



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO Y VIDA MEDIA DE  
DICLOFENACO, TRIMETOPRIMA Y 17- $\alpha$ -ETINILESTRADIOL EN SOLUCIÓN ACUOSA  
BAJO RADIACIÓN DE LUZ UV.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

I.Q. MARÍA EUGENIA BECERRIL ORTIZ

DIRIGIDA POR:

DR. JORGE JAVIER RAMÍREZ GARCÍA

DRA. NORMA CAVAZOS ROCHA

DR. ARMANDO RAMÍREZ SERRANO

Toluca, Estado de México. Julio 2019



## Contenido

RESUMEN .....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCIÓN .....	15
2. JUSTIFICACIÓN .....	17
3. ANTECEDENTES.....	18
3.1. Contaminantes emergentes .....	19
3.2. Fármacos en el medio ambiente .....	19
3.2.1. Movilidad ambiental .....	19
3.2.2. Bioconcentración y bioacumulación.....	20
3.2.3. Persistencia .....	21
3.2.4. Inestabilidad química.....	21
3.3. Cinética de degradación.....	22
3.4. Diclofenaco (DCF) .....	24
3.4.1. Propiedades fisicoquímicas del diclofenaco .....	25
3.4.2. Toxicidad .....	25
3.5. Trimetoprima (TMT).....	25
3.5.1. Propiedades fisicoquímicas.....	27
3.5.2. Toxicidad .....	27
3.6. 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2).....	28
3.6.1. Propiedades fisicoquímicas.....	29
3.6.2. Toxicidad .....	29
3.7. Validación de un método analítico por CLAR .....	29
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	31
4.1. Hipótesis .....	32
4.2. Objetivo general .....	32
4.3. Objetivos Específicos .....	32
5. METODOLOGÍA .....	34
5.1. Caracterización de los fármacos .....	35
5.2. Cuantificación de la concentración de los fármacos por CLAR .....	35
5.3. Degradación de fármacos con equipo de radiación por luz UV .....	37
5.3.1. Seguimiento de la degradación de los fármacos .....	37
5.3.2. Determinación de cinética de fotodegradación y vida media de los fármacos .....	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1. Caracterización del fármaco .....	39
6.1.1. Identidad por radiación infrarroja (IR) .....	39

6.1.2.	Identidad por Ultravioleta (UV).....	41
6.2.	Método analítico para cuantificación por cromatografía de líquidos .....	42
6.2.1.	Validación de método .....	43
6.3.	Degradación de los fármacos por radiación de luz UV-C.....	45
6.3.1.	Efecto de la radiación de luz UV-C en DCF .....	45
6.3.2.	Efecto de la radiación de luz UV-C en EE2 .....	46
6.3.3.	Efecto de la radiación de luz UV-C en TMT.....	47
6.4.	Modelo cinético de fotodegradación .....	48
6.4.1.	Cinética de fotodegradación de DCF.....	48
6.4.2.	Cinética de fotodegradación de EE2.....	50
6.4.3.	Cinética de fotodegradación de TMT .....	51
6.5.	Parámetros cinéticos .....	52
6.5.1.	Modelo cinético de DCF.....	54
6.5.2.	Modelo cinético de EE2.....	56
6.6.	Parámetros termodinámicos de la fotodegradación.....	58
6.7.	Formación de productos de fotodegradación.....	60
6.7.1.	Productos de degradación de DCF.....	60
6.7.2.	Productos de degradación de EE2 .....	64
7.	CONCLUSIONES .....	67
8.	RECOMENDACIONES .....	67
	Anexos .....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

Ciclo de un fármaco en el ambiente.....	20
Consumo de nueve fármacos antiinflamatorios en 15 países durante el 2011 (McGettigan y Henry, 2013) .....	24
Estructura química del diclofenaco (Nombre IUPAC: Ácido 2-{2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil} acético) (Drug Bank, 2005).....	24
Consumo de principales antibióticos, durante el año 2010 y su proyección de consumo en el año 2030 (Center for Disease Dynamics Economics & Policy, 2015). .....	26
Estructura química de trimetoprima (Nombre IUPAC: 5-[(3,4,5-trimetoifenil) metil]pirimidin-2,4-diamina) (National Center for Biotechnology, 2015) .....	26
Estructura química de 17- $\alpha$ -etinilestradiol (Nombre IUPAC: 8R,9S,13S,14S,17R)-17-etinil-13-metil-7,8,9,11,12,14,15,16-octahidro-6H-ciclopenta[a]fenantrene-3,17-diol) (Drug Bank, 2005). .	28
Equipo de degradación por luz UV .....	37
Espectro IR de DCF .....	39
Espectro IR de TMT.....	40
Espectro IR de EE2 .....	41
Espectro UV de DCF, EE2 y TMT .....	42
Cromatograma de inyección individual de diclofenaco .....	43
Cromatograma de inyección individual de 17- $\alpha$ etinil estradiol .....	43
Cromatograma de inyección individual de trimetoprima.....	43
Perfil de degradación de DCF ( $C_0 = 10 \text{ mg L}^{-1}$ ).....	46
Solución de DCF antes (a) y después (b) de la irradiación de luz UV-C.....	46
Efecto de la radiación tipo UV-C sobre la degradación de EE2 ( $C_0 = 10 \text{ mg L}^{-1}$ ).....	47
Perfil de degradación de TMT ( $C_0 = 10 \text{ mg L}^{-1}$ ).....	48
Modelo cinético de DCF .....	50
Modelo cinético de EE2 .....	51
Modelo cinético de TMT.....	52
Regresión lineal de la ecuación de Arrhenius para DCF.....	53
Regresión lineal de la ecuación de Arrhenius para EE2 .....	53
Comportamiento cinético de fotodegradación DCF a diferentes temperaturas.....	54
Comportamiento del coeficiente cinético de fotodegradación de DCF (k).....	55
Comportamiento de la vida media DCF a diferentes temperaturas.....	55
Comportamiento cinético de fotodegradación EE2 a diferentes temperaturas.....	56
Comportamiento de la constante cinética de fotodegradación de EE2 (k).....	57
Comportamiento de la vida media EE2 a diferentes temperaturas.....	58
Regresión lineal de la ecuación de van't Hoff para DCF.....	59

Regresión lineal de la ecuación de Van't Hoff para EE2.....	59
Cromatograma de formación de productos de degradación a) inicial, b) 1h c) 24 h, d) 48 h después de exposición a radiación de luz tipo UV-C.....	63
Productos de degradación de radiación tipo UV-C EE2 .....	65
Linealidad del sistema DCF .....	71
Linealidad del sistema EE2 .....	72
Linealidad del sistema TMT .....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

Propiedades fisicoquímicas del diclofenaco.....	25
Movilidad, persistencia y bioconcentración del diclofenaco. ....	25
Propiedades fisicoquímicas de trimetoprima. ....	27
Movilidad, persistencia y bioconcentración de trimetoprima. ....	27
Propiedades fisicoquímicas de 17- $\alpha$ -etinilestradiol.....	29
Movilidad, persistencia y bioconcentración de 17- $\alpha$ -etinilestradiol. ....	29
Parámetros de desempeño a estudiar en un método analítico .....	30
Parámetros, metodología y criterios de aceptación de la validación.....	36
Interpretación de espectro infrarrojo de DCF.....	39
Interpretación de espectro infrarrojo de TMT.....	40
Interpretación de espectro infrarrojo de EE2 .....	41
Condiciones cromatográficas para la determinación de fármacos en estudio. ....	42
Resultados de validación del método analítico CLAR.....	44
Valores de las constantes de la ecuación de Arrhenius .....	53
Parámetros cinéticos de DCF .....	56
Parámetros cinéticos de EE2 .....	58
Parámetros termodinámicos de DCF y EE2.....	60
Adecuabilidad .....	69
Precisión del sistema .....	70
Linealidad del sistema.....	71
Resultados obtenidos del límite de detección y cuantificación.....	73
Linealidad del método.....	74
Exactitud y repetibilidad del método .....	75
Precisión del método DCF .....	75
Precisión del método EE2 .....	76
Precisión del método TMT.....	76
Distribución t de Student conforme a grados de libertad. ....	79

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Adecuabilidad del sistema .....	69
Anexo 2. Precisión del sistema.....	70
Anexo 3. Linealidad del sistema.....	71
Anexo 4. Límite de detección y cuantificación .....	73
Anexo 5. Linealidad del método.....	73
Anexo 6. Exactitud y repetibilidad .....	75
Anexo 7. Precisión del método.....	75
Anexo 8. Fórmulas para realizar los cálculos de los parámetros de validación de métodos analíticos.....	77
Anexo 9. Tabla estadística de la distribución t de student.....	79
Anexo 10. Artículo .....	80
Anexo 11 Acta congreso.....	98

## NOMENCLATURA

A	Absorbancia	
A	Factor de frecuencia de la ecuación de Arrhenius	min <sup>-1</sup>
BCF	Factor de bioconcentración	
C <sub>A</sub>	Concentración del fármaco	mg L <sup>-1</sup>
C <sub>DCF</sub>	Concentración de diclofenaco	mg L <sup>-1</sup>
C <sub>DCF0</sub>	Concentración inicial de diclofenaco	mg L <sup>-1</sup>
C <sub>EE2</sub>	Concentración de 17- $\alpha$ etinilestradiol	mg L <sup>-1</sup>
C <sub>EE20</sub>	Concentración inicial de etinilestradiol	mg L <sup>-1</sup>
C <sub>TMT</sub>	Concentración de trimetoprima	mg L <sup>-1</sup>
C <sub>TMT0</sub>	Concentración inicial de trimetoprima	mg L <sup>-1</sup>
C <sub>0</sub>	Concentración inicial del fármaco en los experimentos de fotodegradación	mg L <sup>-1</sup>
CV	Coefficiente de Variación o desviación estándar relativa	
CV <sub>y/x</sub>	Coefficiente de Variación de la regresión	
C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> y C <sub>4</sub>	Productos de degradación de 17- $\alpha$ -etinilestradiol.	
E <sub>a</sub>	Energía de activación	kJ mol <sup>-1</sup>
F <sub>0.025,gl</sub>	Valor de la distribución F de Fisher asociado a una confianza del 2.5% a grados de libertad (gl) establecidos.	
F <sub>0.05,gl</sub>	Valor de la distribución F de Fisher asociado a una confianza del 5% a grados de libertad (gl) establecidos.	
F <sub>0.975,gl</sub>	Valor de la distribución F de Fisher asociado a una confianza del 97.5% a grados de libertad (gl) establecidos.	
gl	Grados de Libertad	
k <sub>DCF</sub>	Coefficiente cinético de la velocidad de reacción de diclofenaco	min <sup>-1</sup>
k <sub>EE2</sub>	Coefficiente cinético de la velocidad de reacción de de 17- $\alpha$ -etinilestradiol	min <sup>-1</sup>
k <sub>TMT</sub>	Coefficiente cinético de la velocidad de reacción de trimetoprima	(mol L <sup>-1</sup> ) <sup>-1/2</sup> min <sup>-1</sup>
K	Grados Kelvin	
K <sub>oc</sub>	Coefficiente adsorción en suelo-agua	
K <sub>ow</sub>	Coefficiente de partición octanol-agua	
IC ( $\beta_1$ )	Intervalo de Confianza correspondiente a la pendiente	



IC ( $\beta_0$ )	Intervalo de Confianza correspondiente a la ordenada	
IC ( $\mu$ )	Intervalo de Confianza correspondiente al recobro	
LC	Límite de Cuantificación	
LD	Límite de Detección	
n	Número de mediciones	
pKa	Coefficiente de disociación	
P <sub>0</sub> ,P <sub>1</sub> ,P <sub>2</sub> ,P <sub>3</sub> ,P <sub>4</sub> y P <sub>5</sub>	Productos de degradación de diclofenaco	
R	Constante de los gases ideales	8.314 x 10 <sup>-3</sup> kJ mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
r <sub>a</sub>	Velocidad de reacción	mol L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación	
S	Desviación estándar	
Sb <sub>0</sub>	Desviación estándar de la ordenada al origen	
Sb <sub>1</sub>	Desviación estándar de la pendiente	
S <sub>y/x</sub>	Desviación estándar de la regresión	
t <sub>0.975,gl</sub>	Valor de la distribución t de Student asociado a una confianza del 95% y a grados de libertad (gl) establecidos	
T	Transmitancia	
T	Temperatura absoluta	K
t	Tiempo	min
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención	min
t <sub>1/2</sub>	Vida media	min
$\bar{x}$	Media Aritmética de x	
$\bar{y}$	Media Aritmética de y	
$\Delta H^\circ$	Cambio de entalpía	kJ mol <sup>-1</sup>
$\Delta S^\circ$	Cambio de entropía	kJ mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
$\Delta G^\circ$	Cambio de energía libre de Gibbs	kJ mol <sup>-1</sup>

#### Letras griegas

$\alpha$	orden de la reacción	
$\lambda$	Longitud de onda	nm

#### Acrónimos

CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
DCF	Diclofenaco
EE2	17- $\alpha$ -etinilestradiol.
FTIR	Transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier
IR	Radiación Infrarroja
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
TMT	Trimetoprima
UV	Ultravioleta
UV-C	Ultravioleta tipo C

# Agradecimientos

El trabajo de esta tesis se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).

Agradezco a las autoridades de la institución por las facilidades brindadas, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero con número de beca 476596, y al proyecto 215997 CONACYT para la realización de este trabajo.



## RESUMEN

El incremento en el consumo de medicamentos ha generado que la presencia continua de fármacos en el medio ambiente se haya incrementado. Diversos estudios han reportado la aparición de efectos adversos en plantas y animales; por lo que este tipo de compuestos han sido clasificados como contaminantes emergentes.

Existen diversas propuestas que sugieren nuevas alternativas para su remoción. Sin embargo, es necesario estudiar la vía por la que se están degradando para ofrecer técnicas de remoción más efectivas, ya que las tradicionales como la cloración, lodos activados y la biofiltración ofrecen una baja eficiencia de remoción (20-40%). En este trabajo se analizó el comportamiento cinético de la fotodegradación de DCF, EE2 y TMT y sus parámetros termodinámicos de la reacción bajo la radiación de luz tipo UV-C.

Los resultados obtenidos indicaron que el DCF y el EE2 presentan una cinética de primer orden, la cual se favorece con el incremento de la temperatura y la TMT sigue una cinética de orden 0.5. Además, se encontró que el DCF es susceptible a la degradación por efecto de la radiación tipo UV-C y la TMT presentó resistencia. En el caso del DCF y EE2 la aplicación de radiación UV-C genera la formación de una mezcla de subproductos, siendo los de DCF más estables, ya que tienden a permanecer aún después de que el fármaco ha sido degradado en su totalidad.

Lo anterior indica que los productos de degradación son liberados al medio ambiente, por lo que es necesario extender un estudio sobre sus propiedades y su posible impacto ambiental.

## ABSTRACT

The increase in the consumption of medicines has generated that the continuous presence of drugs in the environment has increased.

Several studies have reported the appearance of adverse effects in plants and animals; therefore, these types of compounds have been classified as emerging pollutants.

There are several proposals that suggest new alternatives for their removal. However, it is necessary to study the way in which they are being degraded to offer more effective removal techniques, since the traditional ones such as chlorination, activated sludge and biofiltration offer a low removal efficiency (20-40%).

In this work the kinetic behavior of the photodegradation of DCF, EE2 and TMT and its thermodynamic parameters of the reaction under UV-C light radiation was analyzed.

The obtained results indicated that the DCF and the EE2 present a kinetics of first order, which is favored with the increase of the temperature and the TMT follows a kinetics of order 0.5.

In addition, it was found that DCF is susceptible to degradation due to UV-C type radiation and TMT showed resistance. In the case of DCF and EE2, the application of UV-C radiation generates the formation of a mixture of by-products, DCF being more stable, since they tend to remain even after the drug has been completely degraded.

The above indicates that degradation products are released to the environment, so it is necessary to extend a study on their properties and their possible environmental impact.

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una creciente preocupación sobre la presencia continua de productos farmacéuticos en el ambiente debido a que se ha detectado un impacto negativo sobre plantas y animales. Los fármacos se introducen en los efluentes acuáticos a través de su transporte en aguas residuales que contienen excretas de personas que los hayan utilizado, residuos de medicamentos que tuvieron un manejo inadecuado o por medio de residuos agrícolas, como el estiércol del ganado (Alalm, Tawfik and Ookawara, 2015). Esto ha originado que plantas y animales se encuentren continuamente en contacto con este tipo de compuestos ocasionando alteraciones en su ciclo normal de crecimiento y reproducción (Cooper and Song, 2007; Orepeza, 2008). Diversos estudios han evaluado la exposición prolongada de contaminantes farmacéuticos en animales y plantas, obteniendo resultados que muestran efectos tóxicos sobre ellos como modificaciones endocrinas, citotoxicidad, teratogénesis e inhibición de su crecimiento (Rainsford, Kean and Ehrlich, 2008; Jiménez, 2011; Melo *et al.*, 2014; Wang and Hu, 2014; Garima and Sindri, 2017). Los argumentos anteriores han dado pauta para clasificar a los fármacos como contaminantes emergentes.

Conociendo el perfil de degradación del fármaco se puede evidenciar la inestabilidad o resistencia de este y la formación de sus subproductos, predecir su porcentaje de descomposición y estimar su vida media. Siendo esta última el tiempo específico que le toma a la cantidad presente del compuesto reducirse a la mitad (Gidal *et al.*, 2017).

En este trabajo se determinaron los datos anteriores para DCF, EE2 y TMT a través del estudio de su comportamiento cinético ante la fotólisis y el perfil de formación de sus subproductos. Se estableció un método analítico válido para su cuantificación, se determinó el comportamiento de su modelo cinético, constante cinética y vida media. Además, se estableció el perfil de formación de sus productos de degradación. Esta información nos ayudó a caracterizar la susceptibilidad a la degradación de los fármacos ante la radiación UV-C.



# Justificación

## 2. JUSTIFICACIÓN

El constante consumo de fármacos, la disposición inadecuada de fármacos caducos o no utilizados y una ineficiente remoción de estos materiales de las aguas residuales de la industria farmacéutica, hospitales e instituciones de investigación genera que estos se incorporen al medio ambiente; a pesar de que sus concentraciones en el agua son relativamente bajas, estudios recientes demuestran que su presencia y contacto con especies acuáticas pueden causar toxicidad (Wang y Hu, 2014). Diferentes procesos y técnicas de tratamiento se han utilizado para eliminar este tipo de contaminantes del agua como tratamientos fisicoquímicos, de oxidación avanzada y biológicos demostrando eficiencias de remoción altas. Sin embargo, no se ha determinado si este tipo de técnicas está removiendo al fármaco o a sus productos de degradación. El análisis del comportamiento cinético, determinación de la vida media y estabilidad de productos de degradación de los fármacos evaluados representan factores importantes para complementar el estudio de remoción de estos.

# Antecedentes

### 3.1. Contaminantes emergentes

Actualmente existe una creciente preocupación sobre la recurrencia y persistencia de productos farmacéuticos y de cuidado personal en el ambiente debido a su impacto potencial en los ecosistemas y en la salud humana (Cooper and Song, 2007). Se han identificado que algunos compuestos químicos de este tipo son capaces de alterar la homeostasis de los sistemas endocrinos de los organismos, dando lugar a efectos adversos sobre la salud, crecimiento, desarrollo y reproducción de los individuos (Orepesa, 2008). Estos compuestos se encuentran clasificados como contaminantes emergentes; término que engloba a aquellos componentes químicos o moléculas que anteriormente no eran conocidas y a los ya existentes pero que no se habían estudiado como contaminantes ambientales (Desrosiers and Assessment, 2014).

El acelerado desarrollo y crecimiento de la industria farmacéutica ha generado un incremento global en la existencia de diferentes clases de fármacos y en su consumo, por lo que han sido considerados como contaminantes recurrentes por el volumen de su uso. La mayoría de estos son no biodegradables, pueden resistir a las condiciones ácidas del estómago o son de liberación prolongada, representando un riesgo cuando estos ingresan al medio ambiente. Este tipo de moléculas pueden dispersarse o acumularse en efluentes acuíferos o suelos e ingresar a la cadena alimenticia para posteriormente reingresar a los organismos (Wang and Hu, 2014).

Diversos estudios han evaluado la exposición prolongada de contaminantes farmacéuticos en animales y plantas, obteniendo resultados que muestran efectos tóxicos sobre ellos como modificaciones endocrinas, citotoxicidad, teratogénesis e inhibición de su crecimiento (Ferrari *et al.*, 2003).

### 3.2. Fármacos en el medio ambiente

La manera en la que los fármacos interactúan con el ambiente y los organismos depende de su distribución, potencial de acumulación, toxicidad y el comportamiento de su degradación química o biológica.

#### 3.2.1. Movilidad ambiental

Depende de la vida media de la sustancia, debido a que si esta se degrada fácilmente no tendrá tiempo de distribuirse en el ambiente. Propiedades fisicoquímicas como solubilidad en agua, coeficiente adsorción en suelo-agua (Koc), presión de vapor y coeficiente de disociación (pKa), describen la tendencia en la que el fármaco se distribuirá en el ambiente. (Kuster *et al.*, 2008). Si un fármaco presenta presión de vapor relativamente alta, es parcialmente soluble en agua, no se degrada de manera inmediata o su valor de Koc es alto tenderá a adsorberse en el suelo por lo que tendrá un potencial alto para contaminar aguas superficiales, ya que podría integrarse a procesos

biogeoquímicos como erosión o precipitación y distribuirse continuamente en el ambiente mientras que no se degrade (Jiménez, 2011).

Los fármacos se han detectado principalmente en aguas que no reciben ningún tratamiento, en efluentes de plantas de tratadoras de aguas residuales que no están diseñadas para este tipo de compuestos y en suelos donde se han aplicado biosólidos y estiércol,(Ferrari *et al.*, 2003; Blair *et al.*, 2015). Otros sitios han sido rellenos sanitarios donde se acumulan residuos de medicamentos y desechos fecales. En la Figura 1 se describe el proceso y las vías en las que pueden distribuirse.

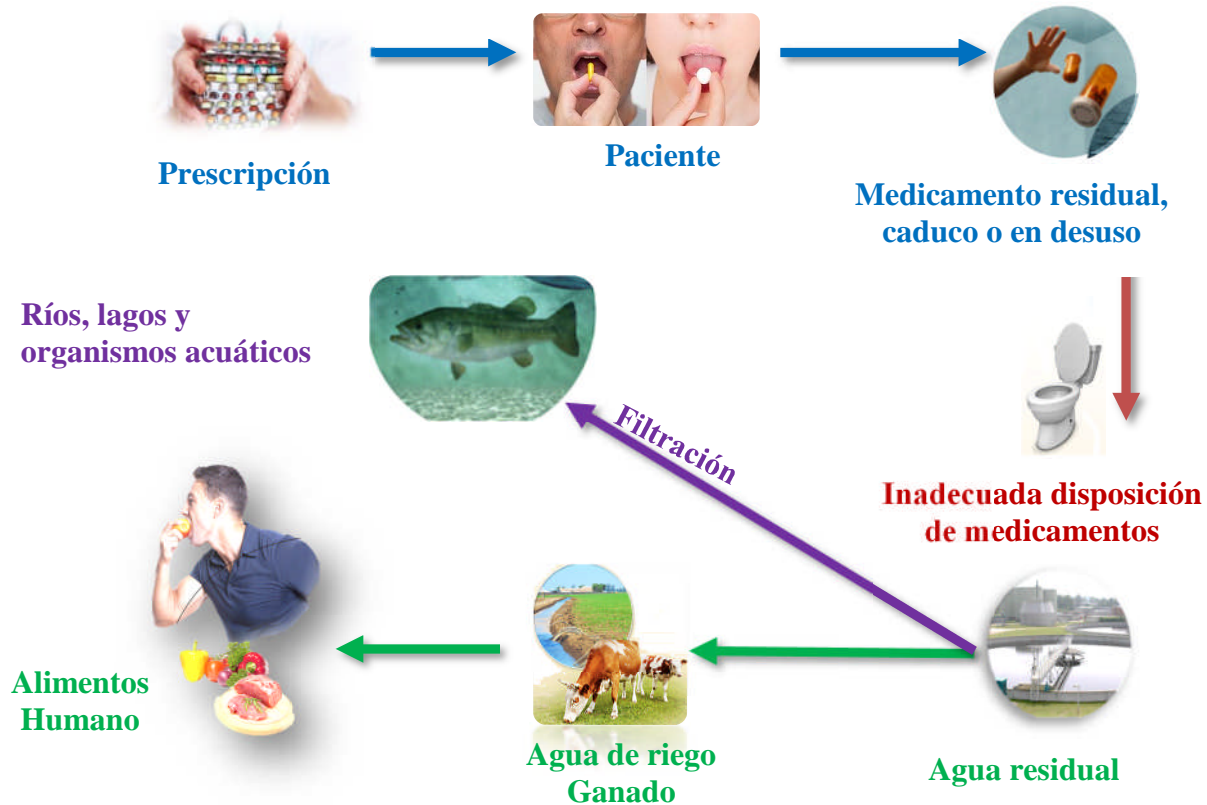


Figura 1. Ciclo de un fármaco en el ambiente (Jiménez, 2011).

### 3.2.2. Bioconcentración y bioacumulación

El término bioconcentración se refiere a la afinidad que algunas sustancias tienen por los tejidos de ciertos organismos por el agua, por lo que pueden alcanzar concentraciones más elevadas en esos organismos comparados con la concentración que pudiese existir en el agua (Ji et al., 2016).

La bioacumulación consiste en el incremento de la concentración de una sustancia en el organismo expuesto en función del tiempo, depende de propiedades fisicoquímicas y bioquímicas del compuesto como la solubilidad y la velocidad de eliminación (Orepesa, 2008).

a) Factor de bioconcentración: es la capacidad de bioconcentración y bioacumulación. Se mide por medio del factor de bioconcentración (BCF, por sus siglas en inglés). Este es la relación entre la concentración de la sustancia química y la concentración de la misma sustancia en el agua. (Orepesa, 2008; Wang and Hu, 2014; Magureanu *et al.*, 2015; Jewell *et al.*, 2016). Sustancias con valores de BCF elevados se bioacumularán en el organismo y podrán biomagnificarse a través de las redes tróficas por lo que su potencial para causar daño biológico es muy elevado (Lucila, María and Argelia, 2015; Loera *et al.*, 2016). La biomagnificación ocurre cuando la sustancia es concentrada de manera sucesiva en cada eslabón de la cadena trófica, como resultado las concentraciones en los organismos que están al final de dichas cadenas es mucho más elevada que los organismos que están en la base de ellas (Orepesa, 2008; Frank-Andreas Weber *et al.*, 2014; Lucila, María and Argelia, 2015).

b) Coeficiente de partición octanol-agua: la distribución de la sustancia en el agua, suelo, aire y organismos, depende de su afinidad relativa por estos medios, la cual se mide en coeficientes de partición (Orepesa, 2008; Loera *et al.*, 2016). El más utilizado es el coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ).

### 3.2.3. Persistencia

Es la característica de las sustancias a resistir la degradación fotoquímica, biológica y química, determina la vida media de la sustancia en el ambiente y se refiere a la estabilidad del fármaco (Loera *et al.*, 2016). La estabilidad se define como la capacidad de conservar sus propiedades químicas, físicas, microbiológicas y biofarmacéuticas dentro de límites especificados, depende de las condiciones de almacenamiento, exposición a la luz, así como cambios de temperatura y humedad (Blessy *et al.*, 2014).

Dependiendo de las modificaciones en sus propiedades, se presentan los siguientes tipos de inestabilidad (Blessy *et al.*, 2014):

- a) Química: consiste en la degradación del fármaco, pudiendo generar pérdida de su eficacia terapéutica y productos de degradación tóxicos.
- b) Física: se producen alteraciones de propiedades mecánicas y aspecto de las formas de dosificación.
- c) Biofarmacéutica: ocurren cambios en la biodisponibilidad del medicamento.
- d) Biológica: se produce desarrollo microbiano.

### 3.2.4. Inestabilidad química

En la inestabilidad química el fármaco sufre una degradación la cual puede ser originada por mecanismos donde variables como la temperatura, humedad e intensidad de la luz se ven involucradas (Thormann *et al.*, 2014), estos mecanismos se describen a continuación:

a) Hidrólisis: ocurre cuando los iones del fármaco reaccionan con los iones del agua para formar una molécula neutra. Los fármacos que tienen tendencia a este fenómeno son los ésteres, amidas, sales de ácidos débiles y bases fuertes; como el ácido acetilsalicílico, la penicilina, procaína, entre otros (Marolia *et al.*, 2016).

b) Oxidación: consiste en la pérdida de un átomo electropositivo, radical o electrón, o bien, la adición de un átomo electronegativo o radical. Los factores que influyen son la presencia de oxígeno, pH, luz y presencia de impurezas que pueden actuar como catalizadores (Sopaj *et al.*, 2015). Este mecanismo de degradación afecta a los esteroides, ácidos grasos poliinsaturados y fenotiazinas como simvastatina y antibióticos poliénicos con dobles ligaduras conjugadas (Feng *et al.*, 2013).

c) Isomerización: es la conversión del fármaco en su isómero óptico o geométrico que generalmente tienen menor actividad terapéutica (Elkins *et al.*, 2014). Ejemplos de fármacos más propensos a este tipo de degradación son tetraciclinas (epimerización en solución ácida), cefalosporinas (isomerización por catálisis ácido-base) y la Vitamina A (isomerización cis-trans) (Maggio *et al.*, 2014).

d) Fotoquímica: consiste en la disociación de las moléculas por efecto de la luz y se divide en directa e indirecta. La fotólisis directa ocurre cuando la molécula absorbe la luz y como resultado directo se transforma, sin ninguna colaboración de otras sustancias químicas. En la fotólisis indirecta, la energía de la luz es absorbida por fotocatalizadores (por ejemplo,  $\text{TiO}_2$ ) o agentes oxidantes como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que generan especies excitadas que transfieren energía, electrones o átomos de hidrógeno hacia la molécula y dan paso a su transformación (Franquet-Griell *et al.*, 2017).

En cuanto a la degradación en el medio ambiente, un fármaco puede sufrir degradación química principalmente por hidrólisis (en el medio acuoso) o por fotólisis (en la atmósfera), así como biodegradación aerobia o anaerobia por microorganismos (Castro-Pastrana *et al.*, 2015). El resultado de estos mecanismos es un producto de degradación, definido como toda molécula resultante de un cambio químico en la molécula de un fármaco producida con el tiempo y por la acción de luz, temperatura, pH, agua, o por reacción con un aditivo (Melo *et al.*, 2014).

La descripción de los productos de degradación observados se conoce como perfil de degradación y es utilizado para establecer la cinética de degradación de un fármaco considerando la frecuencia y presencia de los productos detectados (Alsante *et al.*, 2014).

### 3.3. Cinética de degradación

La cinética de degradación estudia la rapidez con que se pierde la actividad del fármaco y es utilizada para determinar su vida media (tiempo específico que le toma a la cantidad presente reducirse a la mitad por medio de degradación (Gidal *et al.*, 2017)) y por lo tanto indica su estabilidad (Joss *et al.*, 2006). Es una herramienta útil para la determinación de la efectividad de

remoción de un fármaco de aguas residuales e identificación de la presencia de los posibles productos tóxicos de degradación derivados de la reacción de degradación (Blair *et al.*, 2015).

Al conocer los valores de la cinética se logra predecir en qué momento se degrada el fármaco, en qué tiempo se forman los productos y a su vez conocer si son persistentes o inestables (Alsante *et al.*, 2014). Sin embargo, es importante mencionar que los compuestos químicos, en este caso el fármaco, tendrán un comportamiento cinético distinto dependiendo las condiciones a las que se encuentren expuestos (Zhang *et al.*, 2015).

En este proyecto se analizará el comportamiento cinético de degradación por un mecanismo de fotólisis para una mezcla de tres fármacos (diclofenaco, trimetoprima y 17- $\alpha$ -etinilestradiol) frecuentemente detectados en aguas residuales; para determinar su vida media y el momento en el que se presentan sus productos de degradación, para que estos datos puedan ser utilizados para la evaluación de remoción del fármaco.



### 3.4. Diclofenaco (DCF)

Es un antiinflamatorio no esteroide, utilizado como analgésico, antiartrítico, y para otro tipo de desórdenes inflamatorios (Lonappan *et al.*, 2016). Como se muestra en la Figura 2, es una molécula dicloro difenilamino que contienen un grupo ácido acético como sustituyente, el cual lo hace muy soluble en agua (Drug Bank, 2005).

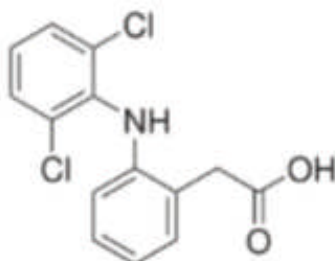


Figura 2. Estructura química del diclofenaco (Nombre IUPAC: ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil] acético) (Drug Bank, 2005).

La presencia de este fármaco se ha detectado frecuentemente en efluentes de agua residual como resultado del alto consumo de medicamentos con este principio activo (Castro-Pastrana *et al.*, 2015) y de la baja eficiencia de remoción que tratamientos de aguas residuales tradicionales poseen (20-40%) (Magureanu *et al.*, 2015). En la Figura 3, se muestra la tendencia de su consumo en 15 países comparado con otros nueve fármacos antiinflamatorios durante el año 2011 (McGettigan y Henry, 2013), donde se puede notar que el diclofenaco es el antiinflamatorio que ha tenido mayor uso.

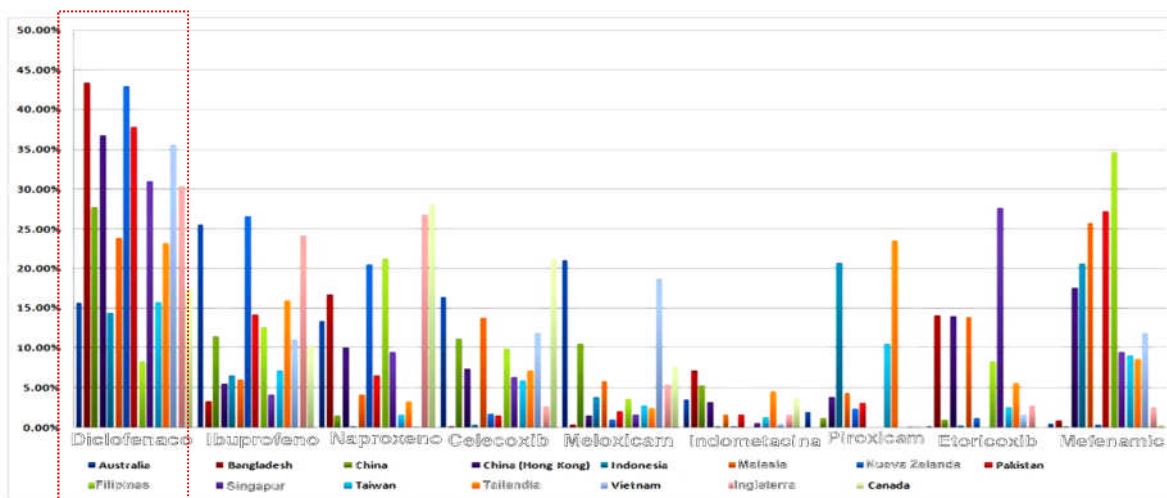


Figura 3. Consumo de nueve fármacos antiinflamatorios en 15 países durante el 2011 (McGettigan y Henry, 2013)

### 3.4.1. Propiedades fisicoquímicas del diclofenaco

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del diclofenaco (Drug Bank, 2005).

Fórmula	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>
No. CAS	15307-86-5
Peso molecular	296.149 g mol <sup>-1</sup>
Apariencia	Polvo cristalino fino blanco a blanco crema
Estado físico	Sólido
Punto de fusión	283-285 °C

Tabla 2. Movilidad, persistencia y bioconcentración del diclofenaco (Drug Bank, 2005).

Movilidad ambiental				Persistencia			Bioconcentración y bioacumulación	
Koc	Presión de vapor	Solubilidad en agua a 25 °C	pKa	Fotólisis	Biodegradación	Hidrólisis	log Kow	BCF
245	6.14 X 10 <sup>-8</sup> mm Hg a 25 °C	2.37 mg L <sup>-1</sup>	4.15	+	-	-	4.51	3.0-4.09

### 3.4.2. Toxicidad

El diclofenaco se ha detectado en el ambiente en concentraciones alrededor de 1 µg L<sup>-1</sup> (Alharbi *et al.*, 2017; Garima and Sindri, 2017). Se han reportado datos de toxicidad para este compuesto después de una exposición de corto plazo (hasta 4 días) para varias especies acuáticas incluyendo algas, plantas acuáticas, crustáceos, bivalvos y algunas especies de peces como la trucha arcoíris y el pez cebra. (Memmert *et al.*, 2013; Magureanu *et al.*, 2015; Lonappan *et al.*, 2016; Garima and Sindri, 2017).

### 3.5. Trimetoprima (TMT)

Es un antibiótico inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa, se prescribe de manera conjunta con sulfamidas para el tratamiento de enfermedades infecciosas urinarias en humanos y animales (Jewell *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017). Es una aminopiridina cuya estructura consiste en 2,4 diamina y 1,2,3-trimetoxibenceno unidos por un puente metileno, ver Figura 4 (National Center for Biotechnology, 2015).

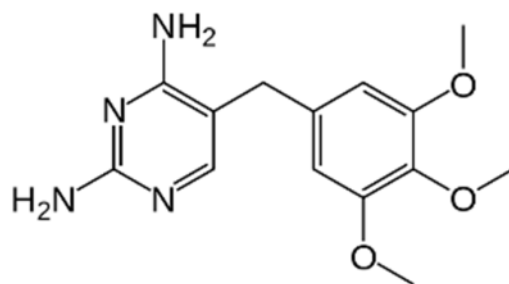


Figura 4. Estructura química de trimetoprima (Nombre IUPAC: 5-[(3,4,5-trimetoifenil) metil]pirimidin-2,4-diamina) (National Center for Biotechnology, 2015).

Los antibióticos son uno de los medicamentos más consumidos a nivel mundial (Woolhouse *et al.*, 2016). Como se observa en la Figura 5, México es uno de los países latinoamericanos con mayor consumo de este grupo terapéutico, siendo la trimetoprima y sus combinaciones uno de los tres antibióticos de mayor consumo (Center for Disease Dynamics Economics & Policy, 2015).

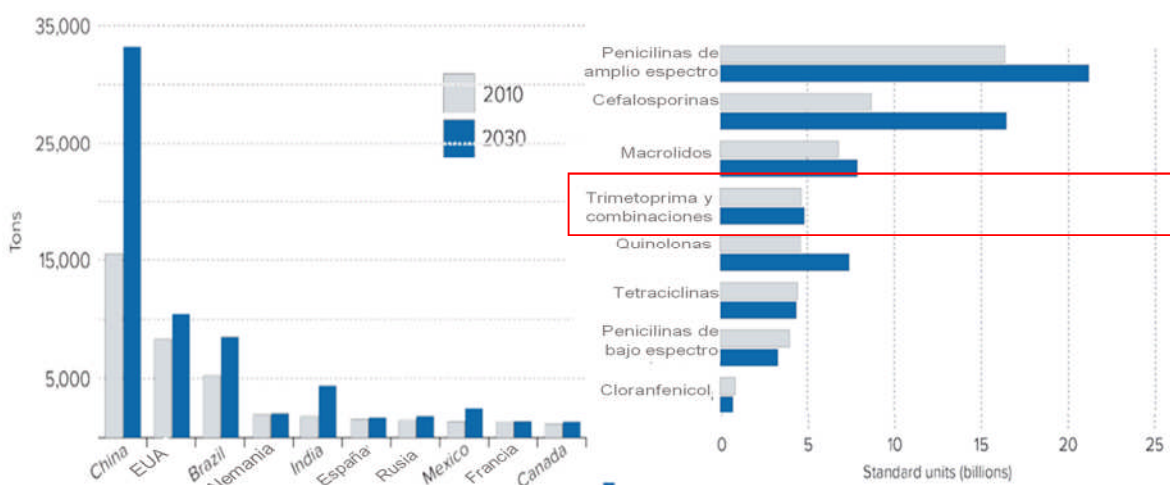


Figura 5. Consumo de principales antibióticos, durante el año 2010 y su proyección de consumo en el año 2030 (Center for Disease Dynamics Economics & Policy, 2015).

### 3.5.1. Propiedades fisicoquímicas

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de trimetoprima (National Center for Biotechnology, 2015).

Fórmula	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
No. CAS	73384-59-5
Peso molecular	290.323 g mol <sup>-1</sup>
Apariencia	Polvo cristalino blanco a blanco crema
Estado físico	Sólido
Punto de fusión	199-203 °C

Tabla 4. Movilidad, persistencia y bioconcentración de trimetoprima (National Center for Biotechnology, 2015).

<i>Movilidad ambiental</i>				<i>Persistencia</i>			<i>Bioconcentración y bioacumulación</i>	
Koc	Presión de vapor	Solubilidad en agua a 25 °C	pKa	Fotólisis	Biodegradación	Hidrólisis	log Kow	BCF
2692	9.9 x 10 <sup>-9</sup> mm Hg 25 °C	400 mg L <sup>-1</sup>	7.12	+	-	-	0.91	1.41-0.16

### 3.5.2. Toxicidad

Trimetoprima es particularmente toxico para humanos y mamíferos por administración oral a corto y largo plazo. Sin embargo, puede ser irritante y sensibilizadora. Puede ser teratogénico y embriológico (Kim, Kim and Yu, 2015). Es muy estable y es común detectarlo en concentraciones menores a 10 ng L<sup>-1</sup> en efluentes acuáticos (Wu *et al.*, 2016), su presencia continua en el ecosistema representa un peligro, ya que ha ocasionado la aparición de patógenos resistentes a los medicamentos (Wu, Chen and Kookana, 2011).

### 3.6. 17- $\alpha$ -etinilestradiol (EE2).

Es un estrógeno esteroídico sintético, derivado del estradiol, para administración oral. Se caracteriza por la presencia de un grupo etinilo en la posición 17 alfa en la molécula del estrógeno (Ver Figura 6) (Micevych *et al.*, 2007).

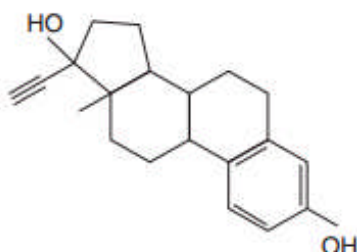


Figura 6. Estructura química de 17- $\alpha$ -etinilestradiol (Nombre IUPAC: 8R,9S,13S,14S,17R)-17-etinil-13-metil-7,8,9,11,12,14,15,16-octahidro-6H-ciclopenta[a]fenantrene-3,17-diol) (Drug Bank, 2005).

Al igual que el estradiol, constituye el principal ingrediente activo de medicamentos anticonceptivos, se utiliza en las terapias de reemplazamiento estrogénico, y para prevenir o reducir los síntomas asociados a la menopausia (Orepesa, 2008), está identificado como uno de los compuestos disruptores endócrinos estrogénicos (e-EDCs) que pueden ser hormonalmente activos a bajas concentraciones y provocar efectos negativos en el sistema endócrino de humanos y animales. Como se muestra en la Figura 7 durante los últimos 20 años el uso de medicamentos con este tipo de activo se ha incrementado, dando paso al incremento de la generación de residuos que pueden ser liberados al medio ambiente (Jurgens *et al.*, 2002).

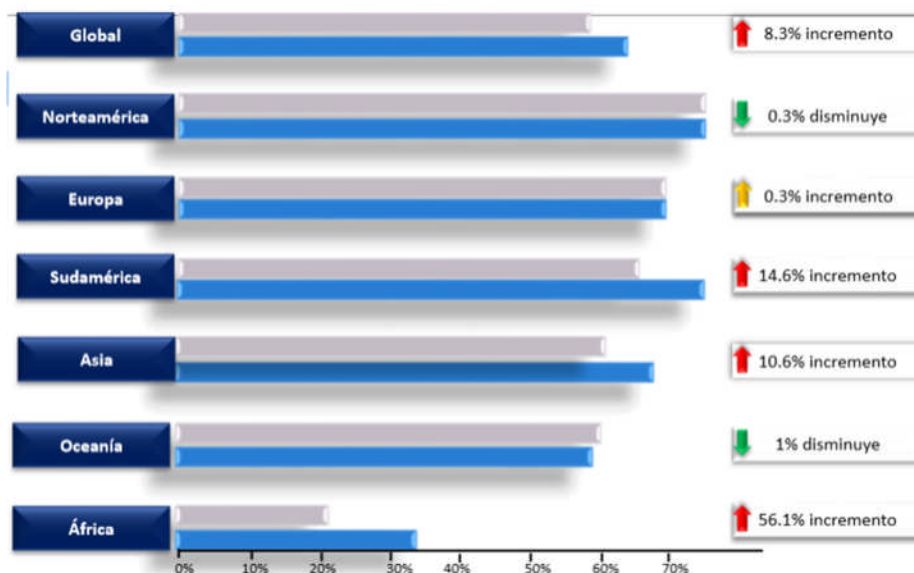


Figura 7. Uso de anticonceptivos a nivel mundial. (Jurgens *et al.*, 2002).

### 3.6.1. Propiedades fisicoquímicas

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de 17- $\alpha$ -etinilestradiol (Drug Bank, 2005).

Fórmula	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
No. CAS	50-63-6
Peso molecular	296.403 g mol <sup>-1</sup>
Apariencia	Polvo cristalino fino blanco a blanco crema.
Estado físico	Sólido
Punto de fusión	142 °C- 144 °C.

Tabla 6. Movilidad, persistencia y bioconcentración de 17- $\alpha$ -etinilestradiol (Drug Bank, 2005).

Movilidad ambiental				Persistencia			Bioconcentración y bioacumulación	
Koc	Presión de vapor	Solubilidad en agua a 25 °C	pKa	Fotólisis	Biodegradación	Hidrólisis	log Kow	BCF
6310	1.95 x 10 <sup>-9</sup> mm Hg a 25 °C	11.3 mg L <sup>-1</sup>	10.33	+	-	-	3.67	3.88

### 3.6.2. Toxicidad

El etinilestradiol ha sido detectado en aguas superficiales en concentraciones en el rango de 0.05 a 831 ng L<sup>-1</sup>, (Orepesa, 2008) aunque son relativamente bajas, su potencia disruptora endocrina es de 10 a 50 veces más elevada que otros estrógenos naturales como el estradiol y la estrona. Algunos efectos ocasionados por la exposición de esta sustancia a los organismos incluyen la disminución de su eficacia reproductora debido a su interacción con el receptor de estrógenos, alteraciones en la diferenciación sexual, generación de individuos intersexo y alteraciones en el comportamiento reproductivo.

### 3.7. Validación de un método analítico por CLAR

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra.

La validación es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

Los métodos se pueden clasificar en función de su propósito analítico:

- a) Métodos para cuantificar el analito (contenido o potencia)
- b) Métodos para establecer la presencia del analito a un límite
- c) Métodos para identificar el analito

Esta clasificación se utiliza para establecer los parámetros de desempeño a estudiar en la validación del método analítico. La tabla 7 muestra los parámetros requeridos dependiendo de la aplicación del método analítico.

Tabla 7. Parámetros de desempeño a estudiar en un método analítico (CNQFB, 2002)

Parámetro de Desempeño	Contenido Potencia/ Valoración	Prueba de Impurezas		Identidad
		Contenido/ Valoración	Límite	
Adecuabilidad del Sistema	Si	Si	Si	*
Precisión del Sistema	Si	Si	Si	*
Linealidad del Sistema	Si	Si	No	No
Especificidad <sup>1</sup>	Si	Si	No	Si
Exactitud y repetibilidad	Si	Si	No	No
Linealidad del método	Si	Si	No	No
Precisión intermedia <sup>2</sup>	Si	Si	No	No
Estabilidad analítica de la muestra <sup>2</sup>	*	*	No	No
Límite de Detección	No	No	Si	No
Límite de Cuantificación	No	Si	No	No
Robustez	*	*	*	No
Tolerancia	*	*	*	No

\*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

Como se indica la tabla los parámetros a evaluar durante la validación del método analítico, deberán estudiarse dependiendo de la clasificación del método, y teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

1. La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía de capa fina.
2. También es definido como un estudio de tolerancia.
3. Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

# Hipótesis y objetivos



#### 4.1. Hipótesis

La presencia de radiación UV afecta la estabilidad de los fármacos diclofenaco, trimetoprima y 17- $\alpha$ -etinilestradiol y favorece la formación de sus productos de degradación estables.

#### 4.2. Objetivo general

Determinar el comportamiento cinético y la vida media de diclofenaco, trimetoprima y 17- $\alpha$ -etinilestradiol en solución acuosa bajo radiación de luz UV.

#### 4.3. Objetivos Específicos

- Caracterizar los estándares y fármacos a utilizar mediante las técnicas analíticas de Espectrofotometría por UV Visible e Infrarrojo.
- Optimizar y validar los métodos analíticos por cromatografía de líquidos (CLAR) para la identificación y cuantificación de los fármacos diclofenaco, trimetoprima y 17- $\alpha$ -etinilestradiol.
- Implementar a nivel laboratorio una celda fotolítica para la realización de la degradación de los fármacos bajo radiación de luz UV (fotodegradación).
- Realizar la prueba de degradación bajo radiación de luz UV (fotodegradación) de los fármacos diclofenaco, trimetoprima y 17- $\alpha$ -etinilestradiol.
- Determinar la cinética de degradación y vida media de los fármacos por cromatografía de líquidos (CLAR).
- Evidenciar y determinar la estabilidad de los productos de degradación de los fármacos en medio acuoso por Cromatografía de líquidos (CLAR).

# Metodología

## 5. METODOLOGÍA

El desarrollo experimental se realizó considerando las actividades mostradas en el diagrama de flujo de la Figura 8. Se inició con la caracterización de los fármacos y la validación del método analítico, finalizando con los experimentos de fotodegradación y el análisis de los resultados.

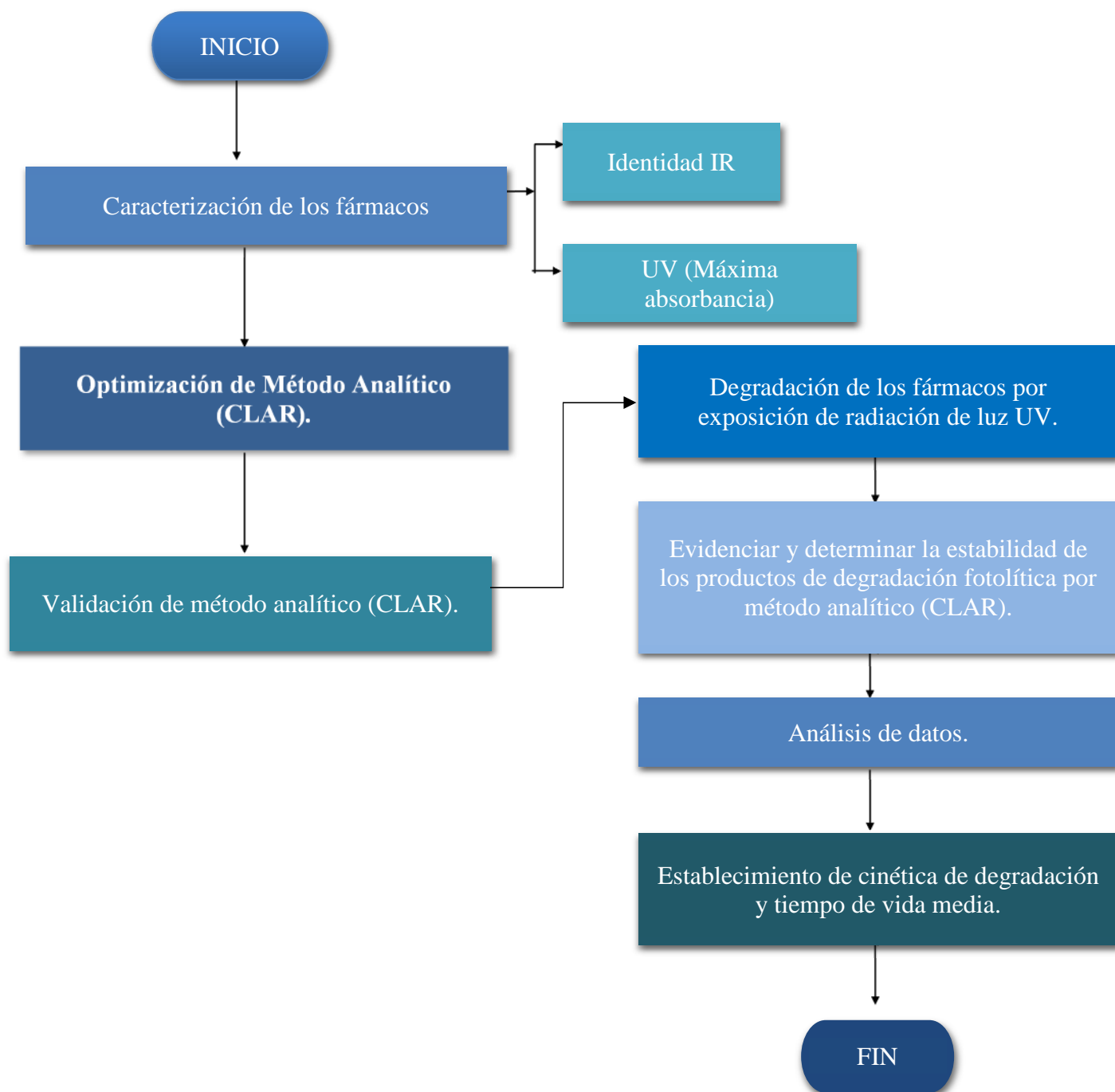


Figura 8. Diagrama de flujo de metodología

### 5.1. Caracterización de los fármacos

Los fármacos utilizados corresponden a diclofenaco, trimetoprima y 17- $\alpha$  etinilestradiol de la marca Sigma Aldrich con 98% de pureza grado estándar.

#### a) Identidad por radiación infrarroja (IR)

Se obtuvieron los espectros de absorbancia de FTIR para diclofenaco, trimetoprima y 17- $\alpha$  etinilestradiol con el Espectrómetro IR Avatar 360 (Nicolet) usando pastillas de KBr. Las pastillas se prepararon mezclando cada muestra con KBr seco, aplicando una presión aproximada a 8 toneladas durante 5 minutos. Se realizaron 32 barridos sobre el intervalo de número de onda de 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ . El software OMNIC fue utilizado para la interpretación del espectro IR.

#### b) Identidad por Ultravioleta (UV)

La prueba se realizó en un espectrofotómetro Lambda 25-Perkin Elmer con software UV WinLab, tomando lectura de una solución de 10  $\text{mg L}^{-1}$  de cada uno de los fármacos.

Las soluciones se prepararon realizando una dilución de una solución de 100  $\text{mg L}^{-1}$  con agua desionizada tipo 1 Milli-Q. Para el caso del EE2 se diluyó previamente con metanol y la TMT con acetonitrilo.

Con esta prueba se definió la longitud de onda a la que hay mayor absorción, para determinar las condiciones del método analítico CLAR.

### 5.2. Cuantificación de la concentración de los fármacos por CLAR

Se propuso la metodología descrita a continuación, para la determinación de diclofenaco, trimetoprima y 17- $\alpha$ -etinilestradiol por CLAR.

Equipo: Waters Detector 2487 (ABS dual) Bomba 515 de flujo isocrático con detector UV.

Materiales: estándar de referencia de diclofenaco, trimetoprima y 17- $\alpha$ -etinilestradiol de la marca Sigma Aldrich, acetonitrilo grado HPLC, agua desionizada tipo 1 Milli-Q, ácido fórmico.

Condiciones cromatográficas:

- Columna: Columna Eclipse XDB- C18 5  $\mu\text{m}$  4.6 x 250 mm
- Flujo: 1.0  $\text{mL min}^{-1}$
- Fase móvil: Acetonitrilo: Ácido fórmico 0.1% (v/v) 70:30
- Volumen de inyección: 10  $\mu\text{L}$
- Temperatura de columna: ambiente
- Longitud de onda: 280 nm.

a) Validación de método

La validación del método analítico se realizó conforme a lo indicado en la Guía de Validación de Métodos Analíticos emitida por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (CNQFB, 2002).

En la Tabla 8 se muestra la metodología a seguir para realizar la validación del método desarrollado para la cuantificación de los analitos estudiado.

Tabla 8. Parámetros, metodología y criterios de aceptación de la validación (CNQFB, 2002)

Parámetro de desempeño	Preparación	Criterio de aceptación
Adecuabilidad	Preparar una muestra obtener seis lecturas	$CV \leq 2.0\%$
Precisión del sistema	Preparar seis muestras	$CV \leq 1.5\%$
Linealidad del sistema	Preparar 5 niveles en un intervalo de concentración de 40% - 120%	$r^2 \geq 98.0$ IC ( $\beta_1$ ) No debe incluir el cero
Exactitud y Repetibilidad	Preparar seis muestras a la concentración de 100% con placebo adicionado	El porcentaje de recobro y el coeficiente de variación global deben cumplir el siguiente: El intervalo de confianza para la media poblacional (IC ( $\mu$ )) incluye el 100 % o el promedio del % de recobro se incluye en el intervalo de 98.0 % - 102.0 %. $C.V. \leq 2.0 \%$ .
Linealidad del método	Preparar tres niveles de 40% - 140% con placebo adicionado	$r^2 \geq 0.98$ . IC ( $\beta_1$ ) Incluye la unidad. IC ( $\beta_0$ ) Incluye el cero. $C.V. y/x. \leq 2.0 \%$ . El porcentaje de recobro y el C. V. de cada nivel y global del intervalo de la linealidad deben cumplir con el siguiente: IC ( $\mu$ ) incluye el 100 % y/o se incluye en el intervalo de 98.0 % - 102.0% $C.V. \leq 2.0 \%$ .
Precisión del método	Preparar por dos analistas y en dos días diferentes	$C.V. \leq 2.0 \%$ .

### 5.3. Degradación de fármacos con equipo de radiación por luz UV

Se utilizó una celda fotolítica con agitación consistente en un reactor tipo batch equipado de una lámpara monocromática tipo UV-C con una longitud de onda fija ( $\lambda=254$  nm) y potencia de 15 W; con un sistema de reflujo para mantener la temperatura constante (298,288 y 278 K) y una parrilla de agitación magnética a 700 rpm aproximadamente, el reactor se encuentra aislado de la luz exterior. La Figura 9 muestra el esquema del dispositivo.

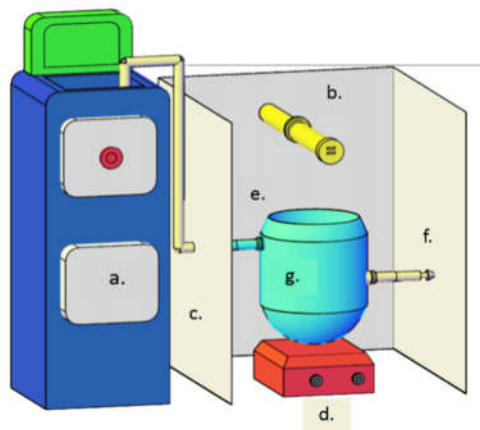


Figura 9. Equipo de degradación por luz UV.

- a) Baño de agua para control de temperatura. b) Lámpara. c) Cámara de oscuridad. d) Parrilla para agitación magnética. e) y f) Salida y entrada de agua g) Reactor con muestra del fármaco en solución

#### 5.3.1. Seguimiento de la degradación de los fármacos

Se tomaron alícuotas de la solución irradiada a diferentes intervalos de tiempo para evaluar el cambio en la concentración inicial de la solución y evidenciar la formación de sus productos de degradación. Previo a su análisis las muestras se filtraron usando acrodiscos de nylon con tamaño de poro de  $0.45 \mu\text{m}$ . El análisis cuantitativo se realizó utilizando un método analítico de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

#### 5.3.2. Determinación de cinética de fotodegradación y vida media de los fármacos

Los datos obtenidos del experimento de fotodegradación y de la cuantificación por el método cromatográfico se trataron aplicando el método integral (Scott Fogler, 2002), el cual implica suponer el orden de reacción (0, 1, 2, etc.) y sustituir los datos obtenidos en la ecuación de velocidad de degradación correspondiente al modelo del sistema, con el propósito de obtener el mejor ajuste a los datos experimentales, obteniendo la constante cinética y la vida media de cada uno de los fármacos.

# Resultados y discusión

## 6.1. Caracterización del fármaco

### 6.1.1. Identidad por radiación infrarroja (IR)

#### a) Diclofenaco

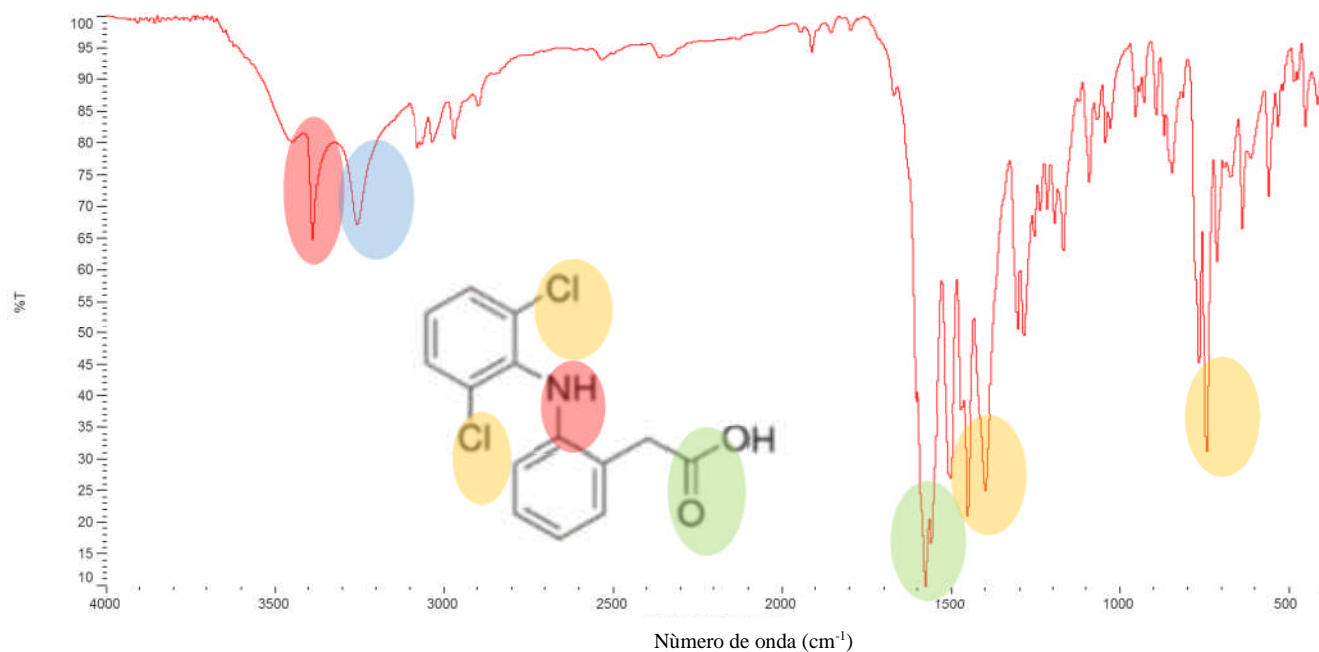


Figura 10. Espectro IR de DCF

Tabla 9. Interpretación de espectro infrarrojo de DCF

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional
3750-3000	N-H alargamiento
3300-2900	Ar-H alargamiento
3000-2700	-CH <sub>2</sub> -, C-H alargamiento
3000- 2700	H-C=O alargamiento
1900-1650	C=O alargamiento
1500-1450	-Cl flexión
850-750	-Cl flexión
1475-1300	-CH- flexión
1000-650	Ar-H flexión

Como se muestra en la Figura 10 y se indica en la Tabla 9 el espectro infrarrojo muestra los principales picos de absorción a 3381.26 cm<sup>-1</sup> debido a la presencia de aminas secundarias (- NH), 1575.31 cm<sup>-1</sup> debido a iones carboxilo (- C = O) y 770.36 cm<sup>-1</sup> debido a que se extiende en el espectro de C-Cl. Los datos obtenidos coinciden con lo reportado en la literatura (Durga, Lohithasu and Murthy, 2017; Hana *et al.*, 2017).



b) Trimetoprima

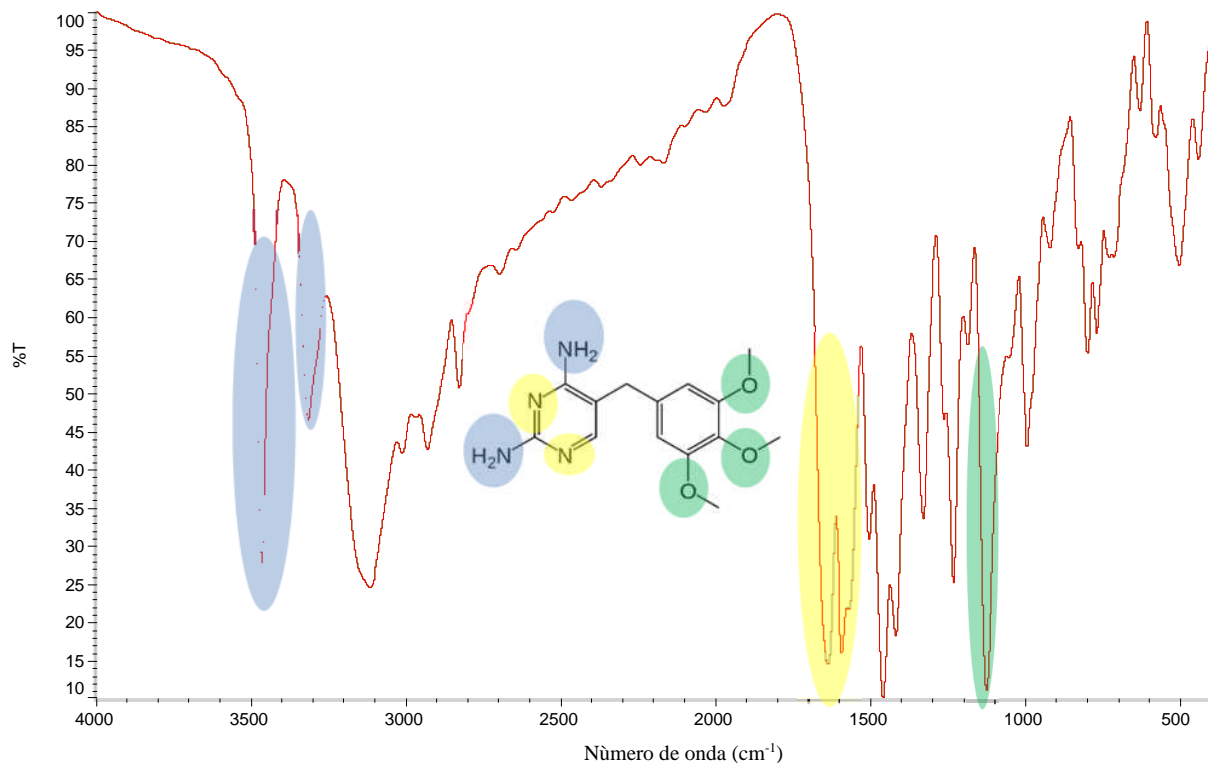


Figura 11. Espectro IR de TMT.

Tabla 10. Interpretación de espectro infrarrojo de TMT.

Número de onda	Grupo funcional
3500	N-H <sub>2</sub> Alargamiento asimétrico
3400	N-H <sub>2</sub> Alargamiento simétrico
3300-2900	Ar-H alargamiento
3000-2700	-CH <sub>2</sub> -, C-H alargamiento
1620-1590	N-H <sub>2</sub> deformación por superposición con anillo aromático
1500-1400	CH Anillo aromático flexión
1400-1300	CH flexión
1200-1100	Metoxi aromático flexión
1000-650	Ar-H flexión

La Figura 11 y la Tabla 10 indican los principales picos de absorción a 3500 y 3400 cm<sup>-1</sup> debido a la presencia del grupo amino primario (-NH), 1575.31 cm<sup>-1</sup> debido a iones carboxilo (-C=O). Los datos obtenidos coinciden con lo reportado en la literatura (Manius, 1978; Hernández *et al.*, 2018).

c) 17- $\alpha$  etinil estradiol

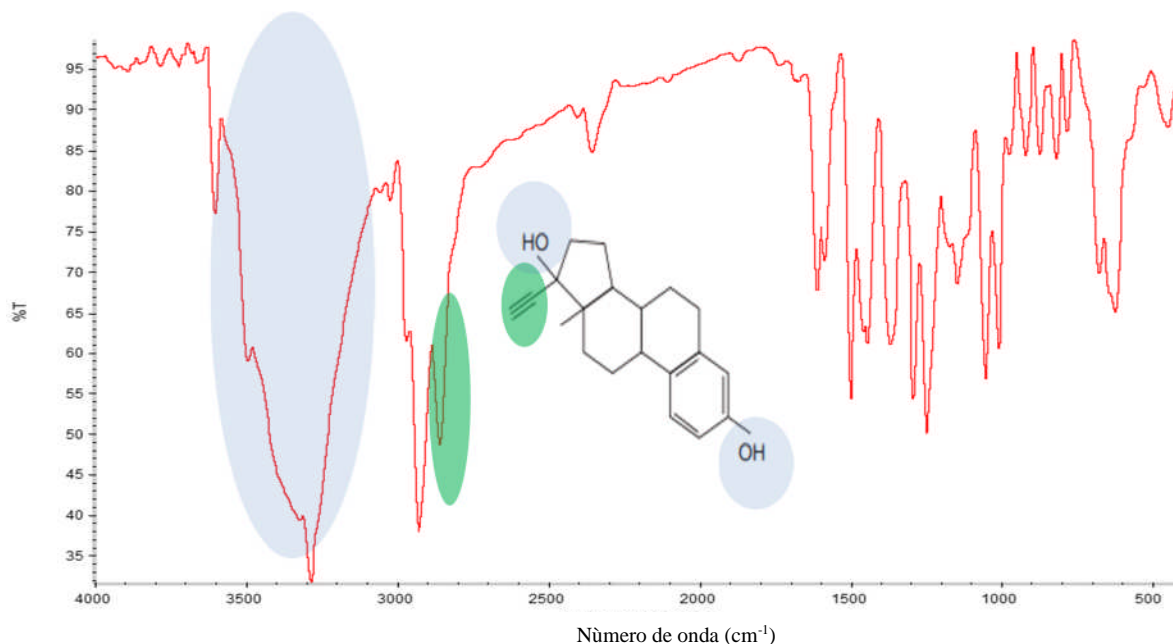


Figura 12. Espectro IR de EE2.

Tabla 11. Interpretación de espectro infrarrojo de EE2.

Numero de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo funcional
3350-3250	OH alargamiento
3300	CH alargamiento
2980-2580	$\text{C}\equiv\text{C}$ alargamiento
1600-1475	$\text{C}=\text{C}$ alargamiento
700-800	C-H flexión

En la Figura 12 y en la Tabla 11 se muestra el espectro IR de EE2 con una señal dentro del Intervalo de  $3350\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$ , la cual representa un grupo de alcohol (OH). Otra señal se encuentra en  $2980\text{-}2580\text{ cm}^{-1}$ , indicando la presencia del grupo alquilo. Los datos obtenidos coinciden con el espectro FTIR de Spectral Database Organic Compounds SDBS No.: 10994.

#### 6.1.2. Identidad por Ultravioleta (UV)

Se encontró que la longitud de onda con máxima absorbancia para los tres fármacos es 280 nm (Figura 13). Esta corresponde a la absorción del doble enlace del anillo aromático que constituye a la molécula de cada uno de los fármacos, esta longitud de onda se utilizó como referencia para las lecturas del método analítico.

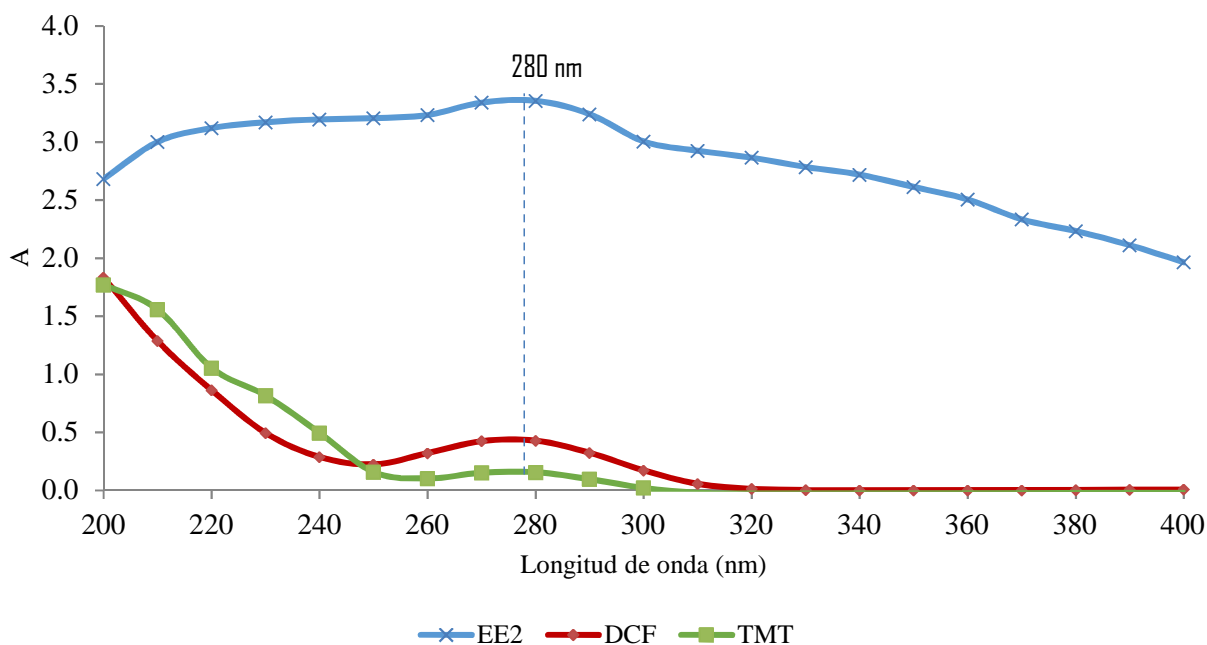


Figura 13. Espectro UV de DCF, EE2 y TMT.

#### 6.2. Método analítico para cuantificación por cromatografía de líquidos

Para determinar el tiempo de retención de los fármacos se inyectó una solución de 10 mg L<sup>-1</sup> de cada estándar en un cromatógrafo Waters Detector 2487 (ABS dual) Bomba 515 de flujo isocrático con detector UV bajo las condiciones cromatográficas descritas en la Tabla 12.

Tabla 12. Condiciones cromatográficas para la determinación de fármacos en estudio.

Columna	Eclipse XDB- C18 5 μm 4.6 x 250 mm
Flujo	1.0 mL min <sup>-1</sup>
Fase móvil	A: acetonitrilo: B: ácido fórmico 0.1% 70:30 (v/v)
Volumen de inyección	10 μL
Temperatura de columna	Temperatura ambiente
Longitud de onda	280 nm
Equipo	Cromatógrafo de líquidos marca Waters Detector espectrofotométrico de onda dual modelo 2487 Bomba isocrática modelo 515 Sistema de inyección automática modelo 717 Software Waters Breeze

Los tiempos de retención se reportan se muestran en los cromatogramas de la figuras 14 a la 16:

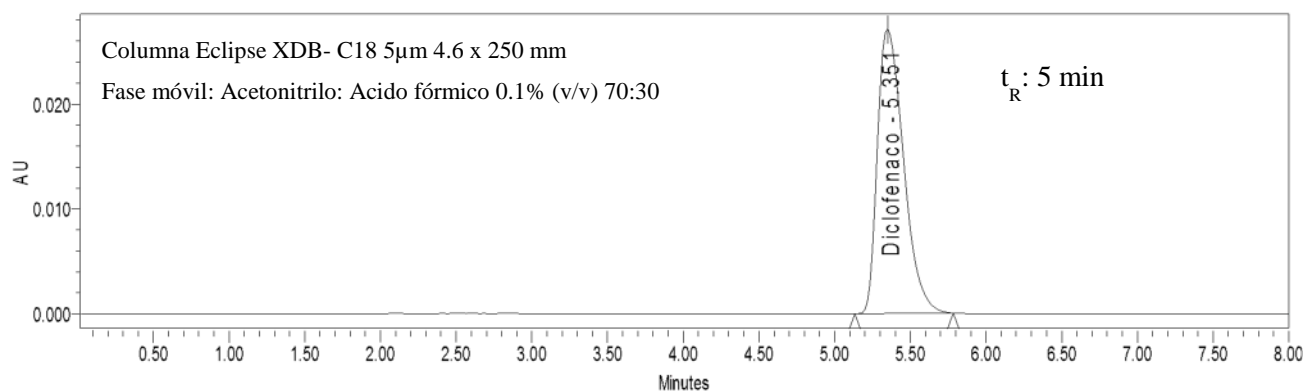


Figura 14. Cromatograma de inyección individual de diclofenaco.

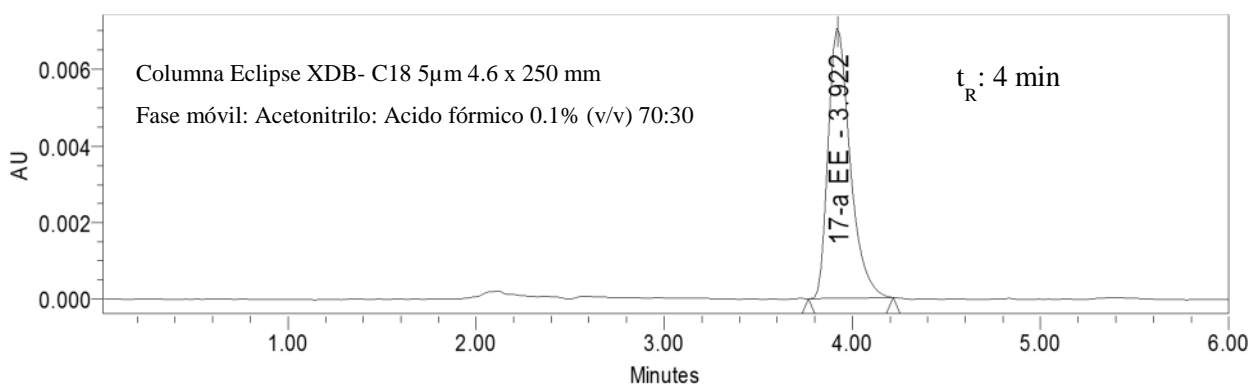


Figura 15. Cromatograma de inyección individual de 17- $\alpha$  etinil estradiol.

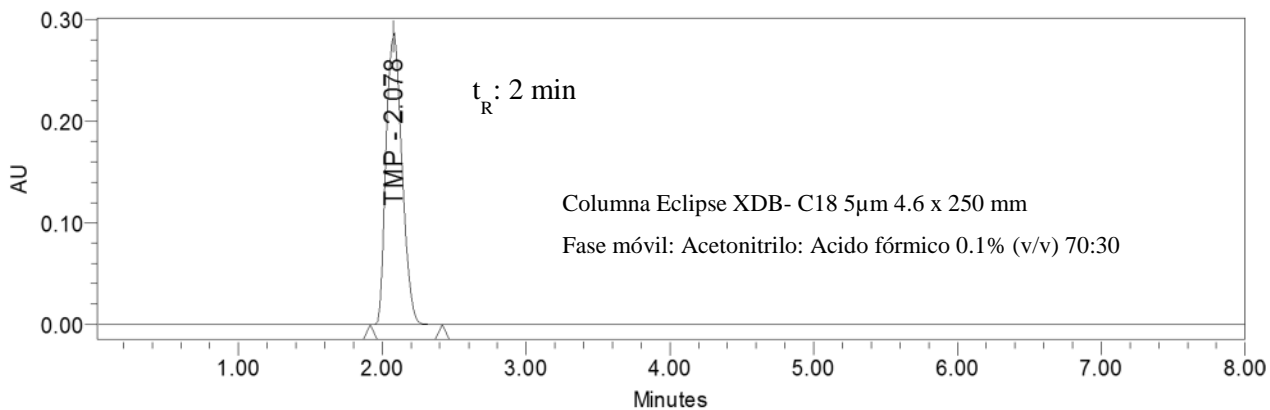


Figura 16. Cromatograma de inyección individual de trimetoprima.

#### 6.2.1. Validación de método

La validación del método analítico se realizó conforme a lo indicado en Guía de Validación de métodos analíticos editada por el Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México. Los resultados de la validación se reportan en la Tabla 13, indicado que el método analítico es exacto, preciso y lineal y los resultados son reproducibles para cada una de las pruebas analíticas. En los Anexos del 1 al 7 se describe la obtención de los parámetros para la validación.

Tabla 13. Resultados de validación del método analítico CLAR.

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Resultado DCF	Resultado EE2	Resultado TMT
Adecuabilidad del sistema	$CV \leq 2.0\%$	CV =1.6%	CV = 0.5%	CV = 1.2%
Precisión del sistema	$CV \leq 1.5\%$	CV=0.9%	CV = 1.3%	CV = 1.1%
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 98.0$ IC ( $\beta_1$ ) No debe incluir el cero	$r^2=98.8$ IC ( $\beta_1$ ) No incluye el cero	$r^2 = 98.9$ IC ( $\beta_1$ ) No incluye el cero	$r^2 = 98.6$ IC ( $\beta_1$ ) No incluye el cero
Exactitud y Repetibilidad	El porcentaje de recobro y el coeficiente de variación global deben cumplir el siguiente: El intervalo de confianza para la media poblacional (IC ( $\mu$ )) incluye el 100 % o el promedio del % de recobro se incluye en el intervalo de 98.0 % - 102.0 %. C.V. $\leq 2.0$ %.	IC ( $\mu$ ) incluye el 100 % % de Recobro = 100.00 C.V. = 0.62 % IC: 100.65%-99.35%	IC ( $\mu$ ) incluye el 100 % % de Recobro = 98.10 % C.V. = 0.95 % IC: 98.97%-97.23%	IC ( $\mu$ ) incluye el 100 % % de Recobro = 100.95 % C.V. = 1.31 % IC: 102.00%-99.56%
Linealidad del método	$r^2 \geq 0.98$ . IC ( $\beta_1$ ) Incluye la unidad. IC ( $\beta_0$ ) Incluye el cero. C.V. y/x. $\leq 2.0$ %. El porcentaje de recobro y el C. V. de cada nivel y global del intervalo de la linealidad deben cumplir con el siguiente: IC ( $\mu$ ) incluye el 100 % y/ó se incluye en el intervalo de 98.0 % - 102.0% C.V. $\leq 2.0$ %.	$r^2 = 0.9987$ IC ( $\beta_1$ ) Incluye la unidad IC ( $\beta_0$ ) Incluye el cero IC ( $\mu$ ) Incluye el 100 % % de Recobro = 98.84% C.V. = 0.7 %	$r^2 = 0.9880$ IC ( $\beta_1$ ) Incluye la unidad IC ( $\beta_0$ ) Incluye el cero IC ( $\mu$ ) Incluye el 100 % % de Recobro = 98.80 % C.V. = 0.2 %	$r^2 = 0.9943$ IC ( $\beta_1$ ) Incluye la unidad IC ( $\beta_0$ ) Incluye el cero IC ( $\mu$ ) Incluye el 100 % % de Recobro = 99.21 % C.V. = 1.2 %
Precisión del método	C.V. $\leq 2.0$ %.	C.V. = 1.1 %	C.V. = 1.4%	C.V. = 1.9%
Límite de detección		0.0002 mg L <sup>-1</sup>	0.002 mg L <sup>-1</sup>	0.003 mg L <sup>-1</sup>
Límite de cuantificación		0.001 mg L <sup>-1</sup>	0.01 mg L <sup>-1</sup>	0.01 mg L <sup>-1</sup>

### 6.3. Degradación de los fármacos por radiación de luz UV-C

Los experimentos de fotodegradación se realizaron utilizando una solución de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  expuesta a radiación de luz ultravioleta tipo UV-C (longitud de onda de 254 nm) a tres temperaturas diferentes (278, 288 y 298 K). Se siguió el cambio de concentración tomando muestra a diferentes intervalos de tiempo y analizándolos con el método analítico CLAR descrito previamente. Un cuarto experimento se efectuó a temperatura de 298 K pero sin exposición a la radiación, el cual se consideró como un blanco para verificar si la degradación del fármaco ocurre debido al efecto de la radiación y no a la hidrólisis o algún factor ambiental no considerando dentro de la evaluación de los resultados.

#### 6.3.1. Efecto de la radiación de luz UV-C en DCF

El perfil de degradación del DCF a diferentes temperaturas se muestra en la Figura 17. En este gráfico se observa que a la temperatura de 298 K el cambio de la concentración de DCF ocurrió durante los primeros diez minutos de exposición a la radiación y después de este tiempo la concentración permaneció constante, se alcanzó un porcentaje de degradación aproximado al 90%.

Para el caso de los perfiles de las temperaturas de 288 y 278 K, el proceso de degradación ocurrió con menor rapidez, ya que alrededor de los 10 minutos el porcentaje de degradación para 288 K fue de solo 55% y para 278 de 45%, alcanzándose el 90% hasta casi los treinta minutos. Ambas temperaturas tuvieron un comportamiento similar, y durante los primeros quince minutos presentaron un cambio de concentración continuo; después de este tiempo el cambio fue en menor grado. Lo anterior muestra que la degradación de DCF es susceptible a los cambios de temperatura y la reacción de degradación se ve favorecida si esta se incrementa.

Alrededor de los treinta minutos las tres temperaturas alcanzaron la misma concentración (90% de degradación de DCF), punto que podría indicar que a partir de ese momento el factor de la temperatura no influye y se ha alcanzado el equilibrio de la reacción.

Para el caso del perfil definido como blanco, durante el tiempo de exposición a la radiación no se presentó alguna modificación en la concentración del compuesto indicando que la degradación fue ocasionada por la exposición del fármaco a la radiación tipo UV-C.

También se observó que durante el experimento la apariencia de las soluciones expuestas a la radiación fue cambiando gradualmente a un tono amarillo, siendo esto indicativo de la presencia de subproductos derivados de la descomposición del fármaco. Lo anterior no ocurrió en la solución indicada como blanco, aportándose como prueba adicional para confirmar que el DCF es susceptible a los efectos de la radiación tipo UV-C. La Figura 18 ilustra el aspecto inicial y final de la solución irradiada, esto concuerda con lo reportado en trabajos de fotólisis de DCF con radiación de luz solar o luz tipo UV-C, donde el tono amarillo de la solución indica que se han formado los

productos de degradación denominados como carbazoles (Eriksson, Svanfelt and Kronberg, 2010; Keen *et al.*, 2013).

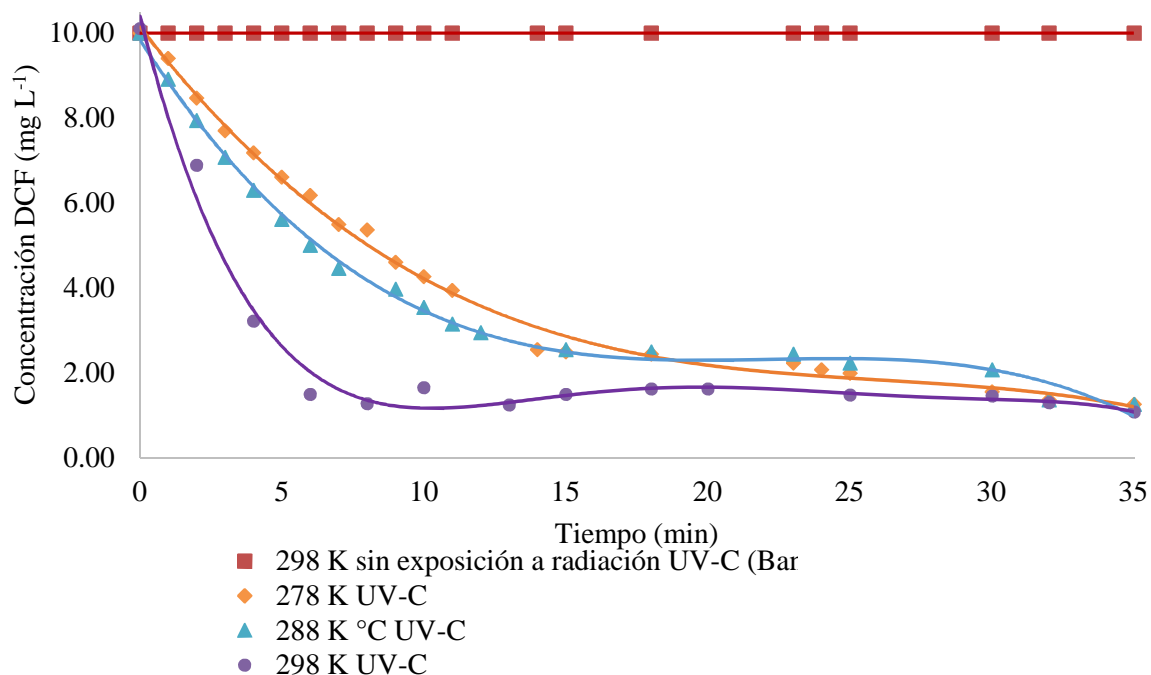


Figura 17. Perfil de degradación de DCF ( $C_0 = 10 \text{ mg L}^{-1}$ ).



Figura 18. Solución de DCF antes (a) y después (b) de la irradiación de luz UV-C.

### 6.3.2. Efecto de la radiación de luz UV-C en EE2

La Figura 19 muestra el comportamiento del EE2 para las cuatro condiciones evaluadas. Se puede observar que durante el tiempo de radiación el blanco, no presentó cambios de concentración indicando que la degradación fue debido a la exposición de la solución a la radiación tipo UV-C.

En el gráfico se aprecia que a 298 K la degradación del fármaco ocurrió en un tiempo ligeramente menor que las otras dos temperaturas; siendo la temperatura de 278 K la que presentó una degradación más lenta y con menor porcentaje de degradación (75%). A una temperatura de 298 K se alcanzó una reducción del fármaco del 95% alrededor de las 20 horas; a 288 K el 85% se alcanzó

cercano a las 22 horas de exposición a la radiación y en este mismo tiempo a 278 K la degradación fue del 75%. Lo anterior indica que la temperatura impacta ligeramente en la rapidez con la que se degrada el EE2 y la reacción se ve favorecida con su incremento.

*Figura 19. Efecto de la radiación tipo UV-C sobre la degradación de EE2 ( $C_0 = 10 \text{ mg L}^{-1}$ ).*

### 6.3.3. Efecto de la radiación de luz UV-C en TMT

El perfil de degradación para TMT se muestra en la Figura 20. Durante el tiempo de exposición el blanco no presentó cambios de concentración por lo que se confirma que la degradación ocurrió por la radiación.

Al someterlo a la radiación a una temperatura de 298 K se observó resistencia a la degradación, ya que después de 72 horas sólo se alcanzó un porcentaje de degradación aproximado al 4%. Durante las primeras 30 horas del experimento ocurrió un cambio de concentración, y después de este tiempo esta variable se mantuvo estable debido a que la reacción alcanzó el equilibrio y a partir de este punto no es susceptible a la fotólisis. Comportamientos similares se encontraron en trabajos previos, donde también se estudió el comportamiento del fármaco bajo radiación de luz UV (Kim, Kim and Yu, 2015; Wu *et al.*, 2016).

Debido al bajo porcentaje de degradación alcanzado (4%) y a la tendencia observada en los experimentos de los dos fármacos anteriores no se evaluó la degradación a las otras dos temperaturas, ya que como se observó en los resultados obtenidos el porcentaje de degradación fue menor a temperaturas por debajo de 298 K.



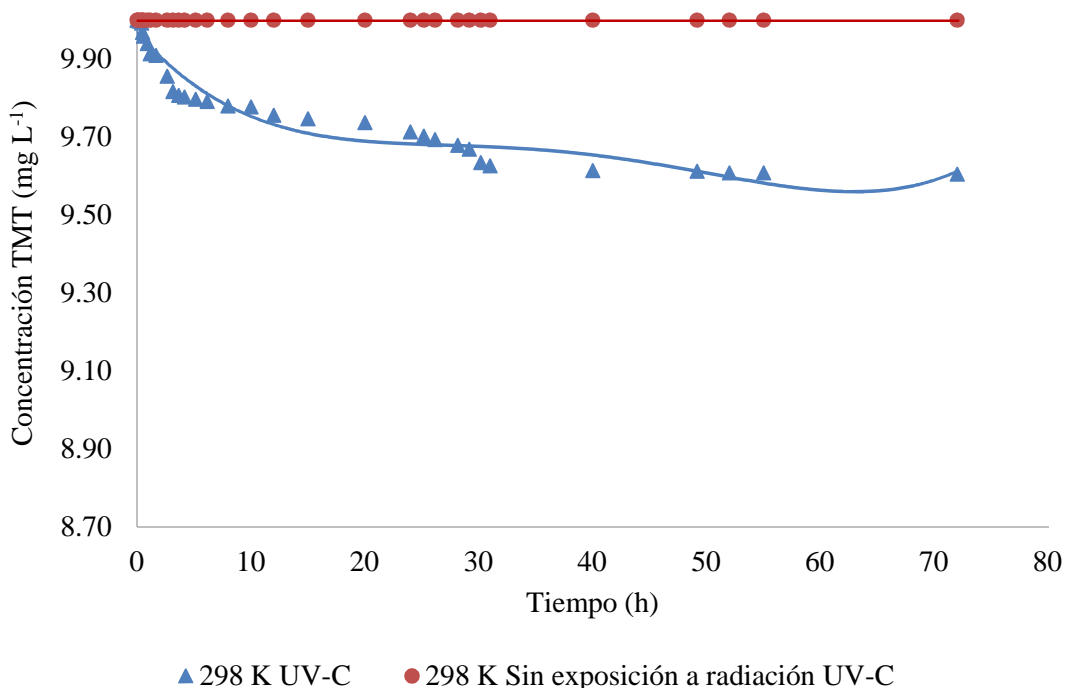


Figura 20. Perfil de degradación de TMT ( $C_0 = 10 \text{ mg L}^{-1}$ ).

#### 6.4. Modelo cinético de fotodegradación

Se tomaron alícuotas de la solución irradiada a diferentes tiempos para evaluar el cambio en la concentración inicial de la solución, cuantificando las muestras con el método analítico previamente descrito.

Para la determinación del orden de velocidad de fotodegradación se utilizaron los valores de concentración encontrados a diferentes tiempos y fueron tratados utilizando el método integral (Scott Fogler, 2002), considerando al sistema como un reactor tipo batch con agitación homogénea, volumen y temperatura constante, para obtener los parámetros que describen la ecuación de la ley velocidad de reacción siguiente:

$$r_A = \frac{dC_A}{dt} = -kC_A^\alpha \quad (1)$$

Donde  $r_A$  ( $\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) es la velocidad de reacción,  $C_A$  es la concentración del fármaco ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $t$  el tiempo (min),  $k$  el coeficiente cinético de la velocidad de reacción y  $\alpha$  el orden de la reacción.

##### 6.4.1. Cinética de fotodegradación de DCF

Para DCF se encontró que el modelo cinético de primer orden describe su perfil de degradación; esto concuerda con trabajos previos donde también se ha estudiado su cinética de fotodegradación (Hashim, Natarajan and Ray, 2014; Kovacic *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Este tipo de orden es

característico de reacciones de descomposición, degradación o isomerización (Scott Fogler, 2002). La representación matemática del modelo se muestra en la ecuación siguiente:

$$\ln \frac{C_{DCF0}}{C_{DCF}} = k_{DCF}t \quad (2)$$

Donde  $C_{DCF}$  es la concentración de diclofenaco ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $C_{DCF0}$  es la concentración inicial de diclofenaco ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $t$  el tiempo (min) y  $k_{DCF}$  el coeficiente cinético de la velocidad de reacción de DCF ( $\text{min}^{-1}$ ).

Tener una cinética de primer orden indica que su velocidad de degradación es directamente proporcional a la concentración, ocasionando que la variación de la concentración del fármaco a lo largo del tiempo dependa directamente del valor del coeficiente cinético de la reacción, como se indica en la ecuación 2.

La dependencia directa al coeficiente cinético muestra que para aumentar o disminuir la velocidad de degradación el valor de esta deberá de ser modificada. Según la ecuación de Arrhenius el valor de esta constante depende de manera directa de la energía de activación de la reacción y de la temperatura, por lo que degradación de DCF será afectada por estos dos factores de forma directa.

La Figura 21 describe el modelo cinético de primer orden para las tres temperaturas evaluadas (298, 288 y 278 K), el cual se ajustó a los datos experimentales de cambio de concentración obtenidos durante el tiempo evaluado. A partir de este modelo se determinó la variación de las tasas de cambio de concentración y del coeficiente cinético para cada temperatura. Este último se obtuvo de la pendiente de la regresión lineal de la recta en el gráfico del logaritmo de las concentraciones en función del tiempo.

Los valores calculados fueron de  $0.16 \text{ min}^{-1}$  para 298 K,  $0.11 \text{ min}^{-1}$  para 288 K y  $0.084 \text{ min}^{-1}$  a 278 K. Lo anterior indica un aumento de la constante con el incremento de la temperatura, ocasionando que la degradación ocurra en menor tiempo al aumentar el valor de este parámetro en la solución irradiada, tal y como ocurre en el perfil de degradación mostrado en la Figura 17.

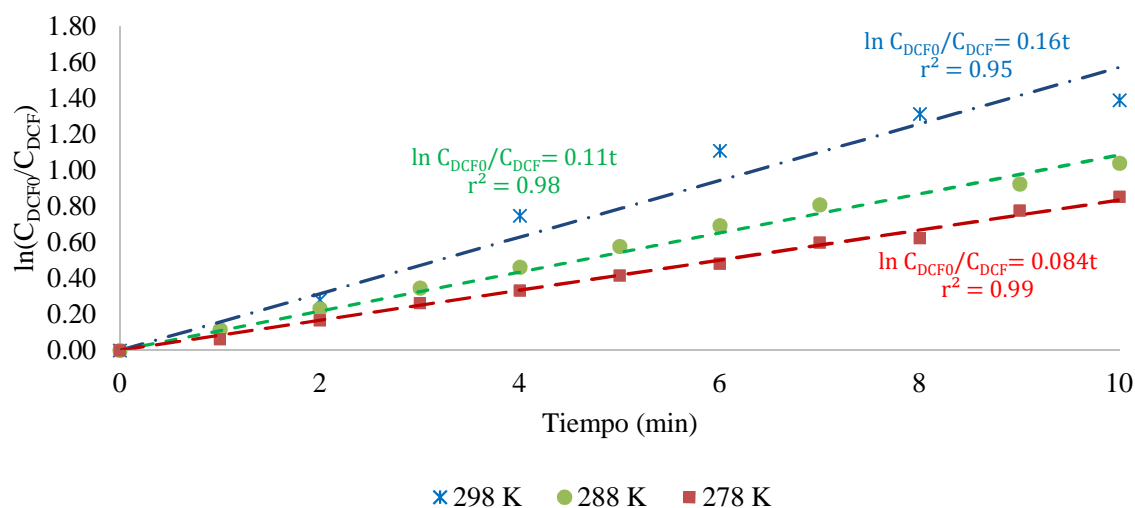


Figura 21. Modelo cinético de DCF.

#### 6.4.2. Cinética de fotodegradación de EE2

Para EE2 también se encontró que el modelo cinético de primer orden describe su perfil de degradación; coincidiendo con lo reportado en trabajos previos donde también se ha estudiado su cinética (Zhang *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2015). La representación matemática se muestra a continuación:

$$\ln \frac{C_{EE20}}{C_{EE2}} = k_{EE2}t \quad (3)$$

Donde  $C_{EE2}$  es la concentración de 17- $\alpha$  etinilestradiol ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $C_{EE20}$  es la concentración inicial de etinilestradiol ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $t$  el tiempo (min) y  $k_{EE2}$  el coeficiente cinético de la velocidad de reacción de EE2 ( $\text{min}^{-1}$ ).

La cinética de primer orden, al igual que en DCF, indica que su velocidad de degradación es directamente proporcional a la concentración, ocasionando que la cantidad del fármaco presente a lo largo del tiempo dependa de manera directa del valor del coeficiente cinético.

Este tipo de relación muestra que para aumentar o disminuir la velocidad con la que se degrada el fármaco el valor de esta variable deberá de ser modificada.

La Figura 22 describe el modelo cinético de primer orden para las tres temperaturas evaluadas (298, 288 y 278 K), a partir del cual se determinó las tasas de cambio de concentración y el coeficiente cinético para cada temperatura. De la pendiente de la recta obtenida por regresión lineal, representa el valor de los coeficientes cinéticos siendo  $0.021 \text{ min}^{-1}$  para 298 K,  $0.0015 \text{ min}^{-1}$  para 288 K y  $0.001 \text{ min}^{-1}$  a 278 K; reflejando que al aumentar la temperatura esta variable se incrementa ocasionado que la degradación ocurra en menor tiempo.

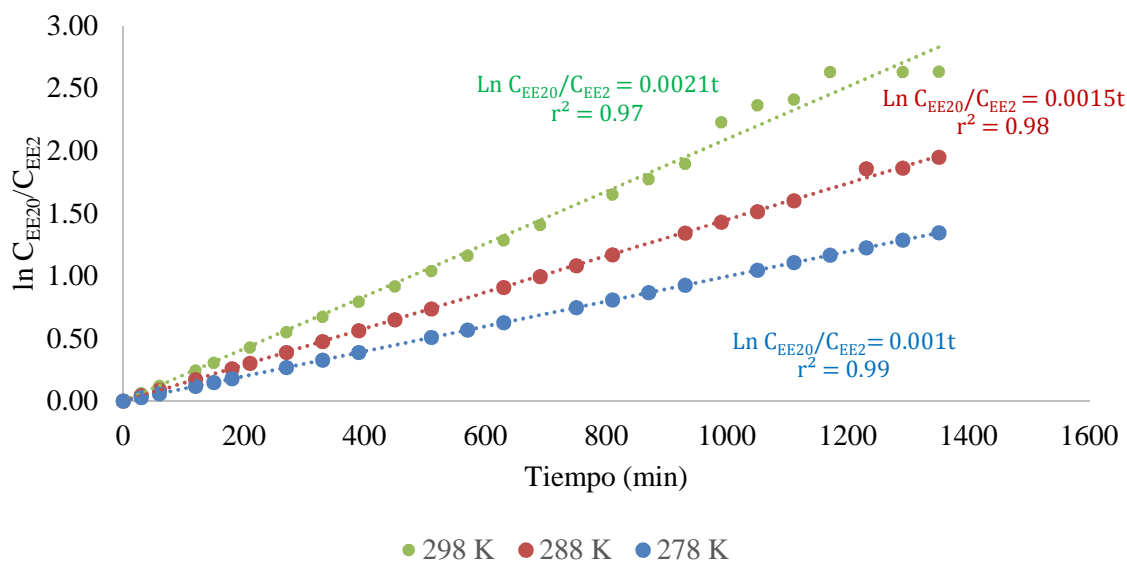


Figura 22. Modelo cinético de EE2.

#### 6.4.3. Cinética de fotodegradación de TMT

Para TMT el modelo cinético se ajustó a un orden de 0.5 para la etapa en la que ocurrió un cambio de concentración, ya que presentó una resistencia a la radiación tipo UV-C. La ecuación siguiente **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** describe la cinética de la reacción:

$$C_{TMT}^{0.5} = -k_{TMT}t + C_{TMT0}^{0.5} \quad (4)$$

Donde  $C_{TMT}$  es la concentración de trimetoprima ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $C_{TMT0}$  es la concentración inicial de trimetoprima ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $t$  el tiempo (min) y  $k_{TMT}$  el coeficiente cinético de la velocidad de reacción de trimetoprima ( $\text{mg L}^{-1})^{-1/2} \text{ min}^{-1}$ .

El orden fraccional de esta reacción indica que es una reacción no elemental a las condiciones evaluadas su reacción química se da en cadena o presenta un mecanismo de reacción complejo (Taoukis, Tsironi and Giannakourou, 2014).

Este tipo de cinética ha sido encontrado casos donde el coeficiente de velocidad de reacción es inversamente proporcional a la concentración, indicando que si la concentración se incrementa la reacción será más lenta (Hernández Enríquez *et al.*, 2011). Comportamientos similares a los resultados obtenidos se observaron en fármacos como la doxorubicina (Beijnen, van der Houwen and Underberg, 2002), donde se atribuye esta conducta a que la molécula actúa como un filtro de los fotones emitidos por la radiación, ocasionando que no se absorba la energía necesaria para la activación de la degradación, por lo que los tiempos necesarios para que se degrade el fármaco resultan ser mayores a los de un fármaco con una cinética de primer orden (Piechocki and Thoma, 2007).

La Figura 23 describe el modelo cinético de orden 0.5 a 298 K, de la pendiente de la regresión lineal de la recta se calculó el valor del coeficiente cinético siendo de  $1.34 \times 10^{-5} (\text{mg L}^{-1})^{-1/2} \text{ min}^{-1}$  a

278 K. La vida media se obtuvo de la ecuación 4, considerando la mitad de la concentración inicial siendo esta de 69133 min (48 días).

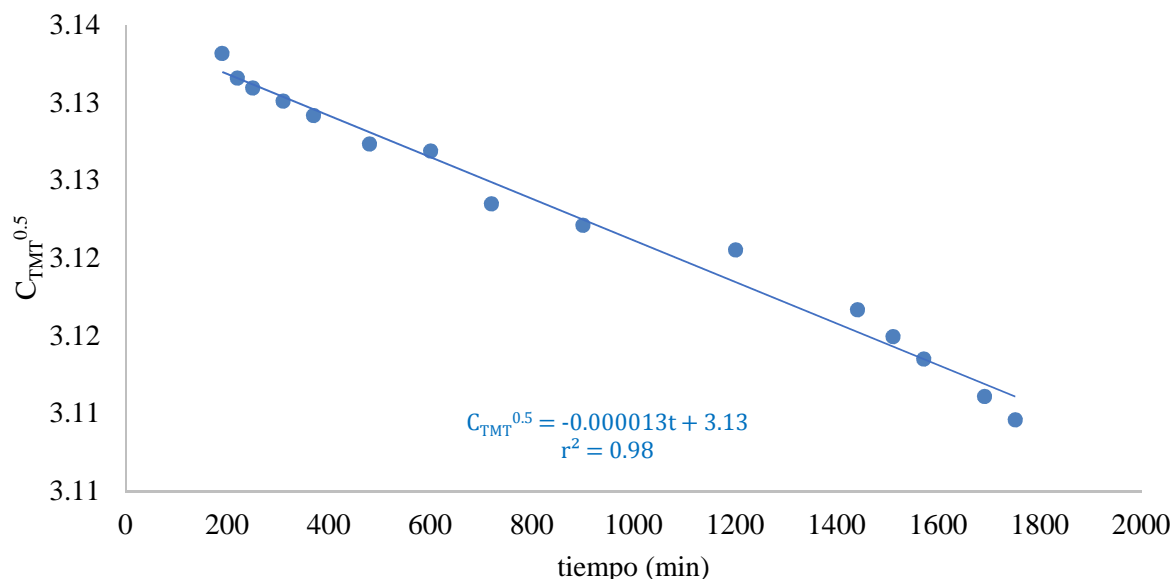


Figura 23. Modelo cinético de TMT.

En la tabla 14 se resumen los valores de las constantes cinéticas y el orden de reacción para cada uno de los fármacos a las temperaturas evaluadas, siendo DCF y EE2 reacciones de primer orden y TMT de orden 0.5, es decir una reacción no elemental.

Tabla 14. Orden cinético y constante cinética de la fotodegradación de DCF, EE2 y TMT.

Fármaco	Orden cinético	Temperatura	Valor de constante cinética	Coefficiente de correlación
DCF	1	298	$0.16 \text{ min}^{-1}$	0.95
		288	$0.11 \text{ min}^{-1}$	0.98
		278	$0.084 \text{ min}^{-1}$	0.99
EE2	1	298	$0.0021 \text{ min}^{-1}$	0.97
		278	$0.0015 \text{ min}^{-1}$	0.98
		288	$0.001 \text{ min}^{-1}$	0.99
TMT	0.5	298	$2.63 \times 10^5 (\text{mol L}^{-1})^{-1/2} \text{ min}^{-1}$	0.98

#### 6.5. Parámetros cinéticos

Con base en la ecuación de Arrhenius (Scott Fogler, 2002), se realizó la regresión lineal para la determinación de los parámetros cinéticos para DCF y EE2, considerando el modelo matemático mostrado a continuación:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T} \right) \quad (5)$$

Donde  $k$  es el coeficiente cinético,  $A$  el factor de frecuencia ( $\text{min}^{-1}$ ),  $E_a$  es energía de activación ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ),  $T$  la temperatura absoluta en grados Kelvin y  $R$  es la constante de los gases ideales ( $8.314 \times 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ).

Esta ecuación es utilizada para analizar el efecto de la temperatura en la tasa de velocidad de la reacción de degradación (Scott Fogler, 2002). Las Figuras 24 y 25 muestran los gráficos de la regresión lineal de la ecuación de Arrhenius y la Tabla 15 los valores de cada uno de los parámetros calculados.

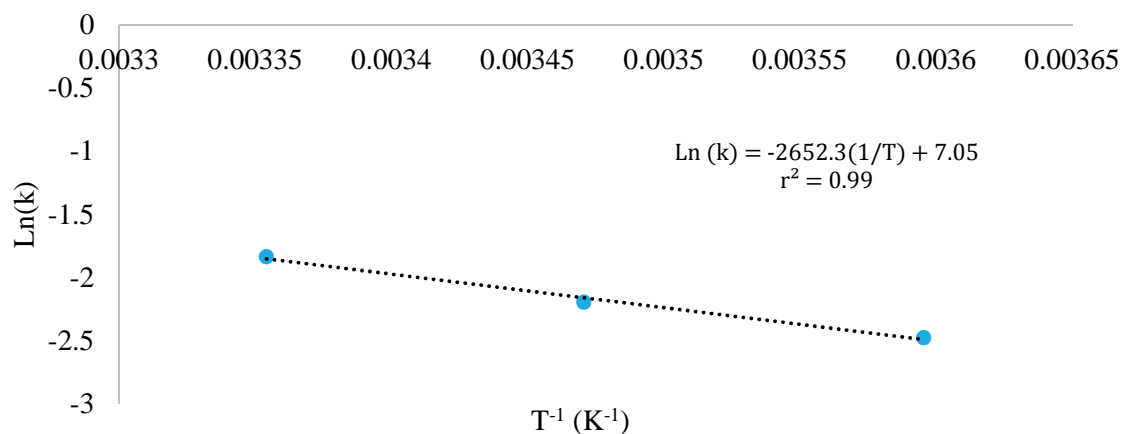


Figura 24. Regresión lineal de la ecuación de Arrhenius para DCF.

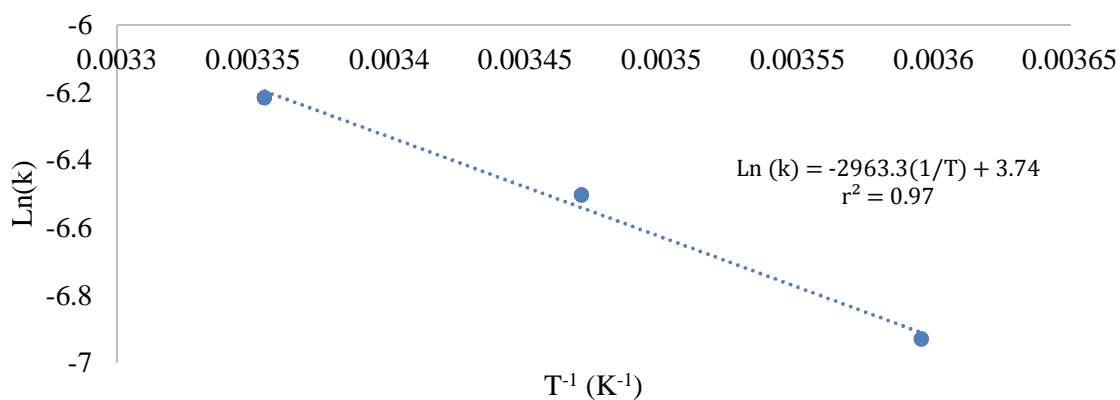


Figura 25. Regresión lineal de la ecuación de Arrhenius para EE2.

Tabla 15. Valores de las constantes de la ecuación de Arrhenius.

Fármaco	Energía de activación ( $E_a$ , $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$A$ ( $\text{min}^{-1}$ )
DCF	22.05	1.15
EE2	24.64	42.2

Utilizando los valores de  $E_a$  y  $A$  obtenidos se realizó la simulación del perfil de fotodegradación dentro del intervalo de 273 a 308 K para ambos fármacos. Posteriormente se evaluó el coeficiente cinético aparente y la vida media a diferentes temperaturas.

#### 6.5.1. Modelo cinético de DCF

El grafico mostrado en la Figura 26 se presenta la predicción del comportamiento de la fotodegradación utilizando el valor de energía de activación obtenido para DCF (Tabla 15) y la ecuación 2, donde la reducción de la concentración se favorece con el incremento de la temperatura y provoca un incremento en la velocidad de reacción.

Durante los primeros treinta minutos el DCF es afectado por la temperatura y el cambio de concentración dependerá del valor de ésta. Se observa que alrededor de los cuarenta minutos los valores de concentración son similares para todas las temperaturas evaluadas, y alrededor de los sesenta minutos cuando se alcanza la mínima concentración para todos los perfiles y la velocidad de degradación ya no es dependiente de la temperatura.

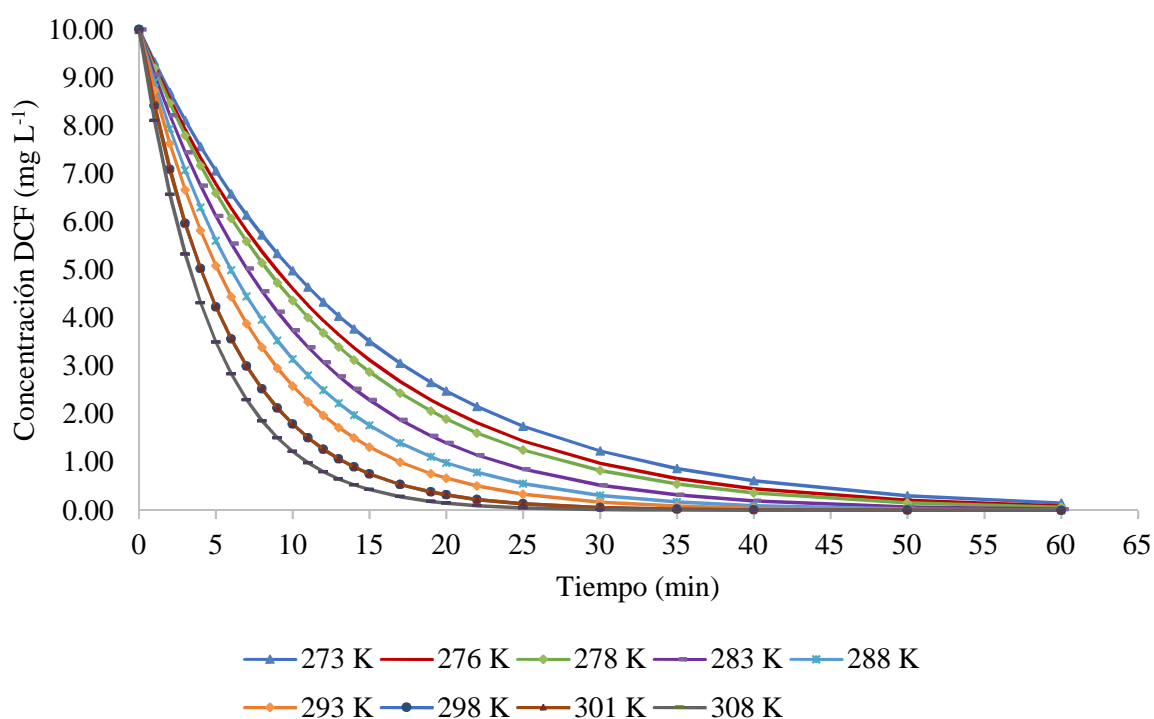


Figura 26. Predicción del comportamiento cinético de fotodegradación DCF

Dentro del intervalo de temperatura evaluado los valores del coeficiente cinético ( $k$ ) oscila entre 0.05 a 0.20  $\text{min}^{-1}$ ; mostrando que a menor temperatura la velocidad de la reacción ocurrirá de manera más lenta, y a temperatura alta la degradación será favorecida. El comportamiento de esta constante se muestra en la figura 27.

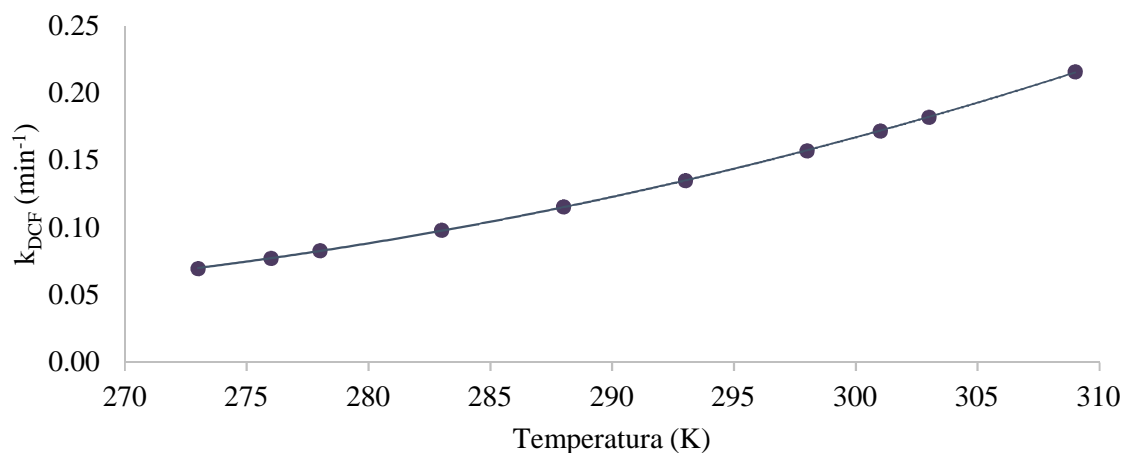


Figura 27. Predicción del comportamiento del coeficiente cinético de fotodegradación del DCF ( $k$ ).

El perfil de la vida media ( $t_{1/2}$ ) se obtuvo de la ecuación 6, considerando una reacción de primer orden y una concentración correspondiente a la mitad de la concentración inicial.

$$t^{1/2} = \ln[0.5] \left[ \frac{1}{k} \right] \quad (6)$$

Donde  $t^{1/2}$  es la vida media del fármaco (min) y  $k$  la constante cinética de la reacción de fotodegradación ( $\text{min}^{-1}$ ).

Los valores encontrados para la vida media de DCF, oscilan entre los 3 y 9 minutos aproximadamente, disminuyendo con el aumento de la temperatura, debido a que aumenta el valor del coeficiente cinético, ocasionando que el avance de la degradación se acelere (Figura 28). Lo anterior sugiere que a temperaturas bajas el DCF es más estable y a temperaturas más elevadas se degrada con mayor facilidad.

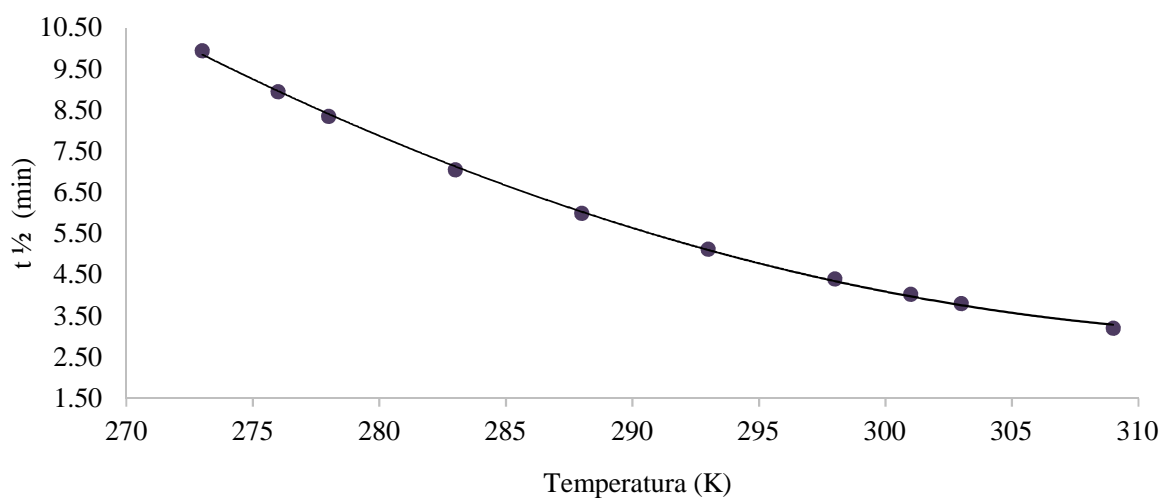


Figura 28. Predicción del comportamiento de la vida media DCF.



La corta vida media de este fármaco apunta a que existe una mayor probabilidad de que este se presente en menor proporción que la concentración inicial al encontrarse expuesto a la radiación tipo UV-C, y que sea más probable localizarlo como una mezcla de subproductos derivados de su degradación. La Tabla 16 muestra los valores de los parámetros evaluados.

Tabla 16. Parámetros cinéticos de DCF.

Temperatura (K)	273	276	278	283	288	293	298	301	303	308
k (min <sup>-1</sup> )	0.07	0.08	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16	0.17	0.18	0.21
Vida media (min)	9.95	8.95	8.35	7.06	6.00	5.13	4.41	4.03	3.80	3.30

### 6.5.2. Modelo cinético de EE2

El gráfico mostrado en la Figura 29 muestra la predicción del comportamiento de la fotodegradación de EE2 determinado a partir de su energía de activación (Tabla 15) y de la ecuación 3, donde se observa que al igual que en DCF la reducción de la concentración se favorece con el incremento de la temperatura, pero debido a que muestra resistencia mayor su degradación toma más tiempo prolongándose hasta casi setenta horas para alcanzar alrededor del 90% de degradación.

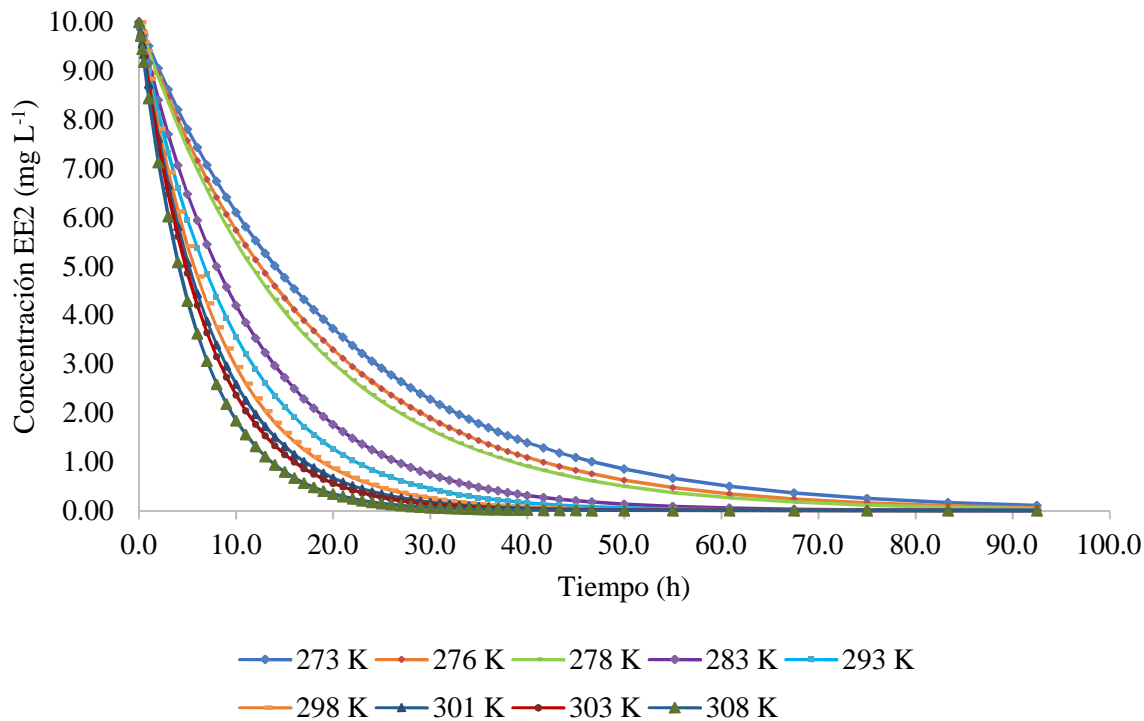


Figura 29. Predicción del comportamiento cinético de fotodegradación EE2

Dentro del intervalo de temperatura evaluado los valores del coeficiente cinético ( $k$ ) oscila entre 0.0005 a 0.0025  $\text{min}^{-1}$ ; mostrando que a menor temperatura la velocidad de la reacción ocurrirá de manera más lenta, y a temperatura alta la degradación será favorecida. Los valores de la constante menores a los de DCF indican que esta degradación tomará más tiempo. El comportamiento de esta constante se muestra en la Figura 30.

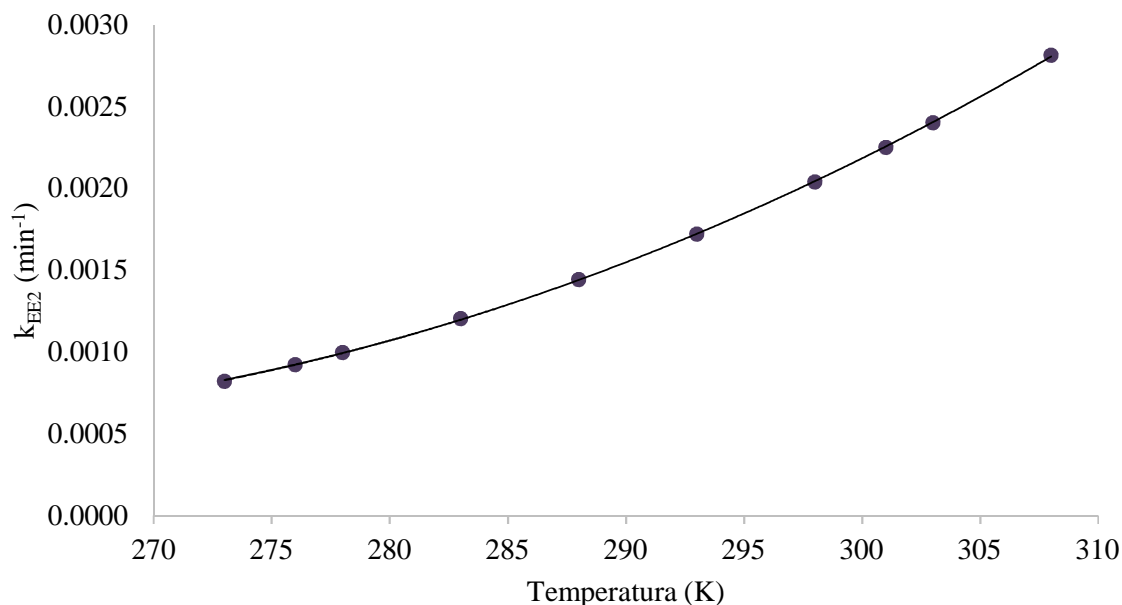


Figura 30. Predicción del comportamiento de la constante cinética de fotodegradación de EE2 ( $k$ ).

El perfil de la vida media ( $t_{1/2}$ ) al igual que para DCF se obtuvo de la ecuación 6, ya que también presenta una reacción de primer orden.

Los valores encontrados para la vida media, oscilan entre las 4 y 14 horas aproximadamente, disminuyendo con el aumento de la temperatura, debido a que el aumento del valor del coeficiente cinético también se ve favorecido ocasionando que el avance de la degradación se acelere (Figura 31). Lo anterior sugiere que en presencia de radiación de luz UV-C, el EE2 a temperatura baja es más estable y a temperaturas más elevadas se degrada con mayor facilidad, pero mostrando mayor resistencia a la fotólisis comparado con el comportamiento que el DCF mostró. La Tabla 17 muestra los valores para cada uno de los parámetros mencionados.

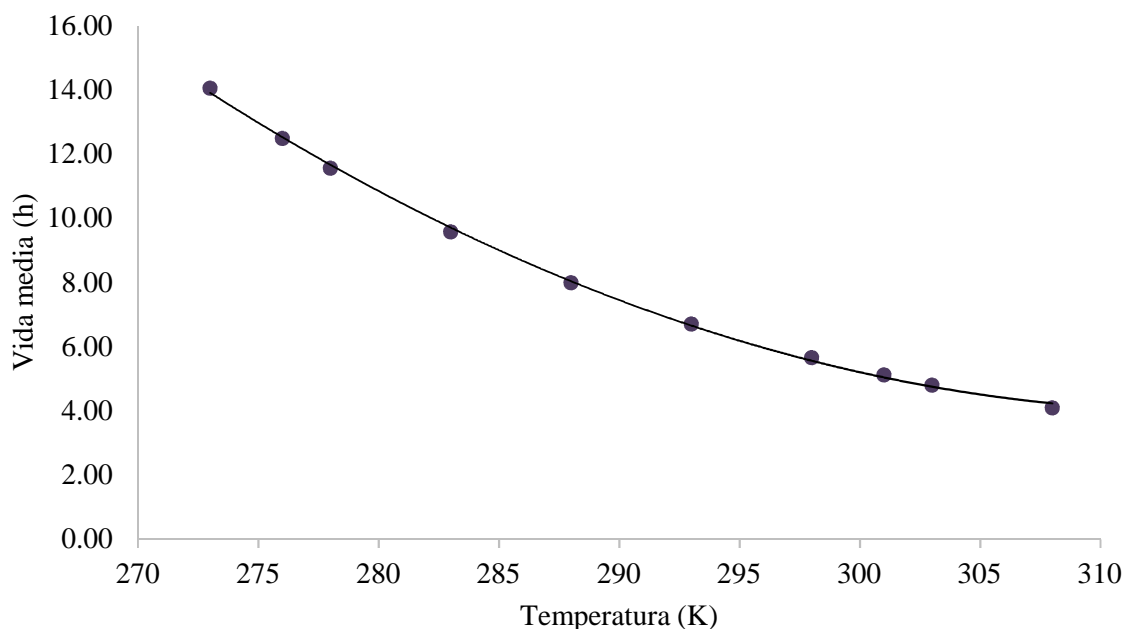


Figura 31. Predicción del comportamiento de la vida media EE2.

Tabla 17. Parámetros cinéticos de EE2.

Temperatura (K)	273	276	278	283	288	293	298	301	303	308
k (min <sup>-1</sup> )	0.0008	0.0009	0.0010	0.0012	0.0014	0.0017	0.0020	0.0023	0.0024	0.0028
Vida media(h)	14.01	12.50	11.58	9.59	8.00	6.71	5.66	5.13	4.81	4.10

#### 6.6. Parámetros termodinámicos de la fotodegradación

Teniendo en cuenta los valores de la constante cinética de degradación ( $k$ ) obtenidos y con ayuda de la ecuación linealizada de van't Hoff, (ecuación 7) se realizó la regresión lineal para determinar los valores de cambio de entalpía ( $\Delta H$ , kJ mol<sup>-1</sup>) y de entropía ( $\Delta S$ , kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) para DCF y EE2.

$$\ln(k) = \frac{\Delta H^\circ}{R} \left( \frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (7)$$

Donde  $\Delta H^\circ$  (kJ mol<sup>-1</sup>),  $\Delta S^\circ$  (kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) son el cambio de entalpía y entropía;  $T$  la temperatura absoluta en grados Kelvin;  $R$  la constante de los gases ideales (8.314 x 10<sup>-3</sup> kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>); y  $k$  la constante cinética de la velocidad de reacción.

Con estos datos se realizó el cálculo del cambio de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ , kJ mol<sup>-1</sup>) con ayuda de la ecuación 8 **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y dentro del intervalo de temperatura de 273 a 308 K.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (8)$$

Donde  $\Delta H^\circ$  (kJ mol<sup>-1</sup>),  $\Delta S^\circ$  (kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>),  $\Delta G^\circ$  (kJ mol<sup>-1</sup>), son el cambio de entalpía, entropía y energía libre de Gibbs;  $T$  la temperatura absoluta en grados Kelvin.

Los valores de cambio de entalpía ( $\Delta H$ ,  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) y entropía ( $\Delta S$ ,  $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ) se obtuvieron de la pendiente e intercepto de la ecuación linealizada (Ecuación 7). Las figuras 32 y 33 muestran el gráfico de  $\ln k$  vs inverso de temperatura ( $T^{-1}$ ) y la Tabla 18 muestra los valores de los parámetros.

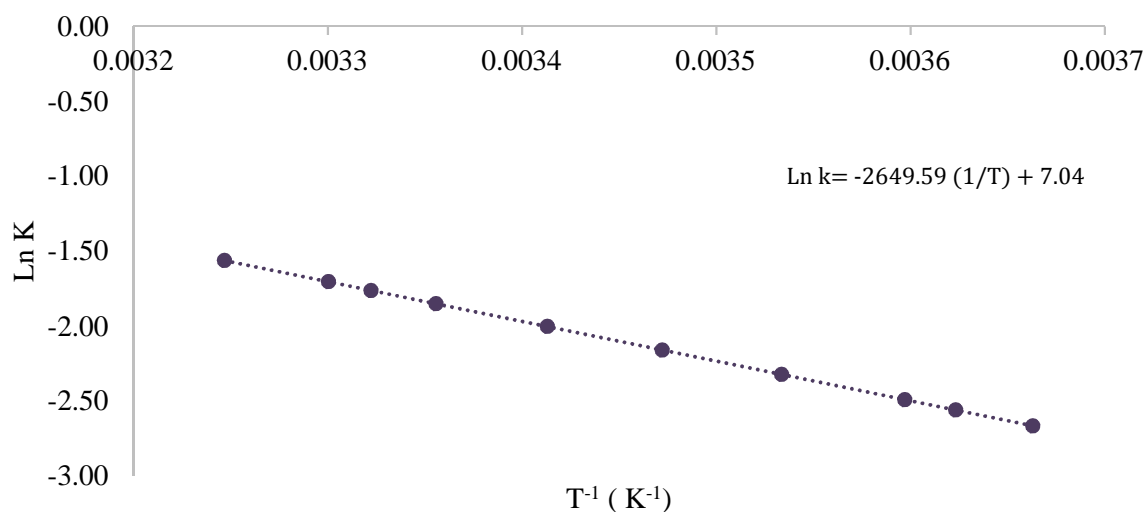


Figura 32. Regresión lineal de la ecuación de van't Hoff para DCF.

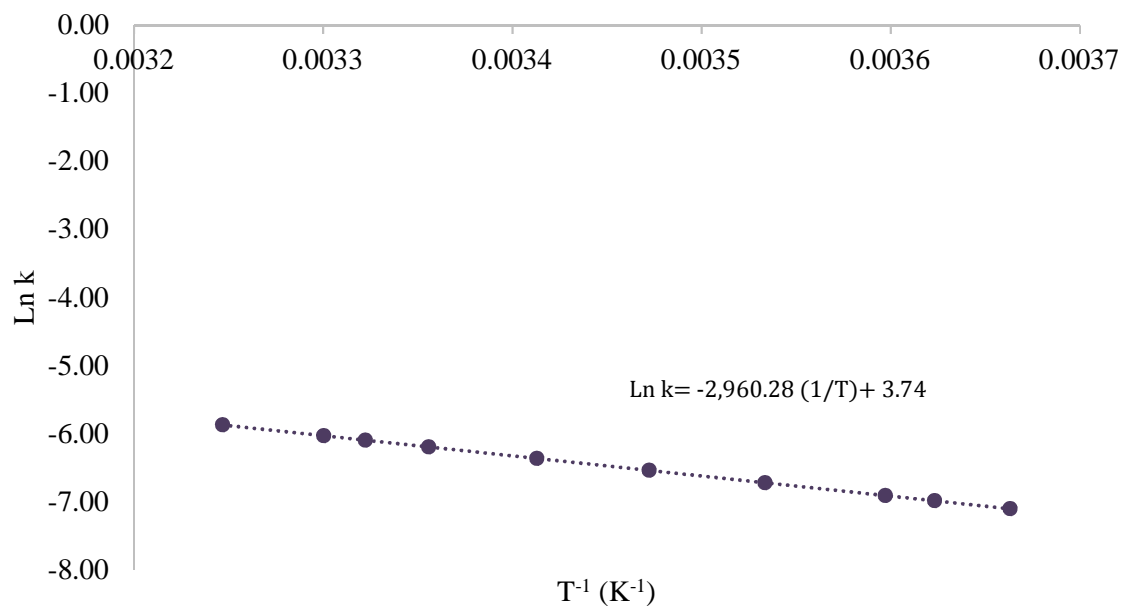


Figura 33. Regresión lineal de la ecuación de van't Hoff para EE2.

Tabla 18. Parámetros termodinámicos de DCF y EE2.

$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (kJ mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\circ$ (kJ mol <sup>-1</sup> )									
		273 K	276 K	278 K	283 K	288 K	293 K	298 K	301 K	303 K	308 K
-22.03	0.058	-38.01	-38.18	-38.30	-38.59	-38.88	-39.17	-39.47	-39.64	-39.76	-40.05
-24.61	0.031	-33.10	-33.19	-33.25	-33.41	-33.56	-33.72	-33.87	-33.97	-34.03	-34.19

El comportamiento termodinámico de ambas degradaciones indica que las reacciones son exotérmicas y ocurren de manera espontánea e irreversible. En estudios previos de la degradación con radiación de luz solar también se encontró un comportamiento similar para la reacción de fotodegradación para el DCF (Zhang *et al.*, 2017) y para EE2 (Rosenfeldt and Linden, 2004; Wei *et al.*, 2018).

## 6.7. Formación de productos de fotodegradación

### 6.7.1. Productos de degradación de DCF

De los experimentos de fotodegradación realizados se detectó la formación de aproximadamente seis subproductos durante la exposición a radiación tipo UV-C (Ver Figura 34).

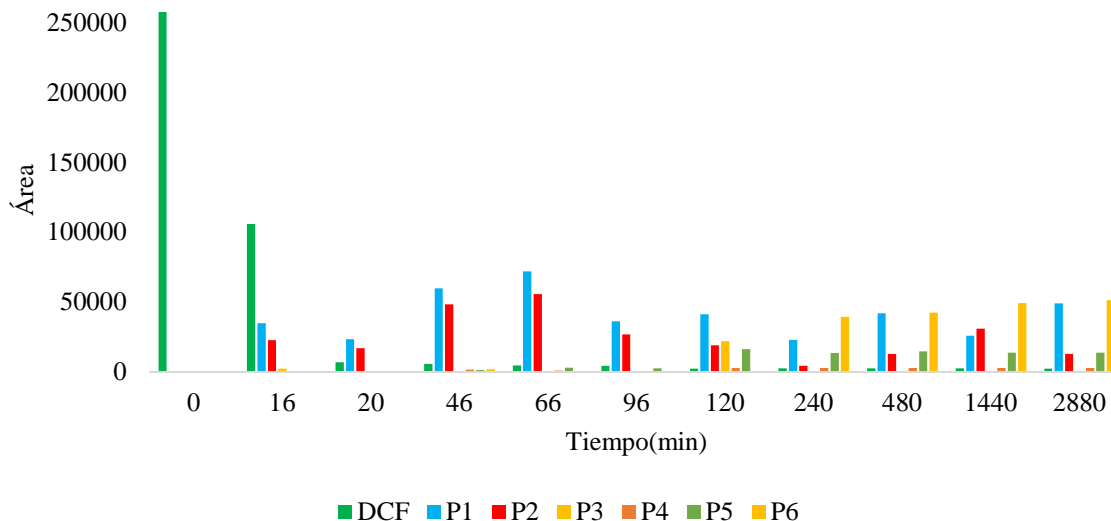


Figura 34. Comportamiento de los productos de degradación de DCF.

Considerando el número de compuestos encontrados y el cambio de coloración ilustrado en la Figura 18; la posible ruta por la que se está degradando el fármaco es la formación de dímeros clasificados como carbazoles (Ver Figura 35) (Qin *et al.*, 2012; Keen *et al.*, 2013; Kovacic *et al.*, 2016); estos son compuestos que dan paso a una solución de coloración amarillenta y su estructura

está integrada por anillos aromáticos que derivan de la unión de los anillos de la molécula de DCF (Keen *et al.*, 2013).

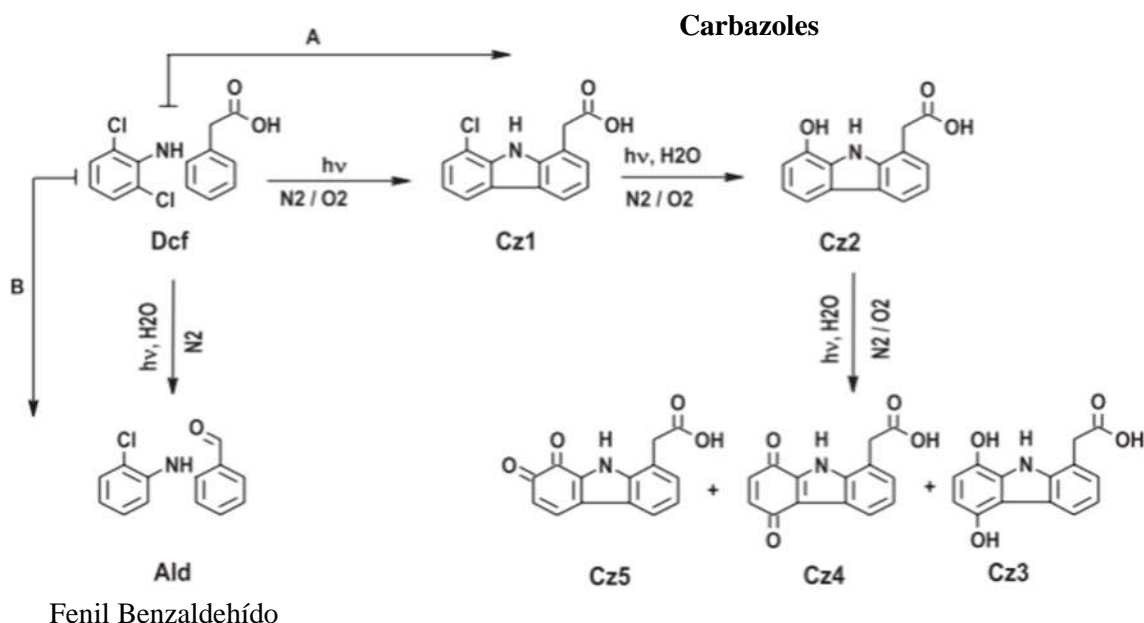


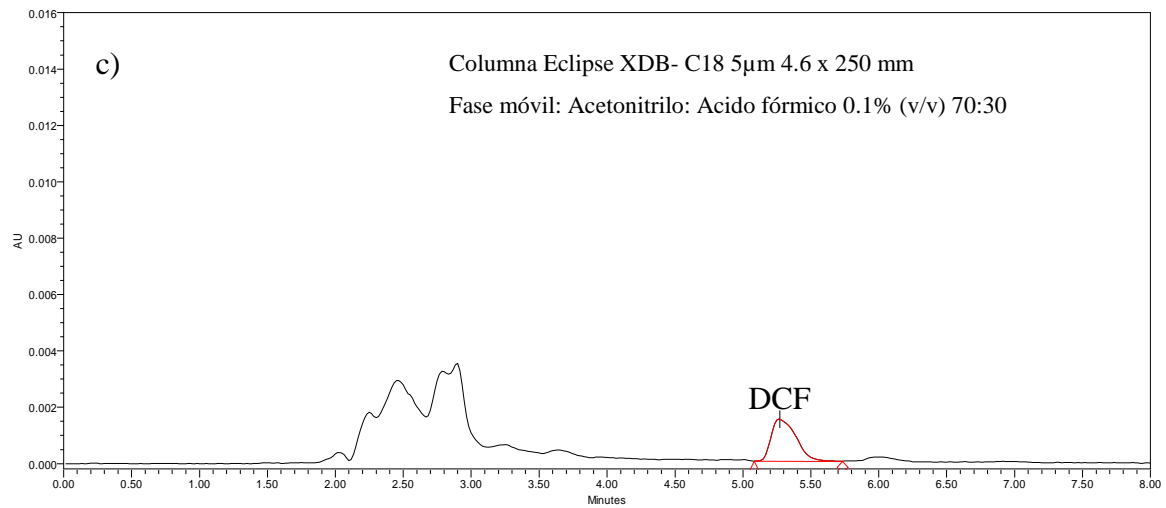
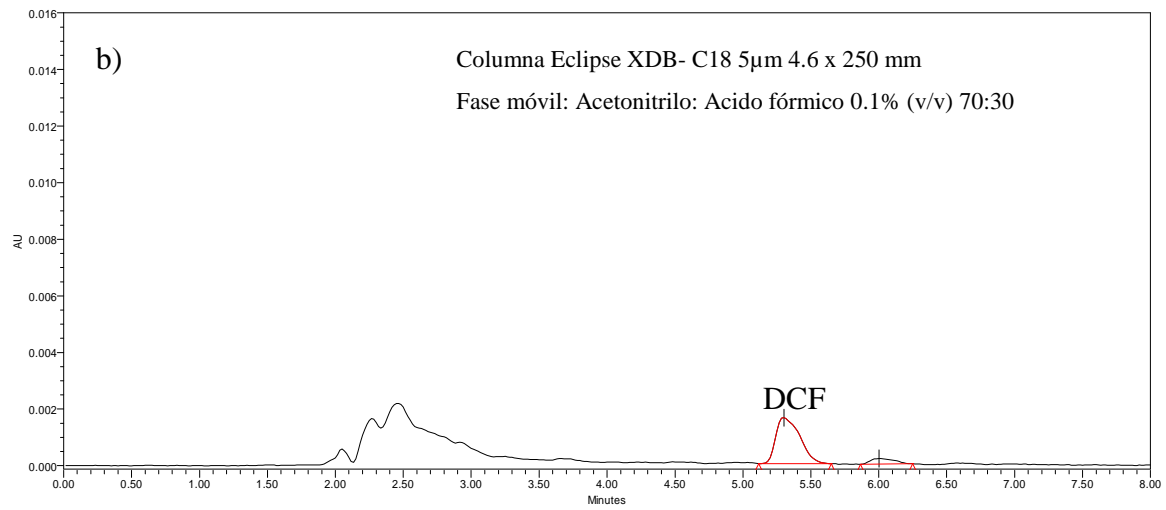
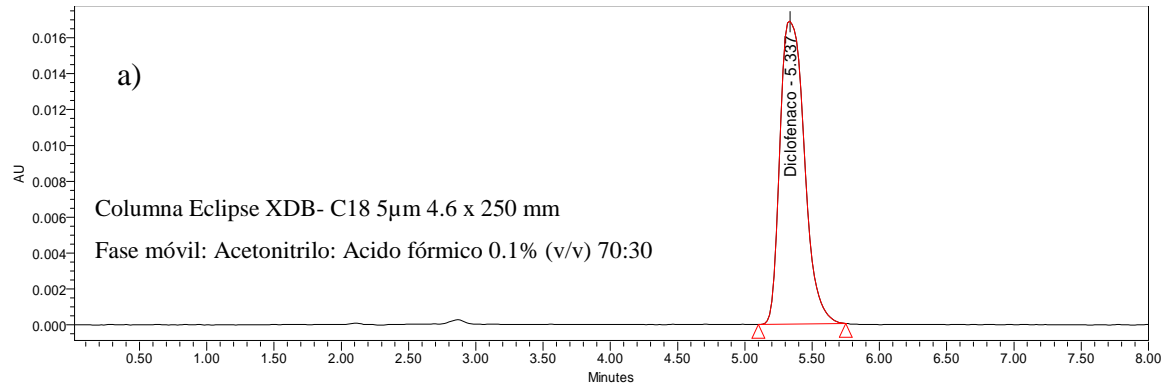
Figura 35. Ruta de degradación de DCF (Keen *et al.*, 2013).

Debido a la estructura química del fármaco (Figura 2), la salida de los dos grupos cloruros se ve favorecida durante el proceso de fotodegradación dando paso a la unión de sus anillos aromáticos originando a los carbazoles (Keen *et al.*, 2013).

Tomando en cuenta lo reportado en trabajos de experimentos similares los productos mayoritarios P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> encontrados derivan de la pérdida consecutiva de los dos cloros de la molécula de DCF, y podrían tratarse de los compuestos denominados como carbazol 1 (8-cloro-9H-carbazol-1-il) ácido acético y carbazol 2 (8-hidroxi-9H-carbazol-1-il) ácido acético, hallados en diversos estudios con radiación de luz solar (Eriksson, Svanfelt and Kronberg, 2010; Kovacic *et al.*, 2016) y los subproductos P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub> y P<sub>6</sub> correspondan estructuras derivadas de la desintegración de estas dos moléculas que dan paso a la formación de más carbazoles o derivados de aldehídos (Eriksson, Svanfelt and Kronberg, 2010).

La Figura 36 a) muestra el cromatograma de la solución inicial de DCF, teniendo un tiempo de retención ( $t_R$ ) alrededor de los 5 minutos. Después de una hora de exposición a la radiación tipo UV-C en la Figura 12 b) se observa la aparición de nuevas señales con un tiempo de retención menor al DCF ( $t_R$  aproximado de 2 a 3 minutos), los cuales corresponden a subproductos derivados de su degradación. Conforme el tiempo transcurre se puede observar en las Figuras 36 c) y 12 d) que las nuevas señales aumentan de intensidad. Por lo tanto, ocurre el incremento de la concentración de los mismos. Esto indica que a pesar de que el activo ha sido degradado alrededor

del 90% durante la primera hora, el 10% de la solución remanente consiste en una mezcla del fármaco (40%) con sus subproductos (60 %).



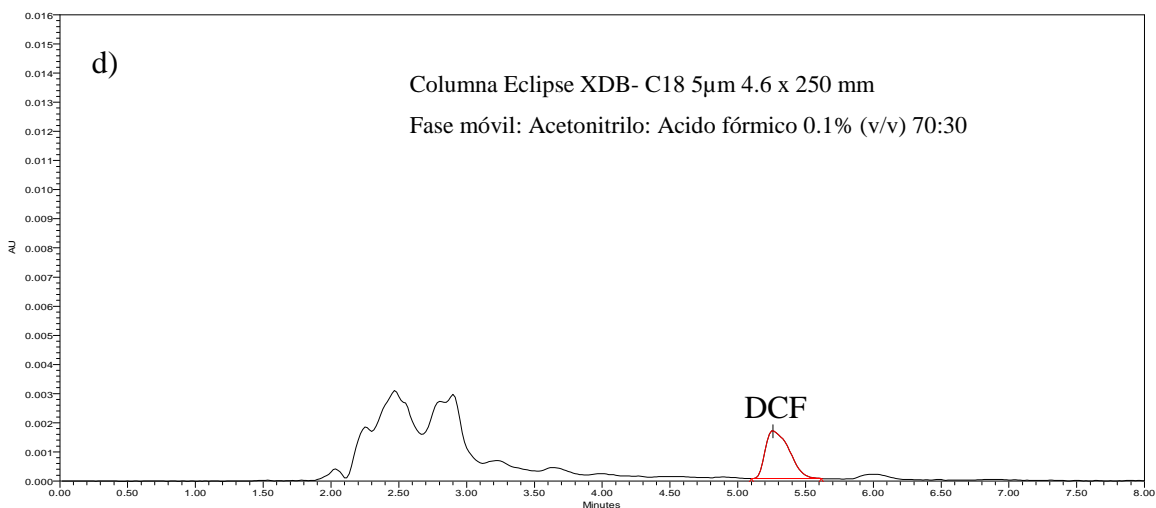


Figura 36. Cromatograma de formación de productos de degradación a) inicial, b) 1h c) 24 h, d) 48 h después de exposición a radiación de luz tipo UV-C.

El aumento y disminución del área de las señales diferentes al DCF en los cromatogramas, posiblemente se deba a que la inestabilidad de los diversos compuestos da paso a la formación de nuevos subproductos. Estos cambios se han reportado como reacciones secundarias que dan como resultado compuestos denominados como carbazoles (Agüera *et al.*, 2005; Eriksson, Svanfelt and Kronberg, 2010)

La presencia constante de los subproductos más allá de la vida media del DCF (aproximadamente 4 minutos a 298 K) sugiere que algunos de estos compuestos son estables ante la radiación tipo UV-C. En la Figura 34 se muestra el comportamiento de su formación y degradación. Durante las primeras 48 horas, se puede notar que los productos P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> son los primeros en aparecer y tienden a permanecer durante todo el tiempo de irradiación. Después de las primeras dos horas la presencia de nuevos compuestos secundarios comienza a ser más considerable, siendo el producto P<sub>3</sub> uno de los primeros en manifestarse, pero en menor proporción que el subproducto P<sub>1</sub>. En el caso del producto P<sub>4</sub>, este aparece en los primeros minutos y no desaparece, sino va variando en la proporción correspondiente a la formación de las otras especies, este compuesto tiene menor presencia en comparación a los demás subproductos. El compuesto P<sub>5</sub> al igual que P<sub>4</sub> va variando su proporción y partir de las primeras 2 horas su presencia incrementa. El producto P<sub>6</sub> aumenta a partir de las 4 horas y permanece como uno de los subproductos mayoritarios a lo largo del periodo restante. Al final se obtiene una solución compuesta por dos productos mayoritarios P<sub>1</sub> y P<sub>6</sub>, que pueden corresponder a alguno de los carbazoles reportados en investigaciones previas (Bartels and von Tümpling, 2007; Eriksson, Svanfelt and Kronberg, 2010; Keen *et al.*, 2013).



### 6.7.2. Productos de degradación de EE2

Para el caso de EE2 un total de 5 productos de degradación fueron detectados durante la fotólisis, siendo el producto mayoritario el compuesto 2. La Figura 37 muestra que la aparición de los subproductos ocurre a partir de las 4 horas de exposición a la radiación, siendo los compuestos C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> los primeros en aparecer, pero solo el compuesto C<sub>2</sub> fue el que presentó mayor estabilidad.

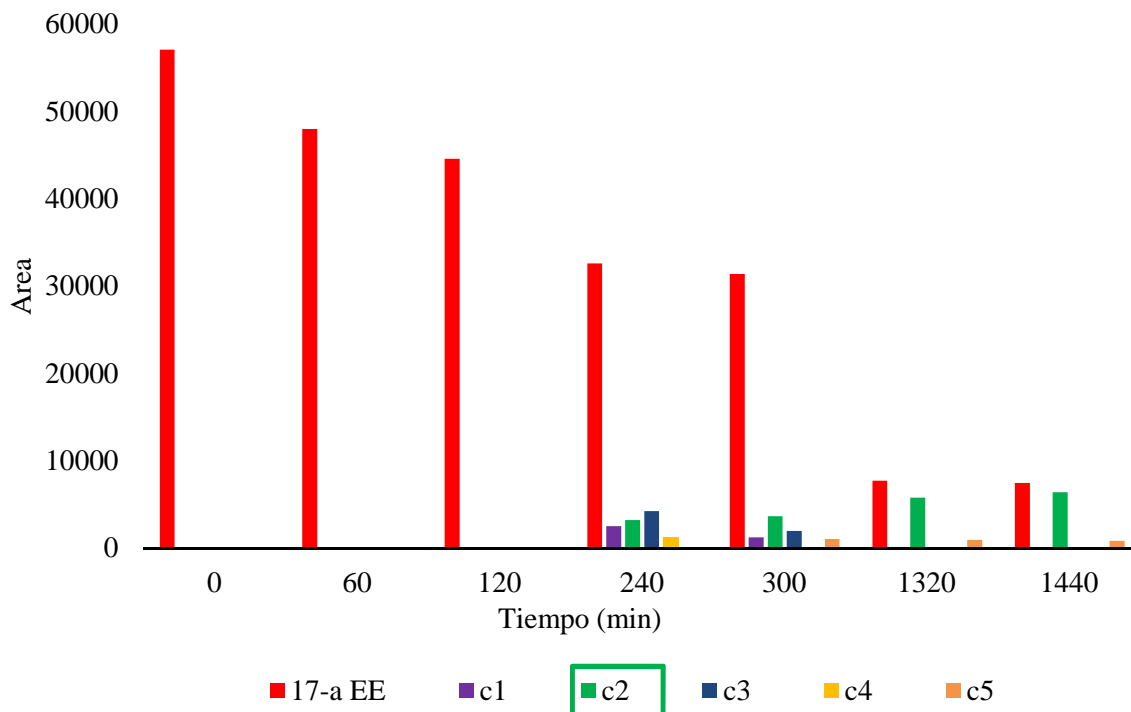


Figura 37. Productos de degradación de radiación tipo UV-C EE2.

El compuesto C<sub>5</sub> apareció a partir de las 5 horas y permaneció a lo largo de la duración del experimento al igual que el C<sub>2</sub> pero en menor proporción. Al final del experimento se tiene una mezcla del fármaco y dos subproductos, pero en este caso el 60% de los componentes de la mezcla corresponden al fármaco, el 30% al subproducto C<sub>2</sub> y 10% al C<sub>5</sub>. Por lo que la solución remanente sigue conservando al activo en mayor proporción, demostrando que esta molécula es resistente a la radiación por luz UV y para asegurar su remoción es necesario aplicar un método con mayor impacto. Con respecto a los productos de degradación estos no presentaron un aumento a lo largo del tiempo como se observó en diclofenaco por lo que su liberación al medio es en menor proporción.

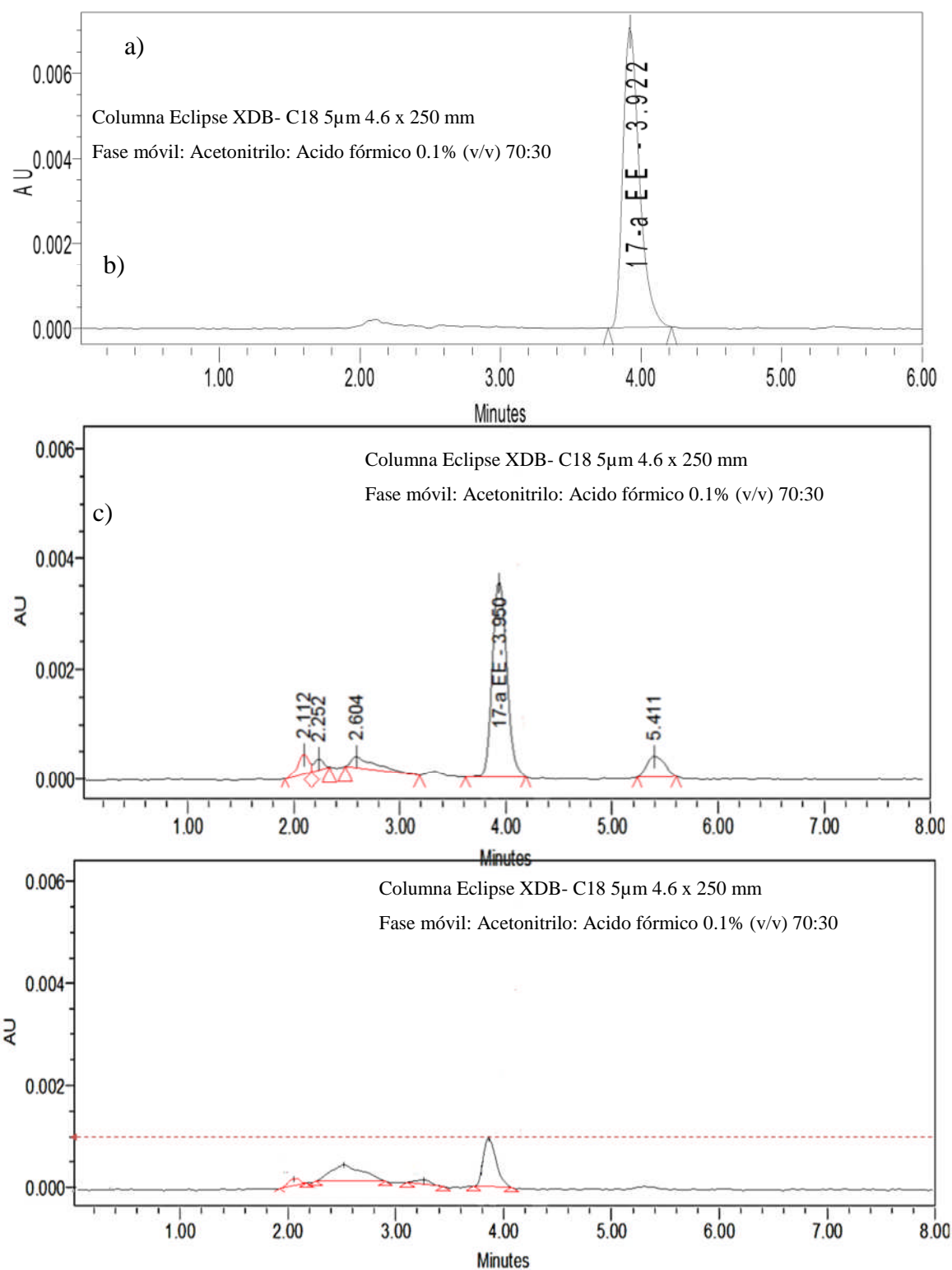


Figura 38. Cromatograma de formación de productos de degradación a) inicial, b) 6 h c) 48 h, después de exposición a radiación de luz tipo UV-C.

# Conclusiones y recomendaciones.

## 7. CONCLUSIONES

La reacción de fotodegradación de DCF y EE2 por radiación de luz tipo UV-C es de primer orden y se ve favorecida por el incremento de temperatura, siendo el DCF el que presenta mayor susceptibilidad a ser afectado por la radiación UV.

TMT sigue una cinética de degradación un comportamiento de orden 0.5, presentando la mayor resistencia a la degradación por luz tipo UV-C.

Los parámetros termodinámicos obtenidos para DCF y EE2 indican que su fotodegradación se da de manera exotérmica en una reacción espontánea e irreversible.

La degradación de DCF y EE2 da paso a la formación de productos de degradación estables siendo la solución remanente una mezcla de compuestos.

Para el caso de DCF los subproductos detectados corresponden a compuestos denominados como carbazoles derivados de la desclorinación del diclofenaco.

## 8. RECOMENDACIONES

Considerando los resultados obtenidos se sugiere realizar un estudio sobre la toxicidad de la solución remanente de los fármacos para conocer si el grado de toxicidad después de la degradación aumento o disminuyo.

Establecer una metodología analítica para la cuantificación y caracterización de los productos de degradación evidenciados.

Para el caso de los dos fármacos que resultaron resistentes a la radiación de luz UV-C (EE2 y TMT); se sugiere realizar un estudio combinando la luz UV-C con un agente oxidante o un catalizador, para favorecer la degradación y evaluar a su vez la estabilidad, el número de productos de degradación generados y el índice de toxicidad de la solución remanente tratado.

Para el caso de los subproductos de degradación de DCF, al mostrar resistencia a la fotólisis en la mezcla final implica la probabilidad de que estos se liberen al medio ambiente; por lo que es necesario extender un estudio sobre sus propiedades y su posible impacto ambiental, ya que se ha encontrado evidencia de que algunos compuestos de este tipo tienden a bioacumularse y han originado efectos tóxicos en algunas especies acuáticas (Chittim *et al.*, 2016a; Salam, Ilori and Amund, 2017).

# Anexos

## Anexos

### Validación del método analítico para la cuantificación de DCF, EE2 y TMT

Se utilizaron estándares de DCF, EE2, y TMT marca Sigma Aldrich para realizar la validación del método con base a la Guía de Validación de métodos analíticos editada por el Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, las fórmulas utilizadas para el cálculo de los parámetros se muestran en el Anexo 8.

#### Anexo 1. Adecuabilidad del sistema

El análisis se realizó inyectando por quintuplicado el estándar de referencia al 100% para cada uno de los fármacos ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), calculando el coeficiente de variación (CV); y para cada inyección se informó el factor de coileo (T), el factor de capacidad ( $K'$ ) y el número de platos teóricos (N), cumpliendo con los criterios de aceptación:  $CV \leq 2$ ,  $T < 2$ ,  $K > 2$  y  $N > 4000$  para métodos cromatográficos. La Tabla 19 muestra los resultados obtenidos

*Tabla 19. Adecuabilidad.*

Fármaco	DCF	EE2	TMT
Tiempo de retención	5 min	4 min	2 min
CV (%)	1.6	0.5	1.2
$K'$	2.7	9.7	3.0
T	1.5	1.4	1.4
N	8734	8671	8413

## Anexo 2. Precisión del sistema

El análisis se realizó preparando un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que representa el 100% de la muestra ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) para cada uno de los fármacos; calculando la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV), cumpliendo con los criterios de aceptación en donde la CV es menor al 1.5%. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

*Tabla 20. Precisión del sistema.*

Muestra	Señal analítica (UA)		
	DCF	EE2	TMT
1	296723	56356	210339
2	299866	55269	214499
3	295836	55073	213780
4	293523	56946	216949
5	294328	56305	215817
6	292206	56041	212838
Promedio	295414	55998	214037
S	2711.40	708.52	2325.53
CV (%)	0.9	1.3	1.1

### Anexo 3. Linealidad del sistema

En la Tabla 21 se muestran los resultados del análisis de la linealidad el cuál se realizó por triplicado para 6 concentraciones diferentes: 20, 40, 60, 80, 100, 120% para los tres fármacos; los cuales cumplen con los criterios de aceptación, la  $r^2$  es mayor a 0.98.

Tabla 21. Linealidad del sistema

Parámetro	DCF	EE2	TMT
Ecuación	$y=3341.5 x - 57655$	$y = 717.82 x - 13481$	$y = 1842.86 x + 51355$
$r^2$	0.988	0.989	0.9861
IC ( $b_1$ )	3539.42-3143.61	758.08-677.55	1960- 1726
$b_1$	3341.5	717.82	1842.86
$b_0$	57655	13481	51355

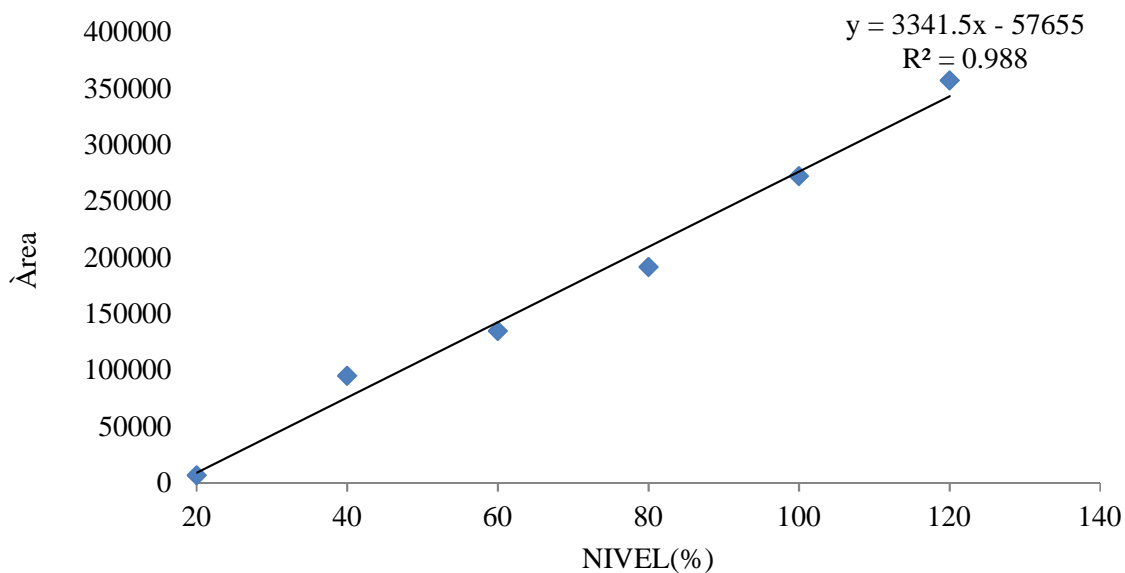
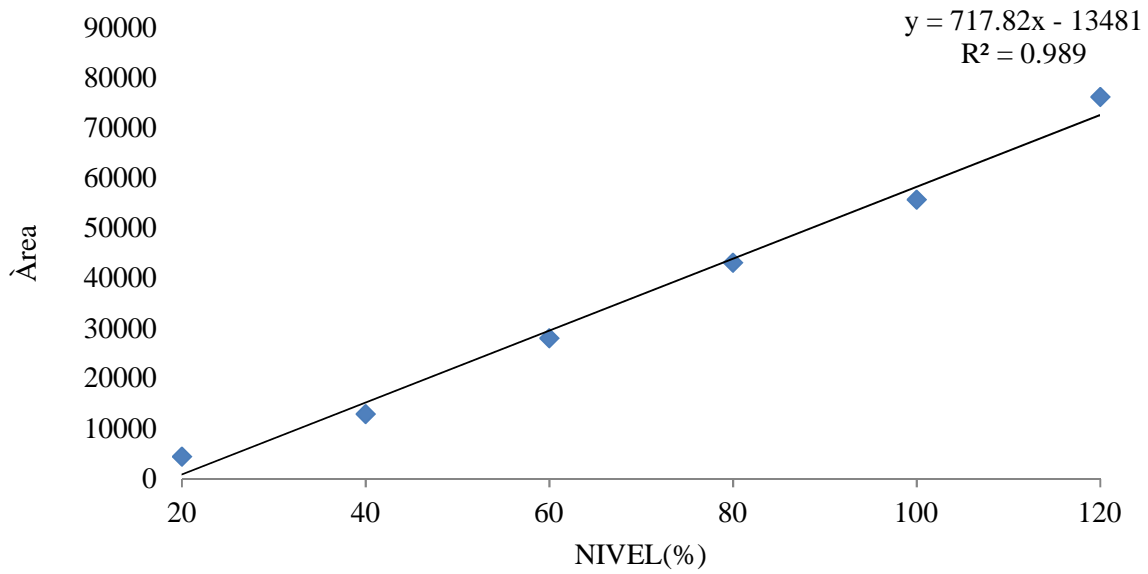
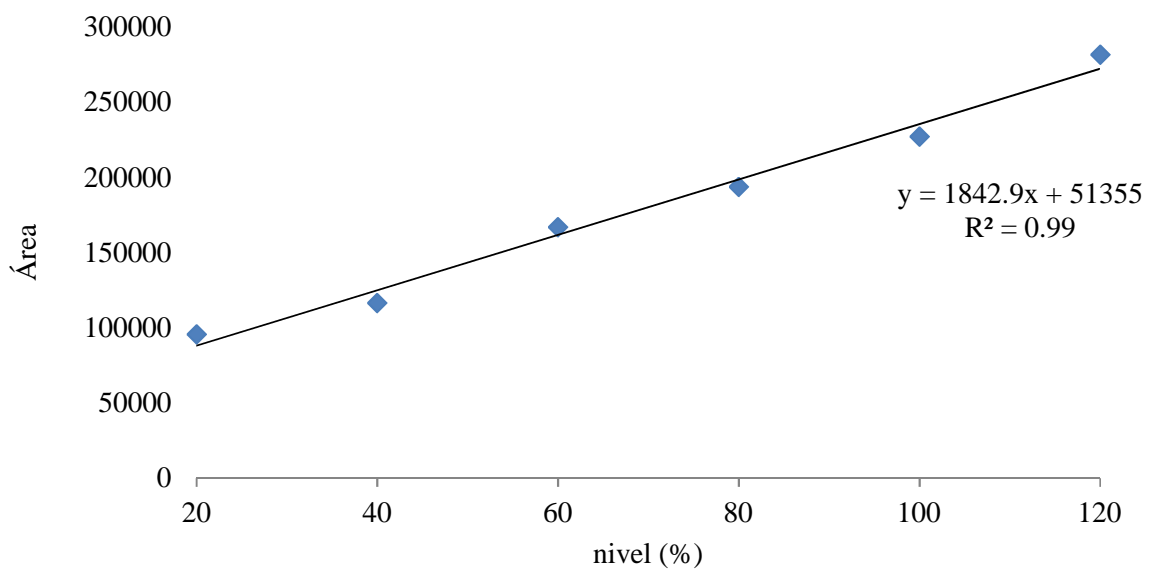


Figura 39. Linealidad del sistema DCF.





*Figura 40. Linealidad del sistema EE2.*



*Figura 41. Linealidad del sistema TMT.*

#### Anexo 4. Límite de detección y cuantificación

Los resultados obtenidos del límite de detección y cuantificación se muestran en la Tabla 22.

*Tabla 22. Resultados obtenidos del límite de detección y cuantificación.*

Parámetros	DCF	EE2	TMT
n	15	15	15
$t_{0.975,n-2}$	2.160	2.160	2.160
$S_{bo}$	2519.6	7629	8139
$S_{b1}$	56057	169728	181090
$S_{y/x}$	8482	25682	27401
IC( $\beta_1$ )+	32851361	11102266	27673104
IC( $\beta_1$ )-	32609193	10369039	26890793
$r^2$	0.9996	0.9967	0.9998
Límite de detección (LD, mg L <sup>-1</sup> )	0.0002	0.002	0.003
Límite de cuantificación (LC, mg L <sup>-1</sup> )	0.001	0.01	0.01

#### Anexo 5. Linealidad del método

Se evaluó la linealidad del método para DCF, EE2 y TMT, los resultados del estudio se muestran en la Tabla 23, los cuales cumplen con los criterios de aceptación que para la relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada utilizando el método de estimación de mínimos cuadrados la  $r^2$  es mayor a 0.98 y coeficiente de variación de regresión ( $CV_{y/x}$ ) del porcentaje de recobro, no es mayor al 2%.

Tabla 23. Linealidad del método.

Analito	% de recobro	Nivel 80%	Nivel 100%	Nivel 120%	Promedio $\pm$ S		CV (%)	
		$\pm$ S	99.29	98.99	98.24	98,84 $\pm$ 0.7		0.7
DCF	Cantidad adicionada & Cantidad recuperada	IC( $\mu$ )		$r^2$	$b_1$	$b_0$	IC( $\beta_1$ )	IC( $\beta_0$ )
		100.09-98.67		0.9987	0.96	0.26	0.97-0.95	0.35-0.17
EE2	% de recobro	Nivel 80%	Nivel 100%	Nivel 120%	Promedio $\pm$ S		CV %	
	$\pm$ S	98.55	98.96	98.56	98.80 $\pm$ 0.2		0.2	
EE2	Cantidad adicionada & Cantidad recuperada	IC( $\mu$ )		$r^2$	$b_1$	$b_0$	IC( $\beta_1$ )	IC( $\beta_1$ )
		100.61-98.55		0.9880	0.96	-0.07	1.0064-0.9847	0.048067-0.195611
TMT	% de recobro	Nivel 80%	Nivel 100%	Nivel 120%	Promedio $\pm$ S		CV %	
	$\pm$ S	98.39	100.52	98.74	99.21 $\pm$ 1.1		1.2	
TMT	Cantidad adicionada & Cantidad recuperada	IC( $\mu$ )		$r^2$	$b_1$	$b_0$	IC( $\beta_1$ )	IC( $\beta_1$ )
		101.46-98.91		0.9943	0.99	-0.02	1.0112-0.9776	0.167650-0.208

## Anexo 6. Exactitud y repetibilidad

Para evaluar la exactitud del método se determinó la cantidad recuperada del fármaco en donde el CV fue menor al 2%. A continuación se muestran los resultados obtenidos en la Tabla 24.

*Tabla 24. Exactitud y repetibilidad del método.*

Analito	% de recobro promedio $\pm$ S	CV %	IC ( $\mu$ )
DCF	100.00 $\pm$ 0.62	0.62	100.65% -99.35%
EE2	98.1 $\pm$ 0.85	0.85	98.97-97.23%
TMT	100.95 $\pm$ 1.32	1.31	102% -99.56%

## Anexo 7. Precisión del método

Se evaluó la precisión del método en dos días diferentes y por dos analistas diferentes, se calculó la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) empleando todos los resultados obtenidos, cumpliendo con los criterios de aceptación en donde el CV es menor al 2%. A continuación, se muestran los resultados en las Tablas 25 a 27.

*Tabla 25. Precisión del método DCF.*

	ANALISTA 1		ANALISTA 2			
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2		
	99.1	97.5	99.3	98.6	<u>Suma<sub>total</sub></u>	1186.8
	99.9	97.8	99.9	98.6	$\hat{y}_{total}$	98.9
	99.1	97.2	100.2	99.4		
SUMA	298.1	292.6	299.4	296.6	<u>S<sub>total</sub></u>	1.0
MEDIA	99.4	97.5	99.8	98.9		
S	0.5	0.3	0.4	0.5	<u>CV<sub>total</sub></u>	1.1
CV	0.5	0.3	0.4	0.5		

Tabla 26. Precisión del método EE2.

	ANALISTA 1		ANALISTA 2			
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2		
	100.4	97.5	99.3	101.5	<u>Suma<sub>total</sub></u>	1194.4
	100.6	97.8	99.9	99.7		
	101.2	97.2	100.2	99.0	$\hat{y}_{total}$	99.5
SUMA	302.2	292.6	299.4	300.2		
					$S_{total}$	1.4
MEDIA	100.7	97.5	99.8	100.1		
S	0.4	0.3	0.4	1.3		
					$CV_{total}$	1.4
CV	0.4	0.3	0.4	1.3		

Tabla 27. Precisión del método TMT.

	ANALISTA 1		ANALISTA 2			
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2		
	100.3	97.5	99.3	103.7	<u>Suma<sub>total</sub></u>	12000.4
	102.4	97.8	99.9	101.2		
	100.3	97.2	100.2	100.7	$\hat{y}_{total}$	100
SUMA	302.9	292.6	299.4	305.6		
					$S_{total}$	1.9
MEDIA	101.0	97.5	99.8	101.9		
S	1.2	0.3	0.4	1.6		
					$CV_{total}$	1.9
CV	1.2	0.3	0.4	1.6		

Anexo 8. Fórmulas para realizar los cálculos de los parámetros de validación de métodos analíticos

Media aritmética de y

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Media aritmética de x

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

Desviación estándar de la pendiente

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Desviación estándar de la regresión

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Desviación estándar de la ordenada al origen

$$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

Diferencia Absoluta

$$|d_i| = |\bar{y}_1 - \bar{y}_0|$$

Límite de Detección (LD), basado en la desviación estándar de la ordenada al origen

$$LD = 3.3 \frac{S_{b_0}}{b_1}$$

Límite de Cuantificación (LC), basado en la desviación estándar de la ordenada al origen

$$LC = 10 \frac{S_{b_0}}{b_1}$$

Anexo 9. Tabla estadística de la distribución t de student

*Tabla 28. Distribución t de Student conforme a grados de libertad.*

<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b><math>t_{0,975}</math></b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b><math>t_{0,975}</math></b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b><math>t_{0,975}</math></b>
1	12.706	26	2.056	51	2.008
2	4.303	27	2.052	52	2.007
3	3.182	28	2.048	53	2.006
4	2.776	29	2.045	54	2.005
5	2.571	30	2.042	55	2.004
6	2.447	31	2.040	56	2.003
7	2.365	32	2.037	57	2.002
8	2.306	33	2.035	58	2.002
9	2.262	34	2.032	59	2.001
10	2.228	35	2.030	60	2.000
11	2.201	36	2.028	61	2.000
12	2.179	37	2.026	62	1.999
13	2.160	38	2.024	63	1.998
14	2.145	39	2.023	64	1.998
15	2.131	40	2.021	65	1.997
16	2.120	41	2.020	66	1.997
17	2.110	42	2.018	67	1.996
18	2.101	43	2.017	68	1.995
19	2.093	44	2.015	69	1.995
20	2.086	45	2.014	70	1.994
21	2.080	46	2.013	71	1.994
22	2.074	47	2.012	72	1.993
23	2.069	48	2.011	73	1.993
24	2.064	49	2.010	74	1.993
25	2.060	50	2.009	75	1.992



Anexo 10. Artículo

## WATE-D-19-00653 - Submission Confirmation

[em.wate.0.628697.1e55f21d@editorialmanager.com](mailto:em.wate.0.628697.1e55f21d@editorialmanager.com) en nombre de  
WATE <[em@editorialmanager.com](mailto:em@editorialmanager.com)>

vie 12/04/2019 8:52

Para: Jorge Javier Ramirez Garcia <[jjramirezg@uaemex.mx](mailto:jjramirezg@uaemex.mx)>;

Dear Dr. Ramírez,

Thank you for submitting your manuscript,  
"Determination of the kinetic behavior of diclofenac, in aqueous solution by UV light radiation", to Water,  
Air, & Soil Pollution

The submission id is: WATE-D-19-00653  
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript.

Your username is: [jjramirezg](#)  
If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at  
<https://www.editorialmanager.com/wate/>.

If your manuscript is accepted for publication in Water, Air, & Soil Pollution, you may elect to submit it to  
the Open Choice program. For information about the Open Choice program, please access the following  
URL: <http://www.springer.com/openchoice>

Alternatively, please call us at 001-630-468-7784 (outside the US)/(630)-468-7784 (within the US) anytime  
from Monday to Friday.  
Thank you very much.

With kind regards,

Journals Editorial Office WATE  
Springer  
P.O. Box 990  
3300 AZ DORDRECHT  
The Netherlands  
Fax: +31 78 657 6555

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about

<https://outlook.office.com/owa/?realm=uaemex.mx>

12/04/2019

publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on [www.springer.com/openchoice](http://www.springer.com/openchoice)). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to [www.springer.com/oafunding](http://www.springer.com/oafunding). Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

---

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/wate/login.asp?a=r>) Please contact the publication office if you have any questions.

Determination of the kinetic behavior of diclofenac, in aqueous solution by UV light radiation

M.E. Becerril\*<sup>1</sup>, J. Ramírez - García\*<sup>1</sup>, N. Cavazos<sup>2</sup>, A. Ramírez Serrano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón esq. Paseo Tollocan S/N, C.P. 50120 Toluca, Edo. de Méx. México.*

<sup>2</sup>*Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento de Química Analítica. Avenida Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño S/N Col. Mitras Centro. Monterrey, N.L.C.P. 64460.*

(\*) corresponding author: [maeugeniabo@gmail.com](mailto:maeugeniabo@gmail.com), [jjramirez@gmail.com](mailto:jjramirez@gmail.com), [nocavazos@yahoo.com](mailto:nocavazos@yahoo.com), [aramirezs75@hotmail.com](mailto:aramirezs75@hotmail.com).

---

*Keywords: photodegradation, drug, half-life, diclofenac.*

---

#### Abstract

Diclofenac (DCF) is one of the most widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs worldwide, several studies have reported adverse effects on the environment, in plants and animals; so it is classified as an emerging pollutant. There are several alternatives for its removal; however, it is necessary to study the way in which the DCF is degrading to offer more effective removal techniques, since the traditional ones such as chlorination, activated sludge and biofiltration offer low removal efficiency (20-40%). This work analyzes the kinetic behavior of the photodegradation of DCF and the thermodynamic parameters of the reaction under UV-C type light radiation. The results obtained indicate that it presents a first order kinetic promoted by the increase of the temperature. Also within the evaluated interval (273 to 308 K) the values of the kinetic coefficient (k) range between 0.05 to 0.20 min<sup>-1</sup> and the half-life ranges from 3 to 9 minutes. The reaction is exothermic and spontaneous and gives way to the formation of approximately 6 byproducts; being two of with the greatest presence and stability. This suggests that its decomposition route occurs through the dechlorination of the molecule and originates compounds known as carbazoles that have been detected in previous works. It was also found that this mixture of byproducts remained after the degradation of the drug, which is released to the environment, so it is necessary to extend a study on its properties and its possible environmental impact.

#### 1. Introduction

There is currently a growing concern about the continued presence of pharmaceutical products in the environment because a negative impact on plants and animals has been detected. The drugs are introduced into the aquatic effluents through their transport in wastewater containing excretes from people who have used them, residues of medicines that were handled improperly or through agricultural residues, such as livestock manure (Alalm, Tawfik and Ookawara, 2015).

This has caused that plants and animals to be continuously in contact with this type of compounds causing alterations in their normal cycle of growth and reproduction (Cooper and Song, 2007; Orepeša, 2008).

Several studies have evaluated the prolonged exposure of pharmaceutical contaminants in animals and plants, obtaining results that show toxic effects on them as endocrine modifications, cytotoxicity, teratogenesis and inhibition of their growth (Rainsford, Kean and Ehrlich, 2008; Jiménez, 2011; Melo *et al.*, 2014; Wang and Hu, 2014; Garima and Sindri, 2017). The previous arguments have given a guideline to classify drugs as emerging contaminants.

Diclofenac has been frequently detected in wastewater effluents at concentrations around  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (Alharbi *et al.*, 2017; Garima and Sindri, 2017)

and its adverse effects have been reported after a short-term exposure to several aquatic species including algae, crustaceans, bivalves and some species of fish such as rainbow trout and zebrafish (Memmert *et al.*, 2013; Magureanu *et al.*, 2015; Lonappan *et al.*, 2016; Garima and Sindri, 2017). In the rainbow trout it was observed that a concentration of  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  generates alterations at the cellular level (Köhler *et al.*, 2004) and in several exposure studies at 48 h, high mortality of aquatic fauna was observed, with maximum mean effective concentration values. ( $\text{EC}_{50}$ ) from  $22.4 \text{ mg L}^{-1}$  to  $39.9 \text{ mg L}^{-1}$  (Ferrari *et al.*, 2003).

Other similar assessments show degenerative impacts on the structure and functions of aquatic organisms at lower concentrations of  $100 \text{ ngL}^{-1}$  (Lawrence *et al.*, 2007).

The presence of DCF in residual effluents is the result of the high consumption of drugs with this active principle and the low removal efficiency (20-40%) (Magureanu *et al.*, 2015) that traditional treatments for wastewater have, such as chlorination, activated sludge or other forms of biological treatment such as biofiltration (Vieno, Tuhkanen and Kronberg, 2006). It is estimated that around 10,000 tons / year are consumed worldwide and these correspond to formulations for human and veterinary use (Memmert *et al.*, 2013).

The existing conventional water treatment plants were not designed for this type of contaminants, so it is necessary to develop proposals with processes and treatment techniques to eliminate drugs. Currently processes include advanced oxidation process (AOPS) such as the use of UV light,  $\text{H}_2\text{O}_2$  or physical (zeolite) and electrochemical methods that have shown high removal rates. However, they do not consider the formation of byproducts that can be stable and have a higher toxicity index than the drug in aqueous medium. Knowing the degradation profile of the drug, the instability or resistance of this and its by-products can be evidenced, its percentage of decomposition can be predicted and its half-life estimated. The latter being the specific time it takes for the present amount of the compound to be reduced by half (Gidal *et al.*, 2017). Obtaining the above data for diclofenac, the kinetic behavior of the active agent was determined before photolysis, the stability of its byproducts and its percentage of degradation.

## 2. Methodology

### 2.1. Chemicals

Diclofenac standard (DCF) Sigma Aldrich brand, deionized Milli Q water from Millipore, acetonitrile (ACN) brand J.T. Baker grade HPLC and formic acid (AF) Fermont brand (reactive grade, 98%).

### 2.2. Photodegradation

A device consisting of a batch reactor equipped with a UV-C type monochromatic lamp with a fixed wavelength (254 nm) was used with a reflux system to maintain the constant temperature and a magnetic stirring grid. The reactor was isolated from outside light. Fig. 1 shows the diagram of the system used. The experiment was carried out by subjecting an aqueous solution of 10 mg L<sup>-1</sup> of DCF under ultraviolet light radiation (254 nm) at three different temperatures of 278, 288 and 298 K with constant magnetic stirring. The samples collected were analyzed immediately after having been exposed to UV-C light radiation for a certain time.

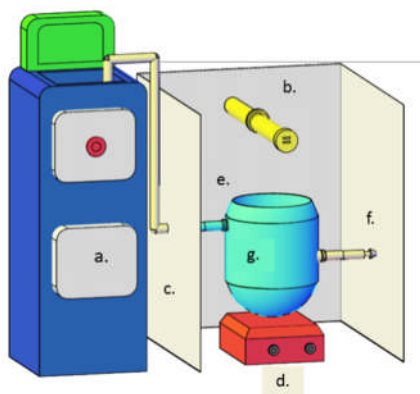


Fig. 42. UV light degradation equipment

a) Water bath for temperature control. b) Lamp. c) Dark chamber. d) Grill for magnetic stirring. e) and f) Water outlet and inlet g). Sample

### 2.3. Analysis

Aliquots of the irradiated solution were taken at different time intervals to evaluate the change in the initial concentration and evidence the formation of their degradation products. Before to their analysis, the samples were filtered using nylon acrodys with a pore size of 0.45  $\mu\text{m}$ . The quantitative analysis was performed using a validated analytical method of high performance liquid chromatography (HPLC) in a Waters brand equipment with UV detector model 2487 (dual ABS) and 515 model pump with isocratic flow and an Eclipse XDB- C18 5 $\mu\text{m}$  4.6 x 250 mm; using as mobile phase a solution of acetonitrile (ACN): formic acid (AF) 0.1% (v / v) 70:30 at a flow of 1.0

mL min<sup>-1</sup>, the injection volume of the samples was 10 µL, it worked at room temperature and the detection was at a wavelength of 280 nm.

#### 2.4. Kinetic evaluation of photodegradation

The data obtained from the photodegradation experiment and the quantification by the chromatographic method were treated considering the system as a batch reactor with homogeneous agitation, volume and constant temperature, to obtain the parameters that describe the rate reaction equation following:

$$r_A = \frac{dC_{DCF}}{dt} = -kC_{DCF}^\alpha \quad (9)$$

Where  $r_A$  is the rate reaction,  $C_{DCF}$  the concentration of diclofenac,  $t$  the time,  $k$  the kinetic coefficient of the reaction rate and  $\alpha$  the order of the reaction.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Effect of UV-C light radiation in DCF

The photodegradation experiments were carried out using a 10 mg L<sup>-1</sup> solution exposed to ultraviolet light radiation using a wavelength of 254 nm at three different temperatures (278, 288 and 298 K). A fourth experiment was carried out at a temperature of 298 K but without exposure to radiation, which was considered as a target to verify if the degradation of the drug occurs due to the effect of the radiation and not to the hydrolysis or some environmental factor not considering within the evaluation of the results.

The degradation profile of the DFC at different temperatures is shown in Fig. 2. In this graph it is observed that at the temperature of 298 K the change in the concentration of DCF occurred during the first ten minutes of exposure to radiation and after this time the concentration remained constant, reaching a degradation percentage of approximately 90%.

In the case of profiles of temperatures of 288 and 278 K, the degradation process occurred less quickly, in the first 10 minutes the percentage for 288 K was only 55% and for 278 of 45%, reaching the 90% up to almost thirty minutes.

Both temperatures had a similar behavior, and during the first fifteen minutes they showed a continuous concentration change; after this time the change was to a lesser degree. The mentioned shows that DCF degradation is susceptible to temperature changes and it is favored if the temperature rises.

Around thirty minutes after, the three temperatures reached the same concentration (90% of drug degradation), point that could indicate that as of that moment the factor of the temperature does not influence and the equilibrium of the reaction has been reached.

In the case of the profile defined as white, during the time of exposure there was no change in the concentration of the compound indicating that the degradation was caused by exposure to UV-C type radiation.

It was also observed that during the experiment the appearance of the solutions were gradually changing to a yellow color, this being indicative of the presence of degradation products derived from the decomposition. The above did not occur in the solution indicated as blank; being provided as additional test to confirm that the DCF is susceptible to the effects of UV-C type radiation. Fig. 3 illustrates the initial and final appearance of the irradiated solution, this agrees with that reported in photolysis work of DCF with sunlight and UV-C light radiation (Eriksson, Svanfelt and Kronberg, 2010; Keen *et al.*, 2013).



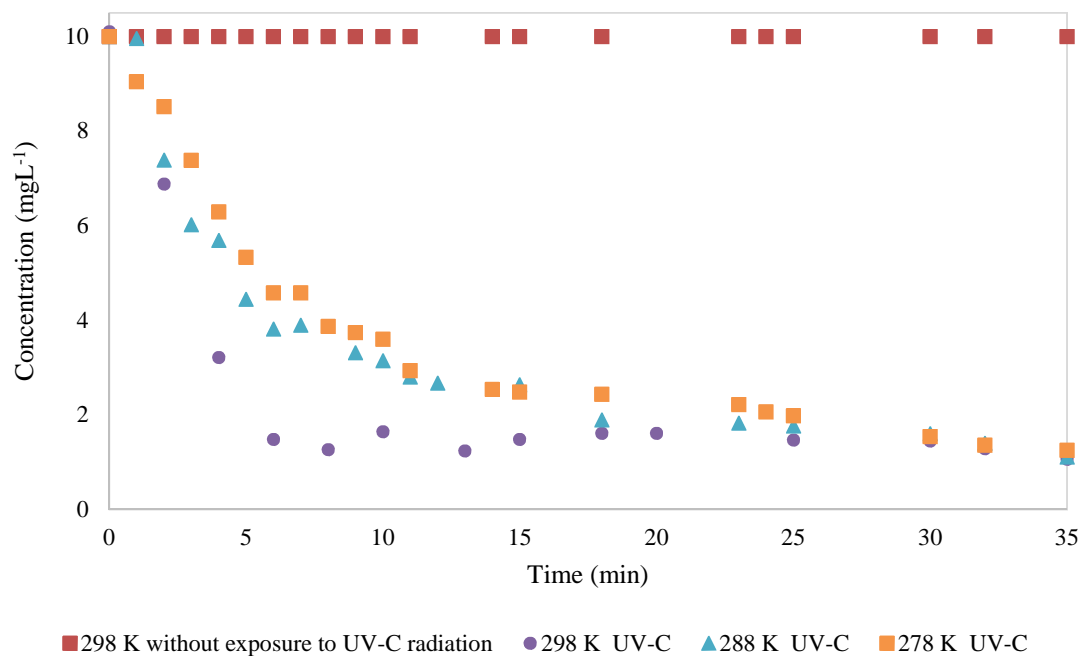


Fig. 43 DCF Degradation profile by UV-C radiation effect.



Fig. 44 DCF solution before (a) and after (b) of UV-C light irradiation

### 3.2. DCF kinetic photodegradation model

Aliquots of the irradiated solution were taken at different time intervals to evaluate the change in the initial concentration of the DCF solution by quantifying the samples with the previously described analytical method.

To determine the order of photodegradation velocity for DCF, the concentration values found at different times were used and were treated using the integral method (Scott Fogler, 2002).

The results obtained indicate that a first-order kinetic model describes the profile of the concentration changes; this is consistent with previous work where the photodegradation kinetics for DCF has also been studied (Hashim, Natarajan and Ray, 2014; Kovacic *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). The mathematical representation is shown below:



$$\ln \frac{C_{DCF0}}{C_{DCF}} = kt \quad (10)$$

Where  $C_A$  is DCF concentration,  $C_{A0}$  is initial DCF concentration  $t$  the time and  $k$  the kinetic coefficient of the reaction rate.

The order obtained indicates that the rate of degradation is directly proportional to the concentration, causing that the variation of the drug over time depends directly on the value of the kinetic coefficient of the reaction, as indicated in equation 2.

This type of order is characteristic of decomposition, degradation or isomerization reactions (Scott Fogler, 2002).

The direct dependency to the kinetic coefficient shows that to increase or decrease the rate of degradation the value of this must be modified. According to the Arrhenius equation, the value of this constant depends directly on the activation energy of the reaction and the temperature, so DCF degradation will be affected by these two factors directly.

Fig. 4 describes the concentration profile with respect to time considering that the reaction is of first order for the three temperatures evaluated (298, 288 and 278 K), determining the variation of the concentration change rates and the kinetic coefficient for each temperature. The latter was obtained from the slope of the linear regression of plot. The calculated values were  $0.16 \text{ min}^{-1}$  at 298 K,  $0.11 \text{ min}^{-1}$  at 288 K and  $0.084 \text{ min}^{-1}$  for 278 K. The above indicates an increase in the constant with the increase in temperature, causing the degradation to occur in less time to increase the value of this parameter in the irradiated solution, as occurs in the degradation profile shown in Fig. 2.

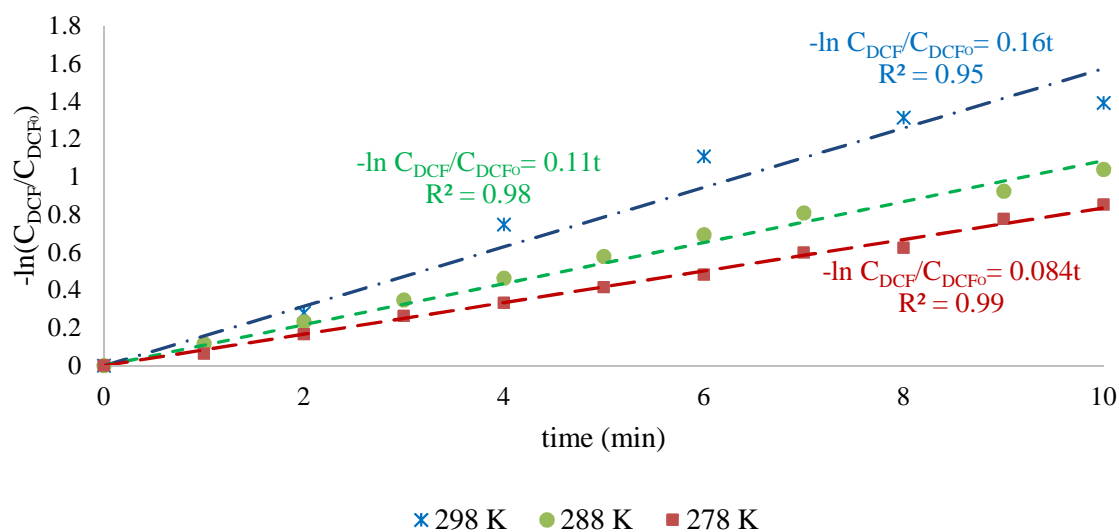


Fig. 45 DCF degradation kinetics ( $C_{DCF0}=10 \text{ mg L}^{-1}$ )

### 3.3. DCF kinetic parameters

Based on the Arrhenius equation (Scott Fogler, 2002) linear regression was performed for the determination of kinetic parameters where the activation energy of 22.05 kJmol<sup>-1</sup> and the frequency factor of 1.15 kJmol<sup>-1</sup> respectively. Next, the mathematical model used is shown:

$$\ln k = \ln A - \frac{Ea}{R} \left( \frac{1}{T} \right) \quad (11)$$

Where k is the kinetic coefficient, A the frequency factor (1 / min), Ea is activation energy (J mol<sup>-1</sup>) and T the absolute temperature in degrees Kelvin.

This equation was used to analyze the effect of temperature on the rate of degradation reaction rate (Scott Fogler, 2002). Fig. 5 shows the graph of the linear regression of the Arrhenius equation for DCF.

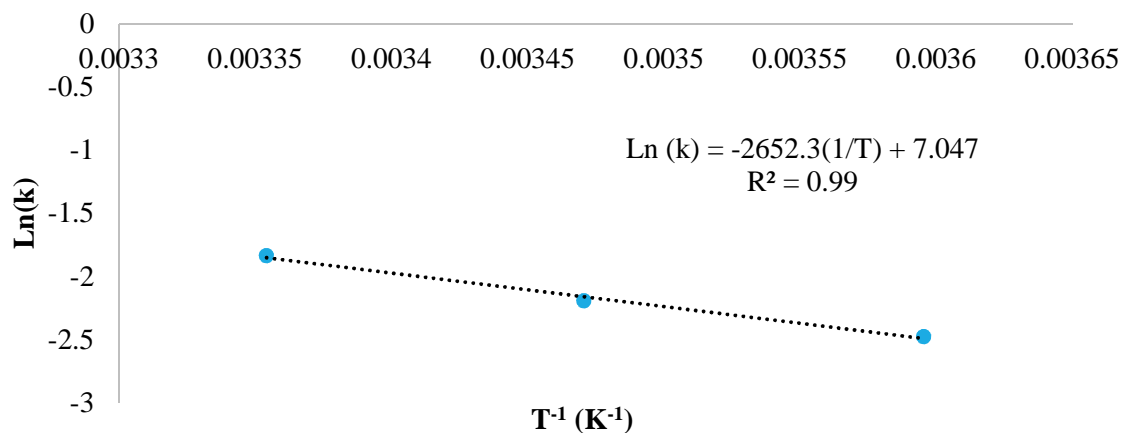


Fig. 46 Linear regression of the Arrhenius equation

Using the values of Ea and A obtained, the simulation of the photodegradation profile was performed (Fig. 6) within the range of 273 to 308 K. Subsequently, the apparent kinetic coefficient (Fig. 7) and the half-life at different temperatures were evaluated (Fig. 8). With the kinetic model shown in Fig. 6, the photodegradation behavior is presented, where the reduction of the concentration is favored with the increase of the temperature and the reaction speed. During the first thirty minutes the DCF is affected by the temperature and the change in concentration will depend on the value of it. It is observed that around forty minutes the concentration values are similar for all the temperatures evaluated, and around sixty minutes when the minimum concentration is

reached for all the profiles and the degradation speed is no longer dependent on the temperature, confirming that the reaction at this point reaches equilibrium.

It was found that within the evaluated temperature range the values of the kinetic coefficient ( $k$ ) oscillates between 0.05 to 0.20  $\text{min}^{-1}$ ; showing that at a lower temperature the speed of the reaction will occur more slowly, and at high temperature the degradation will be favored. The behavior of the values of the constant proves that the temperature directly influences the degradation. (Fig. 7). The half-life profile ( $t_{1/2}$ ) was obtained considering a first-order reaction and a concentration corresponding to half the initial concentration. The equation used is shown below:

$$t_{1/2} = \ln[0.5] \left[ \frac{1}{k} \right] \quad (12)$$

Where  $t_{1/2}$  is DCF half-life (min) and  $k$  the kinetic coefficient ( $\text{min}^{-1}$ ).

The values found for the half-life range from approximately 3 to 9 minutes and this decreases with the increase of the temperature, this is due to the fact that the increase in the value of the coefficient is favored (Fig. 8). The above suggests that at low temperatures the DCF is more stable and at higher temperatures it degrades more easily. The short half-life of the drug suggests that there is a greater probability that it is present in a lower proportion than the initial concentration when exposed to UV-C radiation, and that it is more likely to be located as a mixture of by-products derived from its degradation. Table 1 shows the values of the parameters evaluated.

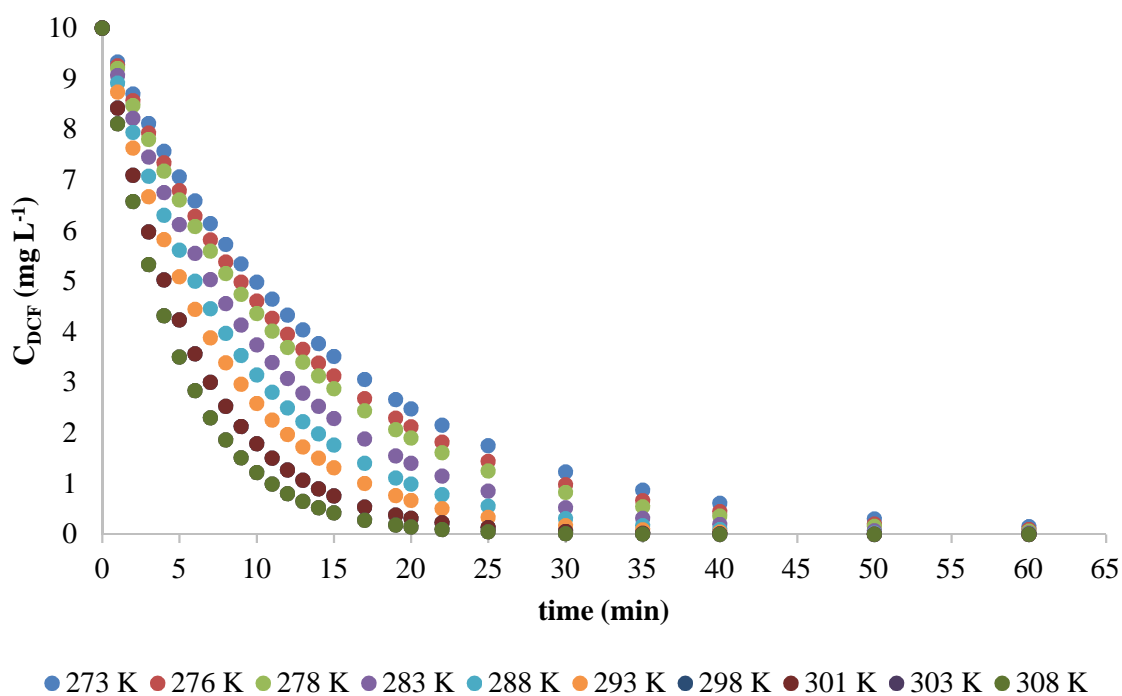


Fig. 47 DCF Kinetic behavior photodegradation at different temperatures

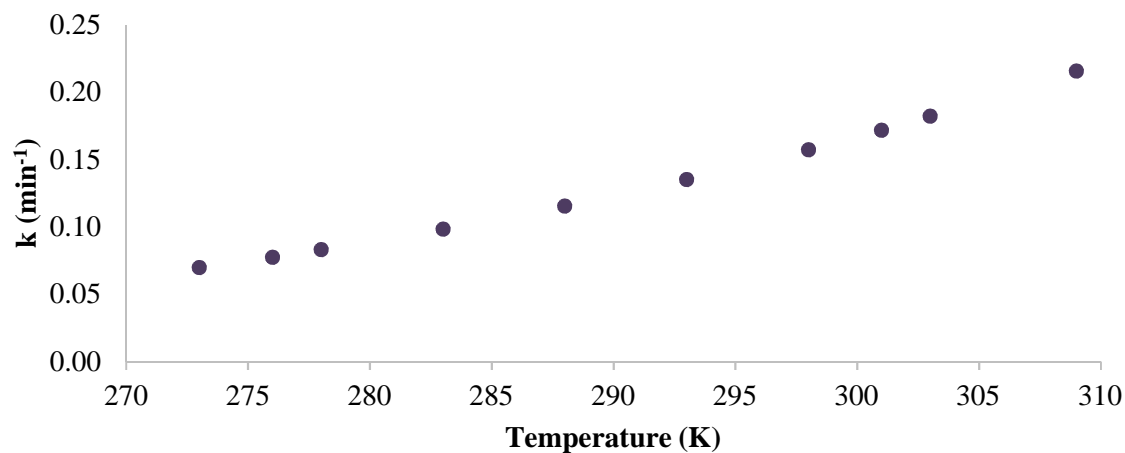


Fig. 48 Behavior of the photodegradation kinetic coefficient (k)

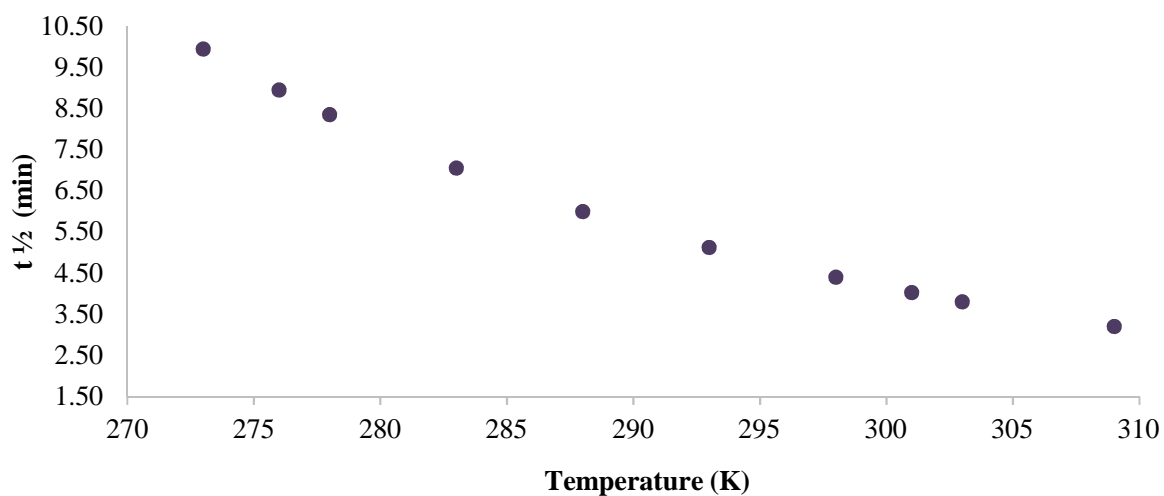


Fig. 49 Behavior of the half-life at different temperatures

Table 29 DCF kinetic parameters

Temperature (K)	273	276	278	283	288	293	298	301	303	308
k (min <sup>-1</sup> )	0.07	0.08	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16	0.17	0.18	0.21
Half-life(min)	9.95	8.95	8.35	7.06	6.00	5.13	4.41	4.03	3.80	3.30

### 3.4. Thermodynamic parameters of DCF photodegradation

The values of the kinetic coefficient (k) obtained using the van't Hoff linearized equation, the enthalpy ( $\Delta H^\circ$ , kJmol<sup>-1</sup>) and entropy ( $\Delta S^\circ$ , kJmol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) were evaluated obtaining values of 22.03 kJmol<sup>-1</sup> and 0.058 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> respectively (Fig. 9). The mathematical model is shown below:

$$\ln(k) = \frac{\Delta H^\circ}{R} \left( \frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (13)$$

Where  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  are the enthalpy and, entropy change; T the absolute temperature in Kelvin; R the ideal gas constant (8.314x 10<sup>-3</sup> kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>); and k kinetic coefficient.

The enthalpy and entropy values were used to calculate the free energy of Gibbs ( $\Delta G$ , kJ mol<sup>-1</sup>) in the temperature interval from 273 to 308 K, with the help of the following equation:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (14)$$

Where  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  and  $\Delta G^\circ$  are the enthalpy, entropy and free energy of Gibbs change; T the absolute temperature in Kelvin.

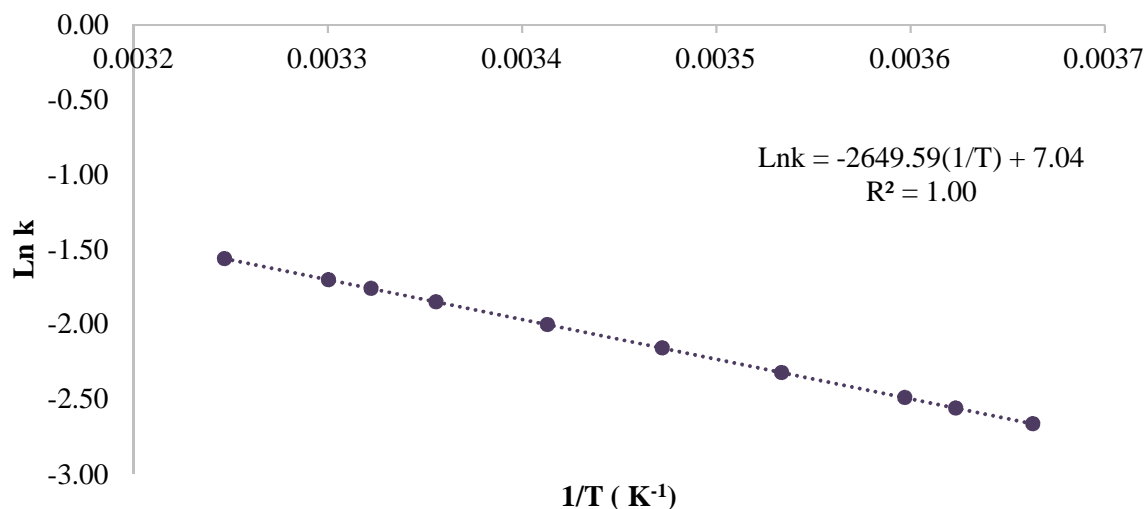


Fig. 50 Linear regression of the van't Hoff equation

The thermodynamic behavior of the photodegradation reaction indicates that it is exothermic and occurs spontaneously and irreversibly. In previous studies with DCF solar radiation, similar behavior was also found (Zhang *et al.*, 2017).

### 3.5. Photodegradation products

Of the photodegradation experiments carried out, the formation of approximately six byproducts was detected during exposure to UV-C radiation (Fig. 10). Considering the number of compounds found and the color change illustrated in Fig. 3; the possible route by which the drug is being degraded is the formation of dimers classified as carbazoles (Qin *et al.*, 2012; Keen *et al.*, 2013; Kovacic *et al.*, 2016); these are compounds that give way to a yellowish solution and its structure is composed of aromatic rings that derive from the union of the rings of the DCF molecule (Keen *et al.*, 2013).

It has been indicated that due to the chemical structure of the DCF (Fig. 11), the exit of the two chlorides groups is favored during the photodegradation process giving way to the union of their aromatic rings originating the carbazoles (Keen *et al.*, 2013).

Taking into account what has been reported in works of similar experiments, the majority products P1 and P2 found are derived from the consecutive loss of the two chlorines of the DCF molecule, and could be compounds called carbazole 1 (8-chloro-9H-carbazole). -1-il) acetic acid and carbazole 2 (8-hydroxy-9H-carbazol-1-yl) acetic acid, found in various studies with solar radiation (Eriksson, Svanfelt and Kronberg, 2010; Kovacic *et al.*, 2016) and byproducts P3, P4, P5 and P6 correspond to structures derived from the disintegration of these two molecules that give way to the formation of more carbazoles or aldehyde derivatives (Eriksson, Svanfelt and Kronberg, 2010).

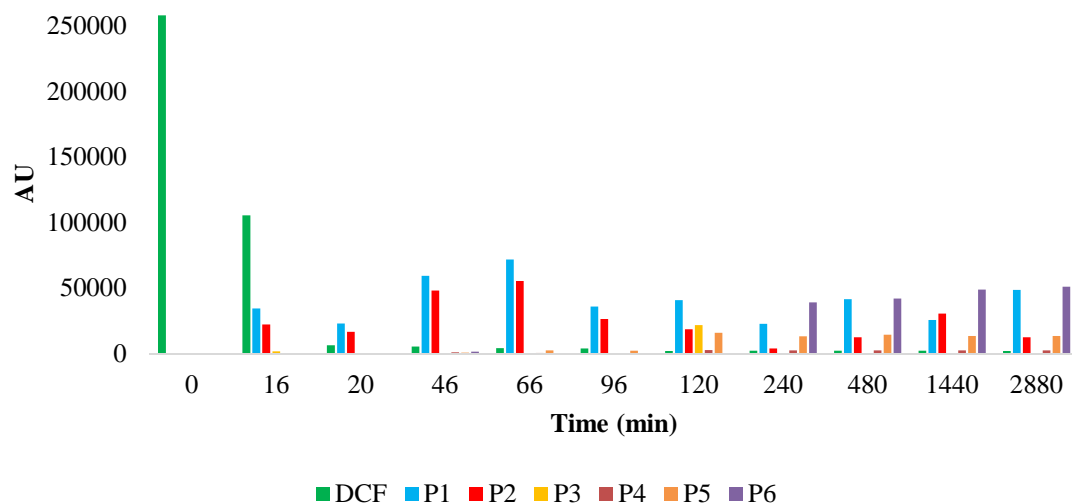


Fig. 51 Behavior of DCF degradation products

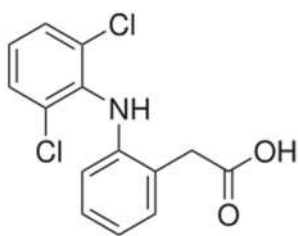


Fig. 52 Chemical structure of diclofenac

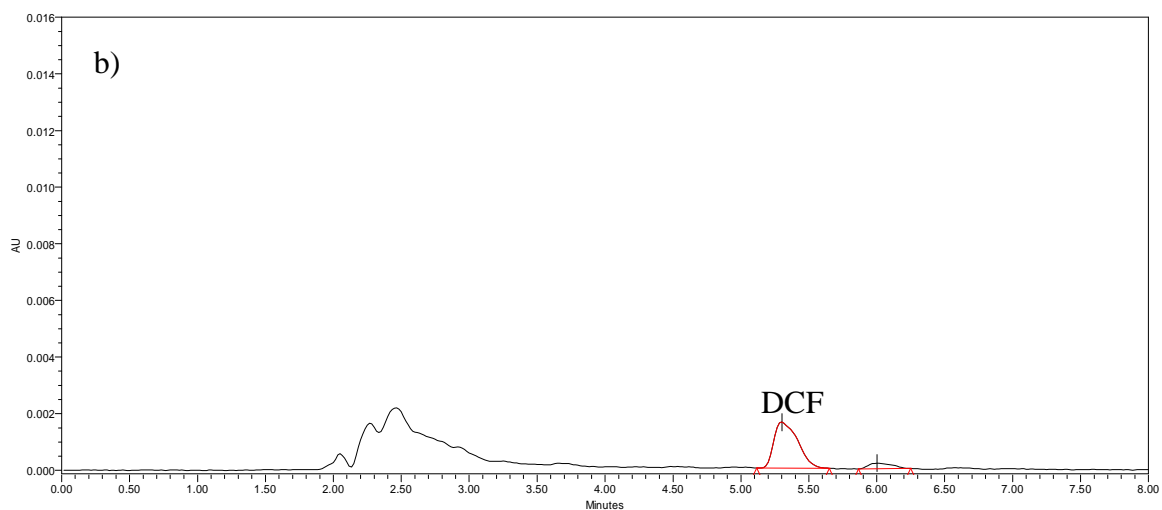
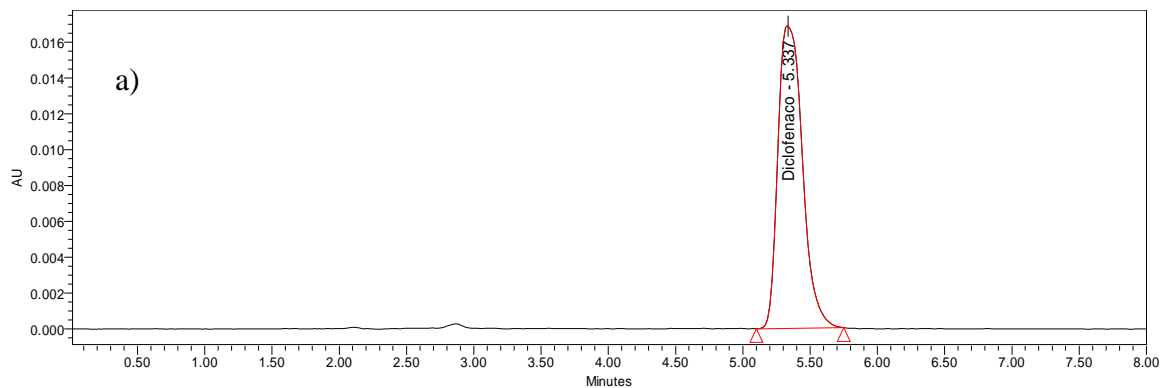
Fig. 12 a) shows the chromatogram of the initial solution of DCF, having a retention time ( $t_R$ ) around 5 minutes. After one hour of exposure to UV-C radiation in Fig. 12 b) the appearance of new signals with a retention time lower than the DCF ( $t_R$  approximately 2 to 3 minutes), which correspond to degradation products, is observed derived from its degradation. As time passes, it can be observed in Fig. 12 c and 12 d) that the new signals increase in intensity. Therefore, the increase in their concentration occurs. This indicates that despite the fact that the asset has been degraded around 90% during the first hour, 10% of the remaining solution consists of a mixture of the drug (40%) with its byproducts (60%).

The increase and decrease in the area of the different signals other than DCF in the chromatograms, possibly due to the instability of the various compounds leads to the formation of new products. These changes have been reported as secondary reactions that result in compounds called carbazoles (Agüera *et al.*, 2005; Eriksson, Svanfelt and Kronberg, 2010).

The constant presence of byproducts beyond the half-life of DCF (approximately 4 minutes at 298 K) suggests that some of these compounds are stable to UV-C radiation. In Fig. 10 the behavior of its formation and degradation during the first 48 hours is described, it can be noted that the products P1 and P2 are the first to appear and tend to remain throughout the irradiation time. After the first two hours the presence of new secondary compounds begins to be more considerable, with the P3 product being one of the first to manifest itself, but to a lesser extent than the P1. The P4 product appears in the first minutes and does not disappear, it only varies in the proportion corresponding to the formation of the other species, and this compound has a lower presence compared to the other products. The P5 compound as P4 varies its proportion and from the first 2 hours its presence increases. The P6 product increases after 4 hours and remains one of the major byproducts throughout the remaining period. At the end we obtain a solution composed of two major products P1 and P6, which may correspond to one of the carbazoles reported in previous research (Bartels and von Tümpling, 2007; Eriksson, Svanfelt and Kronberg, 2010; Keen *et al.*, 2013).

Having carbazoles resistant to photolysis in the final mixture implies the probability that these will be released into the environment; so it is necessary to extend a study on its properties and its possible environmental impact. Evidence has been found that some compounds of this type tend to bioaccumulate and have caused toxic effects in some aquatic species (Chittim *et al.*, 2016b; Salam, Ilori and Amund, 2017).

Currently, drug removal alternatives focus only on the asset and not on its degradation products. However, due to the above results it can be mentioned that options for the management or inactivation of the degradation products must be included since it is very probable to find the presence of these compounds during the treatments of removal of this drug or that some of them have toxic properties.





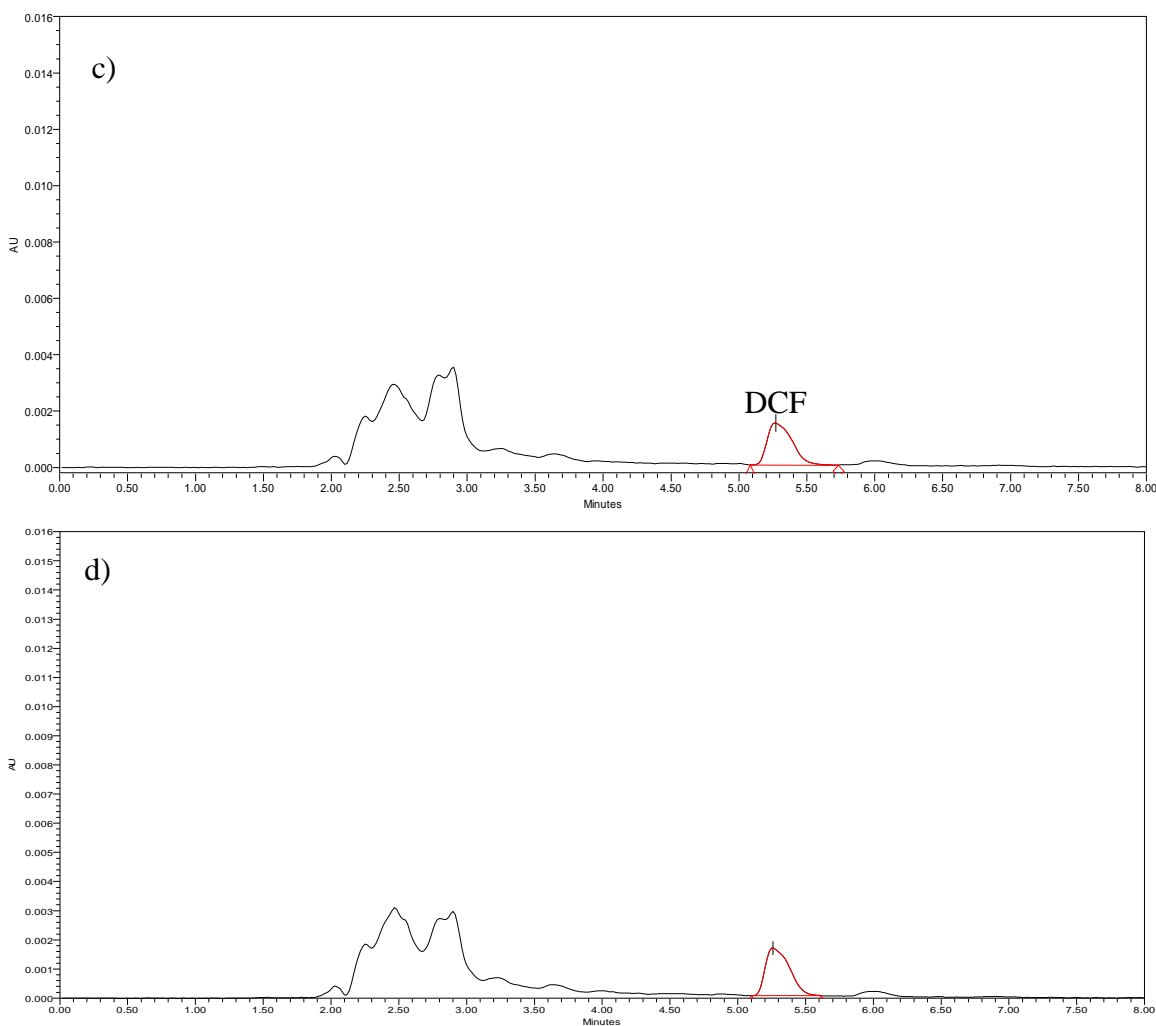


Fig. 53 Chromatogram of formation of degradation products a) initial, b) 1 h c) 24 h, d) 48 h after exposure to UV-C radiation.

#### 4. Conclusions

The photodegradation reaction of DCF by UV-C radiation is a first order and is promoted by the increase of temperature.

The kinetic parameters were determined as a function of temperature (273-308 K) and it was found that the average life of this drug ranges from 3 to 9 min. The thermodynamic parameters obtained indicate that its photodegradation occurs exothermically in a spontaneous and irreversible reaction. The degradation of DCF gives way to the formation of stable degradation products that tend to be present even after their disintegration and possibly correspond to a mixture of compounds called carbazoles derived from diclofenac dechlorination.

#### 5. Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from CONACYT (Project 215997), and CONACYT scholar Grant No. 8060728 for María Eugenia Becerril Ortiz





**La Academia Nacional de Ciencias Ambientales  
y la Universidad Autónoma de Zacatecas**

*Francisco García Salinas*

a través de

**la Unidad Académica de Ciencias de la Tierra  
y la Licenciatura en Ciencias Ambientales**

Otorgan la presente

## CONSTANCIA

**A:** Becerril Ortiz María Eugenia, Ramírez García Jorge Javier, Ramírez Serrano Armando, Cavazos Rocha Norma.

**Por:** Su participación con el Cartel: "DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE DICLOFENACO EN SOLUCIÓN ACUOSA BAJO RADIACIÓN DE LUZ UV." en el marco del XVII Congreso Internacional y XXVIII Congreso Nacional de Ciencias

**Zacatecas, Zac, 15 de junio de 2018**

**Dr. Alberto Pereira Corona**  
Presidente ANCA

**Dr. Santiago Valle Rodríguez**  
Secretario ANCA  
Coordinador General Congreso 2018



# Referencias

## 6. References

- Agüera, A. *et al.* (2005) 'Application of time-of-flight mass spectrometry to the analysis of phototransformation products of diclofenac in water under natural sunlight', *Journal of Mass Spectrometry*, 40(7), pp. 908–915. doi: 10.1002/jms.867.
- Alalm, M. G., Tawfik, A. and Ookawara, S. (2015) 'Degradation of four pharmaceuticals by solar photo-Fenton process: Kinetics and costs estimation', *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), pp. 46–51. doi: 10.1016/j.jece.2014.12.009.
- Alharbi, S. K. *et al.* (2017) 'Photolysis and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of diclofenac, sulfamethoxazole, carbamazepine, and trimethoprim: Identification of their major degradation products by ESI–LC–MS and assessment of the toxicity of reaction mixtures', *Process Safety and Environmental Protection*. Institution of Chemical Engineers, 112, pp. 222–234. doi: 10.1016/j.psep.2017.07.015.
- Alicia, C., Villamizar, A. and Fonseca, A. E. De (2011) 'Estudio preliminar de la presencia de compuestos emergentes en las aguas residuales del Hospital Universidad del Norte'.
- Alsante, K. M. *et al.* (2014) 'Recent Trends in Product Development and Regulatory Issues on Impurities in Active Pharmaceutical Ingredient (API) and Drug Products. Part 2: Safety Considerations of Impurities in Pharmaceutical Products and Surveying the Impurity Landscape', *AAPS PharmSciTech*, 15(1), pp. 237–251. doi: 10.1208/s12249-013-0061-z.
- Bartels, P. and von Tümpling, W. (2007) 'Solar radiation influence on the decomposition process of diclofenac in surface waters', *Science of the Total Environment*, 374(1), pp. 143–155. doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.11.039.
- Beijnen, J. H., van der Houwen, O. A. G. J. and Underberg, W. J. M. (2002) 'Aspects of the degradation kinetics of doxorubicin in aqueous solution', *International Journal of Pharmaceutics*, 32(2–3), pp. 123–131. doi: 10.1016/0378-5173(86)90170-5.
- Blair, B. *et al.* (2015) 'Evaluating the degradation, sorption, and negative mass balances of pharmaceuticals and personal care products during wastewater treatment', *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 134, pp. 395–401. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.04.078.
- Blessy, M. *et al.* (2014) 'Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review', *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(3), pp. 159–165. doi: 10.1016/j.jpha.2013.09.003.
- Center for Disease Dynamics Economics & Policy (2015) 'The State of the world's antibiotics 2015', *Centre for Disease Dynamics, Economics & Policy, CDDEP: Washington, D.C.*, pp. 1–84. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.
- Chittim, B. *et al.* (2016a) 'Environmental levels and toxicological potencies of a novel mixed halogenated carbazole', *Emerging Contaminants*. Elsevier Ltd, 2(3), pp. 166–172. doi: 10.1016/j.emcon.2016.07.002.

- Chittim, B. *et al.* (2016b) 'Environmental levels and toxicological potencies of a novel mixed halogenated carbazole', *Emerging Contaminants*. Elsevier Ltd, 2(3), pp. 166–172. doi: 10.1016/j.emcon.2016.07.002.
- Cooper, W. J. and Song, W. (2007) 'Advanced oxidation degradation of diclofenac', pp. 168–179.
- Desrosiers, M. and Assessment, R. (2014) 'A review of what is an emerging contaminant', *Chemistry Central Journal*, 8(15), pp. 1–7. doi: 10.1186/1752-153X-8-15.
- Drug Bank (2005) *drug Bnk*.
- Drug Bank (no date) *Drug Bank*.
- Durga, D. H. N., Lohithasu, D. and Murthy, K. V. R. (2017) 'Development and evaluation of diclofenac sodium controlled release dosage forms using natural, hydrophilic and hydrophobic polymers and its comparative studies', *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(1), pp. 116–127. doi: 10.5530/ijper.51.1.16.
- Elkins, P. *et al.* (2014) 'Characterization of the isomeric configuration and impurities of (Z)-endoxifen by 2D NMR, high resolution LC-MS, and quantitative HPLC analysis', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier, 88, pp. 174–179. doi: 10.1016/j.jpba.2013.07.010.
- Eriksson, J., Svanfelt, J. and Kronberg, L. (2010) 'A photochemical study of diclofenac and its major transformation products', *Photochemistry and Photobiology*, 86(3), pp. 528–532. doi: 10.1111/j.1751-1097.2009.00703.x.
- Feng, L. *et al.* (2013) 'Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review', *Chemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 228, pp. 944–964. doi: 10.1016/j.cej.2013.05.061.
- Ferrari, B. *et al.* (2003) 'Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(3), pp. 359–370. doi: 10.1016/S0147-6513(02)00082-9.
- Frank-Andreas Weber, A. *et al.* (2014) 'Fármacos en el medio ambiente – la perspectiva global'. Available at: [www.umweltbundesamt.de](http://www.umweltbundesamt.de).
- Franquet-Griell, H. *et al.* (2017) 'Biological and photochemical degradation of cytostatic drugs under laboratory conditions', *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V., 323, pp. 319–328. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.06.057.
- Garima, K. and Sindri, B. (2017) 'NSAIDS in the Environment: From Emerging Problem to Green Solution', *Ann Pharmacol Pharm*, 2(14), pp. 1–3. Available at: [http://remedypublications.com/pharmacology-and-pharmaceutics/articles/pdfs\\_folder/app-v2-id1077.pdf](http://remedypublications.com/pharmacology-and-pharmaceutics/articles/pdfs_folder/app-v2-id1077.pdf).
- Gidal, B. E. *et al.* (2017) 'The application of half-life in clinical decision making: Comparison of the pharmacokinetics of extended-release topiramate (USL255) and immediate-release topiramate',

- Epilepsy Research*. Elsevier B.V., 129, pp. 26–32. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2016.10.020.
- ‘Guía de Validación de Método Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2002’
- Hana, Y. K. *et al.* (2017) ‘Physicochemical characterization of physical mixture and solid dispersion of diclofenac potassium with mannitol’, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(1), pp. 204–208. doi: 10.7324/JAPS.2017.70130.
- Hashim, N., Natarajan, P. and Ray, A. K. (2014) ‘Intrinsic Kinetic Study for Photocatalytic Degradation of Diclofenac under UV and Visible Light’, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(49), pp. 18637–18646. doi: 10.1021/ie404355k.
- Hernández, D. *et al.* (2018) ‘Synthetic clay mineral as nanocarrier of sulfamethoxazole and trimethoprim’, *Applied Clay Science*. Elsevier, 161(March), pp. 395–403. doi: 10.1016/j.clay.2018.03.016.
- Hernández Enríquez, J. M. *et al.* (2011) ‘Síntesis, caracterización y actividad fotocatalítica de óxido de titanio modificado con nitrógeno’, *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 50(5), pp. 245–252. doi: 10.3989/cyv.322011.
- Jewell, K. S. *et al.* (2016) ‘New insights into the transformation of trimethoprim during biological wastewater treatment’, *Water Research*. Elsevier Ltd, 88, pp. 550–557. doi: 10.1016/j.watres.2015.10.026.
- Ji, Y. *et al.* (2016) ‘Degradation of trimethoprim by thermo-activated persulfate oxidation: Reaction kinetics and transformation mechanisms’, *Chemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 286, pp. 16–24. doi: 10.1016/j.cej.2015.10.050.
- Jiménez, C. (2011) ‘Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: Productos farmacéuticos’, *Revista Lasallista de Investigación*, 8(2), pp. 143–153. doi: 10.1109/TGRS.2011.2120615.
- Joss, A. *et al.* (2006) ‘Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme’, *Water Research*, 40(8), pp. 1686–1696. doi: 10.1016/j.watres.2006.02.014.
- Jurgens, M. D. *et al.* (2002) ‘The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English Rivers’, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(3), pp. 480–488. doi: 10.1002/etc.5620210302.
- Keen, O. S. *et al.* (2013) ‘Dimer formation during UV photolysis of diclofenac’, *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 93(9), pp. 1948–1956. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.079.
- Kim, H. Y., Kim, T. H. and Yu, S. (2015) ‘Photolytic degradation of sulfamethoxazole and trimethoprim using UV-A, UV-C and vacuum-UV (VUV)’, *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 50(3), pp. 292–300. doi: 10.1080/10934529.2015.981118.

- Köhler, H.-R. *et al.* (2004) 'Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac', *Aquatic Toxicology*, 68(2), pp. 151–166. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.03.015.
- Kovacic, M. *et al.* (2016) 'UV photolysis of diclofenac in water; kinetics, degradation pathway and environmental aspects', *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), pp. 14908–14917. doi: 10.1007/s11356-016-6580-x.
- Kuster, M. *et al.* (2008) 'Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain)', *Journal of Hydrology*, 358(1–2), pp. 112–123. doi: 10.1016/j.jhydrol.2008.05.030.
- Lawrence, J. R. *et al.* (2007) 'Structural and functional responses of river biofilm communities to the nonsteroidal anti-inflammatory diclofenac', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(4), pp. 573–582. doi: 10.1897/06-340R.1.
- Liu, Q. *et al.* (2017) 'The removal of trimethoprim and sulfamethoxazole by a high infiltration rate artificial composite soil treatment system', *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 11(2), p. 12. doi: 10.1007/s11783-017-0920-z.
- Loera, M. A. De *et al.* (2016) 'Ecofarmacovigilancia', 47(1), pp. 12–16.
- Lonappan, L. *et al.* (2016) 'Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review', *Environment International*. Elsevier Ltd, 96, pp. 127–138. doi: 10.1016/j.envint.2016.09.014.
- Lucila, I., María, I. and Argelia, M. (2015) 'Ecofarmacovigilancia en México : perspectivas para su implementación Ecopharmacovigilance in Mexico : prospects of its implementation', *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(3), pp. 16–40.
- Ma, X. *et al.* (2015) 'Simultaneous degradation of estrone, 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol in an aqueous UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system', *International Journal of Environmental Research and Public Health*. doi: 10.3390/ijerph121012016.
- Maggio, R. M. *et al.* (2014) 'Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, pp. 102–122. doi: 10.1016/j.jpba.2014.04.016.
- Magureanu, M. *et al.* (2015) 'Removal of the pharmaceutical diclofenac by pulsed corona discharge', pp. 1–4.
- Manius, G. J. (1978) 'TRIMETHOPRIM'.
- Marolia, B. P. *et al.* (2016) 'Hydrolytic Degradation Kinetic Study of Balofloxacin by Stability Indicating Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography Method', *Pharmaceutical methods*, 7(1), pp. 39–47.
- McGettigan, P. and Henry, D. (2013) 'Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and



High-Income Countries', *PLoS Medicine*, 10(2). doi: 10.1371/journal.pmed.1001388.

Melo, S. R. d. O. *et al.* (2014) 'Advice on Degradation Products in Pharmaceuticals: A Toxicological Evaluation', *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 68(3), pp. 221–238. doi: 10.5731/pdajpst.2014.00974.

Memmert, U. *et al.* (2013) 'Diclofenac: New data on chronic toxicity and bioconcentration in fish', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(2), pp. 442–452. doi: 10.1002/etc.2085.

Micevych, P. E. *et al.* (2007) 'Estradiol stimulates progesterone synthesis in hypothalamic astrocyte cultures', *Endocrinology*, 148(2), pp. 782–789. doi: 10.1210/en.2006-0774.

Orepesa, A. L. (2008) 'Disruptores endocrinos en el medio ambiente: Caso del 17 -  $\alpha$  - etinil-estradiol', *Observatorio Ambiental*, 11, pp. 63–76. doi: 10.5209/REV\_OBMD.2008.V11.22427.

Piechocki, J. T. and Thoma, K. (2007) *Pharmaceutical photostability and stabilization technology*. Informa Healthcare.

*PubChem Compound Database* (no date). Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/trimethoprim#section=Top> (Accessed: 1 January 2017).

Qin, M. *et al.* (2012) 'Photochemical characteristics of diclofenac and its photodegradation of inclusion complexes with  $\beta$ -cyclodextrins', *Quimica Nova*, 35(3), pp. 559–562. doi: 10.1590/S0100-40422012000300022.

Rainsford, K. D., Kean, W. F. and Ehrlich, G. E. (2008) 'Review of the pharmaceutical properties and clinical effects of the topical NSAID formulation, diclofenac epolamine.', *Current medical research and opinion*, 24(10), pp. 2967–2992. doi: 10.1185/03007990802381364.

Rosenfeldt, E. J. and Linden, K. G. (2004) 'Degradation of endocrine disrupting chemicals bisphenol A, ethinyl estradiol, and estradiol during UV photolysis and advanced oxidation processes', *Environmental Science and Technology*. doi: 10.1021/es035413p.

Salam, L. B., Ilori, M. O. and Amund, O. O. (2017) 'Properties, environmental fate and biodegradation of carbazole', *3 Biotech*. Springer Berlin Heidelberg, 7(2). doi: 10.1007/s13205-017-0743-4.

Scott Fogler, H. (2002) *Elements of chemical reaction engineering*. Third, *Chemical Engineering Science*. Third. New Jersey: Prentice Hall Inc. doi: 10.1016/0009-2509(87)80130-6.

Sopaj, F. *et al.* (2015) 'Influence of the anode materials on the electrochemical oxidation efficiency. Application to oxidative degradation of the pharmaceutical amoxicillin', *Chemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 262, pp. 286–294. doi: 10.1016/j.cej.2014.09.100.

Taoukis, P. S., Tsironi, T. N. and Giannakourou, M. C. (2014) 'Reaction kinetics', *Food Engineering Handbook: Food Engineering Fundamentals*, pp. 529–569. doi: 10.1201/b17843.

Thormann, U. *et al.* (2014) 'Mechanism of chemical degradation and determination of solubility by kinetic modeling of the highly unstable sesquiterpene lactone nobilin in different media', *Journal of*

- Pharmaceutical Sciences*, 103(10), pp. 3139–3152. doi: 10.1002/jps.24100.
- Vieno, N., Tuhkanen, T. and Kronberg, L. (2006) 'Removal of pharmaceuticals in drinking water treatment: Effect of chemical coagulation', *Environmental Technology*, 27(2), pp. 183–192. doi: 10.1080/09593332708618632.
- Wang, J. and Hu, X. (2014) 'Ecopharmacovigilance: Current state, challenges, and opportunities in China', *Indian Journal of Pharmacology*, 46(1), p. 13. doi: 10.4103/0253-7613.125158.
- Wei, X. *et al.* (2018) 'Visible light photocatalytic mineralization of 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol (EE2) and hydrogen evolution over silver and strontium modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles: mechanisms and phytotoxicity assessment', *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 8(8), pp. 4329–4339. doi: 10.1039/C7RA12638G.
- Woolhouse, M. *et al.* (2016) 'Global disease burden due to antibiotic resistance – state of the evidence', *Journal of Global Health*, 6(1), pp. 1–5. doi: 10.7189/jogh.06.010306.
- Wu, Y., Chen, D. and Kookana, R. (2011) 'Aqueous Photodegradation of Selected Antibiotics under Different Conditions', *Energy Procedia*, 11, pp. 2098–2103. doi: 10.1016/j.egypro.2011.10.511.
- Wu, Z. *et al.* (2016) 'Roles of reactive chlorine species in trimethoprim degradation in the UV/chlorine process: Kinetics and transformation pathways', *Water Research*. Elsevier Ltd, 104, pp. 272–282. doi: 10.1016/j.watres.2016.08.011.
- Zhang, N. *et al.* (2017) 'Photodegradation of diclofenac in aqueous solution by simulated sunlight irradiation: Kinetics, thermodynamics and pathways', *Water Science and Technology*, 75(9), pp. 2163–2170. doi: 10.2166/wst.2017.075.
- Zhang, R. *et al.* (2015) 'Degradation of pharmaceuticals and metabolite in synthetic human urine by UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and UV/PDS', *Environmental Science and Technology*, 49(5), pp. 3056–3066. doi: 10.1021/es504799n.
- Zhang, Z. *et al.* (2010) 'Kinetic degradation model and estrogenicity changes of EE 2 (17 $\alpha$ -ethinylestradiol) in aqueous solution by UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> technology', *Journal of Hazardous Materials*, 181, pp. 1127–1133. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.05.132.