 23: diseño experimental aleatorizado para 7 componentes.

Orden de corrida	Orden estadístico	Tipo	A	B	C	D	E	F	G
1	42	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000
2	31	-1	0,0714	0,5714	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714
3	9	2	0,0000	0,5000	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
4	26	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000
5	22	2	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000	0,5000
6	28	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
7	44	0	0,1429	0,1429	0,1429	0,1429	0,1429	0,1429	0,1429
8	41	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
9	12	2	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000
10	3	2	0,5000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11	36	-1	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714	0,5714
12	29	0	0,1429	0,1429	0,1429	0,1429	0,1429	0,1429	0,1429
13	14	1	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
14	15	2	0,0000	0,0000	0,5000	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000
15	18	2	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000
16	10	2	0,0000	0,5000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000
17	7	2	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000
18	38	1	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
19	21	2	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,5000	0,0000
20	16	2	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000
21	23	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
22	34	-1	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714	0,5714	0,0714	0,0714
23	19	1	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
24	20	2	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,5000	0,0000	0,0000
25	33	-1	0,0714	0,0714	0,0714	0,5714	0,0714	0,0714	0,0714
26	2	2	0,5000	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
27	8	1	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
28	40	1	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
29	35	-1	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714	0,5714	0,0714
30	39	1	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
31	37	1	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
32	11	2	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000
33	17	2	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000
34	30	-1	0,5714	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714
35	24	2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,5000	0,0000
36	32	-1	0,0714	0,0714	0,5714	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714
37	5	2	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000
38	4	2	0,5000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000
39	27	2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,5000
40	6	2	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000
41	25	2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,5000
42	1	1	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
43	43	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
44	13	2	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000

Donde:

A corresponde a paracetamol, B corresponde a ibuprofeno, C corresponde a cafeína, D corresponde a claritromicina, E corresponde a naproxeno, F corresponde a carbamazepina, G corresponde a metformina y H corresponde a diclofenaco

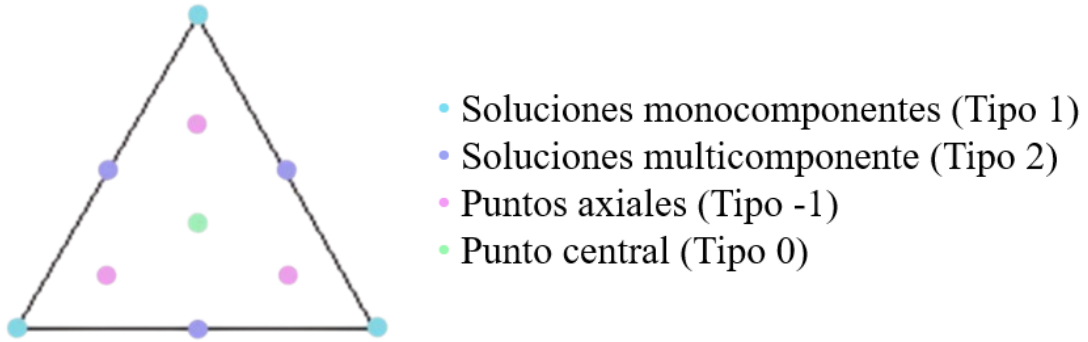


Figura 5: Diseño de la región experimental ampliado. Fuente: adaptación de (Minitab, 2024b)

ANEXO D “Curvas de calibración”

A continuación, se presenta un gráfico de la absorbancia vs longitud de onda a distintas concentraciones y luego su respectiva curva de calibración para cada compuesto.

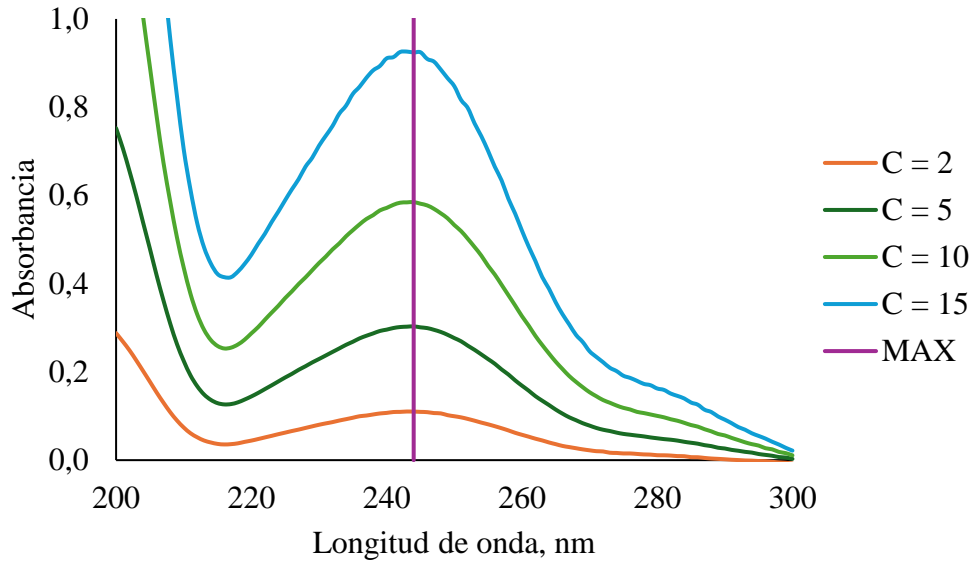


Figura 6: Absorbancia vs longitud de onda del paracetamol.

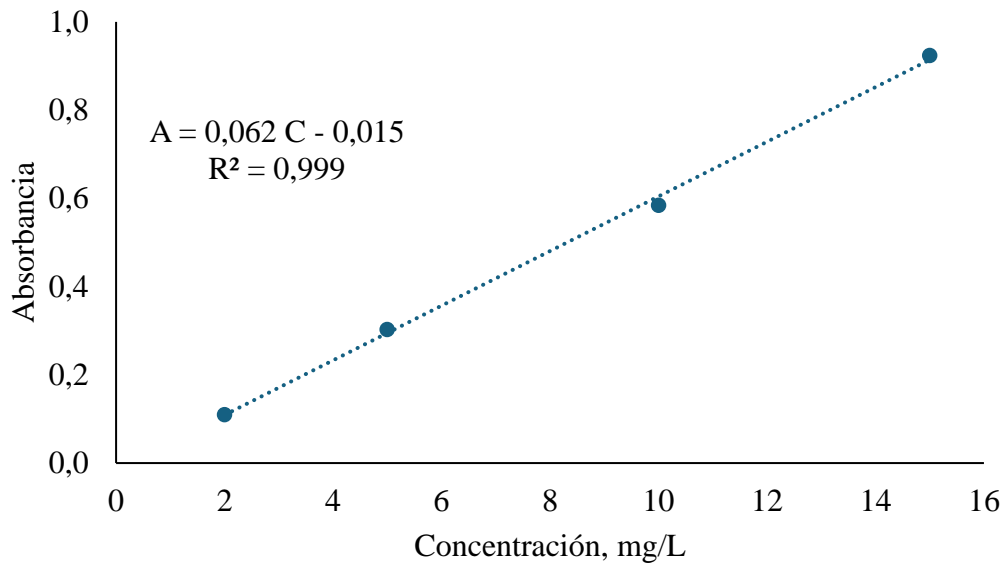


Figura 7: Absorbancia vs concentración del paracetamol.

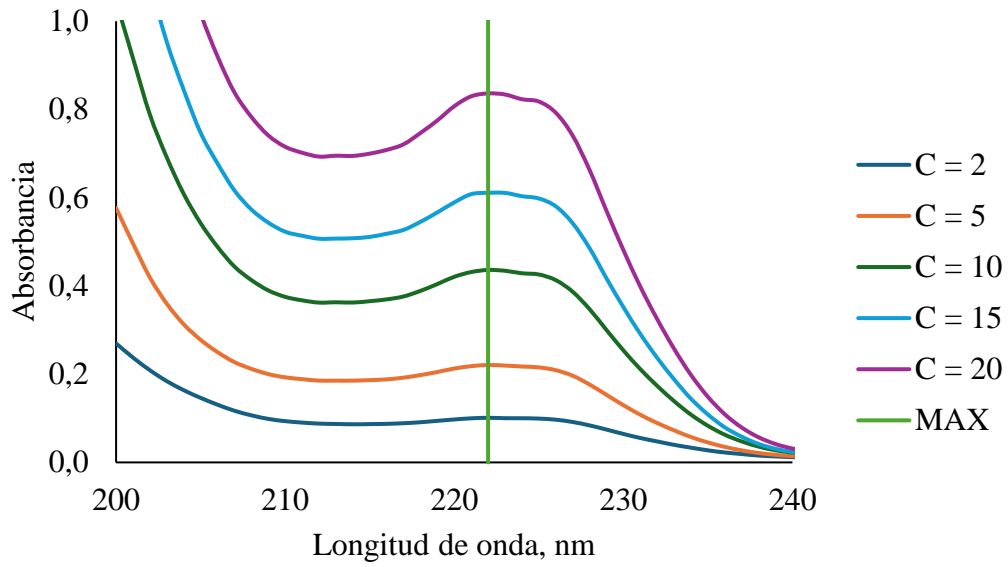


Figura 8: Absorbancia vs longitud de onda del ibuprofeno.

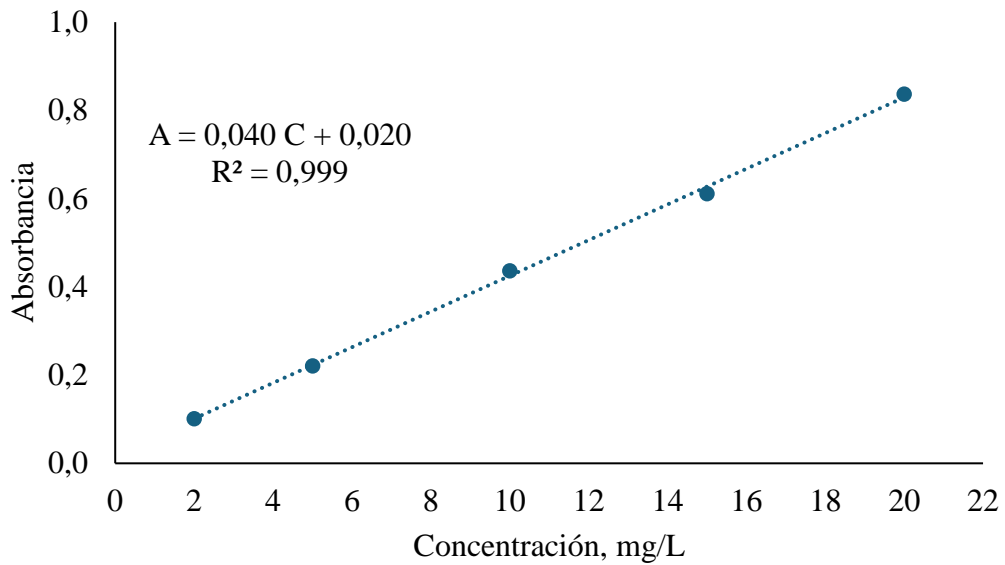


Figura 9: Absorbancia vs concentración del ibuprofeno.

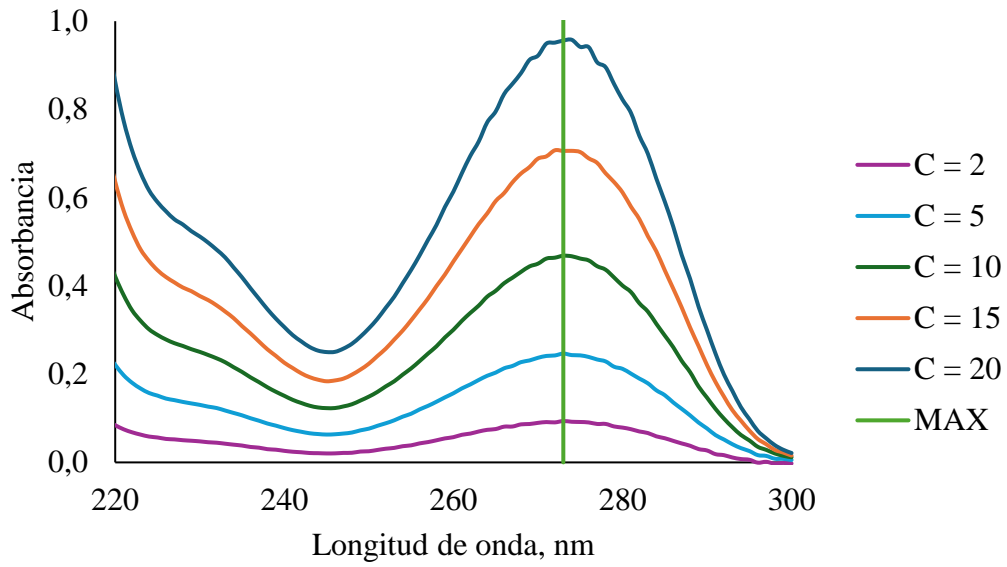


Figura 10: Absorbancia vs longitud de onda de la cafeína.

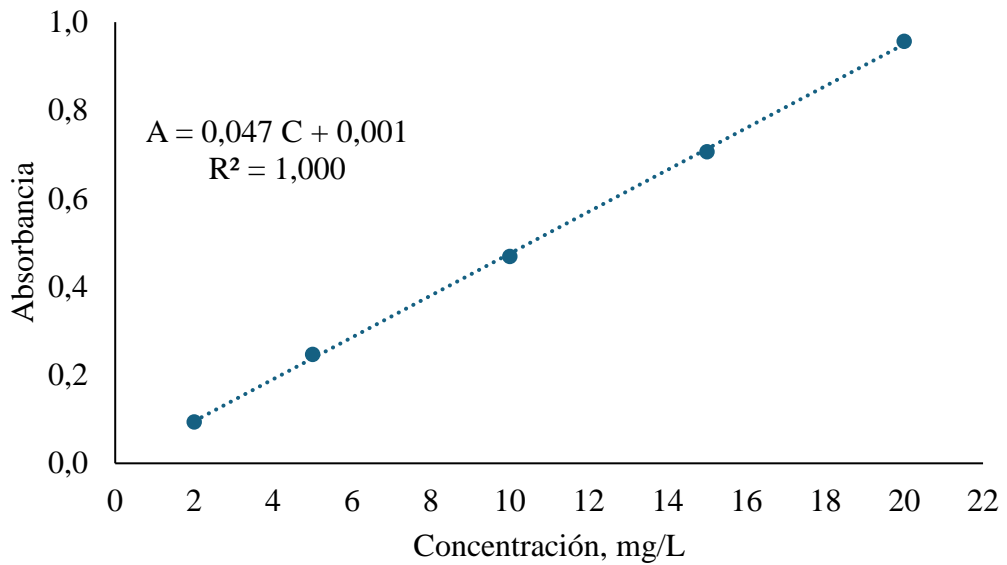


Figura 11: Absorbancia vs concentración de la cafeína.

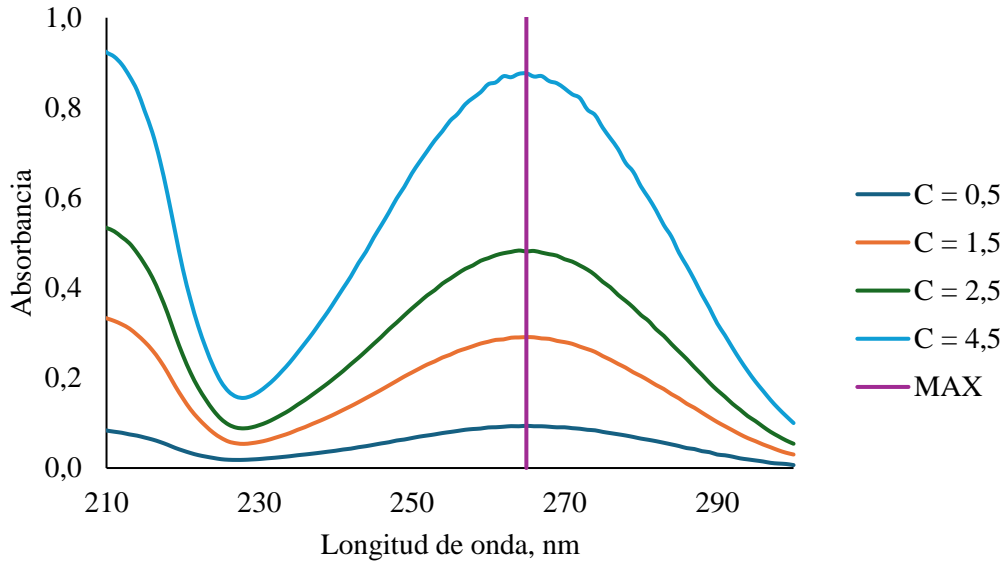


Figura 12: Absorbancia vs longitud de onda de la claritromicina.

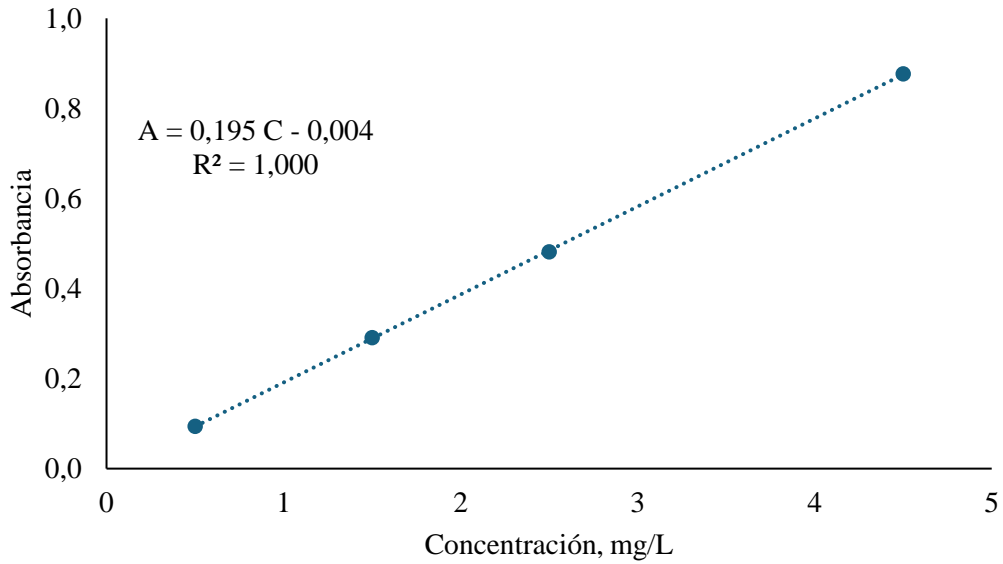


Figura 13: Absorbancia vs concentración de la claritromicina.

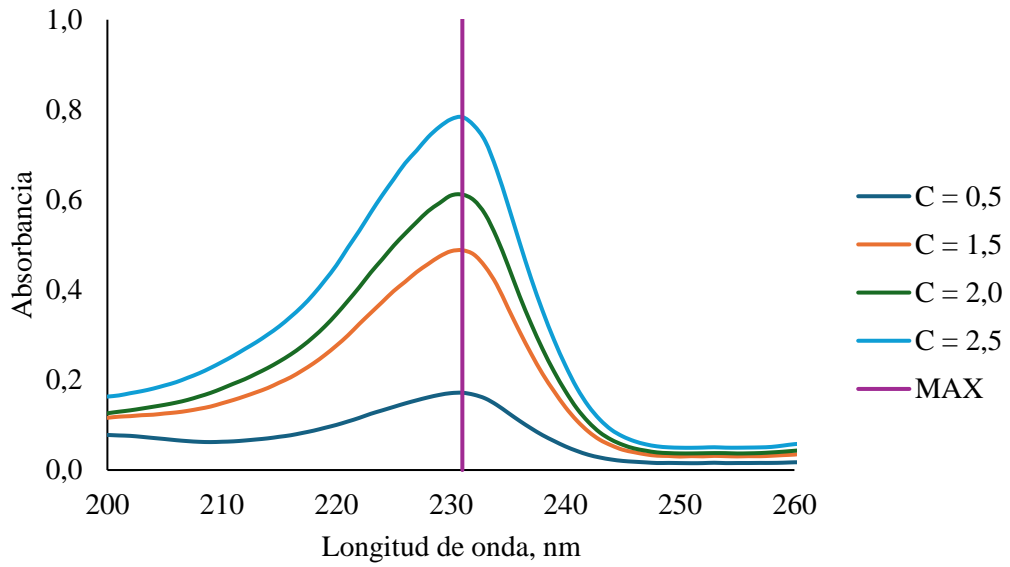


Figura 14: Absorbancia vs longitud de onda del naproxeno.

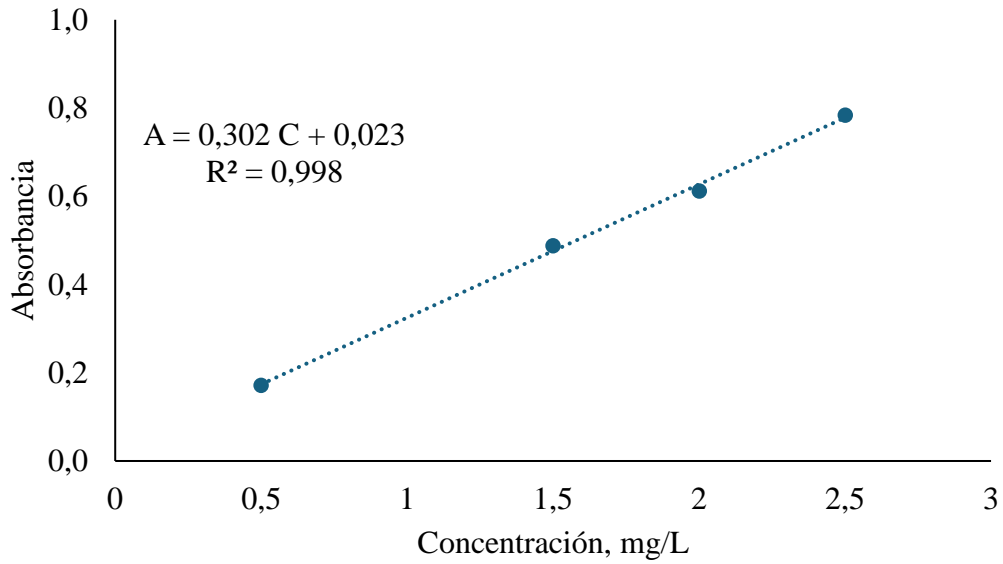


Figura 15: Absorbancia vs concentración del naproxeno.

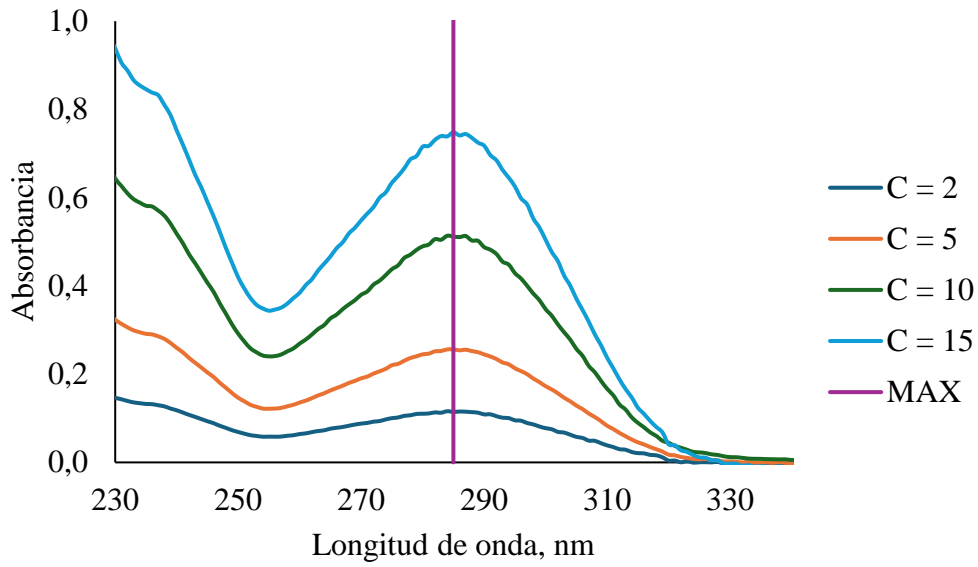


Figura 16: Absorbancia vs longitud de onda de la carbamazepina.

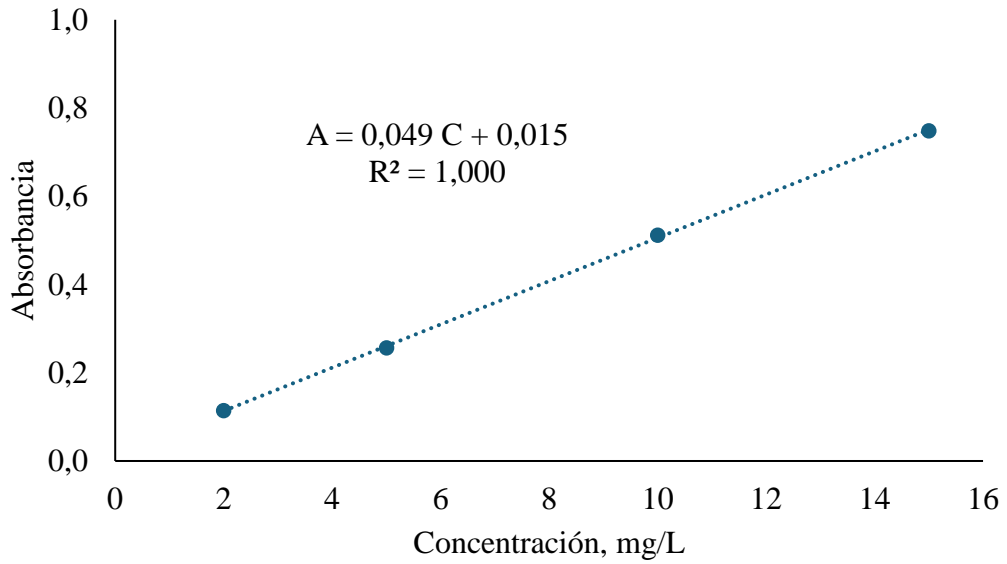


Figura 17: Absorbancia vs concentración de la carbamazepina.

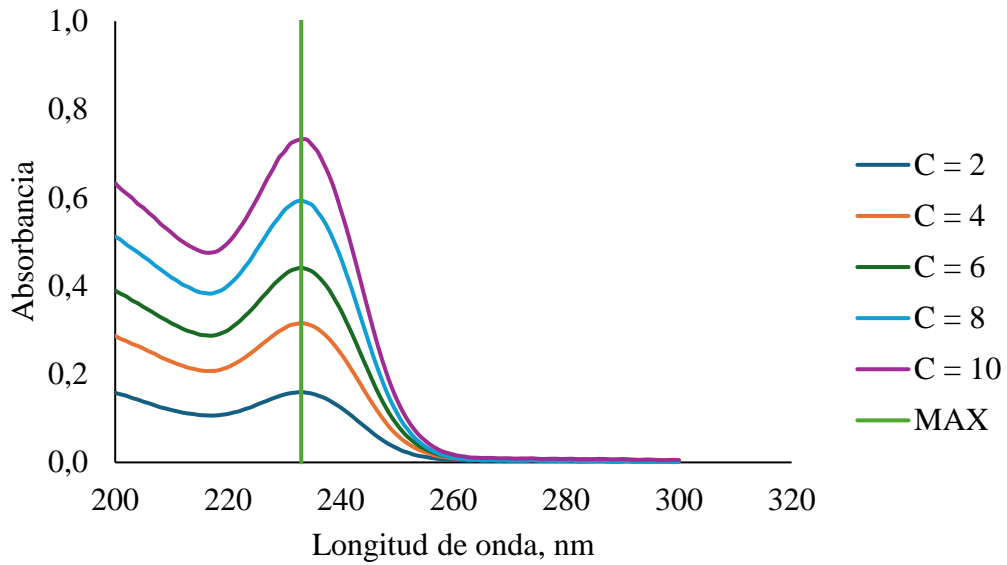


Figura 18: Absorbancia vs longitud de onda de la metformina.

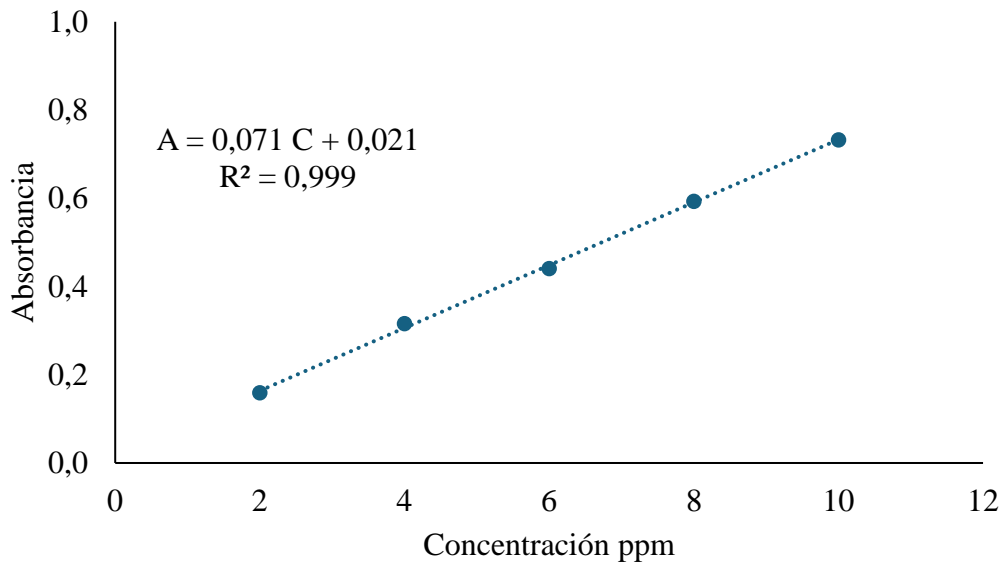


Figura 19: Absorbancia vs concentración de la metformina.

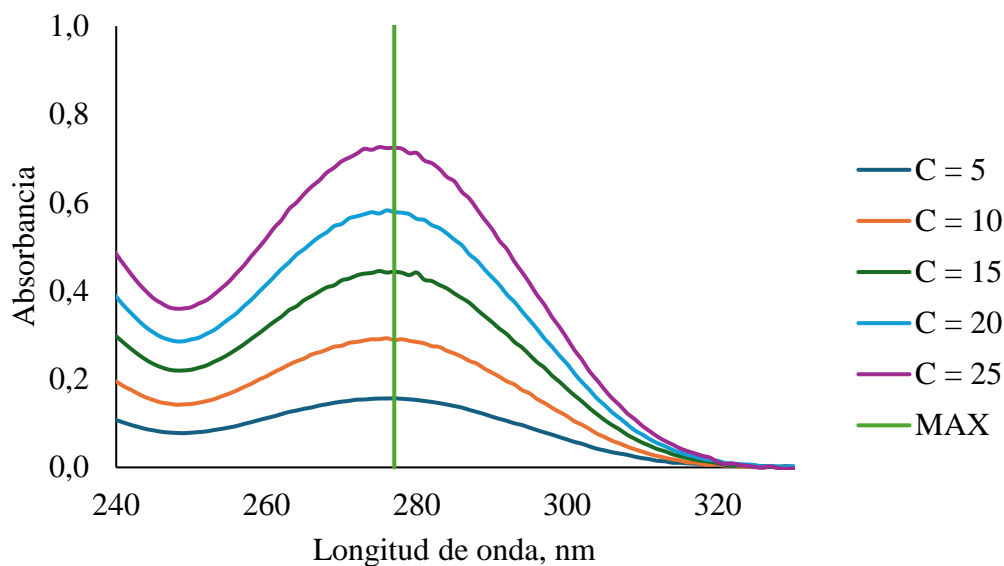


Figura 20: Absorbancia vs longitud de onda del diclofenaco.

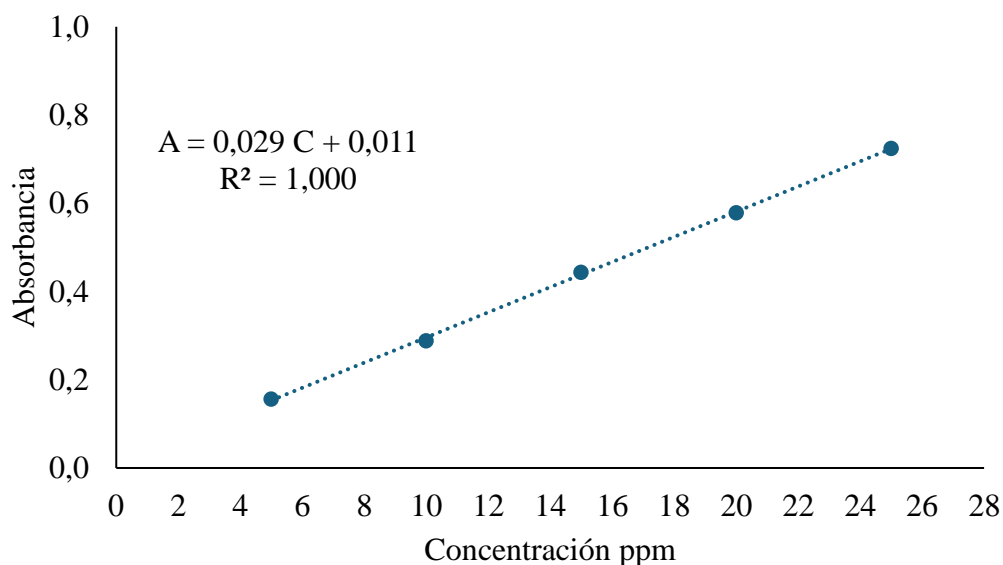


Figura 21: Absorbancia vs concentración del diclofenaco.

Tabla 24: Resultados de la curva de calibración.

compuestos	Longitud de onda <i>nm</i>	Ecuaciones de la recta	R^2
Paracetamol	244	$A = 0,062 \cdot C - 0,015$	0,999
Ibuprofeno	222	$A = 0,040 \cdot C + 0,020$	0,999
Cafeína	273	$A = 0,047 \cdot C + 0,001$	1
Claritromicina	265	$A = 0,195 \cdot C - 0,004$	1
Naproxeno	231	$A = 0,302 \cdot C + 0,023$	0,998
Carbamazepina	285	$A = 0,049 \cdot C + 0,015$	1
Metformina	233	$A = 0,071 \cdot C + 0,021$	0,999
Diclofenaco	277	$A = 0,029 \cdot C + 0,011$	1

ANEXO E “Resultado del diseño experimental para soluciones mono y multicomponentes”

Tabla 25: EC_{50} del diseño experimental a los 5 y 15 min.

Orden de corrida	Combinación	EC_{50} 5 min	EC_{50} 15 min
1	Metformina	9623,5	5773,2
2	Punto axial ibuprofeno	1034,5	769,3
3	Ibuprofeno + Cafeína	67,3	74,1
4	Metformina	12116,3	8229,9
5	Naproxeno + Diclofenaco	15,1	11,6
6	Diclofenaco	9,8	9,0
7	Punto central	829,2	733,6
8	Carbamazepina	107,0	99,4
9	Ibuprofeno + Metformina	32381,6	22938,6
10	Paracetamol + Cafeína	91,1	83,5
11	Punto axial diclofenaco	199,9	201,8
12	Punto central	1104,7	919,4
13	Cafeína	616,6	1297,8
14	Cafeína + Naproxeno	174,0	192,1
15	Cafeína + Diclofenaco	263,6	227,9
16	Ibuprofeno + Naproxeno	43,3	37,7
17	Paracetamol + Diclofenaco	184,5	188,9
18	Ibuprofeno	11,3	11,7
19	Naproxeno + Metformina	7517,5	5418,7
20	Cafeína + Carbamazepina	374,9	358,3
21	Carbamazepina	169,8	112,6
22	Punto axial carbamazepina	402,7	355,3
23	Naproxeno	34,8	31,9
24	Naproxeno + Carbamazepina	102,8	91,8
25	Punto axial naproxeno	439,4	399,6
26	Paracetamol + Ibuprofeno	305,6	324,4
27	Ibuprofeno	6,5	6,4
28	Naproxeno	54,0	57,8
29	Punto axial metformina	10144,2	7239,5
30	Cafeína	548,9	510,3
31	Paracetamol	415,7	458,1
32	Ibuprofeno + Carbamazepina	29,0	28,9
33	Cafeína + Metformina	7345,3	7192,0
34	Punto axial paracetamol	421,9	448,4
35	Carbamazepina + Metformina	14284,8	4750,6
36	Punto axial cafeína	506,6	503,9
37	Paracetamol + Carbamazepina	190,9	183,8
38	Paracetamol + Naproxeno	222,0	206,7
39	Metformina + Diclofenaco	2157,9	1539,3
40	Paracetamol + Metformina	3501,8	2939,0
41	Carbamazepina + Diclofenaco	20,3	16,1
42	Paracetamol	306,1	347,8
43	Diclofenaco	8,9	9,7
44	Ibuprofeno + Diclofenaco	8,9	7,6

ANEXO F “Conceptos básicos para la comprensión del análisis estadístico”

En la tabla de "coeficientes de regresión estimados", se presentan varios términos estadísticos, como el término, el coeficiente, el error estándar del coeficiente, el valor T, el valor P y el FIV (Factor de Inflación de la Varianza).

- **Término:** Se refiere al parámetro que se está estudiando, como un efecto principal o una interacción entre factores.
- **Coeficiente:** Indica cuánto cambia la respuesta promedio (o resultado) cuando el valor de un término (factor) aumenta en una unidad, manteniendo constantes los demás factores. Si el coeficiente es significativo y positivo, indica que existe una posible interacción sinérgica; si es significativo pero negativo, sugiere una interacción antagónica.
- **Error estándar del coeficiente:** Mide la variabilidad del coeficiente si el experimento se repitiera. Cuanto más bajo sea el error, más confiable y consistente será el coeficiente entre diferentes muestras.
- **Valor T:** Mide la relación entre el coeficiente y su error estándar. Este valor se utiliza para calcular el valor P.
- **Valor P:** Es la probabilidad de que un resultado haya ocurrido por azar. Un valor P bajo sugiere que hay más evidencia de que el efecto observado es real y no una coincidencia. Este valor se compara con el nivel de significancia (generalmente 0,05 por defecto). Si el valor P es menor que el nivel de significancia, el coeficiente se considera estadísticamente significativo; si es mayor, el coeficiente se considera no significativo, lo que indica que el parámetro no contribuye a explicar la respuesta del modelo.
- **Factor de Inflación de la Varianza (FIV):** Mide el aumento de la variabilidad (incertidumbre) de los coeficientes en un modelo de regresión debido a la multicolinealidad, que ocurre cuando los factores (o predictores) están correlacionados entre sí. La multicolinealidad puede indicar una inestabilidad de los coeficientes. Si el $FIV = 1$, los factores no están correlacionados; si $1 < FIV < 5$, están moderadamente correlacionados; y si $FIV > 5$, la correlación es alta.

En la tabla "resumen del modelo", se presentan varios términos estadísticos, como desviación estándar (S), R-cuadrado, R-cuadrado ajustado, la suma de los cuadrados de los errores de predicción (PRESS) y R-cuadrado pronosticado.

- Desviación estándar (S): Representa la separación entre los valores observados y los valores ajustados por el modelo. Un valor más bajo de S indica que el modelo ajusta mejor la respuesta, ya que los puntos de datos están más cerca de la línea de regresión.
- R-cuadrado (R^2): Este valor indica el porcentaje de la variación en la respuesta que es explicado por el modelo. Cuanto mayor sea el R^2 , mayor será la proporción de la variabilidad de los datos explicada por el modelo, lo que implica que los puntos de datos se ajustan mejor a la línea de regresión.
- R-cuadrado ajustado: Este término también mide el porcentaje de la variación en la respuesta explicada por el modelo, pero a diferencia del R^2 , se ajusta por el número de predictores (factores) en el modelo en relación con el número de observaciones. Este ajuste es útil para evitar una sobreestimación del R^2 cuando se añaden muchos predictores al modelo.
- Suma de los cuadrados de los errores de predicción (PRESS): Esta medida se utiliza para evaluar la capacidad del modelo para predecir nuevos datos. Un valor bajo de PRESS indica que el modelo tiene un buen poder predictivo, es decir, puede predecir con precisión los datos nuevos. En cambio, un valor alto de PRESS sugiere que el modelo podría estar sobreajustado, ya que ha incorporado información o términos innecesarios que no aportan a la predicción de datos.
- R-cuadrado pronosticado: Este valor mide la capacidad del modelo para predecir datos nuevos que no forman parte del conjunto original de observaciones. Un valor alto de R^2 pronosticado indica que el modelo tiene un buen desempeño predictivo para datos futuros, mientras que un valor bajo sugiere que el modelo podría no generalizar bien fuera de los datos del modelo.

En la tabla "análisis de varianza", se presentan varios términos estadísticos, como grados de libertad (GL), suma secuencial de cuadrados (SC Sec.), suma secuencial de cuadrados ajustada (SC Ajust.), cuadrados medios ajustados (MC Ajust.), valor F y Valor P.

- Grados de libertad (GL): Representan la cantidad de información disponible en los datos para realizar estimaciones y ajustar el modelo.

- Suma secuencial de cuadrados (SC Sec.): Mide la variación en los datos y se utiliza para evaluar el impacto de diferentes partes del modelo sobre la respuesta. En el caso de la regresión, la suma de cuadrados explica la variación en la variable de respuesta. Los términos lineales o cuadráticos representan la variabilidad explicada por estos términos específicos, mientras que el error refleja la variación en los datos que no puede ser explicada por el modelo. La suma total representa la variabilidad total en los datos, tanto la explicada como la no explicada por el modelo.
- Suma secuencial de cuadrados ajustada (SC Ajust.): Mide la variación de los diferentes componentes del modelo, pero a diferencia de la suma secuencial de cuadrados, no considera el orden de los predictores en el modelo, lo que permite evaluar la contribución de cada término sin sesgos relacionados con el orden en que se ingresaron.
- Cuadrados medios ajustados (MC Ajust.): Representan la variación explicada por un término o conjunto de términos, asumiendo que todos los demás términos están presentes en el modelo. Son útiles para evaluar la relevancia de cada factor o interacción dentro del contexto general del modelo.
- Valor F: Este valor se utiliza para determinar si algún término incluido en el modelo está asociado significativamente con la respuesta. Un valor F alto sugiere que el término o los términos explican una porción significativa de la variabilidad en la respuesta.
- Valor P: El valor P es la probabilidad asociada que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula. Un valor P bajo proporciona una evidencia más fuerte en contra de la hipótesis nula, lo que sugiere que el término o el modelo tiene un efecto significativo. Si el valor P es menor que el nivel de significancia establecido (comúnmente 0,05), se concluye que el modelo explica la variación en la respuesta de manera estadísticamente significativa.

En la tabla "ajustes y diagnósticos para todas las observaciones", se presentan varios términos estadísticos, como EC_{50} , ajuste, error estándar de ajuste, residuo y residuo estandarizado.

- Ajuste: El valor ajustado es el resultado de aplicar el modelo estadístico a un valor específico de las variables independientes (X). Este valor representa la estimación de la respuesta basada en el modelo propuesto.

- Error estándar del ajuste (EE ajuste): El error estándar del ajuste mide la precisión con la que el modelo predice el valor de la respuesta para una configuración específica de las variables. Cuanto menor sea el error estándar, más confiable será la predicción, indicando una estimación más precisa de la respuesta media.
- Residuo: El residuo se define como la diferencia entre el valor observado y el valor ajustado correspondiente.
- Residuo estandarizado: El residuo estandarizado se calcula dividiendo el residuo por una estimación de su desviación estándar. Este valor se utiliza para identificar valores atípicos en los datos. Los residuos estandarizados cuyo valor sea mayor que 2 o menor que -2 se consideran grandes y se identifican con una R en la tabla. Estos valores indican que la observación correspondiente se desvía significativamente del modelo ajustado y podrían requerir una revisión más detallada.

Por otro lado, existen cuatro gráficas para evaluar el ajuste del modelo y la validez de sus supuestos:

1. Histograma de residuos: muestra la distribución de los residuos para todas las observaciones. Se utiliza para evaluar si los datos presentan asimetría o valores atípicos. Si el histograma muestra una larga cola en una dirección, podría indicar asimetría en los datos. Además, si se observa una barra alejada de las demás, podría ser señal de un valor atípico.
2. Gráfica de probabilidad normal: se emplea para verificar el supuesto de normalidad de los residuos. Idealmente, los puntos deben alinearse a lo largo de una línea recta. Cualquier patrón significativo, como una curva en forma de "S", una "S" invertida, una curva descendente o puntos alejados de la línea, podría sugerir que los residuos no siguen una distribución normal o que existen valores atípicos en los datos.
3. Gráfica de residuos vs. Ajustes: Esta gráfica permite comprobar el supuesto de que los residuos están distribuidos aleatoriamente y que tienen una varianza constante (homocedasticidad). El comportamiento ideal sería que los puntos se distribuyan aleatoriamente alrededor del cero, sin mostrar patrones visibles que sugieran algún tipo de dependencia entre los residuos y los valores ajustados.
4. Gráfica de residuos vs. Orden: se utiliza para verificar el supuesto de independencia de los residuos. Los puntos no deben mostrar tendencias, patrones

o ciclos, ya que cualquier indicio de dependencia entre los residuos sería contradictorio con el supuesto de independencia, lo que afectaría la validez del modelo.