

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**CUANTIFICACIÓN DE CARBAMAZEPINA EN EFLUENTES
HOSPITALARIOS POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA
RESOLUCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

Q.F.B. ADRIANA YAZMIN MARTÍNEZ GARAY

DIRIGIDO POR:

DR. JORGE JAVIER RAMÍREZ GARCÍA

DR. JOSÉ LUIS GALLEGOS PÉREZ

DR. ARTURO COLÍN CRUZ



TOLUCA ESTADO DE MÉXICO, DICIEMBRE 2013



UAEM | Universidad Autónoma del Estado de México

3° (EV. DE GRADO)
OFICIO NO 523/2013

Toluca, México, 12 de noviembre de 2013

**P. DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
ADRIANA YAZMIN MARTINEZ GARAY
FACULTAD DE QUIMICA
P R E S E N T E**

La que suscribe Directora de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

Dr. Arturo Colín Cruz
PRESIDENTE

Dra. Edith Erielia Gutiérrez Segura
SECRETARIO

M. en C.A. María Magdalena García Fabila
PRIMER VOCAL

Dr. Jorge Javier Ramírez García
SEGUNDO VOCAL

Dr. Francisco Granados Correa
TERCER VOCAL

Dr. Armando Ramírez Serrano
SUPLENTE

Dra. Araceli Amaya Chávez
SUPLENTE

FIRMA

(Handwritten signatures of the jury members)

**ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO**
"2013, 50 Aniversario Luctuoso del Poeta Heriberto Enriquez"

(Handwritten signature of Guadalupe Ofelia Santamaría González)
**M. en A.P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARIA GONZALEZ
DIRECTORA**



**U. A. E. M.
FACULTAD DE QUIMICA
DIRECCION**



c.c.p. Archivo

www.uaemex.mx

Facultad de Química • Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan • Toluca Estado de México
Tel. y Fax: 217-5109 y 217-3890 • fquim@uaemex.mx

*Este trabajo se lo dedico a Dios, porque gracias a ti mi amado Jesús,
tengo y soy lo que soy ahora. Porque todo viene de tí y es para tí.
Gracias Señor por fijar tu mirada en mí y permitirme llegar hasta este
momento. Toma mi mano y nunca te separes de mí, mi dulce amor.*

AGRADECIMIENTOS

A mi amado esposo **Jhon** por creer en mí, por su apoyo y amor a lo largo de estos años que hemos compartido.

A mi pequeño **David**, fruto de nuestro amor, la luz de mi vida, por tus hermosas sonrisas que me motivaron a seguir adelante.

A mis padres, **Arturo y Araceli**, por su guía espiritual, su amor incondicional y sus oraciones para mí.

A mis suegros, **José Luis y Patricia**, por todo su apoyo y paciencia que he recibido de ustedes.

A mis profesores y amigos, **Dr. Jorge Ramírez, Dr. José Luis Gallegos y Dr. Arturo Colín** cuyo compromiso y valioso tiempo ha sido primordial para que este trabajo haya sido concluido.

A la **Universidad Autónoma del Estado de México** por las facilidades, accesibilidad y los recursos proporcionados para la ejecución del presente trabajo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada para estudios de posgrado.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	12
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA	16
2.2 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE FÁRMACOS Y SU ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA.....	17
2.3 FORMACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE DESINFECCIÓN EN EL AGUA POTABLE	19
2.4 PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LA CARBAMAZEPINA	22
2.5 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CARBAMAZEPINA	23
2.6 METABOLITOS DE LA CARBAMAZEPINA	24
2.7 REMOCIÓN DE LA CARBAMAZEPINA EN LAS PLANTAS TRATADORAS DE AGUAS RESIDUALES	27
2.8 PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA PARA LA DEGRADACIÓN DE CARBAMAZEPINA..	28
2.9 FOTOTRANSFORMACIÓN DE LA CARBAMAZEPINA	31
2.10 CINÉTICA DE DEGRADACIÓN Y VIDA MEDIA	33
2.11 TOXICIDAD DE LA CARBAMAZEPINA	36
2.12 METODOLOGÍAS ANALÍTICAS.....	41
2.13 VALIDACIÓN	43
2.14 PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA	48
2.15 EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE)	48
2.16 EXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA (SPE).....	49
2.17 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)	52
2.18 IDENTIDAD POR ULTRAVIOLETA (UV).....	53
2.19 IDENTIDAD POR RADIACIÓN INFRARROJA (IR)	54
3. JUSTIFICACIÓN	55
4. HIPÓTESIS.....	56
5. OBJETIVOS	56
5.1 OBJETIVO GENERAL	56
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56

6.	METODOLOGÍA	57
6.1	CARACTERIZACIÓN DEL ESTÁNDAR Y MEDICAMENTO GENÉRICO DE CBZ	58
6.1.1	APARIENCIA	58
6.1.2	IDENTIDAD POR ULTRAVIOLETA (UV)	58
6.1.3	IDENTIDAD POR RADIACIÓN INFRARROJA (IR)	58
6.1.4	pH DE LAS SOLUCIONES DEL ESTÁNDAR Y MEDICAMENTO GENÉRICO	58
6.2	MUESTREO	59
6.2.1	IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS (ETIQUETADO)	59
6.2.2	MUESTREO EN CANALES O COLECTORES (NMX-AA-003-1980)	59
6.2.3	PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA DE AGUA RESIDUAL	60
6.2.4	PREPARACIÓN DE MUESTRA	60
6.3	EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)	61
6.4	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN	62
6.5	MONTAJE DEL MÉTODO ANALÍTICO	62
6.6	DEGRADACIÓN DE LA CARBAMAZEPINA	63
6.7	VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA	63
6.7.1	LINEALIDAD	64
6.7.2	EXACTITUD	64
6.7.3	PRECISIÓN DEL SISTEMA	65
6.7.4	PRECISIÓN INTERMEDIA	65
6.7.5	LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)	66
6.7.6	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LQ)	66
6.7.7	ROBUSTEZ	66
6.8	CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS	67
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
7.1	ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN:	70
7.2	GESTIÓN DEL MUESTREO	89
7.3	CARACTERIZACIÓN DEL ESTÁNDAR Y MEDICAMENTO GENÉRICO	90
7.4	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE COLUMNAS CROMATÓGRAFICAS	92
7.5	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	93
7.5.1	VERIFICACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN	94

7.5.2	LINEALIDAD DE LA CBZ	95
7.5.3	VERIFICACIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DE LA LINEALIDAD PARA LA CBZ (DESVIACIÓN DE LA LINEALIDAD).....	96
7.5.4	PRECISIÓN.....	97
7.5.4.1	REPETITIVIDAD DEL SISTEMA	97
7.5.4.2	REPETITIVIDAD DEL MÉTODO.....	98
7.5.5	PRECISIÓN INTERMEDIA	99
7.5.6	EXACTITUD.....	99
7.5.6.1	DESVIACIÓN DE LA LINEALIDAD.....	99
7.5.6.2	RECOBROS.....	101
7.5.7	ROBUSTEZ.....	102
7.6	SEGUIMIENTO DE LA DEGRADACIÓN DE CBZ POR CLAR	106
7.6.1	LUZ SOLAR	108
7.6.2	LUZ UV	112
7.7	CUANTIFICACIÓN DE LA CARBAMAZEPINA DEL AGUA RESIDUAL HOSPITALARIA.....	114
7.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	115
7.9	CONSUMO DE CARBAMAZEPINA EN PACIENTES DE HOSPITALIZACIÓN	119
8.	CONCLUSIONES.....	120
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Estructura molecular de la carbamazepina	22
FIGURA 2	Principales metabolitos de la carbamazepina y sus porcentajes en dosis oral	25
FIGURA 3	Vías de metabolismo hepático de la CBZ y oxcarbamazepina	26
FIGURA 4	Cálculo del factor de asimetría o coleo (USP)	47
FIGURA 5	Extracción líquido-líquido	49
FIGURA 6	Etapas para el proceso de extracción por SPE	51
FIGURA 7	Detalle de una fibra montada en un soporte (SPME)	52
FIGURA 8	Metodología general	57
FIGURA 9	Proceso de filtración de la muestra de agua residual	60
FIGURA 10	Proceso de extracción de la muestra de agua residual mediante cartuchos Oasis HLB	61
FIGURA 11	Espectro de luz UV-VIS de estándar y medicamento de CBZ de 4 mg/L en Metanol	90
FIGURA 12	Espectro de IR del estándar de carbamazepina	91
FIGURA 13	Cromatograma de la CBZ (10 mg/L), columna Symmetry C18 5 μ m 3.0 x 250mm Waters y fase móvil metanol: agua (70:30)	94
FIGURA 14	Linealidad de la carbamazepina	95
FIGURA 15	Espectros de luz UV-VIS para la degradación de CBZ por luz solar, seguida por un periodo de 5 días	106
FIGURA 16	Espectros de luz UV-VIS para la degradación de CBZ por luz UV, seguida por un periodo de 5 días	107
FIGURA 17	Cromatograma de la solución blanco (a) y de CBZ tiempo inicial preparada el día 20-08-12, pureza de 99.84% (b)	108
FIGURA 18	Cromatograma de la solución de CBZ de 10 mg/L tras 56 días de exposición a luz solar, pureza 91.22%	109
FIGURA 19	Cinética de degradación de primer orden por luz solar de la carbamazepina. $k= 0.0039 \text{ días}^{-1}$, $t_{1/2}= 194.73 \text{ días}$	110
FIGURA 20	Cromatograma de la solución de CBZ de 10 mg/L tras 43 días de exposición a luz UV, pureza 91.44%	111
FIGURA 21	Cinética de degradación de primer orden por luz UV de la carbamazepina. $k= 0.0026 \text{ días}^{-1}$, $t_{1/2}= 267.56 \text{ días}$	112
FIGURA 22	Cromatograma de Afluente (a) y Efluente (b) de agua residual muestreado el día 20-03-13.	114
FIGURA 23	Valor medio para los dos tipos de fotodegradación, correspondiente a luz solar y luz UV. A un nivel de confianza de 95%	116
FIGURA 24	Representación de caja para luz solar y luz UV contra la variable de respuesta concentración. A un nivel de confianza de 95%.	117

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Grupos terapéuticos de fármacos	19
TABLA 2	Información básica de desinfectantes	22
TABLA 3	Propiedades físicas, químicas y farmacológicas de la carbamazepina.	23
TABLA 4	Ejemplos de toxicidad aguda en algunos organismos de prueba	40
TABLA 5	Condiciones de operación para la extracción en fase sólida (SPE)	62
TABLA 6	Condiciones cromatográficas de operación	63
TABLA 7	Lectura de pH de la solución estándar y el medicamento genérico a 23.5°C ± 0.2.	93
TABLA 8	Parámetros cromatográficos como: tiempo de retención, área, altura, respuesta, número de platos teóricos (N), factor de capacidad (k') y factor de coleo	94
TABLA 9	Relación señal/ruido para DL y QL de CBZ	95
TABLA 10	Verificación de la desviación de la linealidad para la concentración del QL.	97
TABLA 11	Repetitividad del sistema a 1 mg/L	98
TABLA 12	Repetitividad del método con agua residual hospitalaria	99
TABLA 13	Reproducibilidad del método a 1 mg/L	100
TABLA 14	Desviación de la linealidad a concentraciones de 0.25, 0.5 y 1.0 mg/L	101
TABLA 15	Diluciones tomadas de una solución de 100 mg/L y las concentraciones finales para el cálculo de la exactitud del método	102
TABLA 16	% de Recobro a diferentes concentraciones y diferentes muestras de agua residual hospitalaria	103
TABLA 17	Modificaciones al método para la prueba de Robustez	104
TABLA 18	Condiciones originales de operación	104
TABLA 19	Robustez de proporción de fase móvil	105
TABLA 20	Robustez de flujo de fase móvil	106
TABLA 21	Concentraciones promedio encontradas en el afluente y efluente del "Centro Médico Adolfo López Mateos" en mg/L	114
TABLA 22	Datos de ANOVA para el diseño experimental de dos factores	116
TABLA 23	Cantidad administrada de CBZ a pacientes de hospitalización	119

ABREVIATURAS

ARN	Ácido ribonucleico
APCI	Ionización química a presión atmosférica (Atmospheric pressure chemical ionisation)
 d_i 	Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto de la media aritmética del análisis inicial
CBZ-DiOH	trans-10,11-dihidro- 10,11-dihidroxicarbamazepina
CBZ-EP	10,11-dihidro- 10,11-exoxicarbamazepina
CBZ	Carbamazepina
CL-EM	Cromatografía de Líquidos acoplado a Espectrometría de Masas
NDMA	<i>N</i> - nitrosodimetilamina
<i>log de P</i>	Coefficiente de partición octanol-agua
IM	Iminostilbeno
EPA	Environmental Protection Agency
ESI	Ionización por electrospray (Electrospray ionization)
HO	Hemooxidasa
GST	glutación –S-tranferasa
GOT	glutamato oxalacetato transaminasa
GTP	glutamato piruvato transaminasa
<i>D.magna</i>	<i>Daphnia magna</i>
W	Watts
CH	Cavitación Hidrodinámica
CA	Cavitación acústica
YES	Pantalla de estrógeno de levadura (Yeast estrogen screen)
THMs	Trihalometanos
UV	Radiación ultravioleta
CE₅₀	Concentración de tóxico efectiva que afecta el 50% de la población
SPE	Extracción en fase sólida
LLE	Extracción líquido- líquido
SPME	Microextracción en fase sólida

CV	Coeficiente de variación
r²	Coeficiente de determinación
s	Desviación estándar
X	Promedio
s/n	Relación señal/ruido

ABSTRACT

In the last decade due to the emergence of more sensitive analytical techniques has been feasible finding and quantifying different compounds worldwide in water bodies such as drugs and many wastewater treatment plants are not designed to remove these kinds of compounds so effluent treatment plants contribute to the presence of drugs such as carbamazepine in the environment.

In this project an analytical method by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was developed and validated for determination and quantification of carbamazepine in influent and effluent treatment plant from The Medical Center Adolfo Lopez Mateos located in Toluca city, Estado de Mexico, Mexico. This is a tertiary care center and serves patients from all the state.

Method developed is based on the separation of carbamazepine through a chromatographic column Symmetry C18 (5 μm) (3.0 x 250mm) with UV detection at 285 nm using a mobile phase consisting of methanol: water, 70:30 v/v. Calibration curve was performed in concentration range of 2.5 to 10 000 $\mu\text{g/L}$ which resulted linear with a determination coefficient of 0.999. Detection limit was 1 $\mu\text{g/L}$ and 2.5 $\mu\text{g/L}$ for quantification limit. The analytical method was linear, precise, specific and accurate in the range of concentrations studied.

Quantification of CBZ in hospital wastewater was carried out in 11 weekly samples in a period of time April-June 2013. The analyte was extracted with Oasis HLB cartridges, finding recoveries in influent ranging from 80.72-104.30% and in effluent 82.67-114.44%. And for 200 mL wastewater samples, CBZ was detected at concentrations ranging from 3.3 – 55.8 and < 1 - 5.9 ($\mu\text{g/L}$) in hospital influent and effluent wastewater samples respectively.

We investigate the suitability of CBZ photodegradation by natural solar and ultraviolet (UV) light. The irradiation experiments were carried out for 8 months: placing a solution of CBZ 10 mg/L in direct contact with natural periods of solar light and in a dark chamber equipped with two lamps at radiation source of 15-W each one, Hg (254 nm). Photodegradation for both cases showed first-order kinetics. An analysis of variance was made and significant differences between sunlight and UV light were observed with a confidence level of 95%.

RESUMEN

En la última década gracias al surgimiento de técnicas analíticas más sensibles se ha venido encontrando y cuantificando alrededor del mundo en los diferentes cuerpos de agua, diferentes compuestos como fármacos, hormonas y productos de higiene personal, esto debido a que la mayoría de las plantas tratadoras de agua residual no están diseñadas para la eliminación de este tipo de compuestos y por lo tanto contribuyen a la presencia de fármacos como la carbamazepina en los efluentes de las plantas de tratamiento.

En este trabajo se desarrolló y validó un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la determinación y cuantificación de carbamazepina en afluentes y efluentes de la planta de tratamiento del Centro Médico Adolfo López Mateos ubicado en Toluca Estado de México. El cual es un hospital de tercer nivel donde ofrecen 33 especialidades y atienden a pacientes de todo el Estado de México.

El método desarrollado se basó en la separación de la carbamazepina por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) a través de una columna cromatográfica Symmetry C18 (5 μ m) (3.0 x 250mm) Waters con detección UV a una longitud de onda de 285 nm con una fase móvil compuesta por metanol: agua, en proporción 70:30. La curva de calibración se realizó en el intervalo concentraciones de 2.5 a 10 000 μ g/L donde resultó lineal con un coeficiente de determinación igual a 0,999. El límite de detección fue de 1 μ g/L y el de cuantificación de 2.5 μ g/L. El método analítico resultó lineal, preciso, específico y exacto en el intervalo de concentraciones estudiadas.

Para la cuantificación de CBZ en el agua residual del hospital, se realizaron 11 muestreos semanales en el periodo comprendido de abril a junio del 2013. El analito se extrajo y concentró mediante cartuchos Oasis HLB, encontrando recobros de 80.72-104.30% en el afluente y de 82.67-114.44% en el efluente. Hallándose concentraciones de 3.3-55.8 y <LD-5.9 μ g/L en el afluente y efluente respectivamente.

Se realizó la cinética de degradación de una solución de carbamazepina de 10 mg/L expuesta a periodos naturales de luz solar y otra solución a luz UV en una cámara oscura con 2 lámparas de Hg de 15 Watts durante un periodo de 8 meses, Para ambos casos los datos obtenidos se ajustaron a una cinética de primer orden. Se determinó mediante un análisis de varianza que existían diferencias significativas entre la luz solar y la luz UV, de igual forma el tiempo de exposición es un factor que influye en este resultado, con un nivel de confianza de 95%.

1. INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los recursos naturales, fundamentales para el desarrollo humano. Fue hasta finales del siglo XIX que se reconoció al agua como origen de numerosas enfermedades infecciosas (1). Del agua proveniente de lagos, ríos y de corrientes subterráneas, solamente el 0.62% está disponible para consumo del hombre y sus actividades (2).

Últimamente se le ha prestado mucha atención a la identificación, análisis y caracterización del riesgo que genera la presencia de compuestos farmacéuticos en el ambiente. Y en particular en los diferentes tipos de agua (agua superficial, potable y de plantas de tratamiento). Muchos estudios demuestran que las aguas residuales urbanas son las que producen mayor contaminación acuática por los fármacos y sus productos de degradación (3, 4). Ya que los tratamientos convencionales del agua residual no logran eliminar con eficiencia algunos de estos fármacos, lo que conlleva a la presencia de éstos en agua de efluentes de hospitales, industrias y casas (3, 5, 6).

La continua presencia de fármacos de diferente naturaleza en agua residual proveniente de industrias farmacéuticas y de efluentes hospitalarios, nos motiva a continuar trabajando en esta área. Su monitoreo es difícil dada la cantidad tan grande de grupos terapéuticos que existen hoy en día, con diferentes estructuras químicas y propiedades fisicoquímicas.

De aquí surge el interés de determinar y cuantificar la carbamazepina en el agua residual procedente de un hospital. Por lo tanto se validó una metodología para dicho fin por CLAR. Y se determinó la cinética de degradación de la CBZ, bajo luz solar y luz ultravioleta (UV).

El fármaco antiepiléptico carbamazepina (CBZ) es uno de los compuestos que se ha detectado de manera frecuente en el ambiente y por tal motivo se ha considerado como un marcador de contaminación antropogénica.

Por tal motivo, el presente trabajo se encuentra organizado en 9 secciones, en el apartado 2 se encuentran los antecedentes donde se tocan tópicos como propiedades físicas, químicas y farmacológicas de la carbamazepina, remoción de la carbamazepina en las plantas de tratamiento, toxicidad de la carbamazepina etc.

En los apartados 3, 4 y 5 se justifica la investigación, se establece la hipótesis y los objetivos respectivamente. En la sección 6 se describe la metodología seguida para el cumplimiento de los objetivos establecidos, la caracterización de la carbamazepina, el muestreo de agua residual, el pretratamiento de la muestra, la extracción del agua residual, la cuantificación de carbamazepina en el agua residual etc.

En la sección 7 contiene la parte de resultados y discusión como los incluidos en el artículo de investigación generado durante este trabajo, la carta de envío del artículo a la revista Chemosphere, en este artículo se presentan los resultados derivados del desarrollo y validación de la metodología para la determinación de carbamazepina por cromatografía de líquidos y su cinética de degradación. Y finalmente otros resultados no incluidos en el artículo de investigación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Contaminación del agua

El agua que procede de fuentes superficiales (ríos y lagos), es objeto día a día de una severa contaminación, producto de las actividades del hombre; quien al agregar al agua sustancias ajenas a su composición, modifica la calidad de ésta (7).

Las fuentes de contaminación son resultados indirectos de las actividades domésticas, industriales o agrícolas. Ríos y canales son contaminados por los desechos hospitalarios, desechos industriales, detergentes, abonos y pesticidas que son arrastrados de las tierras agrícolas. El efecto en los ríos se traduce en la desaparición de la vegetación natural, disminuyen la cantidad de oxígeno produciendo la muerte de los peces y demás animales acuáticos.

El agua contaminada, se convierte en un vehículo de agentes infecciosos como hongos, virus, bacterias, protozoarios y helmintos, además de sustancias tóxicas como pesticidas, metales pesados y otros compuestos orgánicos, que son perjudiciales para la salud (8, 9).

El agua también se utiliza para irrigar cultivos y para dar a beber a los animales, los cuales a su vez se van a convertir en alimento para los humanos y otros seres vivos, haciendo una cadena alimentaria, de tal manera que si las fuentes utilizadas están contaminadas, también se contaminarán los cultivos, animales terrestres y acuáticos y a los humanos.

2.2 Propiedades fisicoquímicas de fármacos y su actividad farmacológica

Los hábitos de consumo actuales en nuestra sociedad están generando una serie de residuos o microcontaminantes que hace tan solo unos años no habían sido identificados. Entre estas nuevas sustancias aparecen los fármacos y los productos de higiene personal que son un amplio grupo de compuestos químicos utilizados en medicina, veterinaria, prácticas agrícolas, salud humana y cosmetología. Estudios recientes demuestran que los fármacos y productos de higiene personal son altamente persistentes y pueden pasar a través de las plantas de tratamiento de agua residual con poca o sin degradación alguna, convirtiéndolos en importantes fuentes para la contaminación ambiental (9).

Después de su administración, estos medicamentos son absorbidos y metabolizados por el organismo y luego excretados junto con las aguas residuales. Algunas de estas sustancias no son degradadas en las plantas tratadoras y llegan a las aguas superficiales con los vertidos de los efluentes depurados, éste es el caso de la carbamazepina la cual es removida por procesos de ozonización que son técnicas costosas pero es resistente a la cloración y a radiación UV (6).

En la Tabla 1 (10) se muestra la clasificación de fármacos de acuerdo a su grupo terapéutico y su mecanismo de acción:

Tabla 1. Grupos terapéuticos de fármacos

TIPO	MECANISMO/ACCIÓN	EJEMPLOS
Antidepresivos	Aumentan la actividad de ciertos neurotransmisores inhibidores, reduciendo así el funcionamiento de ciertas áreas del cerebro. Producen somnolencia, descenso en la ansiedad y relajación de los músculos.	Benzodiacepinas
Antiinflamatorios y analgésicos	Para combatir el dolor e inhibiendo la síntesis de compuestos involucrados en la respuesta inflamatoria	Paracetamol, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y diclofenaco
Antiepilépticos	Evita el cúmulo excesivo, rápido y repetitivo de impulsos eléctricos, manteniendo normal la actividad cerebral	Carbamazepina
Antineoplásicos	Empleados para el tratamiento del cáncer	Bisulfan, ciclofosfamidias
Antilipemiantes	Usados para bajar los niveles de colesterol en sangre	Fibratos y estatinas
Betabloqueantes	Bloquean los receptores beta que existen en el corazón, consiguiendo disminuir la necesidad de oxígeno del corazón, reducir el ritmo cardíaco, disminuir la fuerza de contracción del corazón, y reducir la contracción de los vasos sanguíneos.	Atenolol, propanolol, metoprolol
Antiulcerosos y antihistamínicos (H ₂)	Contra la acidez de estómago, úlceras y otras alteraciones estomacales	Ranitidina
Antibióticos.	Algunos son bacteriostáticos que impiden el crecimiento de los microorganismos y otros son bactericidas que los destruyen.	Fluoroquinolonas, cloranfenicol, tilosina y trimetoprim sulfonamida, penicilinas.

Generalmente los fármacos son moléculas polares y tienen más de un grupo ionizable. El grado de ionización y sus propiedades dependen del pH de la solución.

Los fármacos están diseñados para ser muy activos e interaccionar con receptores específicos en el hombre y animales, o bien para resultar tóxicos para organismos infecciosos como las bacterias, hongos, parásitos, etc. Aunque hasta la fecha hay pocos estudios sobre los efectos directos de la presencia de estas sustancias en el medio ambiente.

Por ejemplo ciertos problemas en algunas especies de peces que pueden ser debidos a la presencia en las aguas superficiales de medicamentos empleados como agentes antidepresivos. Algunos estudios recientes han reportado la evaluación del riesgo de mayores anomalías congénitas asociadas con el consumo de carbamazepina (11), acumulación de componentes activos de medicamentos antidepresivos en el cerebro, el hígado y los músculos de tres tipos de peces diferentes que vivían en ríos a los que vertían efluentes de plantas tratadoras de aguas residuales (12), alteraciones en el comportamiento y fisiología de los insectos, inhibición o estimulación del crecimiento en plantas acuáticas y algas, y desarrollo de bacterias resistentes, etc (13).

Por otro lado, y aunque a corto plazo parece que no se pueden detectar efectos graves sobre la salud o sobre el ambiente, sí resultan probables: efectos potencialmente acumulativos de los fármacos a mediano o largo plazo pudiendo ocasionar cambios en el medio ambiente o daños en el hombre y en el caso de antibióticos como proliferación de microorganismos resistentes a los mismos (14).

2.3 Formación de subproductos de desinfección en el agua potable

El uso de cloro para la desinfección de agua potable ha eliminado prácticamente la mayoría de enfermedades transmitidas por el agua, que resultan de la ingestión de agua potable. Sin embargo la cloración forma un número de subproductos de desinfección que son motivo de preocupación. Algunos de estos subproductos de la desinfección tienen riesgos de cáncer así como algunos efectos agudos y crónicos para la salud humana. A la fecha estudios toxicológicos y epidemiológicos han caracterizado estos efectos de al menos treinta de estos subproductos en la salud humana y animal.

Desde que se descubrió en 1974 algunos de estos subproductos, se han venido investigando incluyendo a los trihalometanos (THMs), ácidos haloacéticos (HAAs), haloacetoneitrilos y halocetonas.

El cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano, bromoformo, ácidos dicloroacéticos, ácidos tricloroacéticos, tricloroacetoneitrilo, bromatos y cloro ya se han reportado que poseen efectos carcinogénicos para la salud humana, como tumores en hígado, riñón, piel, colon y muerte del embrión. Algunos otros subproductos nitrogenados como la *N*-nitrosodimetilamina (NDMA) pueden fomentar mayor riesgo de cáncer. Si a la desinfección primaria del cloro se le sigue la adición de cloroaminas para una mayor desinfección, es probable que se formen NDMA, y subproductos de la cloración algunos regulados y otros no regulados (15).

La Tabla 2 (14) muestra que el cloro es muy eficaz en la mayoría de los casos y es un desinfectante relativamente barato. Las eficiencias de desinfección se ven afectadas por sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, esta eficiencia del producto se puede determinar mediante la concentración residual del producto desinfectante y el tiempo de contacto del desinfectante en el agua.

Tabla 2. Información básica de desinfectantes .

Característica		Cloro	Cloroamina	Dioxido de cloro	Ozono	Radiación UV
Aplicación		Más común	Común	Ocasional	Común	Uso emergente
Costo		Más bajo	Moderado	Alta	Alta	Extremadamente alto
Eficiencia en desinfección	Bacterias (<i>V. cholera</i> , <i>E. coli</i> , etc)	Excelente	Bueno	Excelente	Excelente	Buena
	Virus (Polio, rota virus,etc)	Excelente	Bueno	Excelente	Excelente	Moderado
	Protozoarios (<i>G. lamblia</i> , <i>C. parvum</i> , <i>E. intestinalis</i> ,etc)	Moderado	Bajo	Buena	Bueno	Excelente
	Endoesporas	Moderado	Bajo	Moderado	Excelente	Moderado
Rebote de organismos		Nulo	Nulo	Nulo	Más probable	Más probable
Límites de residuos libres		4 mg/L	4 mg/L	0.8 mg/L	-	-
Subproductos	Regulados	4 (THMs) y (HAAs)	Trazas de (THMs) y (HAAs)	Cloro	Bromatos	Ninguno
	No regulados	Muchos	Varios Haluros de cianógeno, (NDMA)	Algunos subproductos selectivos de cloro	Compuestos orgánicos biodegradables	Ninguno conocido
Oxidación		Fuerte	Débil	Excelente	Fuerte	Ninguno
Remoción de olor y sabor		Excelente	Buena	Inestable	Moderado	Ninguno
Estabilidad		Estable	Estable		Inestable	Inestable

2.4 Propiedades físicas, químicas y farmacológicas de la carbamazepina

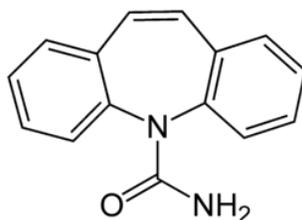


Figura 1. Estructura molecular de la carbamazepina

Tabla 3. Propiedades físicas, químicas y farmacológicas de la carbamazepina.

Formula	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O
No.CAS	298-46-4
Peso Molecular	236.27 g mol ⁻¹
Uso	Analgésico, antiepiléptico
Solubilidad en agua	17.7.mg L ⁻¹ (25°C)
Log P (octanol/agua)	2.45
Constante de la ley de Henry	1.09 x 10 ⁻⁵ Pa m ³ mol ⁻¹ (25°C) 1,08 x 10 ⁻¹⁰ atm m ³ mol ⁻¹ (25°C)
pka	7
Presión de vapor	1,84 x 10 ⁻⁷ mm Hg (25 °C)
Vida media de eliminación	25-65 hrs

En la Tabla 3 (16) se muestran algunas propiedades fisicoquímicas de la carbamazepina. De acuerdo a su valor de solubilidad, tenderá a disolverse principalmente en agua, metanol, etc. También se observa que presenta un bajo potencial para volatilizarse, siendo fácilmente transportado del lugar del vertimiento por una fuerte lluvia, riego o escurrimiento, hasta cuerpos de agua superficial y/o subterránea. Cuando el valor del coeficiente de partición octanol-agua es alto, el medicamento puede fijarse a la materia orgánica, sedimento o biota, valores bajos dan noción de presencia del medicamento en los acuíferos y en aguas superficiales (16). En este caso valores altos de *log de P*, están

considerados como valores de 3.5 a 5 y bajos de 1 a 3. De acuerdo a su estructura química y pKa es un compuesto neutro (ver Figura 1) que hará más fácil su determinación por CLAR.

2.5 Mecanismo de acción de la carbamazepina

Este fármaco es un antiepiléptico de primera generación, que se usa en todo el mundo para tratar epilepsia (crisis parciales simples y complejas y tónico-clónicas generalizadas, pero no ausencias), bulimia, trauma encéfalo-craneano, diabetes insípida central, dolor del miembro fantasma, neuralgias del trigémino y glossofaríngeo, neuropatías periféricas, detoxificación por consumo de estimulantes y alcoholismo (16). Ha sido usada por casi 40 años.

La carbamazepina es un fármaco que ha demostrado propiedades anticonvulsionantes en ratas y ratones inducidos química y eléctricamente con convulsiones. Parece que actúa reduciendo la respuesta poli sináptica y bloqueando la potenciación posttetánica. La carbamazepina no está relacionada químicamente con otros anticonvulsionantes u otros fármacos usados para el dolor del trigémino. Han sido propuestos muchos mecanismos de acción donde la evidencia experimental apoya la disminución en la habilidad de las neuronas para disparar a alta frecuencia mejorando la inactivación del canal de sodio. Sin embargo la carbamazepina ha demostrado también ser antagonista de receptores A1 adenosina, es poco probable que las acciones en los receptores de adenosina sean responsables de las propiedades anticonvulsionantes de la carbamazepina. Los receptores agonistas de adenosina son los que poseen las propiedades anticonvulsionantes no los antagonistas.

El principal metabolito de la carbamazepina el 10,11-epóxido (CBZ-EP), tiene también propiedades anticonvulsionantes demostrando su eficiencia produciendo limitados disparos repetitivos de alta frecuencia a concentraciones comparables a los de carbamazepina. Sin embargo un metabolito inactivo de la carbamazepina,

el diol (CBZ-DiOH), no afecta los disparos repetitivos de alta frecuencia hasta concentraciones de un orden mayor que aquellos efectivos para carbamazepina (17).

2.6 Metabolitos de la carbamazepina

Después de la administración algunos fármacos no son completamente metabolizados. Parte del fármaco y algunos metabolitos que son metabolizados son subsecuentemente excretados del cuerpo vía urinaria y fecal. En lugares con sistemas de drenaje, estos desechos farmacéuticos entran a las plantas tratadoras de aguas residuales. Aproximadamente el 72% de la carbamazepina administrada por vía oral es absorbida, mientras que el 28% es descargado sin cambios a través de las heces (16).

La carbamazepina es metabolizada principalmente en hígado, dando como resultado la formación de varios metabolitos principalmente 10,11-dihidro- 10,11-epoxicarbamazepina (CBZ-epóxido) y trans-10,11-dihidro- 10,11-dihidroxicarbamazepina (CBZ-diol). Solo aproximadamente el 1% de la dosis de la carbamazepina se excreta de forma inalterada. Al menos se han identificado 30 diferentes metabolitos. Se han descrito tres diferentes vías principales para su metabolismo (18). La Figura 2 muestra los porcentajes de distribución en heces y orina de la carbamazepina y sus metabolitos (4).

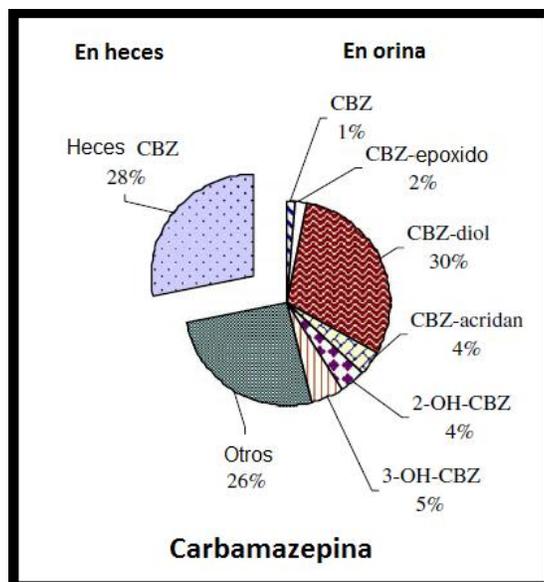


Figura 2. Principales metabolitos de la carbamazepina y sus porcentajes en dosis oral.

Se han descrito tres rutas principales para el metabolismo de la carbamazepina (Figura 3). La ruta principal es la formación de carbamazepina-10,11-epoxido que es un compuesto activo con propiedades anticonvulsionantes. La segunda ruta concierne a la producción de compuestos hidroxilados. y la tercera ruta minoritaria conduce a la formación de iminostilbeno (IM) (4).

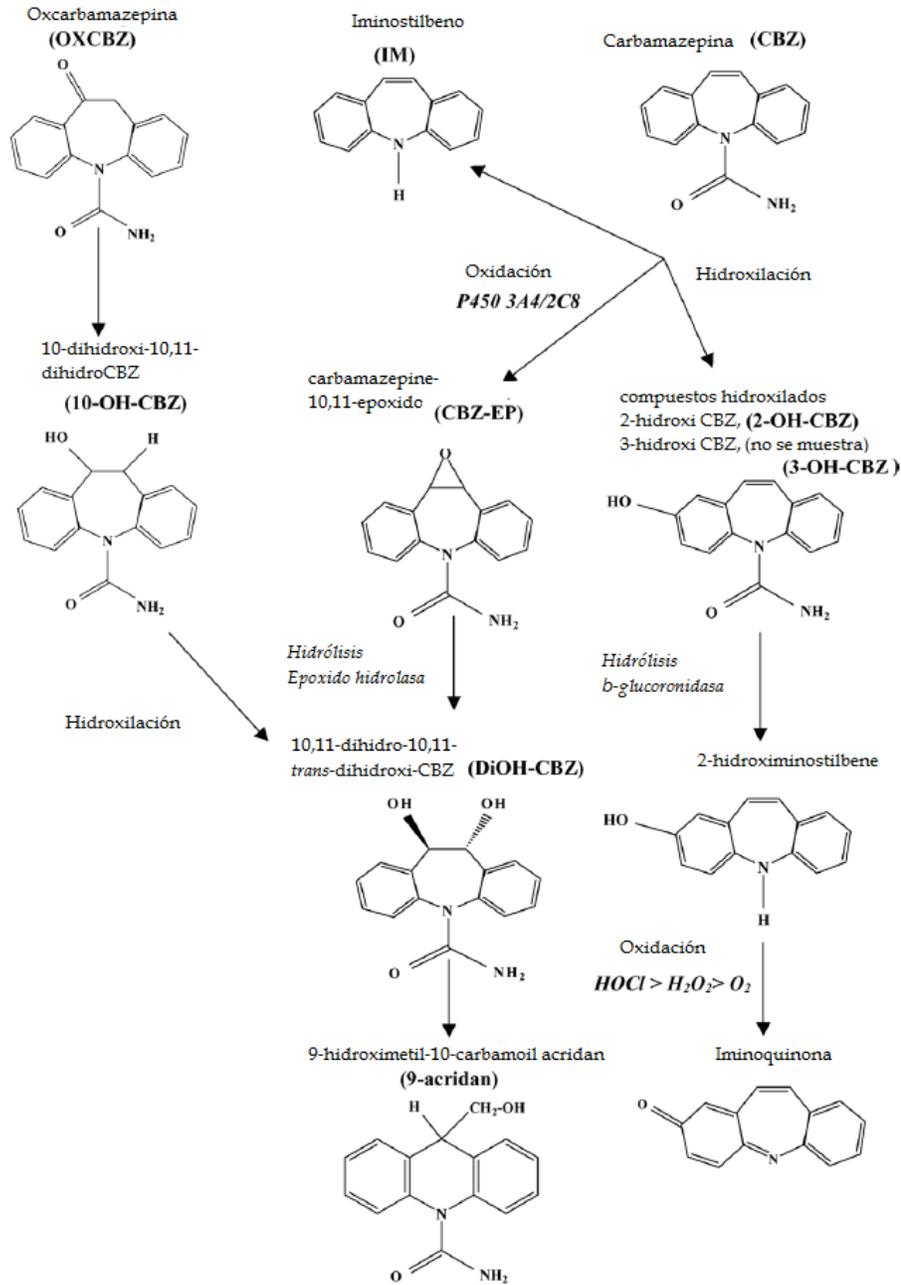


Figura 3. Vías de metabolismo hepático de la CBZ y oxcarbamazepina

Aunque el hígado es el órgano de mayor metabolismo de fármacos, los leucocitos son las células de mayor cantidad en el organismo humano, involucradas en la inducción de respuestas inmunes. Dentro de los leucocitos la carbamazepina, es convertida por la mieloperoxidasa en una serie de metabolitos principalmente en un aldehído intermedio 9-carboxialdehído acridina, acridina y acridona. Por lo tanto Breton y colaboradores (4), diseñaron un método por CL-EM para la detección y cuantificación de carbamazepina y ocho de sus principales metabolitos en plasma humano para el monitoreo continuo en pacientes tratados con este fármaco y estudiar la posible relación entre los metabolitos reactivos y la aparición de reacciones idiosincráticas.

2.7 Remoción de la carbamazepina en las plantas tratadoras de aguas residuales

La mayoría de las plantas tratadoras utilizan procesos de lodos activados donde se aplican microorganismos para mineralizar los contaminantes en agua y dióxido de carbono o degradarlos. Los contaminantes pueden ser también removidos del agua por extracción con aire o por absorción en lodos que son descargados regularmente. Algunas sustancias pueden estar sujetas a la fototransformación. Por lo tanto la eliminación de residuos farmacéuticos en los procesos de lodos activados incluye cuatro mecanismos: biotransformación, extracción con aire, sorción y fototransformación. Sin embargo se ha encontrado que un coeficiente de Henry mayor a 3×10^{-3} es necesario para la extracción significativa en un bioreactor con aireación de burbujas finas (16). De acuerdo al valor que se encuentra en la Tabla 3 para la carbamazepina de $1.09 \times 10^{-5} \text{Pa m}^3 / \text{mol}$ (25°C) este proceso de aireación de burbujas finas no es del todo eficiente para su remoción (16).

En varios estudios se ha encontrado que la carbamazepina es persistente y sus eficiencias de remoción se encuentran menores a 10%, la más alta encontrada fue de 53% por Paxéus en el 2004 (16). Esta baja remoción de la carbamazepina

puede ser explicada con base a sus propiedades. Primero resulta que es resistente a la biodegradación a bajas concentraciones. Smartelatou et al, (2003) (16) realizaron un experimento de biodegradabilidad de la carbamazepina en acetato de sodio en un cultivo de lodos activados en agua de mar y agua dulce. No observaron biodegradación en ambas aguas a una concentración de 0.5 mg/L. La segunda es que difícilmente se une a los lodos, su coeficiente de distribución entre agua y el lodo secundario (K_d) es de 1.2 L/kg, el cual está muy lejano al que realmente se necesita para que haya una absorción en el lodo significativa (500 L/kg).

La remoción de compuestos orgánicos depende de varias propiedades fisicoquímicas de la sustancia específica. Especialmente la absorción de compuestos orgánicos en el lodo juega un papel importante. Esta absorción puede predecirse por el coeficiente de partición octanol-agua ($\log P$), para la carbamazepina su $\log P$ es de 2.45, lo cual indica un bajo potencial de absorción en el lodo (19).

2.8 Procesos de oxidación avanzada para la degradación de carbamazepina

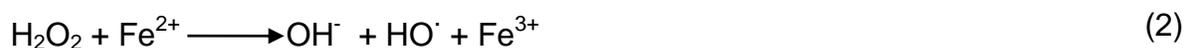
Debido a su amplia utilización de la carbamazepina en la vida diaria, el compuesto original y algunos de sus metabolitos posteriormente se liberan a las plantas de tratamiento de aguas residuales, donde como ya se ha mencionado que el tipo de tratamiento de éstas ha resultado ser completamente ineficiente en la mayoría de los casos es menor a un 10% de remoción (16).

La degradación de la carbamazepina se ha convertido en un tema de preocupación debido a que no se elimina mediante tratamientos convencionales biológicos y de biorreactores con membrana de las plantas tratamientos (< 10%). Procesos fisicoquímicos como la coagulación-floculación y flotación no dan buenos resultados en cuanto a eliminación (20-35 %). Por otra parte, los procesos de oxidación avanzada como la ozonización, la degradación fotolítica por UV-

H₂O₂, degradación fotocatalítica con TiO₂ dan altos porcentajes de degradación (>90%). Pero la principal limitante es la formación de productos no deseables y en algunos casos tóxicos (20).

Por lo tanto se requieren tecnologías de tratamiento avanzadas para eliminar a la carbamazepina y otros compuestos persistentes y tóxicos para el ambiente acuático. El tratamiento ultrasónico es considerado un proceso de tratamiento de oxidación avanzada que genera radicales hidroxilo a través de cavitaciones acústicas. La destrucción de compuestos químicos usualmente se logra por una combinación de reacciones pirrolicas que ocurren dentro o cerca de una burbuja y reacciones de radicales hidroxilo que ocurren en la mayoría del líquido.

Otro tipo de oxidación, ocurre con el reactivo de Fenton, que en la presencia de metales ferrosos o iones férricos con peróxido de hidrógeno a través de una reacción en cadena de radicales libres que produce radicales hidroxilo. Las sustancias orgánicas se eliminan durante dos estados de oxidación y coagulación, ver ecuaciones (1 – 2).



En un estudio llevado a cabo en el 2013 (21) en agua proveniente de una planta de tratamiento de una comunidad en Quebec, Canadá. Dicha planta tratadora tiene una capacidad de 400, 000 m³ por día, a agua recolectada antes de la aplicación del tratamiento con luz UV, se le aplicó un proceso de ultrasonicación, oxidación Fenton y ferro- sonicación (combinación de ambos) donde la oxidación Fenton fue el proceso con mejor remoción de la carbamazepina (84 a 100 %) observándose la mayor demanda química de oxígeno soluble y carbono orgánico soluble. Se identificaron los productos de degradación provenientes de los

diferentes procesos aplicados al agua residual, mediante Espectrometría de Masas hallándose en los tres casos epoxicarbamazepina e hidroxycarbamazepina con una m/z de 251.1 y 253.1 respectivamente.

Otro proceso de oxidación avanzada para la degradación de carbamazepina y otros compuestos farmacéuticos que se ha estudiado recientemente es la Cavitación Acústica Hidrodinámica la cual ha demostrado un efecto sinérgico alto, la Cavitación es capaz de generar in situ radicales altamente reactivos en soluciones acuosas, que pueden actuar como oxidantes para varios contaminantes. Por consiguiente se forman burbujas llenas de vapor o gas, las cuales crecen y subsecuentemente colapsan. En la fase colapsada se genera una alta temperatura (hasta 5000 °K) después de la compresión rápida de los gases o vapores dentro de la burbuja. Así una incisión homolítica puede ocurrir, resultando en la formación de radicales hidroxilos y perhidroxilos reactivos que son capaces de oxidar a los contaminantes en sistemas acuáticos. El proceso de Cavitación puede iniciarse tanto por efectos acústicos (ultrasonido) o por la utilización fenómenos hidrodinámicos. Ambas técnicas tienen ventajas y desventajas, concernientes al escalamiento como eficiencia energética, temperatura de colapso y densidad de burbuja. El proceso de cavitación más frecuente es la generada por transductores ultrasónicos (cavitación acústica CA), pero presenta problemas de requerimiento de energía y de escalamiento. Una técnica alternativa es la cavitación hidrodinámica (CH), donde las burbujas se crean debido a la presión de gota causada por el incremento de la velocidad del fluido o por la separación de la capa límite. Esta tecnología provee mejores posibilidades de escalamiento, altas densidades de burbuja y un menor costo de inversión. La eficiencia energética para ambos métodos que genera el proceso de cavitación es muy diferente. La intensidad de colapso (temperatura y presión en el colapso), para la CH es menor en comparación con la CA. En este estudio en Berlin, Alemania realizaron una combinación de ambas técnicas en un sistema de reactor (Cavitación Acústica Hidrodinámica), al tener las ventajas de ambas técnicas se logró un sinergismo resultando un 96% de degradación de la carbamazepina en solo 15 minutos con condiciones óptimas (22).

2.9 Fototransformación de la carbamazepina

Debido a que la luz solar visible se encuentra de 400-750 nm, difícilmente causa reacciones fotoquímicas, mientras que la radiación UV-B que va de 280-315 nm y la radiación UV-A (315-400 nm) induce varios procesos fotoquímicos directos e indirectos en el nivel superior de aguas superficiales, que puede conducir a una degradación de microcontaminantes antropogénicos (20).

La carbamazepina puede ser fotolizada bajo irradiación de luz solar pero solamente a una velocidad relativamente baja. En un estudio de Andreozzi y colaboradores en el 2003, (16) determinó la vida media de la carbamazepina resultando de 100 días, en agua doblemente destilada por tanto se concluyó que la fotodegradación de la carbamazepina no es significativa por este medio.

Está comprobado que la materia orgánica natural juega un papel importante en el proceso fotoquímico que induce la luz solar en las aguas superficiales. Esta materia orgánica puede actuar como un filtro interior, como eliminador de radicales y como precursor de especies reactivas.

El humus es la sustancia compuesta por ciertos productos orgánicos de naturaleza coloidal, que proviene de la descomposición de los restos orgánicos por organismos y microorganismos benéficos (hongos y bacterias). Se caracteriza por su color negro debido a la gran cantidad de carbono que contiene. Se encuentra principalmente en las partes altas de los suelos con actividad orgánica. Los elementos orgánicos que componen el humus son muy estables, es decir, su grado de descomposición es tan elevado que ya no se descomponen más y no sufren transformaciones considerables.

Una característica importante de los compuestos húmicos radica en su habilidad para iniciar transformaciones fotoquímicas de compuestos orgánicos en aguas naturales y su consiguiente degradación. Los compuestos orgánicos naturales después de ser activados por fotones solares pueden producir especies reactivas

de oxígeno, radicales hidroxilo entre otros. Estas especies reactivas son capaces de degradar compuestos orgánicos antropogénicos (20).

Sin embargo los ácidos húmicos actúan como filtros interiores para la carbamazepina y diclofenaco disminuyendo su fototransformación pero también actúan como fotosensibilizadores para sulfametoxazol, ácido clofíbrico, oflaxocin y propanolol, mejorando su fototransformación (16). Para el caso de la carbamazepina una posible explicación en la disminución del tiempo de vida media con la presencia de compuestos húmicos es que tanto la carbamazepina como los compuestos húmicos absorben radiación ultravioleta en el mismo rango, por lo tanto parte de la radiación emitida por la luz solar la absorben los compuestos húmicos y la restante la carbamazepina disminuyendo así su tiempo de vida media de eliminación (11).

Algunos estudios más recientes han hecho experimentos con tratamientos UV/H₂O₂, indicando que la adición de H₂O₂ durante el tratamiento con UV resulta altamente efectivo para mejorar la degradación de compuestos farmacéuticos y productos de cuidado personal (3, 14).

Doll et al., 2003 (20) estudiaron la degradación mediante un simulador con irradiación solar y UV de varios compuestos como el ácido clofíbrico, la carbamazepina y el iomeprol en agua deionizada (Milli Q), con lámpara de Xenon de 1000 W de arco corto. La carbamazepina mostró la absorción más fuerte de la irradiación que llega con el simulador, comparado con los otros dos fármacos estudiados, sin embargo mostró la menor constante de degradación. Se vio que existía una degradación más rápida en presencia de materia orgánica natural. Este tipo de reacciones puede ocurrir vía especies reactivas formadas por la irradiación de la materia orgánica natural como el anión superóxido, peróxido de hidrogeno, electrones solvatados (electrones libres en una disolución), etc. También es razonable asumir reacciones directas de la materia orgánica natural con la carbamazepina por una transferencia de electrones o transferencia de energía.

2.10 Cinética de degradación y vida media

La base del análisis cinético de una reacción química se encuentra en el hecho experimental de que la evolución entre el estado de reactantes y el de los productos tiene lugar en un periodo durante el que se aprecie un cambio en los valores de las concentraciones. Sobre la base de este cambio, la Cinética química introduce el concepto de velocidad de reacción y trata de encontrar la ecuación de velocidad del proceso como una función matemática que posibilita predecir la evolución de las concentraciones. El fundamento teórico de la cinética está en la “Ley de acción de masas” que establece:

“La velocidad a la cual sucede una reacción es directamente proporcional al producto de las concentraciones de reaccionantes que intervienen en el paso determinante de la reacción, elevadas cada una de ellas a una potencia igual al número de moléculas que intervienen en dicha reacción” (ver ecuación 3).

O sea que:

$$V = K(R)^n \dots\dots\dots(3)$$

Dónde:

V= velocidad de reacción

K= contante de velocidad

(R)= concentración de los reaccionantes

n= No. de moléculas que intervienen en dicha reacción

Orden de reacción

Reacciones de orden cero

Este tipo de reacciones la velocidad de reacción es independiente de la concentración de la sustancia o del fármaco que puede descomponerse al pasar el tiempo, por lo que en la ecuación 4 se describe la constante de velocidad de reacción en su forma diferencial:

$$-\frac{dC}{dt} = k \dots\dots\dots(4)$$

Dónde:

k = constante de velocidad de la reacción

Reacciones de orden uno

Es cuando la reacción depende de la concentración de un solo reactante, que se descompone en uno o más productos la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración del compuesto.

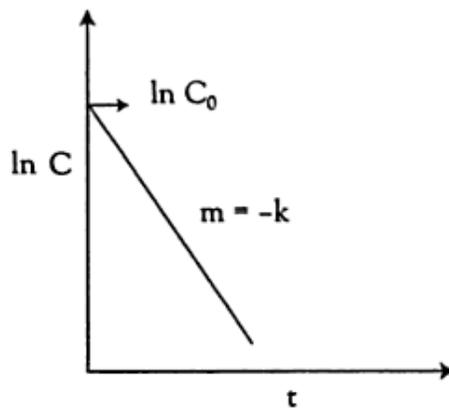
La ecuación 5 en su forma diferencial define el proceso siguiente:

$$\frac{dC}{dt} = -kC \dots\dots\dots(5)$$

Resolviendo la ecuación diferencial se obtiene la ecuación 6 en su forma lineal:

$$\ln C = -kt + \ln C_0 \quad \dots\dots\dots(6)$$

Donde graficamos logaritmo natural de la concentración (ln C) en el eje de las Y contra el tiempo en el eje de las X. La ordenada al origen resulta ser ln C₀ (concentración inicial) y la pendiente es la constante de velocidad en su forma negativa.



El **tiempo de vida media (t_{1/2})**, es el tiempo que transcurre para que se elimine o degrade la mitad de la concentración del fármaco inicial.

Partiendo de la ecuación 7 en su forma lineal:

$$\ln C = -kt + \ln C_0 \quad \dots\dots\dots(7)$$

Y sabiendo que si

$$t = t_{1/2} \rightarrow C = C_0 / 2$$

Se obtiene la vida media para reacciones de orden uno, ver ecuación 8.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K} \rightarrow t_{1/2} = \frac{0.693}{K} \dots\dots\dots (8)$$

Dónde:

$t_{1/2}$ es independiente de las concentraciones iniciales.

2.11 Toxicidad de la carbamazepina

Tanto diazepam como carbamazepina han sido clasificados como sustancias potencialmente peligrosas para el medio acuático, debido a que la mayoría de las especies estudiadas muestran efectos agudos a concentraciones por debajo de los 100 mg/L. Para ambos compuestos es la *D. magna* el organismo más afectado, situándose los valores de toxicidad aguda a concentraciones de 17.2 mg/L (10).

Se ha visto que la carbamazepina no es mutagénico en células de mamífero pero se considera carcinogénico en ratas, además, resulta letal para el pez cebrá a concentraciones de 43 µg/L (10).

En Berlin Conardo-Jara y colaboradores (23) estudiaron carbamazepina, ibuprofeno y bezafibrato debido a su potencial bioacumulativo que presentan estos fármacos y que provocan cambios moleculares en el organismo de prueba *Dreissena polymorpha* (mejillones). Se evaluaron cambios en el ARN mensajero de enzimas y algunas proteínas involucradas en la prevención de daño a proteínas como la proteína de choque térmico 70, (Hsp 70) y el estrés oxidativo (superóxido dismutasa, catalasa y metalotioneína), glutatión S-transferasa clase pi, receptor de aril hidrocarburos, entre otras proteínas que sirvieron como biomarcadores moleculares. Los mejillones fueron expuestos en un sistema de flujo para

aumentar las concentraciones de los tres fármacos (1, 10, 100 y 1000 nM). Se midieron las concentraciones de tejido después de 1, 4 y 7 días, evidenciándose la captación de carbamazepina e ibuprofeno por los mejillones. Se encontró que el factor de bioconcentración más alto en los mejillones fue debido a la concentración más baja de carbamazepina e ibuprofeno, con 90 y 460 veces mayor concentración de tejido respectivamente después de siete días. De los tres compuestos estudiados la carbamazepina fue el único en causar incremento significativo en el nivel de ARN mensajero de la proteína Hsp 70 en branquias en tan solo un día de exposición, evidenciando el potencial de la carbamazepina para inmediatamente provocar condiciones de estrés y causar daño en proteínas de branquias (23).

La función básica de estas proteínas, como chaperonas moleculares dependientes de ATP, incrementa la sobrevivencia celular bajo cualquier tipo de estrés. La función chaperona es natural para la estructura de las proteínas de la familia Hsp70, las cuales tienen un dominio C-terminal que une proteínas no-plegadas y péptidos y adicionalmente tiene un N-terminal con actividad ATPasa que controla la apertura y cierre del surco de unión al péptido. Su papel inmuno estimulante podría antagonizar con su actividad protectora contra la muerte celular inducida por estrés o agentes citotóxicos (24).

Se ha demostrado que la carbamazepina es teratogénica. En un estudio prospectivo de 1255 casos de exposición a carbamazepina durante el embarazo reflejan un aumento en el índice de anormalidades congénitas, principalmente defectos de tubo neural, anormalidades cardiovasculares y del tracto urinario, labio paladar hendido, además de un patrón de anomalías congénitas menores y retraso en el desarrollo. Y una disminución en la edad gestacional del feto (25).

En células como los eritrocitos se han presentados daños provocados por la carbamazepina. Suwalsky y colaboradores en el 2006 (26), realizaron un estudio sobre el daño a la membrana del eritrocito humano. La microscopia electrónica de barrido muestra que en los eritrocitos incubados con 50 μ M de carbamazepina

sufrieron alteraciones morfológicas cambiando su forma discoide a equinocitos y en menor medida a estomatocitos. Los equinocitos suelen presentarse cuando el compuesto añadido se adhiere a la monocapa exterior, mientras que los estomatocitos se observan cuando el compuesto se acumula en la monocapa interna. Estos hallazgos indican que el nivel de citotoxicidad en la membrana de la célula es significativo

En la Universidad de Québec en Canadá (27), estudiaron la bioacumulación de carbamazepina a una concentración de 150 µg/L, a través de una cadena trófica acuática compuesta del alga verde *Pseudokirchneriella subcapita*, el crustáceo *Thamnocephalus platyurus* el cnidaria *Hydra attenuata*. La bioacumulación se evaluó mediante Cromatografía de Líquidos acoplado a Espectrometría de masas dando factores de bioacumulación de 2.2 y 12.6 respectivamente en el alga y en el crustáceo. (se dice que si su factor de bioacumulación es mayor a 5 es altamente acumulable). No se encontró bioacumulación significativa para *H. attenuata*. En *T. platyurus* se observó una fuerte estimulación de la enzima Hemo oxidasa (HO) (76%) y la actividad de la glutatión -S-transferasa (130%) pero una drástica inhibición de la actividad citocromo P450 3A, lo cual sugiere una alteración en la actividad de la enzima causada por la carbamazepina, Sin embargo para *H. attenuata* se observó un incremento en la actividad del citocromo P450 3A, mientras que la actividad de la GST se inhibió.

Repetto en el 2003 (28) estudió la ecotoxicidad de la carbamazepina mediante seis modelos biológicos evaluados a diferentes periodos de tiempo de exposición. Se incluyó la inmovilización de *Daphnia magna*, la inhibición de la bioluminiscencia en la bacteria *Vibrio fischeri*, inhibición del crecimiento del alga *Chlorella vulgaris* y la inducción de micronúcleos e inhibición del crecimiento radicular de la planta *Allium cepa*. La morfología celular, la captación de rojo neutro, el contenido de proteínas totales, metabolismo MTS (ensayo de medida de la actividad metabólica celular), desaparición de la enzima lactato deshidrogenasa y la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa fueron estudiadas en la línea celular de pescado salmónido RTG-2. Para la línea celular Vero de riñón de mono se

investigó la morfología celular, la captación de rojo neutro y el metabolismo MTS. El sistema más sensible para la carbamazepina fue la línea celular Vero, seguida de *Chlorella vulgaris*, *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Allium cepa* y RTG-2. La concentración efectiva 50 (CE₅₀) fue de 19 µM en células Vero en 72 hr. Comparando la concentración en agua y la cantidad cuantificada en este ensayo se concluye que la carbamazepina no produce efectos tóxicos en organismos acuáticos bajo estas circunstancias pero efectos crónicos y sinergismos con otros compuestos químicos no pueden ser excluidos.

Varios estudios han reportado diferentes toxicidades agudas de la CBZ en diferentes organismos de prueba, en todos los casos se ha visto que es menor a 100 mg/L la concentración necesaria para producir efectos. En la Tabla 4 se muestran los siguientes resultados (12):

Tabla 4. Ejemplos de toxicidad aguda en algunos organismos de prueba

Organismo de prueba	Toxicidad aguda
<i>Cyprinus carpio</i>	59.70 mg/L
<i>Daphnia magna</i>	17.2 mg/L
<i>Danio rerio</i>	43.0 µg/L
<i>Aedes albopictus</i> (Mosquito)	34.4 mg/L
<i>Vibrio fischeri</i>	52.5 mg/L

Los vertebrados acuáticos particularmente los peces al parecer tienen enzimas y sistemas de receptores similares a los sistemas de mamíferos. Los peces reaccionan a los compuestos tóxicos que están en el ambiente, cambiando y adaptando sus funciones metabólicas. Cambios en las actividades enzimáticas de los organismos acuáticos son extensamente usados para demostrar el daño tisular y también para diagnóstico de enfermedades en peces. Las enzimas biomarcadoras glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) y la glutamato piruvato

transaminasa (GPT), usualmente se presentan dentro de las membranas de la célula, citoplasma y mitocondria. La acumulación de sustancias toxicas en estas células puede conducir a un daño o desintegración de la célula, liberando a estas enzimas dentro de la circulación sanguínea. Y como resultado puede ocurrir un aumento dramático en el suero sanguíneo de las transaminasas durante las condiciones de estrés. La elevación de la actividad de GOT puede indicar daño tisular especialmente del músculo cardiaco, así como una mayor actividad de GTP indica daño en células hepáticas. La elevación de actividad de transaminasas indica un daño en hígado, riñón y branquias.

En este estudio el aumento significativo de la actividad GOT y GPT en branquias, hígado y músculo, durante la exposición a la concentración aguda y subaguda indica que el daño de los órganos trata de mitigar el estrés inducido por la CBZ, incrementando la tasa de metabolismo. Finalmente el estudio concluye que la CBZ induce alteraciones en la actividad enzimática *C. carpio*, a concentraciones agudas y subagudas (12).

En el 2013 Donner y colaboradores (29) presentan un estudio de ecotoxicidad no solo de la carbamazepina, sino de dos de sus principales y más tóxicos fotoproductos de degradación a partir de luz UV, acridina y acridona. Donde se comparó la ecotoxicidad de la solución de carbamazepina inicial contra la solución obtenida durante la irradiación con luz UV que contenía los fotoproductos y otros productos no identificados. Estas soluciones se sometieron al estudio de ecotoxicidad donde los organismos de prueba de diferentes niveles tróficos y sus correspondientes efectos a observar fueron:

- Inhibición de la bioluminiscencia en la bacteria marina *Vibrio fischeri* (Biotox kit de prueba; ISO 11348-3, 1998)
- Inhibición en el crecimiento del alga verde *Pseudokirchneriella sudcapitata* (ISO 8692, 2004)
- Inmovilización del crustáceo *D.magna* (ISO 6341, 1996)

Los resultados que se obtuvieron fueron que la solución inicial de CBZ resultó ser significativamente menos tóxica que la que contenía los fotoproductos. De igual forma determinaron que la acridona es menos tóxica que la acridina.

2.12 Metodologías analíticas

El análisis químico de residuos farmacéuticos en el ambiente está vinculado con las capacidades analíticas. El desarrollo de equipos más sensibles y versátiles ha sido útil para la detección de niveles muy bajos de analitos en la contaminación del ambiente y es una herramienta que asegura su identificación más precisa.

Desde hace algunos años estudios en matrices complejas como agua residual, se han realizado en cromatografía de líquidos de alta resolución por su capacidad de lograr una separación de la muestra, mediante el uso de estándares para identificar los compuestos de interés, aunque si quedaba la incertidumbre de se identificara otro compuesto con igual tiempo de elución que el buscado, con tiempos de análisis relativamente más largos que los obtenidos con cromatografía de líquidos acoplado a espectrofotometría de masas. Pero aún con esta desventaja que es posible solucionar con otro tipo de análisis. Es de mayor accesibilidad y menor costo realizar análisis con cromatografía de líquidos de alta resolución que con cromatografía de líquidos acoplado a espectrofotometría masas. A demás de que la cromatografía de líquidos de alta resolución presenta ventajas como: separación de una amplia variedad de compuestos de distintas matrices con resultados reproducibles y exactos, altos recobros del analito de interés, manejo fácil de la técnica analítica, es altamente sensible, entre otros.

En la actualidad este tipo de estudios se realiza por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas, cuando se tiene acceso a este equipo. Las ventajas son: proporciona una insuperable especificidad en la determinación del peso molecular debido a la posibilidad de medir exactamente su masa molecular así como obtener información a partir de los fragmentos iónicos de un analito. Su sensibilidad es muy elevada. Se ha demostrado la detección de moléculas en

cantidades de ng/L. Es muy versátil, ya que permite determinar la estructura de tipos de compuestos muy diversos. Es aplicable a los elementos y a todo tipo de muestras, volátiles, no volátiles, polares y apolares, sólidos, líquidos y gases. En combinación con técnicas de separación de alta resolución, es la más cualificada para analizar muestras complejas reales (30). Las desventajas de la espectrometría de masas es una técnica destructiva, es necesario un alto vacío (10^{-6} torr), tiene una dificultad operativa mayor y es más caro que un cromatógrafo de líquidos. La cromatografía de líquidos es una adecuada técnica analítica para la separación y cuantificación de fármacos en este caso para la carbamazepina.

En la literatura existen metodologías para la cuantificación de carbamazepina en diferentes matrices como agua residual, plasma, etc. Para este fin existen varias técnicas analíticas empleadas, como cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), Cromatografía de Líquidos acoplado a Espectrometría de Masas (CL-EM) y Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM).

Para el caso de reportes con el uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución se encuentra un estudio de Costa y colaboradores realizado en la Universidad de San Paulo Brasil (31), desarrollaron un método por CLAR para el monitoreo terapéutico de carbamazepina, carbamazepina -10,11-epoxido, fenitoina y fenobarbital en muestras de plasma. En Arabia Saudita (32) desarrollaron un método analítico por CLAR para la cuantificación de carbamazepina en plasma de conejo con recobros de 98.37 – 100.45 %.

2.13 Validación

Al desarrollar un nuevo método analítico hay que tomar en cuenta que debe estar bien documentado y cumplir con lo que las diferentes instituciones establezcan para que el método analítico sea científicamente adecuado de acuerdo con los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Para esto existen diferentes autoridades regulatorias Europa, EUA y Japón, como la ICH (International Conference on Harmonization) (38), que establece guías para validación de métodos analíticos, originalmente existían dos documentos, Q2A y Q2B. Recientemente estas guías fueron revisadas y combinadas en un solo documento, Q2 (R1).

Es importante definir los términos usados en guías regulatorias cuando se habla de validación de métodos analíticos. (ICH Q2 (R1)).

Exactitud: “La exactitud de un procedimiento analítico expresa la cercanía de la aceptación entre el valor que es aceptable como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado.” La exactitud del método es la concordancia entre la diferencia en la concentración medida del analito de muestras adicionadas y no adicionadas...., el procedimiento de la adición es llamado spiking”. Esto se refiere a que la muestra a analizar contiene cierta cantidad de analito X, a esta misma muestra se le adiciona una cantidad conocida del mismo analito X. Para evaluar la exactitud se debe recobrar la misma cantidad $\pm 20\%$ del analito X.

Precisión: “La precisión de un procedimiento analítico expresa la cercanía de la aceptación entre una serie de mediciones de un múltiple muestreo de una misma muestra homogénea bajo condiciones prescritas. La precisión debe ser considerada a tres niveles: repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad.”

Repetitividad: “La repetitividad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo.”

Precisión Intermedia: “La precisión intermedia expresa las variaciones dentro de laboratorios: diferentes días, diferentes analistas, diferente equipo, etc”.

Reproducibilidad: “La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios”.

Especificidad: “La especificidad es la habilidad de asegurar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se espera que estén presentes”.

Límite de detección: “El límite de detección de un procedimiento analítico individual es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto”.

Límite de cuantificación: “El límite de cuantificación de un procedimiento analítico individual, es la mínima cantidad de un analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud”.

Linealidad: “La linealidad de un procedimiento analítico es la habilidad (dentro de un rango), de obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra”.

Rango: “El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre la concentración mayor y la menor del analito en la muestra, para las cuales el procedimiento analítico ha demostrado ser preciso, exacto y lineal”.

Robustez: “La robustez de un procedimiento analítico es la medición de su capacidad de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en parámetros del método y provee un indicador de su confiabilidad durante el uso normal”.

Para poder evaluar que columna cromatográfica era más adecuada para el método, se tomaron en consideración algunos parámetros cromatográficos como:

Factor de Capacidad

Es un parámetro (k') que se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna. Para una especie A, el factor de capacidad k' se define en términos experimentales como se describe en la ecuación (9):

$$k'_A = \frac{(t_R)_A - t_M}{t_M} \dots\dots\dots(9)$$

Dónde:

$(t_R)_A$ = tiempo de retención del componente A

t_M = tiempo muerto obtenido para una especie no retenida.

Eficiencia de una Columna.

Como se dijo anteriormente, si no se toma en cuenta los factores que afectan el ancho de un pico para la separación cromatografía no se podría lograr una buena separación aun cuando se tenga un factor de selectividad alto para estos picos en una columna particular. Es decir que mientras mayor es la capacidad de la columna de producir picos más estrechos mayor es su eficiencia.

La anchura de una banda aumenta a medida que se mueve a través de la columna, debido a que cuanto más tiempo transcurre mayor es la dispersión que puede tener lugar. Por ello la anchura de la zona está relacionada directamente con el tiempo de residencia en la columna, e inversamente con la velocidad a la que fluye la fase móvil. Se utilizan dos términos afines con frecuencia como

medida cuantitativa de la eficacia de una columna cromatográfica: (a) la altura equivalente de plato teórico H y (b) el número de platos teóricos N . Los dos están relacionados por la ecuación 10:

$$N = \frac{L}{H} \dots\dots\dots (10)$$

Dónde:

L = longitud (normalmente en centímetros) del relleno de la columna.

La eficacia de la columna cromatográfica aumenta cuando mayor es el número de platos, y cuando menor es la altura de plato.

La evaluación experimental de H y N se puede realizar a partir de las siguientes ecuaciones (11 y 12):

$$H = \frac{LW^2}{16t_R^2} \dots\dots\dots(11)$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \dots\dots\dots(12)$$

Donde

L = longitud de la columna (cm)

W = ancho del pico a considerar (cm)

t_R = tiempo de retención (min).

Factor de coleo

Es una medida de la simetría de un pico cromatográfico la cual se obtendría con un factor de coleo de uno. Pero en la realidad no sucede así todo el tiempo. El factor de asimetría de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) lo calcula de la siguiente forma (ver ecuación 13):

$$TF = a+b/2ab \dots \dots \dots (13)$$

Para llegar a una separación óptima entre compuestos, deben obtenerse picos agudos y simétricos. En general, picos con bajo factor de retención son mejores porque se evita su ensanchamiento cumpliendo mejor las características deseables.

A y B son los segmentos medidos al 10 % de la altura del pico (ver la Figura 4).

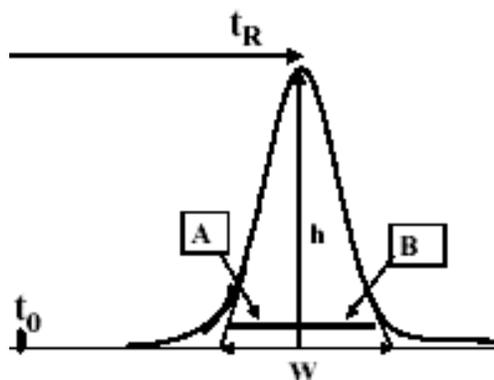


Figura 4. Cálculo del factor de asimetría o coleo (USP)

2.14 Pretratamiento de la muestra

De modo previo a la extracción de los analitos, la muestra es filtrada, generalmente por membranas de fibra de vidrio de 0.45 μm para eliminar la materia sólida que puede provocar problemas durante el proceso de extracción. Además, en muestras complejas, como las aguas residuales, que pueden contener microorganismos, la etapa de filtración elimina dichos microorganismos, contribuyendo a la conservación de la muestra.

Posteriormente, se ajusta el pH de la muestra a ácido, neutro o básico (2, 7 y 9); en función de la naturaleza ácida (Ej. antiinflamatorios no esteroideos), neutra (Ej. carbamazepina), etc. Con el fin de preservarlas éstas son generalmente conservadas a 4 °C hasta el momento de la extracción (33).

Para el caso de la extracción y concentración de muestras acuosas como el agua residual, aguas superficiales entre otras, existen diferentes técnicas a seguir dependiendo de la naturaleza del analito de interés. En la literatura se han empleado distintas técnicas como la microextracción en fase sólida (34), la extracción en fase sólida que ha sido la más ampliamente utilizada (6, 16).

2.15 Extracción líquido-líquido (LLE)

La extracción líquido-líquido (ver Figura 5), es una técnica de preparación de muestra en la cual se produce una transferencia de los analitos desde una fase, generalmente acuosa, a otra orgánica, transferencia regida por una constante de reparto. El mayor problema derivado de esta técnica es el gran consumo de disolventes, con el correspondiente gasto y problema ambiental.

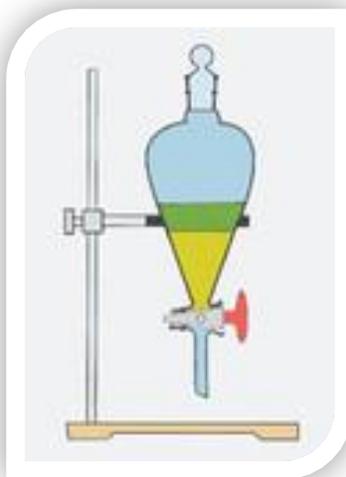


Figura 5. Extracción líquido-líquido

2.16 Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida (Solid phase extraction, SPE) se desarrolló a mediados de los años 70 como alternativa a la extracción líquido-líquido (LLE). Hoy en día es una de las técnicas de preparación de muestra más ampliamente utilizadas en el caso de matrices líquidas e incluso gaseosas (35). Mediante la SPE se consigue concentrar y/o purificar los analitos mediante su retención en una fase sólida, o una fase líquida inmovilizada sobre un soporte sólido, para a continuación proceder a su elución con un disolvente adecuado. Entre las múltiples ventajas que presenta destacan las siguientes

- ✓ Baja manipulación de la muestra
- ✓ Alto poder de concentración
- ✓ Obtención de extractos purificados con altas recuperaciones
- ✓ Menor consumo de disolventes en comparación con la LLE
- ✓ Ausencia de emulsiones
- ✓ Posibilidad de automatización
- ✓ Versatilidad en el tipo de absorbentes utilizados

El adsorbente de extracción en SPE está contenido en tres posibles formatos: discos, cartuchos y jeringas. El primero se utiliza principalmente para concentrar grandes volúmenes de muestra entre 2 – 4 L, permitiendo flujos de paso de líquido muy elevados debido a la escasa resistencia al paso de muestra que poseen, mientras que los cartuchos y jeringas pueden ser fácilmente integrados en sistemas “on-line” con el equipo de medida, generalmente un cromatógrafo de líquidos. De este modo la manipulación de la muestra es mínima, aunque los volúmenes concentrados son inferiores a los empleados en las aplicaciones “off-line” (35).

El proceso de concentración de la muestra en SPE consta de las siguientes etapas básicas, descritas a continuación (ver Figura 6):

- 1.- Acondicionamiento de la fase estacionaria: se hace pasar a través del cartucho un disolvente o mezcla de disolventes adecuado, eliminando así las impurezas, hidratando la fase estacionaria y facilitando la transferencia de materia con la muestra.
- 2.- Paso de la muestra a través del material adsorbente: el objetivo de esta etapa es retener cuantitativamente el analito, consiguiendo además un cierto grado de selectividad.
- 3.- Lavado: se utilizan disolventes con gran afinidad por las interferencias.
- 4.- Elución: Con un disolvente apropiado se recupera el analito de la fase adsorbente. Por lo general se utiliza un pequeño volumen de disolvente orgánico, aunque también se puede realizar una desorción térmica.

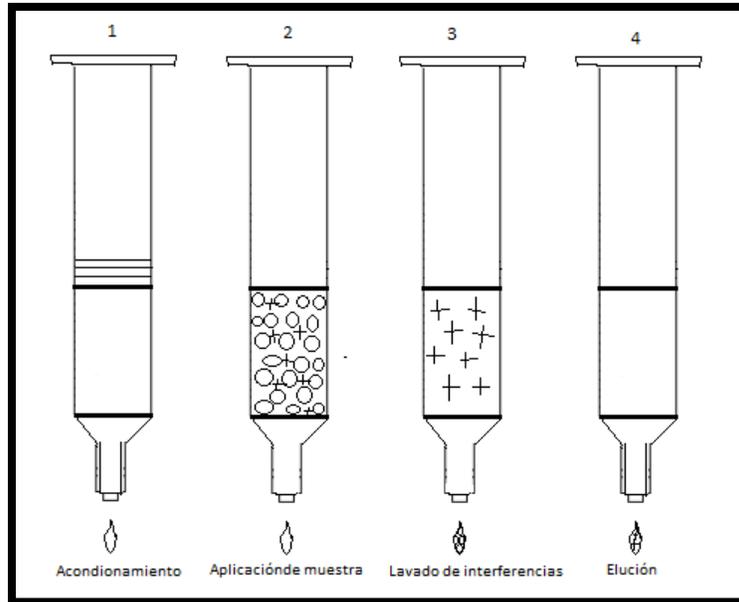


Figura 6. Etapas para el proceso de extracción por SPE

Las fases adsorbentes en SPE son similares a las empleadas en cromatografía de líquidos. Las más comunes son la de sílices enlazadas, polímeros de tipo estireno – divinilbenceno, carbón grafitizado, silicato de magnesio, sílica gel y óxidos de aluminio.

Dentro de las aplicaciones encontradas para muchos analitos es que la SPE es una de las técnicas de concentración de muestras acuosas más utilizada. Para aguas residuales y superficiales, los polímeros más empleados son sílices funcionalizadas y materiales poliméricos de fase reversa como el C18 y Oasis HLB.

En el 2010 la Universidad de Estocolmo en Suecia (36) presentó un método basado en la extracción en fase sólida para determinar 10 fármacos (cafeína, atenolol, metoprolol, oxazepam, carbamazepina, ketoprofeno, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco y gemfibrozil) en agua superficial mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UPLC) combinado con Espectrometría de

Masas de tiempo de vuelo cuadrupolo en conjunto la técnica tiene un gran potencial de ser tanto eficaz en tiempo como fiable.

2.17 Microextracción en fase sólida (SPME)

La microextracción en fase sólida (ver Figura 7), es una técnica de preparación de muestra desarrollada por Balardi y Pawliszyn en 1989. Se basa en la utilización de una fibra de sílice fundida recubierta de una fase absorbente de naturaleza polimérica. En los analitos presentes en la muestra, por lo general, no se extraen cuantitativamente en la fibra, sino que se establece un equilibrio entre las fases existentes en el vial en el que se lleva a cabo el proceso de extracción. A diferencia de la SPE, la SPME no precisa de disolventes orgánicos y requiere una manipulación mínima de la muestra (35).

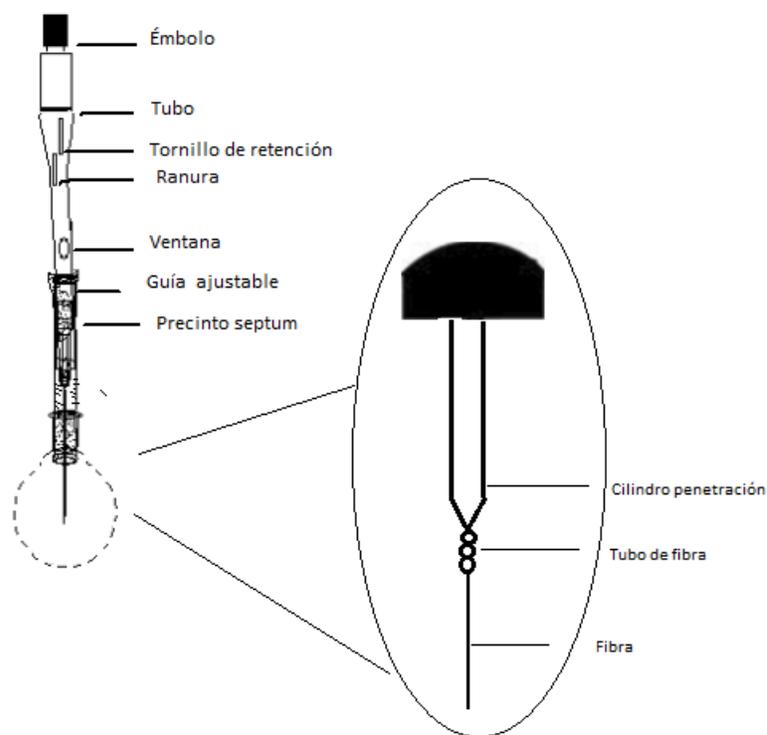


Figura 7. Detalle de una fibra montada en un soporte (SPME)

El proceso de microextracción en fase sólida se desarrolla en dos etapas básicas:

1. Etapa de extracción: Se expone la fibra a la muestra contenida en un vial sellado para que se produzca la migración de los analitos desde ésta hasta la fibra durante un tiempo dado.
2. Etapa de desorción de la fibra de SPME: Se introduce la fibra en el inyector de un sistema analítico (cromatógrafo de gases o líquidos) donde los analitos serán desorbidos térmicamente o por disolución en la fase móvil.

El muestreo puede llevarse a cabo de tres modos diferentes, según las características de los analitos y de la muestra:

- Extracción directa o por inversión
- Extracción en espacio de cabeza
- Microextracción en fase sólida indirecta o a través de una membrana

2.18 Identidad por Ultravioleta (UV)

El principio de la espectroscopía ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta – visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda (λ) comprende entre 190 y 800 nm.

La luz visible o UV es absorbida por los electrones de valencia, éstos son promovidos a estados excitados (de energía mayor). Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible así como en el UV, como es el caso del β -caroteno.

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I . Esta fracción de radiación que no ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$). Por aspectos prácticos, se utilizará la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia ($A = -\log T$), por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la Ley de Beer-Lambert: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ (ϵ : coeficiente de absortividad molar, l : camino óptico, c : concentración de la especie absorbente) (37).

2.19 Identidad por radiación infrarroja (IR)

Cuando la radiación infrarroja incide sobre una muestra, es capaz de provocar cambios en los estados vibracionales de las moléculas constituyentes de la misma. La absorción de radiación por parte de una muestra es indicativa del tipo de enlaces y grupos funcionales presentes en la misma.

La espectroscopía infrarroja es una de las técnicas espectroscópicas más versátiles y de mayor aplicación. Las posibles aplicaciones de esta técnica son muchas. Sin embargo, a continuación se citan algunas de las aplicaciones más importantes (37):

- Caracterización e identificación de materiales poliméricos y sólidos inorgánicos (minerales):
- Análisis de productos farmacéuticos y de síntesis.
- Análisis de contaminantes
- Ciencia forense (identificación)
- Biomedicina (análisis de tejidos)
- Conservación artística (análisis de pigmentos, materiales utilizados...)
- Industria del reciclaje (identificación de materiales poliméricos)
- Agricultura y alimentación (IR cercano)
- Seguimiento de procesos químicos
 - Polimerizaciones, curado, reticulaciones, reacciones catalíticas etc

3. JUSTIFICACIÓN

En la última década la investigación ambiental se ha enfocado a identificar y cuantificar los llamados “contaminantes emergentes” que engloban a los productos farmacéuticos y de cuidado personal debido a que muchos de estos compuestos resultan tóxicos para los organismos acuáticos (23). En la mayoría de los casos las concentraciones de fármacos encontradas en los organismos acuáticos son bajas y sólo causan muertes por efectos crónicos o subletales (38).

Para el caso de la carbamazepina se estima que su consumo global es de 1014 toneladas por año (16) y a pesar de que se trata de concentraciones muy bajas de estos residuos en agua, en el orden de ng/L, su principal problema es que, con el paso del tiempo, se acumulan en los organismos. De ahí la preocupación que actualmente está existiendo en la comunidad científica internacional en torno a estos contaminantes emergentes.

Las plantas de tratamiento de aguas residuales, los hospitales y la industria farmacéutica son las fuentes principales de contaminación del medio ambiente por medicamentos. Por ello es necesario monitorear y caracterizar el agua proveniente de estas fuentes para determinar la cantidad de fármacos y sus metabolitos descargados al medio ambiente (3, 14).

El incremento en los últimos 10-15 años ha sido amplio y rápido en cuanto al surgimiento de nuevas técnicas analíticas versátiles y específicas como la CLAR que ha sido una revolución en análisis ambientales permitiendo la identificación de compuestos farmacéuticos ácidos, básicos y neutros a bajas concentraciones en diferentes matrices.

La aportación del presente trabajo de investigación será el desarrollo e implementación de una técnica analítica (CLAR) para el monitoreo de un antiepiléptico la carbamazepina que es de alto consumo, en aguas residuales provenientes de un hospital así como la determinación de la cinética de degradación.

4. HIPÓTESIS

La técnica analítica desarrollada CLAR permite la detección y cuantificación de carbamazepina en agua residual proveniente de un hospital.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Cuantificar la carbamazepina en el agua residual proveniente de un hospital mediante CLAR y determinar la cinética de degradación.

5.2 Objetivos específicos

- Optimizar y validar una técnica analítica para la detección y cuantificación de carbamazepina en aguas residuales de un hospital.
- Implementación de la técnica analítica para identificar y cuantificar carbamazepina y sus productos de degradación.
- Determinar la cantidad presente de carbamazepina en aguas residuales de un hospital
- Determinación de la cinética de degradación de la carbamazepina.

6. METODOLOGÍA

En la Figura 8 se muestra la metodología general seguida en el presente estudio

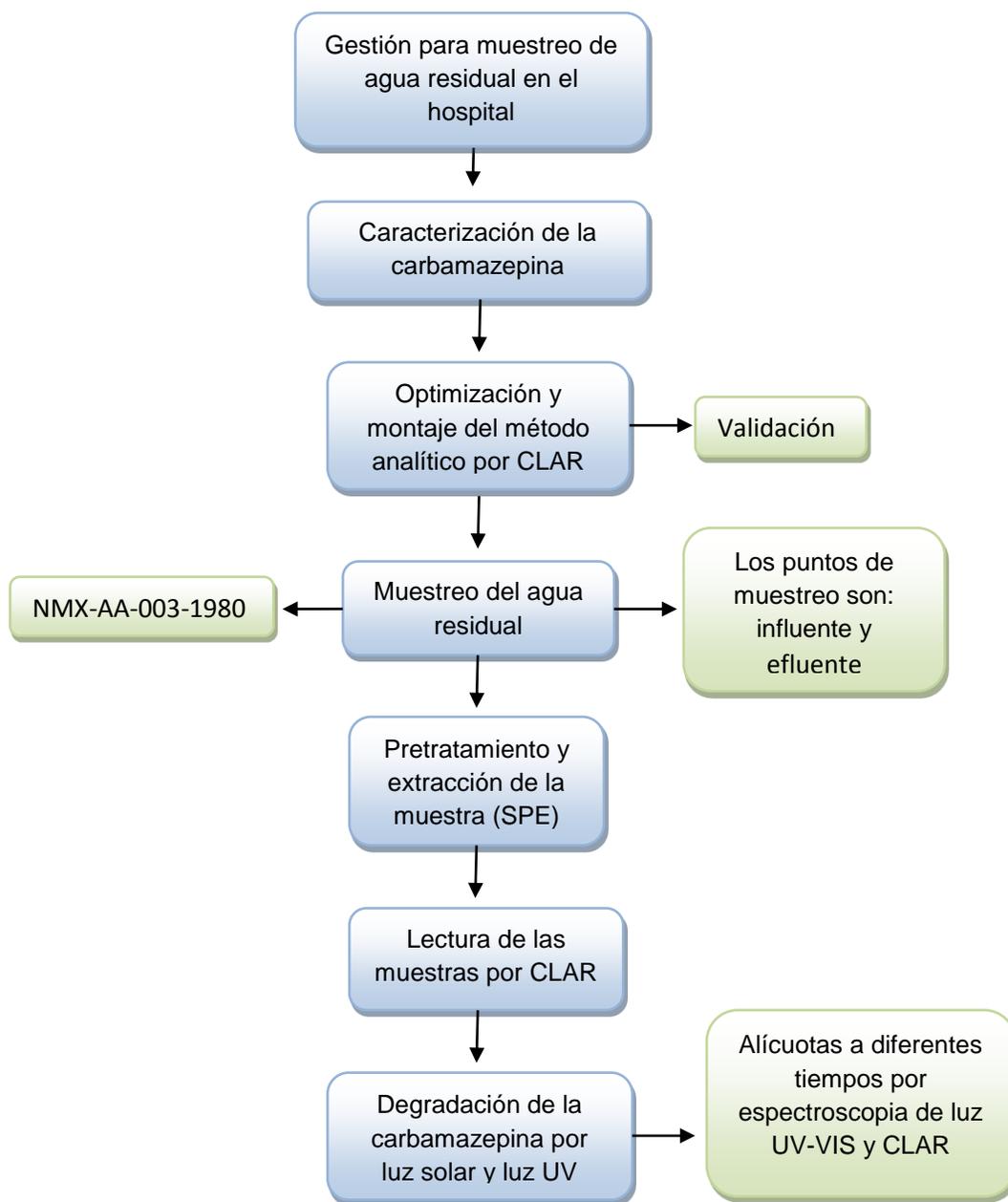


Figura 8. Metodología general

6.1 Caracterización del estándar y medicamento genérico de CBZ

6.1.1 Apariencia

De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos USP 26 pág. 324-325, la apariencia de la CBZ es un sólido blanco o casi blanco. De esta forma se hizo esta prueba tanto para el estándar como para el medicamento genérico. Correspondiendo en ambos casos con la especificación antes descrita.

6.1.2 Identidad por Ultravioleta (UV)

Para esta prueba se preparó una solución fresca de CBZ estándar y del medicamento genérico a una concentración de 4 mg/L en metanol grado HPLC. Y se realizó un barrido de 200 - 400 nm en el equipo Lambda 25 UV-VIS.

6.1.3 Identidad por radiación infrarroja (IR)

Para esta prueba se hizo la técnica de pastilla con bromuro de potasio (KBr) que implica una mezcla de la muestra finamente dividida con polvo de KBr, seguida de la compresión de esta mezcla en un molde para formar una pastilla transparente. Se colocó en un mortero ágata (cuarzo) 5 % de muestra tanto del estándar como del medicamento respectivamente, por 95% de KBr de alta pureza, posteriormente se homogenizó la muestra. Esta mezcla se comprime por dos minutos en una prensa aplicando presiones entre 1200-3000 atm. Resultando pastillas transparentes. El equipo empleado fue el IR avatar 360.

6.1.4 pH de las soluciones del estándar y medicamento genérico

Para la lectura de pH, se leyeron las mismas soluciones preparadas para la prueba de identidad por UV con el potenciómetro marca PHM210 de Meter Lab. A una temperatura de $23.4^{\circ}\text{C} \pm 0.5$.

6.2 Muestreo

6.2.1 Identificación de las muestras (Etiquetado)

Las muestras de agua residual se etiquetaron con la siguiente información:

- Identificación de la descarga.
- Número de muestra.
- Fecha y hora de muestreo.
- Punto de muestreo.
- Nombre de la persona que realizó el muestreo

6.2.2 Muestreo en canales o colectores (NMX-AA-003-1980)

Para el caso del muestreo del agua residual donde los puntos a muestrear fueron el afluente y el efluente del agua residual, se llevó a cabo el siguiente procedimiento, que implica al agua residual contenida en colectores profundos entre 5-8 metros de profundidad:

- El recipiente muestreador utilizado fue una cubeta de plástico de 5 L de capacidad, atado a un lazo de 10 metros de largo.
- Se introduce el recipiente muestreador en el contenedor del agua residual a una profundidad de 1 m aproximadamente.
- La muestra se transfiere del recipiente muestreadora un frasco de vidrio de 1 L de capacidad color ámbar con la ayuda de un embudo de plástico. Teniendo en cuenta que la muestra sea representativa para las determinaciones a efectuar.

6.2.3 Preservación de la muestra de agua residual

La preservación de las muestras de las muestras durante el transporte fue por medio de un baño de hielo conservándose a una temperatura de 4°C, se recomienda que el intervalo de tiempo entre la extracción de la muestra y su análisis sea el menor posible, esto es que no exceda de tres días.

6.2.4 Preparación de muestra

De modo previo a la extracción del analito de la muestra (ver Figura 9), se pasó la muestra por fibra de vidrio contenida en un embudo de vidrio para retener sólidos mayores a 1 μ m, posteriormente se filtró nuevamente en un crisol tipo gooch con membranas de fibra de vidrio con tamaño de poro de 1 μ y 2.10 cm de diámetro marca Ahlstrom para eliminar la materia sólida y microorganismos que puedan provocar problemas durante el proceso de extracción. Con el fin de preservar la muestra esta será conservada a 4° C hasta el momento de la extracción.



Figura 9. Proceso de filtración de la muestra de agua residual

6.3 Extracción en fase sólida (SPE)

Para la extracción de la muestra (agua residual del hospital), se llevó el siguiente proceso como se describe a continuación en la Tabla 5. Y en la Figura 10 se muestra el proceso de extracción mediante cartucho Oasis HLB utilizando el equipo Manifold.

Tabla 5. Condiciones de operación para la extracción en fase sólida (SPE)

Operación	Extracción en fase sólida (Oasis HLB)
Acondicionamiento	5 mL de agua deionizada y 5 mL de metanol
Carga de muestra	200 mL de muestra Flujo: 4-6 mL/min
Lavado	10 mL de agua deionizada Flujo: 4-6 mL/min
Elución	10 mL de metanol Flujo: 2-3 mL/min Secar por 20 min
Reconstitución	Aforar a 10 mL con agua deionizada



Figura 10. Proceso extracción de la muestra de agua residual mediante cartuchos Oasis HLB

6.4 Optimización de las condiciones de separación

Se evaluaron diferentes columnas cromatográficas para optimizar las condiciones de separación las cuales fueron: Eclipse XDB C18 5 μ m 4.6x250mm, μ bondapack C18 5 μ m 3.9 x 300mm Waters, Bonclone C18 10 μ m 3.9 x 300mm Phenomenex, Symmetry C18 5 μ m, 3.0 x 250 mm Waters. Se evaluaron diferentes proporciones de metanol: agua, obteniéndose mejores resultados con la siguiente proporción: metanol: agua 70:30 v/v.

6.5 Montaje del método analítico

Dentro de la optimización del método analítico, se logró una metodología versátil para dos propósitos: la primera cuantificar la carbamazepina en el agua residual hospitalaria y la segunda realizar el seguimiento de la cinética de degradación por las dos condiciones estudiadas, luz solar y luz UV.

Para esto se validó la técnica analítica por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Donde los parámetros que se evaluaron fueron: exactitud, precisión, repetitividad, reproducibilidad y linealidad en un rango de 2.5 – 10000 μ g/L. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes de la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas de operación

Columna	Symmetry C18 5 μ m, 3.0 x 250 mm Waters.
Equipo	Waters Detector 2487 (abs dual) Bomba 515 (isocrático)
Longitud de onda	285 nm
Flujo	0.5 mL/min
Fase Móvil	Metanol : Agua (70:30)
Tiempo de corrida	10 min
Volumen de inyección	25 μ L

6.6 Degradación de la carbamazepina

Para la prueba de degradación, se realizó por triplicado con una solución estándar de carbamazepina de 10 mg/L, se preparó 100 mL de esta solución de CBZ en metanol al 5% en agua. Esta solución se dividió en 6 tubos de vidrio de 10 mL de capacidad cada uno, tres tubos se sometieron a exposición por luz solar colocándose en contacto directo con el sol esto es en periodos naturales de luz oscuridad. Otro 3 tubos se colocaron en contacto con luz UV, para esto se acondicionó una cámara en completa oscuridad que en la parte superior de la misma contiene 2 lámparas de mercurio (Hg) de 15 W cada una que irradian a una longitud de onda de 254 nm.

Al inicio del experimento se tomaban muestras de la solución irradiada tanto por luz solar como por luz UV cada 24 hrs aproximadamente y se leían por espectrofotometría de luz UV-VIS, pero en un periodo de 3 meses que se realizó este experimento no se notaba diferencia o disminución en los resultados, por lo que concluimos que esta técnica no es adecuada para el seguimiento de la degradación (Figuras 17 y 18).

Para corregir este inconveniente se desarrolló un método cromatográfico por HPLC, que es una técnica analítica mucho más sensible y que nos permite observar la disminución en la concentración de CBZ y la aparición de productos de degradación de manera objetiva y más confiable. Para este segundo experimento el seguimiento de la degradación se realizó por la técnica analítica de HPLC y las muestras leídas fueron tomadas semanalmente, por la alta persistencia de este compuesto.

6.7 Validación de la técnica analítica

Una vez que se encontraron las condiciones a las cuales se obtiene la mejor separación y sensibilidad de detección de los analitos de interés se procedió a la validación del método analítico desarrollado con el objetivo de producir evidencia

documental, la cual proporcione un alto grado de seguridad de que funcionará correctamente cuando éste se ponga en práctica, se evaluarán los siguientes apartados, con base a “The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) con la guía Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Methodology” (38).

- Linealidad
- Precisión del sistema
- Límite de detección
- Robustez
- Exactitud
- Precisión intermedia
- Límite de cuantificación
- Repetitividad y reproducibilidad

6.7.1 Linealidad

Se preparó una curva de calibración de 10 puntos (2.5 – 10 000 µg/L), obteniéndose el coeficiente de determinación r^2 , el cual fue mayor a 0.998.

6.7.2 Exactitud

Se determinó el porcentaje de recuperación por triplicado de 3 concentraciones conocidas que correspondían a los niveles bajo, medio y alto de la curva de calibración. El porcentaje de recuperación debe encontrarse entre el 80.0 -120.0% o de 70-130% para concentraciones al nivel de QL. El porcentaje de recuperación se calculó con la ecuación (14):

$$\% \text{ Recobro} = \left(\frac{C_{EXP}}{C_{TEO}} \right) \times 100 \dots \dots \dots (14)$$

Dónde:

C_{EXP} = Concentración experimental

C_{TEO} = Concentración teórica

6.7.3 Precisión del sistema

A partir de las lecturas obtenidas en la prueba de linealidad para cada punto, se obtuvieron los % Desviación Estándar Relativa (DER).

La DER fue menor a 2.0 %, en todos los casos. La DER se calcula con la ecuación (15)

$$\% DER = \frac{[s](100)}{X} \dots\dots\dots(15)$$

Dónde:

s = desviación estándar

X= promedio.

6.7.4 Precisión intermedia

Para esta prueba dos analistas en dos días diferentes realizamos una determinación por día de una misma solución de concentración conocida al punto medio de la curva de calibración. Muestras por analista 6. Muestras por prueba 12. Se determinó la diferencia absoluta entre los resultados obtenidos de cada día expresados como porcentaje de diferencia. La diferencia absoluta entre analistas fue menor a 2.0 %

$$\%Diferencia = \frac{|(V1-V2)|}{|(V1+V2)|} * 100 \dots\dots\dots(16)$$

Dónde:

V1= Valor uno

V2= Valor dos

6.7.5 Límite de detección (LD)

La concentración del límite de detección se seleccionó analizando soluciones estándar adecuadas con concentraciones de mayor a menor concentración comenzando a una concentración de 1 mg/L hasta llegar a 1 µg/L y se determinó su relación señal ruido de cada concentración hasta encontrar un valor de 2-3.

6.7.6 Límite de cuantificación (LQ)

La concentración del límite de cuantificación se seleccionó analizando soluciones estándar adecuadas con concentraciones de mayor a menor concentración comenzando a una concentración de 1 mg/L hasta llegar a 2.5 µg/L y se determinó su relación señal ruido de cada concentración hasta encontrar un valor alrededor de 10.

6.7.7 Robustez

Para determinar la robustez del procedimiento analítico se modificaron algunas condiciones del análisis y se siguieron las afectaciones de los resultados.

En este caso los parámetros a probar son:

- Cambios de flujo de la fase móvil
- Cambios en la proporción de la fase móvil

6.8 Cálculo y expresión de resultados

La cuantificación de las concentraciones de carbamazepina en las muestras de agua residual se realizó por estándar externo, expresando los resultados en $\mu\text{g/L}$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados en dos apartados, en el primero se muestra la carta de envío y el artículo de investigación generado a partir de la presente investigación en el cual se interpretan los resultados analíticos obtenidos en la determinación de carbamazepina por CLAR en agua residual del “Centro Médico Adolfo López Mateos”. Se describe la metodología utilizada para llevar a cabo el desarrollo y validación del método, así como cinética de fotodegradación de la carbamazepina. Seguido de otros resultados llevados a cabo, pero que no fueron incluidos en el artículo de investigación, hasta el momento no publicados.

-Correo electrónico de confirmación de la recepción del artículo

[De: ees.chem.0.24dc1a.331c559f@eesmail.elsevier.com](mailto:ees.chem.0.24dc1a.331c559f@eesmail.elsevier.com)

[\[ees.chem.0.24dc1a.331c559f@eesmail.elsevier.com\]](mailto:ees.chem.0.24dc1a.331c559f@eesmail.elsevier.com) En nombre de Chemosphere [chem-eo@elsevier.com]

Enviado el: domingo, 27 de octubre de 2013 08:27 p.m.

Para: Jorge Javier Ramirez Garcia; jjrg1311@yahoo.com.mx

Asunto: Acknowledgement of receipt of your submitted article

Dear Dr. RAMIREZ,

Your submission entitled "QUANTIFICATION OF CARBAMAZEPINE IN HOSPITAL WASTEWATER SAMPLES AND PHOTODEGRADATION KINETIC STUDY IN AQUEOUS MEDIUM" has been received by Chemosphere

Please note that submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to <http://ees.elsevier.com/chem/> as Author.

Your manuscript will be given a reference number in due course.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal Office Staff

Chemosphere

7.1 ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN:

QUANTIFICATION OF CARBAMAZEPINE IN HOSPITAL WASTEWATER SAMPLES AND PHOTODEGRADATION KINETIC STUDY IN AQUEOUS MEDIUM

A.Y. Martínez- Garay¹, J.L.Gallegos-Perez², Colín- Cruz A³,J.J. Ramírez- García¹,

¹Laboratorio de Análisis Instrumental, Facultad de Química UAEM, Toluca, Estado de México, 50120, México.

²Department of Neurobiology and Behavior, University of California, Irvine, CA 92697, USA.

³Laboratorio de Química Ambiental, Facultad de Química UAEM, Toluca, Estado de México, 50120, México.

Correspondence: Laboratorio de Análisis Instrumental, Facultad de Química UAEM, Paseo Tollocan, Toluca Estado de México, 50120, México.

E-mail: jjramirezg@uaemex.mx

Phone/Fax: +52 (722) 2 17-3890

ABSTRACT

Hospital wastewaters contain a variety of toxic or persistent substances such as carbamazepine (CBZ). This compound was considered as an emerging contaminant; which are quite often unregulated contaminants. In this paper, a specific, sensitive and rapid analytical method was developed for the determination of CBZ in hospital wastewater treatment plant (WWTP) and determination of kinetics degradation. CBZ was extracted from the wastewater samples through cartridges Oasis HLB solid-phase extraction (SPE). Then the analyte was identified and quantified using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The quantification limit (LOQ) was $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ for 200 mL wastewater samples. CBZ was detected at concentrations ranging from 3.3 – 55.9 and $< 1 - 5.9 (\mu\text{g L}^{-1})$ in hospital influent and effluent wastewater samples respectively. Suitability of CBZ photodegradation by natural solar and ultraviolet (UV) light was investigated. The irradiation experiments were carried out placing a solution of CBZ 10 ppm in direct contact with natural periods of solar light and in a dark chamber equipped with two lamps at radiation source of 15-W each one, Hg (254 nm). Photodegradation for both cases showed first-order kinetics.

Highlights

- The HPLC method developed for quantification of CBZ in hospital wastewater is rapid, sensitive, and specific.
- Higher degradation rate was observed with solar light in comparison to UV light, half-life was lower with solar light.
- For the WWTP influent, the average recoveries of CBZ ranged from 95.88 - 104.30%, with the RSD ranging from 1.29-10.77% and for effluent samples recoveries were 82.67-114.44% and the RSD 2.80-7.34%.

Keywords: Carbamazepine, Hospital wastewater, Kinetics degradation.

1. Introduction

Over the past few years due to the existence of more sensitive analytical techniques, it has been possible to analyze contaminants in different matrices that before were difficult to detect. Over the last decade increasing attention has been paid to the presence of emerging contaminants in wastewaters, surface waters and ground waters (39-43). These emerging compounds are unregulated contaminants; monitoring their occurrence depends on their potential health effects.

Carbamazepine (CBZ) is a drug resistant to biodegradation with a high rate of occurrence (16, 20, 44, 45). It is a worldwide used antiepileptic drug currently prescribed for treatment of many other medical conditions (46), only in England its consumption is over 40 tons per year (47).

In surface waters, carbamazepine concentrations are relatively low and also diverse in different countries. The highest detected concentration of carbamazepine in surface water was reported in Berlin in 1999 (1075 ng L^{-1}) (40). It was also detected in sea water, although at a very low concentration (2 ng L^{-1}) (48). Research conducted by the US Geological Survey found an average CBZ concentration of 60 ng L^{-1} in water and 41.6 ng mg^{-1} in the sediment of 44 rivers across the US (49). Tixier et al investigated the presence of carbamazepine in Lake Greifensee, Switzerland, which has a mean water residence time of 408 days. The influents consisted of three WWTP effluents and two rivers receiving the discharge of four other WWTPs. (50).

Hospitals are important sources of contaminants resulting from diagnostic, laboratory and research activities on one side and medicine excretion by patients on the other one. Common contaminants include active principles of drug and their metabolites, chemicals, heavy metals, disinfectants, detergents, radioactive markers and iodinated contrast media (51). A report of a municipal WWTP that treats household sewage (96,000 inhabitants) and effluents of five hospital (2339 beds together) found that 26% of the total carbamazepine in the WWTP was from the hospitals (52).

Common treatment for hospital and municipal wastewater is not considered an adequate solution. They use activate sludge processes wherein microorganisms are applied to

mineralize the contaminants to water and carbon dioxide, or degrade them to less toxic compounds. However removal efficiencies of carbamazepine in many cases are less than 10% (16).

Several studies on Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) photodegradation with solar and UV light report that UV treatment would not be so effective for a variety of PPCPs in water (11, 20, 53-56).

Löffler et al also found that carbamazepine was highly recalcitrant to elimination in a water/sediment system at laboratory scale. The time required for a 50% reduction (DT_{50}) of its initial concentrations ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) was 328 days, as calculated by first-order elimination kinetics (57).

The aims of this study were to optimize the chromatographic analysis for detection and quantification of CBZ in hospital wastewater and to investigate the behavior of its degradation during solar and UV treatment. For the analytical method High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled to a UV/Vis detector was used. Different columns, solvents and gradients were tested to optimize the method. Water coming from Hospitals effluents were collected and used for the optimization of the method as well for quantitation. The kinetic study was follow up with the same developed method by HPLC.

2. Methods

2.1 Reagents

Methanol HPLC grade was purchased from Fermont (Monterrey, Nuevo León, México). Deionized water was obtained from a system of Milli-Q water. Carbamazepine analytical standard was purchased from Sigma–Aldrich (Saint Louis, MO 63103 USA).

2.2 HPLC method optimization and analysis

Two analytical columns were compared during the method optimization: a Symmetry C18 (5 μm particle size, 3.0 x 250 mm Waters) and a $\mu\text{Bondapak}$ C18 (3.9 x 300 mm Waters). Under isocratic conditions, two solvent mixtures of methanol: water (v/v) were tested: 70:30 and 50:50. A Waters HPLC equipment configured as follows: isocratic HPLC Pump Waters model 1515, UV-Visible Dual Absorbance detector Waters model 2487. Injection volume was 20 μL , and all isocratic experiments were programmed at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} .

2.3 Method validation

Linearity was studied by analyzing preparations ($n = 7$) containing standard solution of carbamazepine at concentrations between 2.5 and 10 000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Linear concentration range was estimated on the basis of a linear regression curve ($y = ax + b$) and correlation coefficient (r^2).

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were estimated from the injection of a standard solution successively diluted until reaching a concentration level corresponding to a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively.

Precision was determined as the repeatability of the analytical procedure within a laboratory over a short period of time using the same analyst and the same equipment.

System repeatability was determined by three preparations at five concentrations of the calibration curve with 3 replicate injections of each concentration, calculating relative standard deviation (RSD). Method repeatability was tested by six preparation of the CBZ standard at one concentration of 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Inter-day precision was demonstrated

analyzing by duplicate three samples of influent wastewater in two different days and by two different analysts, result is expressed it as percent of RSD.

Extraction recoveries of CBZ were determined in hospital influent and effluent wastewater using spiked samples at four concentrations levels: 250, 500, 750 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Accuracy was defined as (found value/added value) $\times 100\%$.

All influent and effluent samples were analyzed by triplicate and their CBZ concentrations were calculated by external standard calibration.

2.4 Sample collection

Hospital wastewater samples were collected from the WWTP of a Medical Center located in the city of Toluca, Estado de México, Mexico, that serves patients from all the state. This WWTP performs a pretreatment followed by activated sludge process wherein microorganisms are applied to mineralize the contaminants and a last step clarification and disinfection with sodium hypochlorite. The treatment plant process 250,000 L per week. The sampling period was weekly from March to May of 2013. All samples were collected in glass amber bottles (1000 mL), then stored immediately in ice-packed containers, and transported to the laboratory for further analysis. Upon arrival, samples were immediately passed through a 1- μm glass microfiber filter from Ahlstrom Finland and then stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ until analysis. Extraction and HPLC analysis were performed the next day after sampling.

2.5 Sample extraction

Procedures for sample extraction of pharmaceutical residues using Oasis HLB-SPE cartridges are reported elsewhere (58-60). Briefly, the sorbent of the cartridge has a combination of hydrophilic-lipophilic polymer, which makes it suitable for the extraction of different compounds. Each HLB cartridge was pre-conditioned with 5 mL of water and 5 mL of methanol on an SPE manifold. A volume of 200 mL of the water sample was passed through the HLB-cartridge at a flow-rate of ca. 4–6 mL min^{-1} . After extraction was completed, the cartridge was washed with 10 mL of water and then air-dried under vacuum for 10 min. Trapped analytes were eluted from the cartridge using 10 mL of methanol. Extract was diluted up to 10 mL with distilled water in a volumetric flask and analyzed by HPLC.

2.6 Photodegradation experiments

A solution of carbamazepine (10 mg L^{-1}) was made in a 100 mL volumetric flask with methanol-water 25:75 % v/v. This solution was split in two 50 mL glass tubes; one was exposed to sun light with natural periods of light and darkness. The other was exposed to continuous ultraviolet light consisting in a dark chamber equipped with two lamps with a radiation source of 15 W Hg (254 nm). Irradiation time was from middle August 2012 to early April 2013. These irradiated samples were analyzed once a week at the same hour by HPLC.

3. Results and discussion

3.1 Method optimization and validation

Chromatographic conditions were optimized to achieve a separation with the best sensitivity and avoiding matrix interferences. First, the mobile phase was optimized to achieve a fast separation. Thus, two mixtures of methanol:water were evaluated: Mixture A: 50:50 (v/v) and mixture B: 70:30 (v/v) . It was found that using the mixture A the retention time of CBZ was 7 min in comparison of the 4 min with the mobile phase B. All these experiments were carried out using the Symmetry C18 column. Also, a μ Bondapak C18 column was tested; both columns showed a tailing and resolution to the nearest peak similar however, the CBZ response was about 50% lower that the obtained with Symmetry column and theoretical plates were also higher with this column. Thus the final chromatographic conditions were: Symmetry C-18 analytical column, mobile phase B, flow rate 0.5 mL/min with the UV and, detector set at 285 nm. Under these experimental conditions hospital wastewater samples were injected to verify possible interferences.

We investigated the analytical characteristics of the developed method, such as its linear response range, precision, accuracy and limit of detection and quantification to estimate the efficiency of the approach and feasibility of applying it to the analysis of environmental samples.

The regression equation is linear in the interval of 2.5-10 000 μgL^{-1} with a correlation coefficient of 0.999 for CBZ quantification. Detection and quantification limits were 1 and 2.5 μgL^{-1} respectively.

Precision of CBZ standard and sample are presented in Table 1(a). For all concentrations tested the RSD % was lower the 6. So the repeatability of standard and sample are suitable for its intended use.

Specificity (selectivity) of the developed method is demonstrated by a representative chromatogram from drug-free wastewater sample (blank) and the same sample spiked with CBZ at 1 mg L⁻¹(see Figure 1). In the figure, both chromatograms are overlapped and it is observed that there is not a chromatographic peak that can interfere with the CBZ signal, which show the ability of the method to detect the drug unequivocally in presence of other components present in this type of water samples. Thus, it was concluded that experimental conditions for the separation were appropriated.

All results presented for validation are within specification from the international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use guideline (61)

3.3 Sample pre-treatment and solid phase extraction

The use of Oasis HLB for extraction of pharmaceuticals from different type of waters (wastewater, surface water, groundwater) has been reported elsewhere (16, 62, 63). Authors agree of it is excellent efficiency, yielding high recoveries for acidic, neutral (carbamazepine) and basic analytes at a wide range of pHs, including neutral pH.

For WWTP influent, the average recoveries of CBZ ranged from 95.88 -104.30 %, with the RSD ranging from 1.29-10.77 % and for effluent samples recoveries were 82.67-114.44 % and the RSD 2.80-7.34 %. Recoveries of the influent and effluent might have been affected by the presence of co-extracted matrix components, which typically suppress or, less frequently, enhance, the analyte signals.

3.2 Quantification of CBZ in Hospital wastewater

Quantification of CBZ in Hospital wastewater was performed through comparison of retention time of carbamazepine standard solution and wastewater identification; the quantities were calculated using the calculated calibration curve ($y = 135977x + 1176.2$). Concentrations of CBZ found in the hospital WWTP have been detected in ranges from 3.3 – 55.8 for the influent and from <LOD – 5.9 ($\mu\text{g L}^{-1}$) for effluent (see Table 2). The concentrations of carbamazepine residues in WWTP ranged from not detected. to 0.33 – 1.59 $\mu\text{g L}^{-1}$ in Austria (64), from 0.07 – 0.73 $\mu\text{g L}^{-1}$ in Korea (65). Also carbamazepine has been detected at very high concentrations in WWTP up to 6.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ in German surface waters (66). In this study we found that the concentrations of carbamazepine in the hospital WWTP effluents ranged from <1 to 55.8 $\mu\text{g L}^{-1}$, higher to the concentrations present in other countries, possibly due to the less population in hospital WWTP (150-200 patients per day), than the studies presented in Table 3, who process more wastewater and dilution of carbamazepine is expected (380000 people).

Studies presented in Table 3 were performed by chromatographic techniques coupled to mass spectrometry detectors, however in this paper HPLC was used for carbamazepine quantification obtaining favorable results only with a lower suitability LOD and LOQ higher than those achieved with mass detectors. HPLC-UV/Vis is a technique more available and economic, that's why we expect to soon complete a methodology using LC-MS, and compare the results obtained with different equipment.

3.4 Degradation kinetics

Results of a solution exposed to solar irradiation for 217 days (by triplicate), are shown in Figure 2 (a) the half life obtained was 166.54 day by solar light and indicate that the substrate concentration decreases very slowly in the irradiation time (8 months), comparing with other reports sulphamethoxazole, diclofenac, ofloxacin and propranolol with half-lives of 2.4, 5.0, 10.6 and 16.8 days respectively (16), . Whereas visible sunlight ($400 < \lambda < 750 \text{ nm}$) hardly causes photochemical reactions, solar UV-B radiation ($280 < \lambda < 315 \text{ nm}$) and partially solar UV-A radiation ($315 < \lambda < 400 \text{ nm}$) induce various direct and indirect photochemical processes in the top level of surface waters, which can lead to a degradation of anthropogenic microcontaminants (67). Data reported in Figure 2 for CBZ photochemical degradation of CBZ have been analyzed by plotting the natural log of the

relative residual concentration against the time and adjusted to a first-order kinetic by least squares regression. A kinetic constant value of 0.0048 day^{-1} was obtained. This data agrees with Zhang et al who describe that carbamazepine is extraordinarily persistent to biodegradation at low concentrations and Clara et al studied a full scale WWTP at sludge retention time (SRT) up to 275 days and found no removal of carbamazepine (16, 68).

Experiments with UV radiation at 254 nm cause photolysis of some organic chemicals that absorb UV light directly, causing destruction of chemical bonds and subsequent breakdown of the contaminant. However, some other organic species do not degrade very quickly or efficiently by direct UV photolysis, which is the case of carbamazepine (44). In Figure 2 (b) results for solar irradiation are shown. A kinetic constant value of 0.003 day^{-1} has been obtained from which a half-life $t_{1/2} = 236.89 \text{ day}$ has been calculated.

One way analysis of variance (ANOVA) using STATGRAPHICS Centurion, StatPoint Technologies, Inc, ($p \leq 0.05$) was carried out to determine if no significant differences existed between solar and UV light kinetic results. The data entered into the program were by triplicate, time was the blocking factor because it can interfere in the analysis since sample exposed to sun light was subject to normal weather conditions and UV sample was continuously radiated. Results showed that time of exposure has a statistically significant effect on decrease in the concentration of CBZ and also significant effect on decrease in the concentration of CBZ between solar light and UV light has been observed. We observed more degradation with solar light than UV light, half-life was less by solar light.

4. Conclusions

The HPLC method optimized in this report is rapid, sensitive, and specific. Accuracy and precision of the method are within the parameters recommended by the tripartite harmonised ICH Guideline(61). The simplicity of technique and its high sensitivity make this technique particularly attractive for the quantification of CBZ in hospital wastewater. The method can also be readily adapted to routine quality control analysis and wastewater treatment plants.

Our degradation half life time values by solar and UV light shows the low biodegradability and persistence of carbamazepine. Conditions study for degradation of wastewater is not suitable for this propose because of the low biodegradability of carbamazepine. However

sunlight resulted more efficient than UV light under the conditions studied, with a shorter elimination half-life, verified with the ANOVA.

Acknowledgment

This work was supported by the Instrumental Analysis Laboratory, Department of Chemistry of the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).

REFERENCES

Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G., Pollio, A., 2002. Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Research* 36, 2869-2877.

Benotti, M.J., Stanford, B.D., Wert, E.C., Snyder, S.A., 2009. Evaluation of a photocatalytic reactor membrane pilot system for the removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds from water. *Water Research* 43, 1513-1522.

Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R., Zuccato, E., 2005. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1092, 206-215.

Chen, H.-C., Wang, P.-L., Ding, W.-H., 2008. Using liquid chromatography-ion trap mass spectrometry to determine pharmaceutical residues in Taiwanese rivers and wastewaters. *Chemosphere* 72, 863-869.

Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., Kroiss, H., 2005. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research* 39, 4797.

Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N., 2004. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Research* 38, 947-954.

Cunningham, V.L., Perino, C., D'Aco, V.J., Hartmann, A., Bechter, R., 2010. Human health risk assessment of carbamazepine in surface waters of North America and Europe. *Regul Toxicol Pharmacol* 56, 343-351.

Daughton, C.G., 2004. Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environmental Impact Assessment Review* 24, 711-732.

Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect* 107 Suppl 6, 907-938.

Doll, T.E., Frimmel, F.H., 2003. Fate of pharmaceuticals—photodegradation by simulated solar UV-light. *Chemosphere* 52, 1757-1769.

Fatta, D., Achilleos, A., Nikolaou, A., Meric, S., 2007. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26, 515-533.

Gasser, G., Rona, M., Voloshenko, A., Shelkov, R., Lev, O., Elhanany, S., Lange, F.T., Scheurer, M., Pankratov, I., 2011. Evaluation of micropollutant tracers. II. Carbamazepine tracer for wastewater contamination from a nearby water recharge system and from non-specific sources. *Desalination* 273, 398-404.

Ghauch, A., Baydoun, H., Dermesropian, P., 2011. Degradation of aqueous carbamazepine in ultrasonic/FeO/H₂O₂ systems. *Chemical Engineering Journal* 172, 18-27.

Gros, M., Petrovic, M., Barcelo, D., 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70, 678-690.

Guideline-I.C.H., 2005. Q2 (R1): Validation of analytical procedure: text and methodology. ICH, London.

Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett* 131, 5-17.

Heberer, T., Feldmann, D., 2005. Contribution of effluents from hospitals and private households to the total loads of diclofenac and carbamazepine in municipal sewage effluents—modeling versus measurements. *Journal of hazardous Materials* 122, 211-218.

Jones, O.A.H., Voulvoulis, N., Lester, J.N., 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research* 36, 5013-5022.

Kim, I., Tanaka, H., 2009. Photodegradation characteristics of PPCPs in water with UV treatment. *Environment international* 35, 793-802.

Kim, S.D., Cho, J., Kim, I.S., Vanderford, B.J., Snyder, S.A., 2007. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research* 41, 1013.

Lin, W.-C., Chen, H.-C., Ding, W.-H., 2005. Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1065, 279-285.

Löffler, D., Römbke, J., Meller, M., Ternes, T.A., 2005. Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environmental Science & Technology* 39, 5209-5218.

Lopez, A., Bozzi, A., Mascolo, G., Kiwi, J., 2003. Kinetic investigation on UV and UV/H₂O₂ degradations of pharmaceutical intermediates in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 156, 121-126.

Martinez Bueno, M.J., Ucles, S., Hernando, M.D., Fernandez-Alba, A.R., 2011. Development of a solvent-free method for the simultaneous identification/quantification of drugs of abuse and their metabolites in environmental water by LC–MS/MS. *Talanta* 85, 157-166.

Öllers, S., Singer, H.P., Fässler, P., Müller, S.R., 2001. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *Journal of Chromatography A* 911, 225-234.

Petrovic, M., de Alda, M.J.L., Diaz-Cruz, S., Postigo, C., Radjenovic, J., Gros, M., Barcelo, D., 2009. Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 367, 3979-4003.

Petrovic, M., Gonzalez, S., Barcelo, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22, 685-696.

Petrovic, M., Gros, M., Barceló, D., 2006 Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography–quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, pp. 68–81

Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* 32, 3245-3260.

Thacker, P.D., 2005. Pharmaceutical data elude researchers. *Environmental Science & Technology* 39, 193A.

Tixier, C., Singer, H.P., Öllers, S., Müller, S.R., 2003. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science & Technology* 37, 1061-1068.

- Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barcelo, D., 2010. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology* 389, 416-428.
- Vogna, D., Marotta, R., Andreozzi, R., Napolitano, A., d'Ischia, M., 2004. Kinetic and chemical assessment of the UV/H₂O₂ treatment of antiepileptic drug carbamazepine. *Chemosphere* 54, 497-505.
- Weigel, S., Kuhlmann, J., Hühnerfuss, H., 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Science of The Total Environment* 295, 131-141.
- Yuan, F., Hu, C., Hu, X., Qu, J., Yang, M., 2009. Degradation of selected pharmaceuticals in aqueous solution with UV and UV/H(2)O(2). *Water Res* 43, 1766-1774.
- Zepp, R.G., Callaghan, T.V., Erickson, D.J., 1995. Effects of increased solar ultraviolet radiation on biogeochemical cycles. *Ambio* 24, 181-187.
- Zhang, Y., Geißen, S.-U., Gal, C., 2008. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73, 1151-1161.

Table 1

Validation data

a) Method precision including system repeatability, method repeatability and intermediate precision.

b) Recoveries of CBZ in influent and effluent by solid phase extraction followed by HPLC analysis in hospital wastewater samples

Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	System Repeatability RSD(%) n=3	Method repeatability RSD(%) n=6	Intermediate precision (area)	
			Samples (Date)	RSD% (n=3)
a) 25	3.55			
50	6.12		06/03/13	0.028
100	1.13		13/03/13	0.021
500	5.78	0.97	20/03/13	0.011
1000	3.77			
Accuracy		Recovery (%) (n=3)		
	Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Influent	Effluent	
b)	250	100.44	105.90	
	500	80.72	82.67	
	750	104.30	108.71	
	1000	95.88	114.44	

RSD (%), relative standard deviation

n= number of preparations

Table 2

Quantification of CBZ ($\mu\text{g L}^{-1}$) using solid phase extraction followed by HPLC analysis in hospital wastewater samples and (%RSD) in parentheses.

Date of sampling	Concentration of CBZ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Influent (n=3)	Effluent (n=3)
23-01-13	49.3 (3)	5.9 (4)
06-03-13	7.7 (11)	4.4 (8)
13-03-13	3.7 (7)	<LOD
20-03-13	41.7 (2)	4.7 (6)
03-04-13	8.3 (7)	4.1 (13)
09-04-13	55.8 (3)	< LOD
16-05-13	36.3 (5)	3.2 (9)
28-05-13	3.3 (8)	3.1 (12)
31-05-13	7.7 (9)	3.3 (5)
03-06-13	15.7 (4)	5.2 (7)
05-06-13	20.1 (9)	4.2 (12)

< Concentrations were less than LOD

Table 3Comparison of levels of CBZ in WWTP influents and effluents in different countries ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Location	Influent wastewaters	Effluent wastewaters	References
Austria	0.33-1.85	0.47-1.59	(64)
Germany	-	Up to 6.30	(66).
Italy	-	$< 1.3 \times 10^{-3}$ – 1.32	(69)
Korea	-	0.07 - 0.73	(65)
Spain	<0.10-0.95	< 0.1 – 0.60	(62, 70)
Spain	<61-0.95	< 0.04 – 0.63	(62)
Switzerland	-	Up to 0.95	(50)
Israel	-	0.46 – 1.66	(71)
Taiwan	-	0.29 – 0.96	(72) et
Mexico	3.3 – 55.8	< 1-5.9	This study

- Data not available

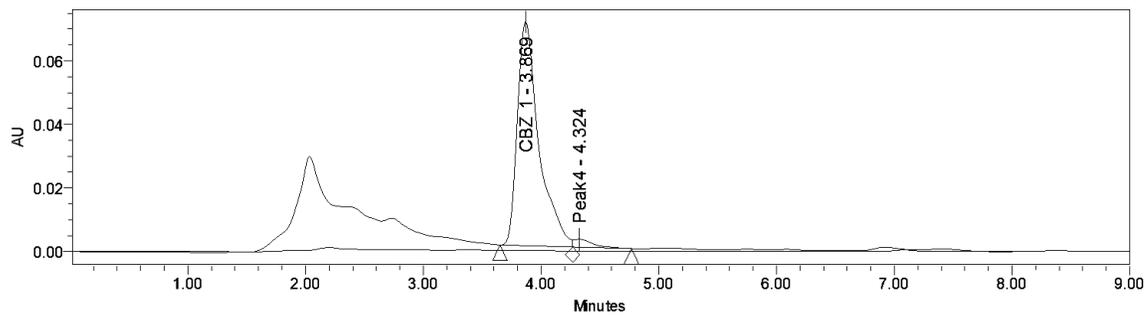


Fig. 1 Chromatogram of hospital wastewater sample (effluent from 09-04-13) and the same spiked effluent with CBZ (1 ppm). Retention time about 3.8 min.

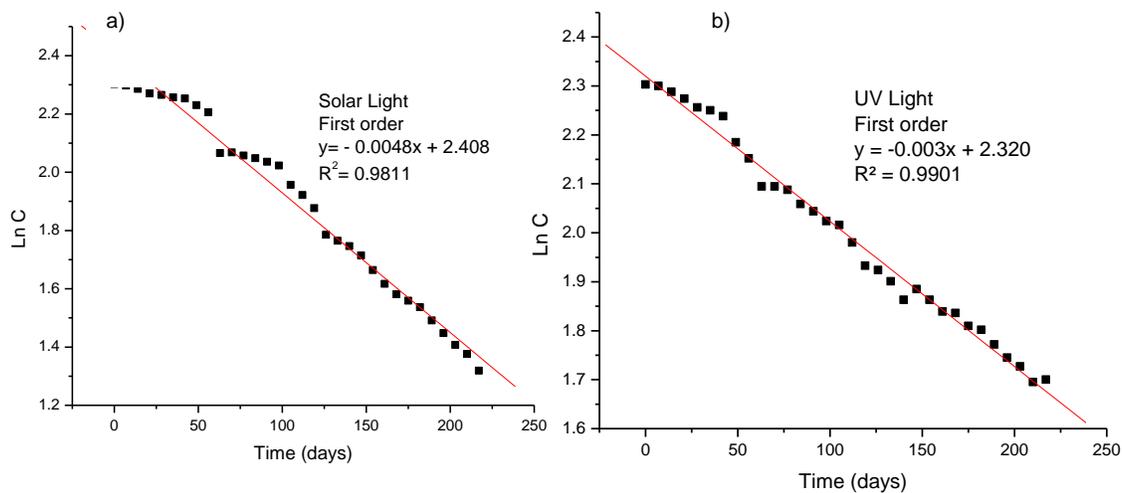


Fig. 2 a) Sunlight photodegradation of CBZ in methanol-water 25:75 % v/v, [CBZ]₀=10 ppm. Start time 11 a.m.–end time 4 p.m. (middle August 2012 to early Apr 2013). Experimental points (full circle), calculated values with first order kinetic model (solid line). $k = 0.0048$ days⁻¹, $t_{1/2} = 166.54$ days. **b)** UV light photodegradation of CBZ in methanol-water 25:75 % v/v, [CBZ]₀=10 ppm. Start time 11 a.m.–end time 4 p.m. (middle August 2012 to early Apr 2013). Experimental points (full circle), calculated values with first order kinetic model (red solid line). $k = 0.003$ days⁻¹, $t_{1/2} = 236.89$ days

A continuación se presentan resultados no publicados.

7.2 GESTIÓN DEL MUESTREO

El día 27 de marzo del 2012 se realizó la gestión para el muestreo del agua residual de la planta de tratamiento en el “Centro Médico Adolfo López Mateos”, siendo aprobado el proyecto por el subcomité de Enseñanza, Investigación y Ética de dicha Institución.

 GOBIERNO DEL ESTADO DE MÉXICO

 ENGRANDE

 ISEM

"2012. Año del Bicentenario de El Ilustrador Nacional"

Toluca de Lerdo, México a
11 de Abril de 2012
C.M.L.A.L.M/DIR/217B50061/ 1671 /2012

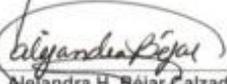
Acta Informativa

Siendo las 10:00 horas del día 27 de Marzo de 2012, reunidos en el Aula 2 de la Subdirección de Enseñanza e Investigación, el Subcomité de Enseñanza, Investigación y Ética procedemos a revisar el protocolo de tesis: "**CUANTIFICACIÓN DE CARBAMAZEPINA E IDENTIFICACIÓN DE SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN AGUA RESIDUAL PROVENIENTE DE UN HOSPITAL POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**" realizado por la Q.F.B. ADRIANA Y. MARTÍNEZ GARAY el cual ha sido **APROBADO** por decisión unánime.

Se da por terminada la reunión siendo las 10:30 horas del día 27 de Marzo de 2012. Firmando al calce los integrantes del Subcomité de Enseñanza, Investigación y Ética de este Centro Médico


Dr. José Rogel Romero
Director del Centro Médico


Dra. Yolanda Flores Cánovas
Subdirectora de Enseñanza e Investigación
Secretaría del Subcomité de Enseñanza e Investigación.


Lic. Alejandra H. Béjar Calzada
Jefa de la Unidad de Calidad
Coordinadora del Subcomité de Enseñanza e Investigación.


Dr. Jorge Javier Ramírez García
Director de Tesis.



SECRETARÍA DE SALUD DEL ESTADO DE MÉX
INSTITUTO DE SALUD DEL ESTADO DE MÉX
COORDINACIÓN DE HOSPITALES REGIONALES DE ALTA ESPECIALIDAD
CENTRO MÉDICO "LIC. ADOLFO LÓPEZ MATEOS"

ACTA INFORMATIVA DEL SUBCOMITÉ DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y ÉTICA DEL ESTADO DE MÉXICO. C.F. 0012

7.3 CARACTERIZACIÓN DEL ESTÁNDAR Y MEDICAMENTO GENÉRICO

Se realizó la caracterización del estándar de CBZ Lote: 061M1687V conforme a la USP 26 pág. 324-325. Esto con el fin de identificar a la carbamazepina con las siguientes pruebas.

-Apariencia: Tanto el estándar como el medicamento genérico corresponden a un sólido blanco

-Identidad por UV: Ambos presentan las mismas bandas de absorción, que se observan en la Figura 11. Para esta prueba se preparó una solución de 4 mg/L del estándar y del medicamento y se leyeron en el equipo Lambda 25 UV-VIS.

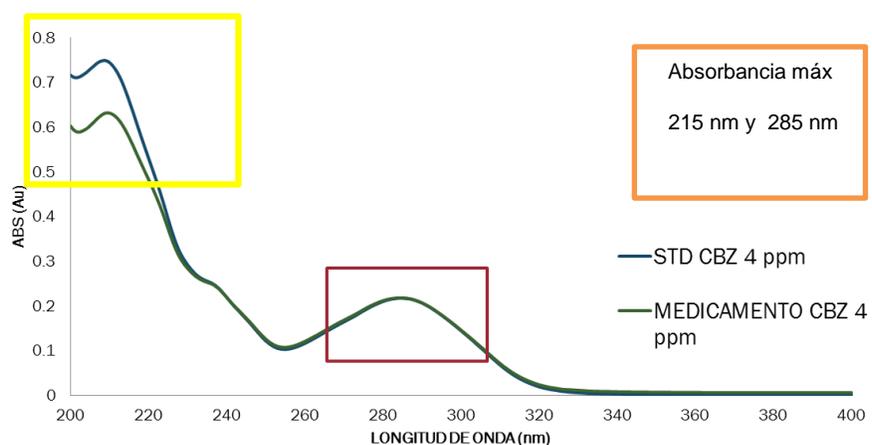


Figura 11. Espectro de luz UV-VIS de estándar y medicamento de CBZ de 4 mg/L en metanol

-Identidad por IR: En la Figura 12 se presenta el análisis de las bandas de absorción del espectro de IR, tanto de la región de sus grupos funcionales característicos como de la región de la huella dactilar del estándar. Esta técnica tiene aplicación para especies moleculares en las cuales existen pequeñas diferencias de energía entre los estados vibracionales y rotacionales.

Para absorber radiación en el infrarrojo, una molécula debe sufrir un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de rotación o de vibración. De esta forma el campo eléctrico alterno de la radiación puede interaccionar con la molécula y provocar cambios en la amplitud de alguno de sus movimientos. La carbamazepina es una molécula adecuada para ser analizada por esta técnica, ya que en su estructura contiene dobles enlaces que le proporcionan cambios dipolares y por lo tanto absorben radiación infrarroja.

En esta prueba se evaluó el espectro de infrarrojo del estándar de CBZ, para identificar las bandas características de la molécula de CBZ, con lo reportado en bibliografía. En este caso se identificó el grupo amida, arilo y el doble enlace, que corresponden con la estructura química mostrada en la Figura 12.

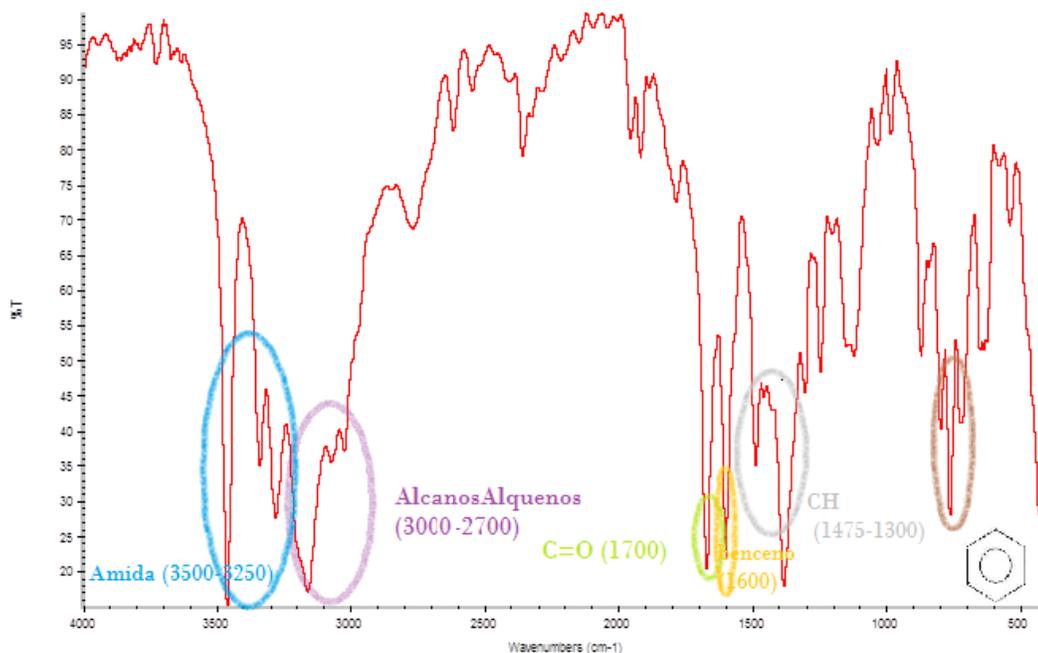


Figura 12. Espectro de IR del estándar de carbamazepina

-Lectura de pH: La literatura informa que la carbamazepina es un compuesto neutro, en la Tabla 7 se muestran resultados de pH tanto del estándar como del medicamento, donde ambos pH son iguales.

Tabla 7. Lectura de pH de la solución estándar y el medicamento générico a 23.5°C ± 0.2.

	Solución estándar	Solución del medicamento
Temperatura (°C)	23.3	23.7
Lectura de pH	7.44	7.45

7.4 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE COLUMNAS CROMATÓGRAFICAS (ADECUABILIDAD DEL SISTEMA)

Se evaluaron diferentes columnas para optimizar las condiciones de separación las cuales fueron: X- Terra C18 5µm 4.6 x 250mm, µBondapack C18 5µm 3.9 x 300 mm Waters, Bonclone C18 10µm 3.9 x 300 mm Phenomenex, Symmetry C18 5 µm, 3.0 x 250 mm Waters. Se evaluó la siguiente fase móvil: metanol: agua en diferentes proporciones de metanol: agua (50:50, 60:40 y 70:30) La proporción de metanol: agua (70:30) fue la proporción que se eligió, debido a que presentó un menor tiempo de análisis, forma del pico más afilado y mayor respuesta. En cuanto a las columnas, las primeras dos se descartaron debido a que en la primera el tiempo de retención era de 15 min y en la segunda no se observaba el pico de la CBZ. Las otras dos columnas fueron las que presentaron buenos resultados para el análisis de la CBZ (Tabla 8), Se inyectó por triplicado una solución de CBZ de 150 µg/L obteniendo los parámetros cromatográficos como: tiempo de retención, área, altura, número de platos teóricos (N), factor de

capacidad (k') y coeio (ver fórmulas para los cálculos en el apartado de 2.13 de validación).

Tabla 8. Parámetros cromatográficos como: tiempo de retención, área, altura, respuesta, número de platos teóricos (N), factor de capacidad (k') y factor de coeio

COLUMNA	TR	N	k'	Coeio	Área	Altura
Bondclone 10 μm C ₁₈ , 300 x 3.9 mm phenomenex	4.6 \pm 0.2	19972	0.55	1.05	31213	2651
Symmetry C ₁₈ 5 μm 3.0 x 250mm Waters	3.6 \pm 0.2	7999	1.27	1.14	67363	6572

7.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se evaluó la linealidad del método, la exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación y robustez, a continuación se muestran los resultados del estudio, los cuales cumplen con los criterios de aceptación de acuerdo a “The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ICH la guía Q2 (R) Validation of Analytical Procedures: Methodology”. que para la relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada utilizando el método de estimación de mínimos cuadrados la r^2 es mayor a 0.990 y una %DER del porcentaje de recobro, no mayor al 2%. La Figura 13 muestra las gráficas de la concentración & la respuesta analítica

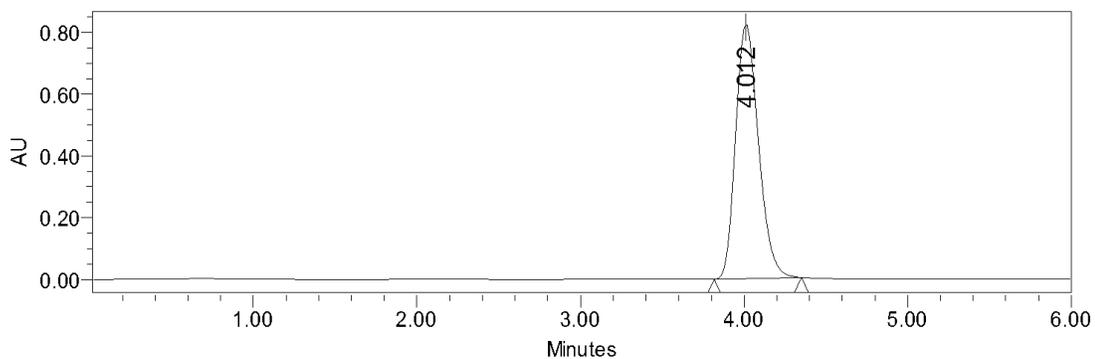


Figura 13. Cromatograma de la CBZ (10 mg/L), columna Symmetry C₁₈ 5µm 3.0 x 250 mm Waters y fase móvil metanol: agua (70:30)

7.5.1 Verificación del Límite de detección y de cuantificación

Se prepararon distintas soluciones de mayor a menor concentración a fin de encontrar la concentración de CBZ que nos proporcione una relación señal/ruido de alrededor de 3 para el DL y de 10 para el QL. Se calculó la s/n encontrándose en un rango de valor de 3-5 para el DL y de 8-13 para el QL (ver Tabla 9).

Tabla 9. Relación señal/ruido para DL y QL de CBZ

	CBZ S/N	
	QL	DL
1	13.0	5.0
2	10.6	3.3
3	9.0	4.0
4	10.6	
5	8.0	
6	9.0	

7.5.2 Linealidad de la CBZ

Se determinó la linealidad del método analítico, analizando diez soluciones estándar de concentraciones entre (2.5 a 10000 µg/L), preparadas a partir de dos soluciones stock. Cada solución estándar se inyectó una vez. En la Figura 14 se muestra la ecuación de la linealidad.

STD	LOTE	PUREZA %
Carbamazepina	061M1687V	99.96

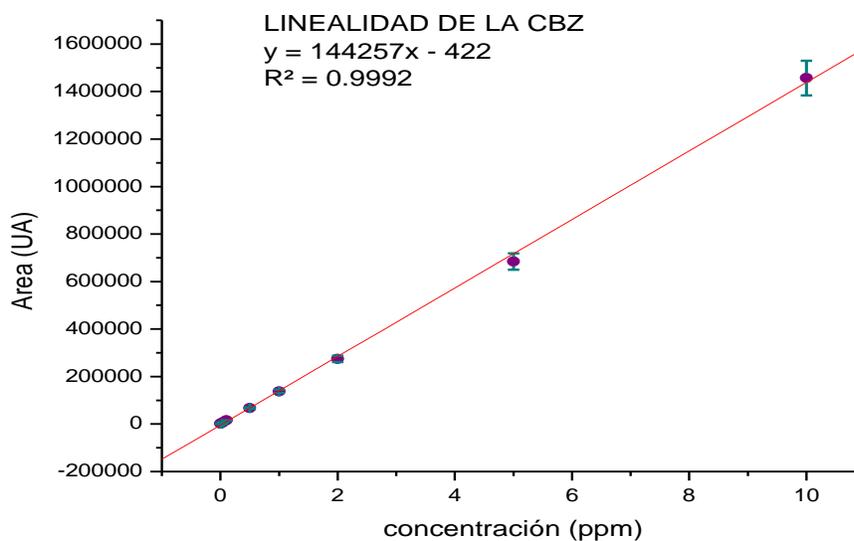


Figura 14. Linealidad de la carbamazepina

Conclusión:

- La regresión lineal demuestra la aceptación del método en un intervalo de concentración de 2.5– 10000 µg/L para la CBZ.
- La $r^2 = 0.9992 > 0.990$.

7.5.3 Verificación del límite de cuantificación de la linealidad para la CBZ (Desviación de la linealidad)

Esta prueba se realizó para saber que tanto se desviaba el valor teórico del experimental, es decir es una prueba de la exactitud del método analítico. En la Tabla 10 se observa que la desviación es de 1.2%

Tabla 10. Verificación de la desviación de la linealidad para la concentración del QL.

Inyección	Área	Concentración (mg/L)	Concentración calculada	% Desviación
1	2569.00	0.027	0.029	108.40
2	2477.00	0.027	0.028	103.01
3	2392.00	0.027	0.026	98.04
4	2491.00	0.027	0.028	103.83
5	2482.00	0.027	0.028	103.31
6	2263.00	0.027	0.024	90.48
Promedio	2445.67			101.18
Desv. std	105.66			
%DER	4.32			

Conclusión:

- El promedio de desviación se encuentra dentro de 70-130 % (calculado con exactitud)
- La desviación estándar relativa (DER) de las áreas de la CBZ es menor a 15.0% para concentraciones menores a 50 mg/L.
- El límite de cuantificación (QL) para la CBZ es de 2.5 µg/L

7.5.4 Precisión

7.5.4.1 Repetitividad del sistema

Una preparación del Estándar de CBZ Lote: 061M1687V a una concentración de 1 mg/L, fue inyectada 6 veces, en la Tabla 11 se muestran las áreas y tiempos de retención de las 6 inyecciones.

Tabla 11. Repetitividad del sistema a 1 mg/L

CBZ de 1 mg/L		
Inyección	Área	TR
1	67087	4.611
2	64046	4.610
3	69041	4.661
4	65125	4.612
5	66962	4.625
6	67425	4.614
Promedio	66614	4.63
Desv. std	1772.27	0.03
%DER	2.66	0.63

Conclusión:

- %DER de áreas es menor a 15.0% para concentraciones menores a 0.05% (50 mg/L)
- %DER para TR es menor a 5.0%

7.5.4.2 Repetitividad del método

Seis preparaciones de una muestra de afluente de agua residual muestreada el día 06-03-13, fueron inyectadas una vez cada preparación. Esta prueba es para evaluar la repetitividad del método en muestras reales de agua residual (ver resultados en Tabla 12).

Tabla12. Repetitividad del método con agua residual hospitalaria

Muestra afluente (06-03-13)	Área	TR (min)	Cantidad presente en la muestra ($\mu\text{g/L}$)
1	7193	3.958	7.91296
2	7205	3.941	7.92128
3	7426	3.951	8.07448
4	7266	4.001	7.96357
5	7341	4.005	8.01556
6	7412	3.966	8.06477
Promedio	7307	3.970	7.992
Desv. Std	101	0.027	0.070
%DER	1.4	0.67	0.88

Conclusión:

- %DER de áreas es menor a 15.0% para concentraciones menores a 0.05% (50 mg/L)
- %DER para TR es menor a 5.0%

7.5.5 Precisión Intermedia

La reproducibilidad del método está demostrada por el análisis de acuerdo al método relevante. Se analizó una solución de estándar de CBZ de una concentración de 1 mg/L, con seis preparaciones diferentes. La prueba se realizó en dos días diferentes y por dos analistas distintos. En la Tabla 13 se muestran los resultados encontrados:

Tabla13. Reproducibilidad del método a 1 mg/L

Nombre	ÁREA		% Diferencia
	Día 1	Día 2	
CBZ	69356	61896	0.108
	69069	60826	0.119
	70102	61906	0.117
	69662	61421	0.118
	70999	60289	0.151
	69880	62036	0.112

Conclusión:

La diferencia en las áreas de carbamazepina es menor a 2.0%

7.5.6 Exactitud

7.5.6.1 Desviación de la linealidad

Los resultados de las pruebas de desviación de la linealidad fueron preparadas nueve soluciones estándar a tres niveles de concentración (0.25, 0.5, y 1 mg/L) y se calculó la concentración experimental conforme a la ecuación de la regresión lineal ($y = 144257x - 4222$).

Cada desviación se calculó de acuerdo a la ecuación 14:

$$\% \text{ Desviación} = C_{EXP} * 100 / C_{TEO} \dots \dots \dots (17)$$

Dónde:

C_{EXP} = Concentración experimental

C_{TEO} = Concentración teórica

A continuación se presentan los resultados en la Tabla 14, con la desviación de la linealidad a las diferentes concentraciones probadas:

Tabla 14. Desviación de la linealidad a concentraciones de 0.25, 0.5 y 1.0 mg/L

	Concentración (mg/L)		
	0.25	0.5	1.0
Inyección	% Desviación		
1	98.26	98.86	92.75
2	108.44	94.65	91.71
3	101.12	101.57	91.21
Promedio	102.61	98.36	91.89

Conclusión:

- La desviación de la concentración calculada respecto a la conocida es $\leq 20.0\%$, por lo tanto la exactitud del método es aceptable para las tres concentraciones de carbamazepina probadas.

7.5.6.2 Recobros

La Exactitud del método se evaluó por medio de recobros a diferentes concentraciones comprendidas dentro del rango estudiado. Se prepararon soluciones blanco por triplicado de las concentraciones probadas para los recobros (0.25, 0.5, 0.75, 1 y 2 mg/L). En un matraz aforado de 200 mL se colocó el volumen necesario de una solución de CBZ de 100 mg/L y se aforo con agua deionizada. Esto con la finalidad de conocer el área teórica de cada concentración.

A 200 mL de muestra de agua residual ya una vez filtrada (afluente y efluente), se le adicióno la cantidad correspondiente (Tabla 15) partiendo de una solución de CBZ de 100 mg/L, preparada el día del análisis. Posteriormente se continuó con el proceso de extracción en fase sólida.

Tabla 15. Diluciones tomadas de una solución de 100 mg/L y las concentraciones finales para el cálculo de la exactitud del método

Dilución	Concentración final (mg/L)
0.5	0.25
1.0	0.5
1.5	0.75
2.0	1
4.0	2

El porciento de recobro se calculó con la siguiente ecuación 15:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{A_{EXP}}{A_{TEO}} * 100 \dots \dots \dots (18)$$

Dónde:

A_{EXP} = Área experimental

A_{TEO} = Área teórica

A continuación en la Tabla 16 se muestran los recobros con 200 mL de muestra de agua residual a diferentes fechas de muestreo y a diferentes concentraciones.

Tabla16. % de Recobro a diferentes concentraciones y diferentes muestras de agua residual hospitalaria

	Recobro %					
Fecha	28/05/2013	31/05/2013	03/06/2013	05/06/2013	16/05/2013	16/05/2013
Concentración (mg/L)	0.25	0.5	0.5	0.75	1	2
Afluente	100.44	80.72	88.07	104.3	98.47	95.88
Efluente	105.9	82.67	93.61	108.71	114.44	108.99

Conclusión:

- Para las 5 concentraciones de recobros probados el promedio de recobro se encuentra entre 80-120 % calculado con exactitud.
- La tendencia es a recuperar mayor cantidad de analito en el efluente debido a que es la muestra de agua que ya ha recibido un tratamiento y por lo tanto es más limpia y con menor interferencia de matriz que el afluente.

7.5.7 Robustez

La robustez de un método analítico es una medida de la capacidad para mantenerse sin afectaciones por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método durante el uso normal.

Una solución de 2 mg/L de carbamazepina se leyó en el cromatógrafo de líquidos bajo distintas condiciones como se muestra en la Tabla 17:

Tabla 17. Modificaciones al método para la prueba de Robustez

Prueba	Variable	Condición original	Modificación
1	Fase Móvil	Metanol : Agua (70:30) v/v	Metanol : Agua (75:25) v/v
			Metanol : Agua (65:35) v/v
2	Flujo	0.5 mL/min	0.4 mL/min
			0.6mL/min

Estos son los resultados de respuesta en áreas de carbamazepina obtenidas con las condiciones originales de operación (ver Tabla 18), con la columna Symmetry C18 5 mm 3.0 x 250 mm Waters y fase móvil metanol: agua (70:30 v/v):

Tabla 18. Condiciones originales de operación

Nombre	RT (min)	Área	¹ T
CBZ	4.197	129580	1.15
	4.161	128075	1.16
	4.167	127358	1.14

¹T (Factor de coeio)

En la Tabla 19, se muestran los resultados de robustez de fase móvil metanol: agua 65:35 y 75: 25 v/v, respectivamente.

Tabla 19. Robustez de proporción de fase móvil

Metanol: Agua (65:35 v/v)		
RT (min)	Área	T
6.024	121289	1.14
6.023	128749	1.15
6.022	122620	1.14
Metano: Agua (75: 25 v/v):		
3.272	124402	1.17
3.268	123761	1.15
3.267	122786	1.15

Conclusión:

- Al cambiar la fase móvil original (70: 30) por la modificada (65:35), solo se afecta el tiempo de retención del analito, al contener mayor cantidad de fase acuosa, el tiempo de retención aumenta, esto es que el analito de interés tarda mayor tiempo en eluir de la columna por su menor afinidad por el agua. El caso contrario ocurre al aumentar el % de metanol en la fase móvil, haciendo que la carbamazepina eluya con mayor rapidez. Las áreas en los diferentes casos se mantienen constantes.
- El tiempo de retención para la CBZ observado en el cambio de proporción de fase móvil (65:25 y 75:25 de metanol: agua respectivamente) es mayor a $\pm 20\%$ respecto al obtenido bajo condiciones originales, por lo tanto no es robusto este cambio.

A continuación en la Tabla 20 se muestran los resultados obtenidos con el cambio de flujo de 0.4 y de 0.6 mL/min:

Tabla 20. Robustez de flujo de fase móvil

Flujo 0.4 mL/min		
RT (min)	Área	T
4.851	124581	1.2
4.856	123175	1.25
4.854	126354	1.22
Flujo 0.6 mL/min		
3.721	124121	1.12
3.784	127895	1.14
3.754	127365	1.13

Conclusión:

- El tiempo de retención de la CBZ observado en el cambio de Flujo de la fase móvil (0.4 y 0.6 mL/min) es menor \pm 20% respecto al obtenido bajo condiciones originales, por lo tanto es robusto este cambio.

7.6 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN POR ESPECTROSCOPIA DE LUZ UV-VIS y HPLC

Como se comentó en el apartado 6.6 de metodología, al inicio del experimento se realizaba el seguimiento de la degradación por espectroscopia de luz UV-VIS, pero resulto ser una técnica poco sensible y para corregir esto, se buscó una técnica analítica más sensible que nos permitiera realizar la cinética de degradación con mayor exactitud. En las figuras 15 y 16 se muestran los espectros de luz UV-VIS para la luz solar y luz UV respectivamente, donde podemos observar una disminución en el espectro de absorción hasta el cuarto día, pero en el quinto día la absorción aumenta y comienzan a distorsionarse los espectros de absorción posiblemente porque sus productos de degradación de la CBZ absorben energía en la misma longitud de onda que la CBZ.

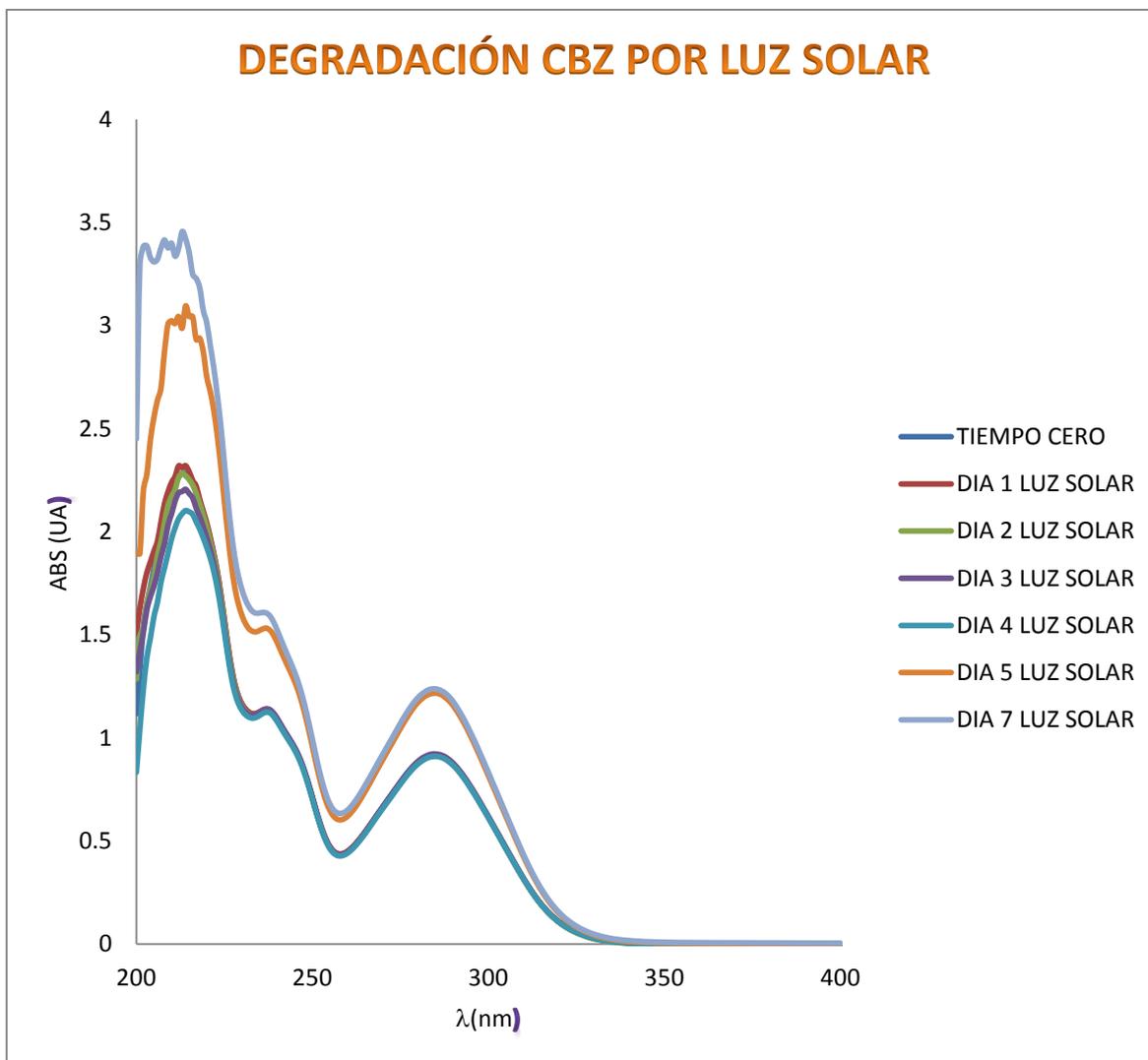


Figura 15. Espectros de luz UV-VIS para la degradación de CBZ por luz solar, seguida por un periodo de 5 días.

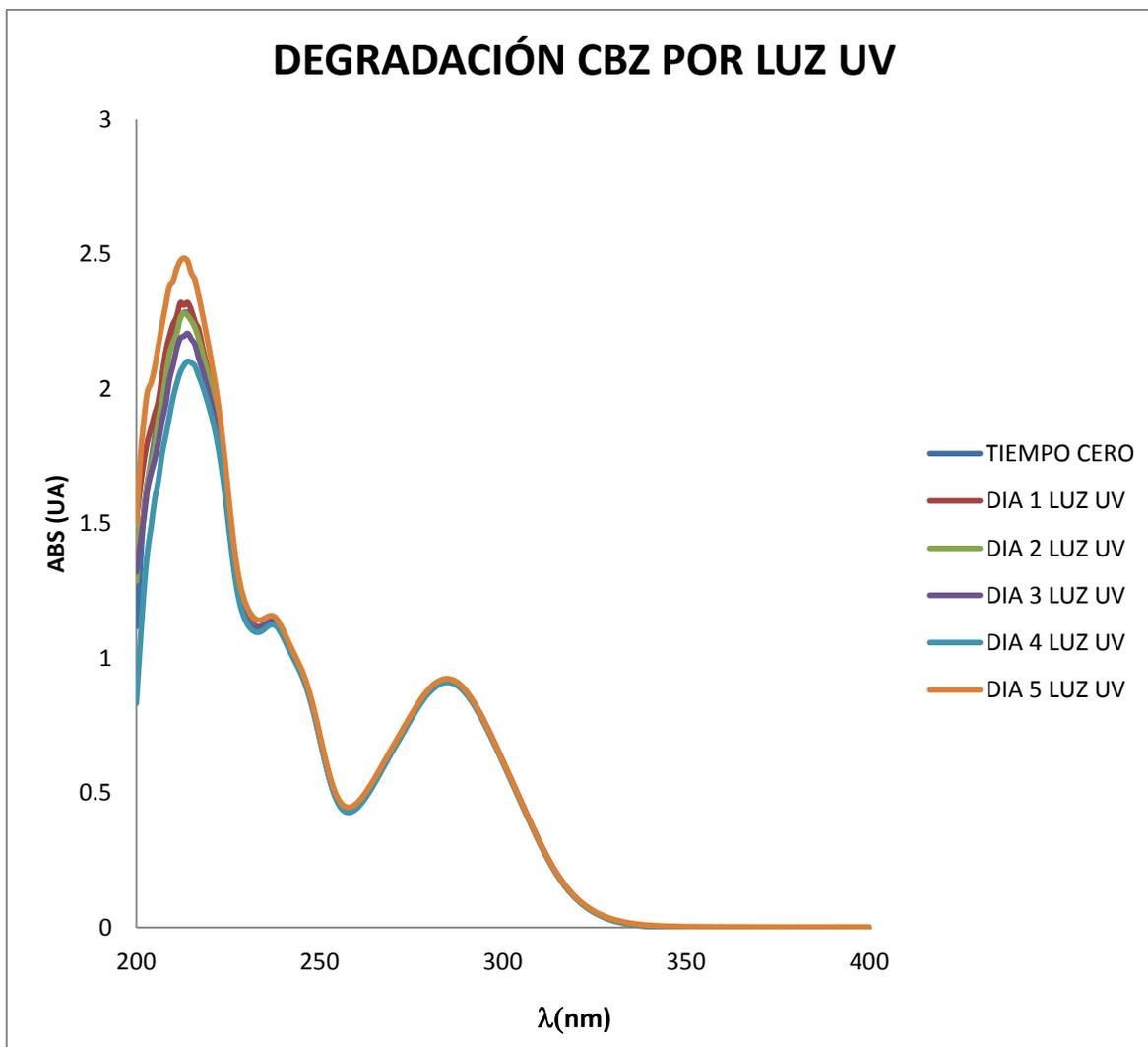


Figura 16. Espectros de luz UV-VIS para la degradación de CBZ por luz UV, seguida por un periodo de 5 días.

7.6.1 LUZ SOLAR

La solución de CBZ de 10 mg/L para irradiar se preparó el día 20-08-12, obteniéndose el siguiente cromatograma de un blanco de metanol: agua (70:30) (Figura 17 (a)) seguido de un cromatograma de la CBZ a un tiempo inicial con una pureza de 99.84% (Figura 17 (b)). Esta pureza obtenida corresponde con la

reportada en el certificado de análisis de Sigma-Aldrich del estándar de CBZ Lote: 061M1687V, en el cual se reporta una pureza de 99.8%.

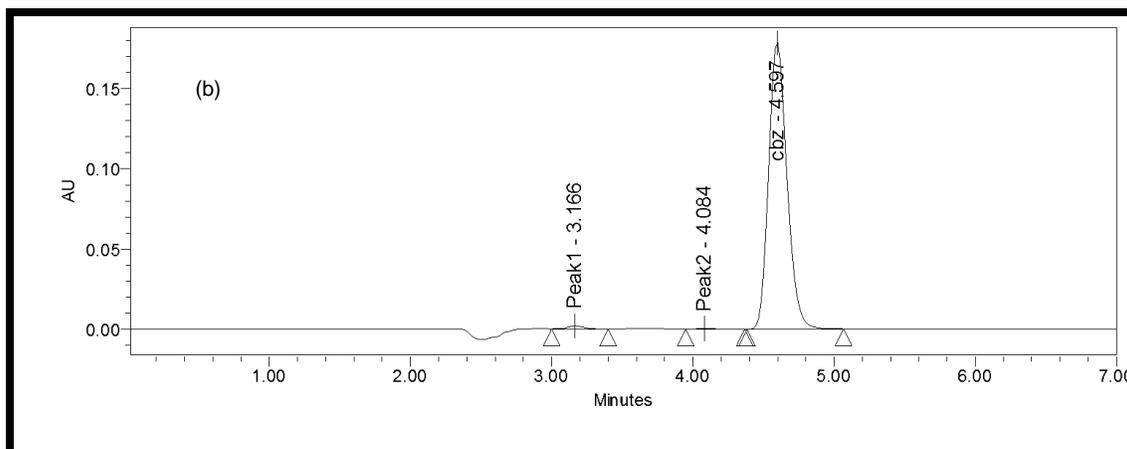
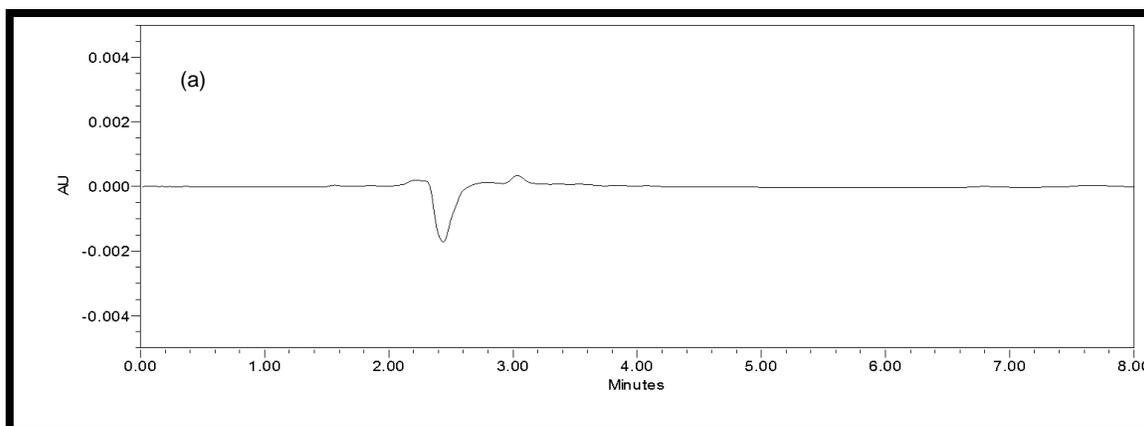


Figura 17. Cromatograma de la solución blanco (a) y de CBZ tiempo inicial preparada el día 20-08-12, pureza de 99.84% (b)

Una vez expuesta esta solución de CBZ de 10 mg/L a luz solar, se leyó con el cromatografo de líquidos semanalmente, hasta un periodo de 253 días (31 semanas). En la Figura 18 se muestra un cromatograma de la solución de CBZ tras 56 días de exposición a luz solar, disminuyendo solo un 8.62% respecto al porcentaje inicial de CBZ a un tiempo inicial.

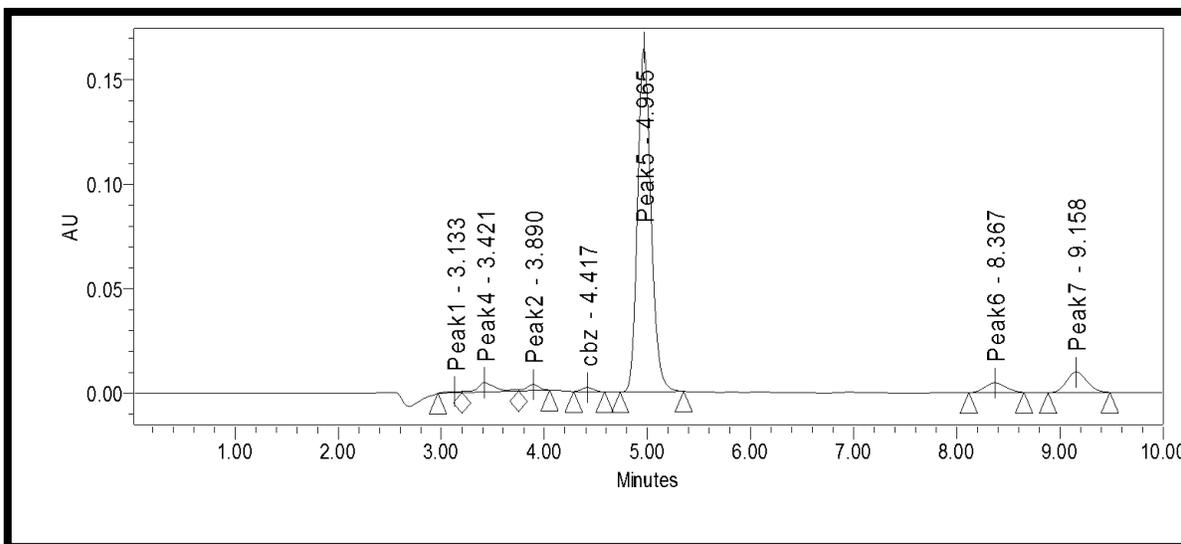


Figura 18. Cromatograma de la solución de CBZ de 10 mg/L tras 56 días de exposición a luz solar, pureza 91.22%

Con los datos obtenidos durante el tiempo de exposición, se graficó logaritmo natural de la concentración contra el tiempo en días. Hallándose una cinética de degradación de primer orden esto significa que la reacción depende de la concentración de un solo reactante, que se descompone en uno o más productos de degradación y la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de la droga. El tiempo de vida media se extrapoló de la ecuación obtenida en la cinética de degradación por luz solar a una concentración de 5 mg/L, obteniéndose un tiempo de vida media de 194.73 días.

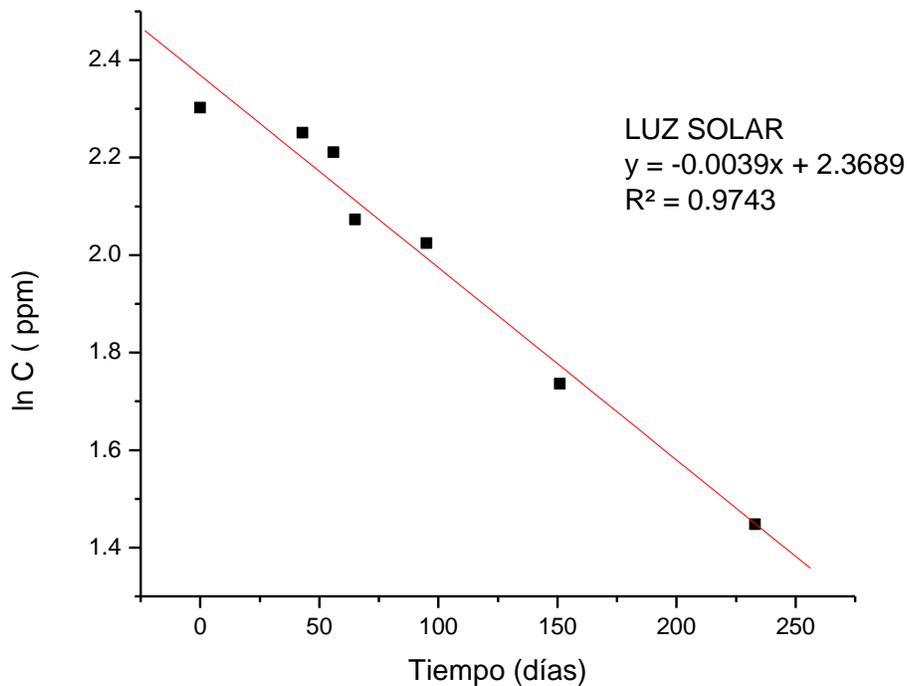


Figura 19. Cinética de degradación de primer orden por luz solar de la carbamazepina.

$k = 0.0039 \text{ días}^{-1}$, $t_{1/2} = 194.73 \text{ días}$.

Podemos decir que bajo estas condiciones de degradación con luz solar la CBZ se degrada muy lentamente en comparación con otros fármacos por lo tanto se concluye que la carbamazepina es un fármaco muy persistente. La cinética de degradación se ajustó a un modelo matemático de primer orden dado que al comprobar diferentes órdenes de reacción el primer orden fue el que presentó una r^2 más cercana a uno. Y como se mencionó en el artículo de investigación ya se ha obtenido el mismo orden de reacción en otros estudios (10).

7.6.2 LUZ UV

El experimento con luz UV se llevó a cabo como se menciona en el apartado de metodología en la sección de degradación por luz UV. Y se leyó en el cromatógrafo de líquidos (ver Figura 20), de la misma forma que con la solución de luz solar.

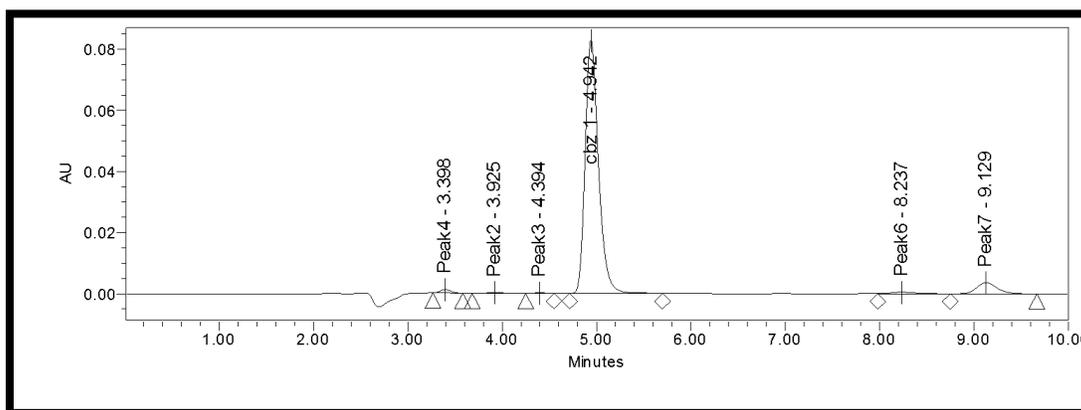


Figura 20. Cromatograma de la solución de CBZ de 10 mg/L tras 43 días de exposición a luz UV, pureza 91.44%

La cinética de degradación calculada fue de primer orden y los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Figura 21.

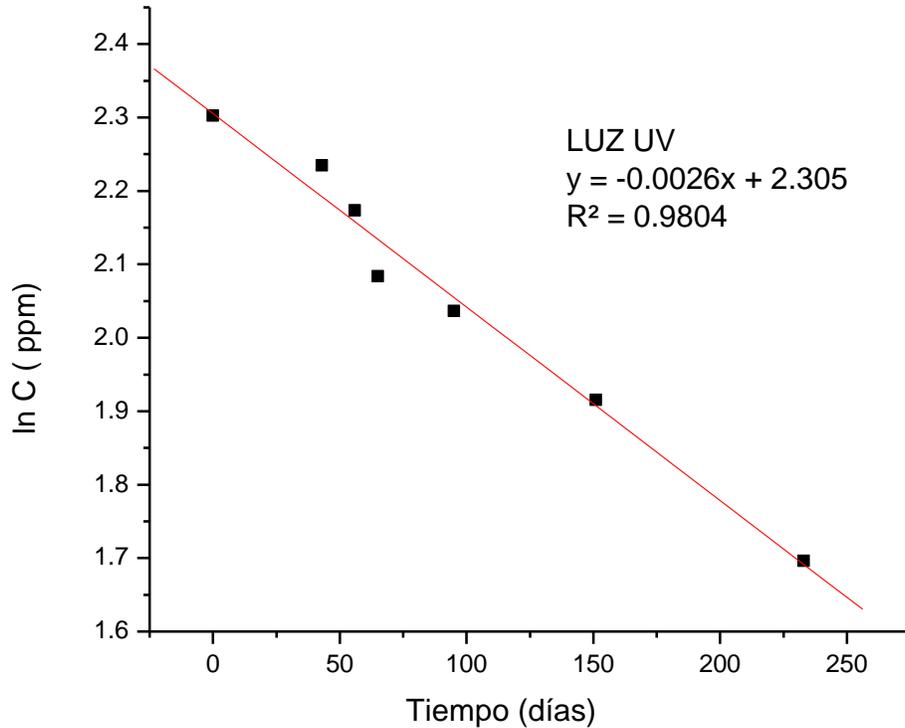


Figura 21. Cinética de degradación de primer orden por luz UV de la carbamazepina. $k=0.0026 \text{ días}^{-1}$, $t_{1/2}=267.56 \text{ días}$

Con lo anterior mencionado se observa un tiempo de vida media de eliminación menor en la solución de CBZ expuesta a luz solar 194.73 días que la de luz UV 267.56 días. Más adelante en el apartado de Análisis estadístico se discute más ampliamente el por qué la variación de resultados entre luz solar y luz UV.

7.7 CUANTIFICACIÓN DE LA CARBAMAZEPINA DEL AGUA RESIDUAL HOSPITALARIA

Se realizaron 11 muestreos en el periodo de enero-junio del 2013 en la planta de tratamiento de agua residual del “Centro Médico Adolfo López Mateos”. La cuantificación de la carbamazepina se hizo por estándar externo con base a la ecuación de la recta obtenida en la prueba de linealidad. A continuación se presenta en la Tabla 19 las concentraciones cuantificadas de carbamazepina en el agua residual (afluente y efluente) y su respectiva fecha de muestreo:

Tabla 21. Concentraciones promedio encontradas en el afluente y efluente del “Centro Médico Adolfo López Mateos” en µg/L

Fecha de muestreo	Concentración de CBZ (µg/L)	
	Afluente	Efluente
23/01/2013	49.29	<LD
06/03/2013	7.68	4.40
13/03/2013	3.69	<LD
20/03/2013	41.74	4.68
03/04/2013	8.32	4.06
09/04/2013	55.83	<LD
16/05/2013	36.25	3.20
28/05/2013	3.25	3.11
31/05/2013	7.70	3.33
03/06/2013	15.68	5.15
05/06/2013	20.14	4.15

A continuación se muestran algunos cromatogramas típicos de Efluente y Afluente de agua residual (ver Figura 22).

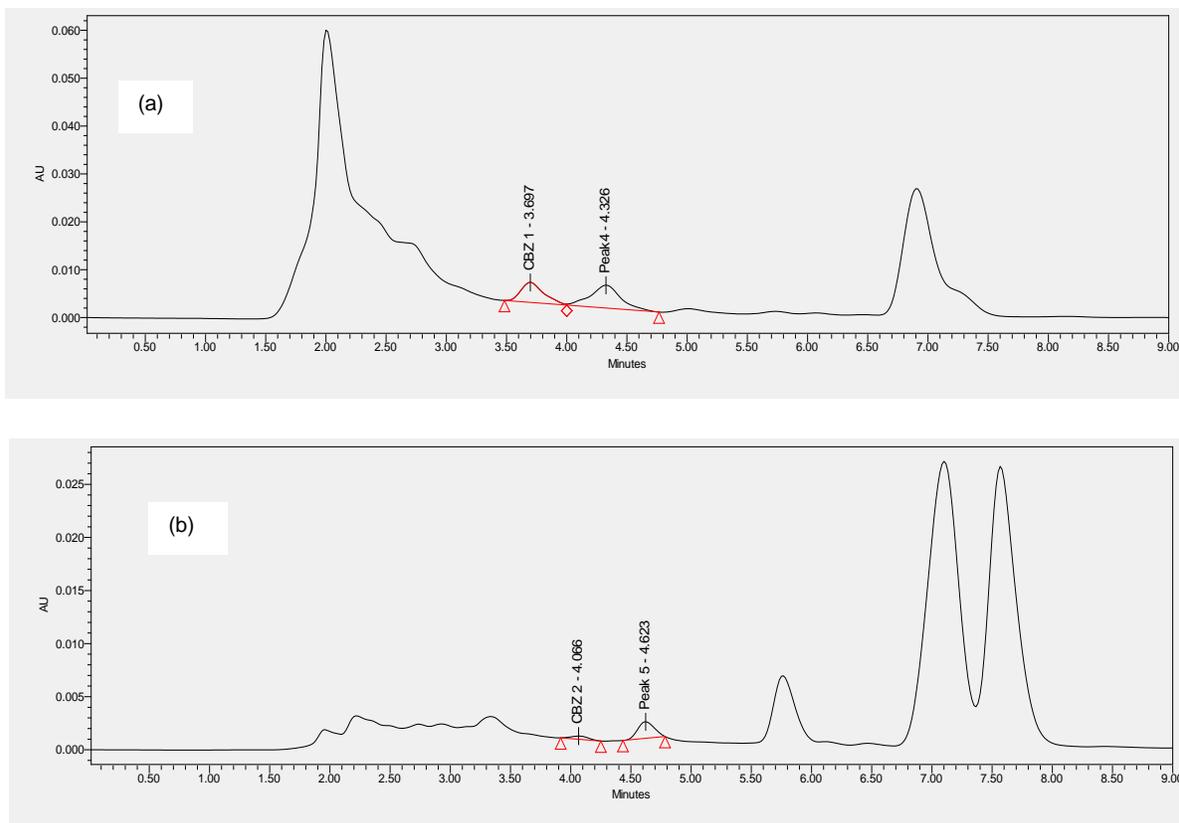


Figura 22. Cromatograma de Afluente (a) y Efluente (b) de agua residual muestreado el día 13-03-13.

7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza de dos factores con la ayuda del programa SPSS 17 para evaluar si existían diferencias significativas entre los dos tratamientos que corresponden a los tipos de fotodegradación (luz solar y luz UV) con respecto al tiempo (en semanas) influía sobre la variable de respuesta (concentración) con un nivel de confianza de 95%.

A continuación se presenta la Tabla 22 correspondiente al análisis de varianza (ANOVA), donde los valores de P para el para todos los casos son menores a 0.05 y por lo tanto indican que existen diferencias significativas entre la luz solar y la luz

UV para la concentración de la CBZ y de igual forma el tiempo si influye sobre la variable de respuesta (concentración).

Tabla 22. Datos de ANOVA para el diseño experimental de dos factores

Tests of Between-Subjects Effects

Variable dependiente::Concentración

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F ₀	Valor P.
Modelo corregido	601.264 ^a	63	9.544	1152.214	0.000
Intercepto	10175.300	1	10175.300	1228445.021	0.000
Radiación	10.609	1	10.609	1280.842	0.000
Tiempo	572.383	31	18.464	2229.122	0.000
Radiación * Tiempo	18.271	31	0.589	71.1550	0.000
Error	1.060	128	0.008		
Total	10777.624	192			
Total Corregido	602.324	191			

a. $R^2 = 0.998$ (R^2 ajustada = 0.997)

GL (grados de libertad)

F₀ (distribución)

En la Figura 23 podemos apreciar que los valores medios para la luz solar y luz UV no se sobreponen son diferentes en ambos casos y con esto se comprueba nuevamente que si existen diferencias significativas en la luz solar y la luz UV a un nivel de confianza de 95%. También se observa que el tiempo si influye para la disminución de CBZ, presentando diferencias significativas.

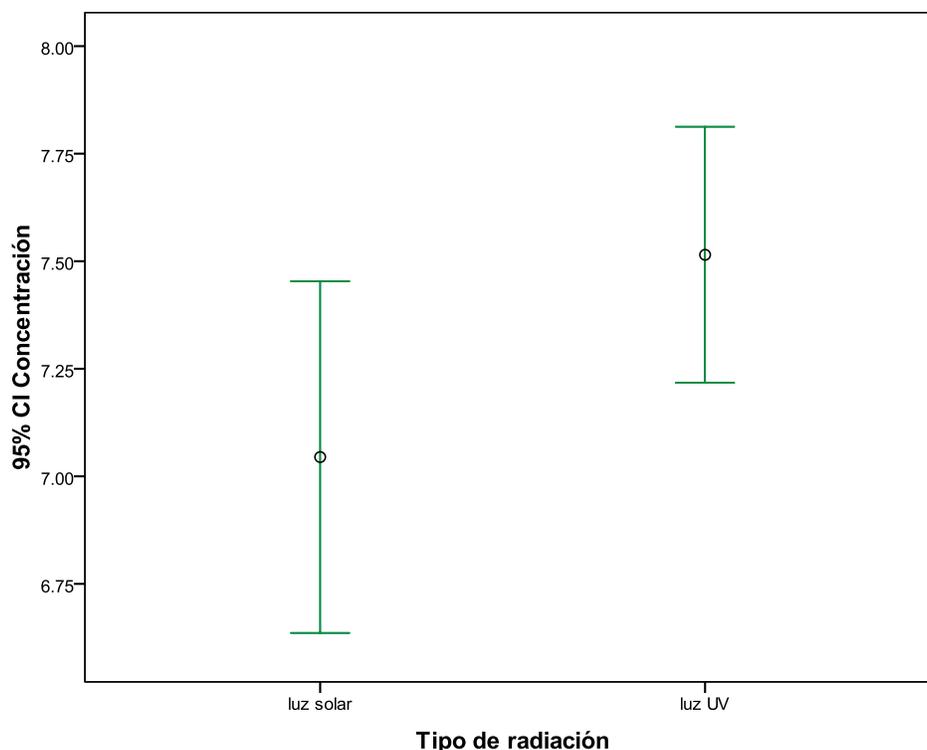


Figura 23. Valor medio para los dos tipos de fotodegradación, correspondientes a luz solar y luz UV. A un nivel de confianza de 95%.

En la gráfica de cajas podemos visualizar el valor mínimo, máximo, el valor intermedio, el 25% de los datos así como también el 75%, para cada dato obtenido de cada semana donde se fue midiendo la disminución en la concentración de CBZ para luz solar (Figura 24). Este tipo de gráfico me indica que la luz solar es más eficiente que la luz UV, ya que en el mismo tiempo de experimentación la luz solar logra menor concentración de la CBZ. Inclusive cuando la luz solar fue con periodos de luz oscuridad natural (aproximadamente 8-9 horas de sol) y la luz UV permaneció todo el tiempo de análisis (8 meses continuos sin interrupción). Este resultado se le atribuye a que la luz solar aparte de radiación UV contiene calor lo cual ayuda a degradar compuestos orgánicos con mayor facilidad. De igual manera se observa menor dispersión de los datos en

la luz UV, la luz solar demuestra mayor dispersión y por lo tanto una menor concentración de CBZ en el mismo tiempo de análisis.

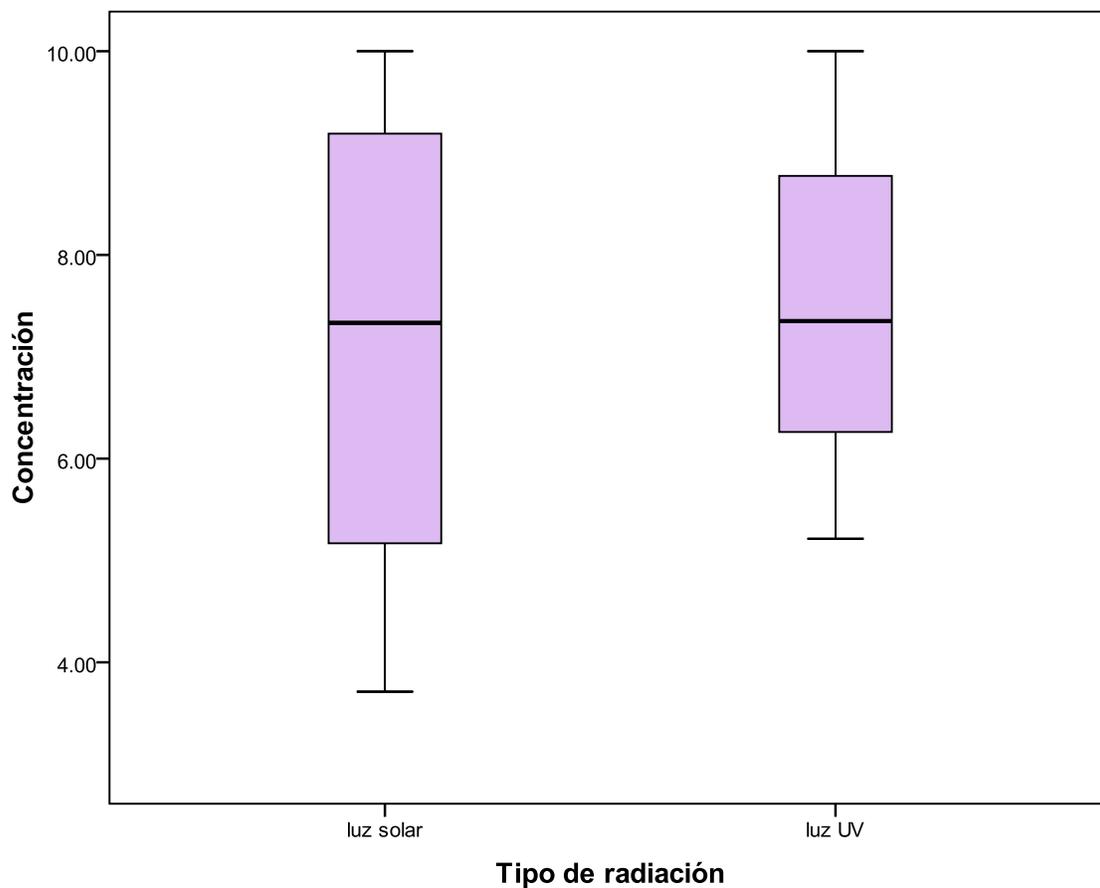


Figura 24. Representación de caja para luz solar y luz UV contra la variable de respuesta concentración. A un nivel de confianza de 95%.

7.9 CONSUMO DE CARBAMAZEPINA EN PACIENTES DE HOSPITALIZACIÓN

Se solicitó por último al Director del Centro Médico Adolfo López Mateos, información acerca de la cantidad de carbamazepina administrada a pacientes hospitalizados durante el periodo de muestreo en la planta de tratamiento de dicho lugar (abril – junio). Así como el número de pacientes hospitalizados, esto con el fin de mostrar un panorama acerca del el número de pacientes, la cantidad administrada de CBZ y la encontrada en el agua residual. Es difícil el poder relacionar estas variables dado que es imposible el tener las mismas variables que influyen en la cantidad encontrada en el agua residual en dos días distintos porque el número de pacientes es diferente, la cantidad de agua utilizada por el hospital de igualmente varia, así como otros factores que influyen.

Tabla 23. Cantidad administrada de CBZ a pacientes de hospitalización

Fecha del muestreo	Cantidad administrada de CBZ (mg)	No. de pacientes, promedio por día	Concentración de CBZ (mg/L)
03/04/2013	5600	174	0.00830
09/04/2013	2000	174	0.05583
16/05/2013	1600	159	0.03625
28/05/2013	2400	159	0.00325
31/05/2013	600	159	0.00770
03/06/2013	800	143	0.01568
05/06/2013	2000	143	0.02014

8. CONCLUSIONES

- ❑ La cromatografía de líquidos de alta resolución es un método más sensible para el seguimiento de la degradación de la carbamazepina, que la espectrofotometría de luz UV-VIS.
- ❑ Se logró optimizar y validar la técnica analítica para la cuantificación de la CBZ y el seguimiento de la degradación, presentando una adecuada exactitud, precisión, repetitividad y linealidad en un rango de 2.5 –10 000 µg/L. De acuerdo con la ICH (guías Q2A y Q2B), entra dentro de especificaciones.
- ❑ Se comprobó que la carbamazepina es un fármaco persistente en el ambiente y no biodegradable, al determinar su tiempo de vida media de **194.73 días** para luz solar y de **267.56 días** para luz UV. Y determinando que entre la luz solar y UV si existen diferencias significativas para la disminución en la concentración de la CBZ, de igual manera el tiempo, el cual si presenta diferencia significativa a un nivel de significancia de 5%.
- ❑ Se han encontrado CBZ en el afluente hospitalario a concentraciones de 3.7 – 55.9 µg/L y en el efluente < LD – 5.8 µg/L.
- ❑ Se determinó el orden de reacción de la CBZ ajustándose a un orden uno tanto para luz solar como para luz UV, con un coeficiente de determinación lo más cercano a uno.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Simmons G, Jury S, Thornley C, Harte D, Mohiuddin J, Taylor M. A Legionnaires' disease outbreak: A water blaster and roof-collected rainwater systems. *Water Research*. 2008;42(6-7):1449-58.
2. 2° Informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo. In: UNESCO, editor. 2002.
3. Kim I, Yamashita N, Tanaka H. Photodegradation of pharmaceuticals and personal care products during UV and UV/H₂O₂ treatments. *Chemosphere*. 2009;77(4):518-25.
4. Breton H, Cociglio M, Bressolle F, Peyriere H, Blayac JP, Hillaire-Buys D. Liquid chromatography–electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2005;828(1-2):80-90.
5. Segura PA, MacLeod SL, Lemoine P, Sauvé S, Gagnon C. Quantification of carbamazepine and atrazine and screening of suspect organic contaminants in surface and drinking waters. *Chemosphere*. 2011;84(8):1085-94.
6. Trenholm RA, Vanderford BJ, Snyder SA. On-line solid phase extraction LC-MS/MS analysis of pharmaceutical indicators in water: A green alternative to conventional methods. *Talanta*. 2009;79(5):1425-32.
7. Islam MS, Mahmud ZH, Uddin MH, Islam K, Yunus M, Nair GB, et al. Purification of household water using a novel mixture reduces diarrhoeal disease in Matlab, Bangladesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011;105(6):341-5.
8. Levantesi C, Bonadonna L, Briancesco R, Grohmann E, Toze S, Tandoi V. Salmonella in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International*. In Press, Corrected Proof.
9. Ghauch A, Baydoun H, Dermesropian P. Degradation of aqueous carbamazepine in ultrasonic/FeO/H₂O₂ systems. *Chemical Engineering Journal*. 2011;172(1):18-27.
10. Morcillo JLS. Análisis y distribución de principios activos farmacológicos en los procesos convencionales de depuración de aguas residuales urbanas. Sevilla, España: Universidad de Sevilla; 2006.
11. Andreozi R, Marotta R, Pinto G, Pollio A. Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Research*. 2002;36(11):2869-77.
12. Malarvizhi A, Kavitha C, Saravanan M, Ramesh M. Carbamazepine (CBZ) induced enzymatic stress in gill, liver and muscle of a common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of King Saud University - Science*. (0).
13. Hoa PTP, Managaki S, Nakada N, Takada H, Shimizu A, Anh DH, et al. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Science of The Total Environment*. 2011;409(15):2894-901.
14. Yuan F, Hu C, Hu X, Wei D, Chen Y, Qu J. Photodegradation and toxicity changes of antibiotics in UV and UV/H₂O₂ process. *Journal of Hazardous Materials*. 2011;185(2-3):1256-63.
15. Chowdhury S, Champagne P, McLellan PJ. Models for predicting disinfection byproduct (DBP) formation in drinking waters: A chronological review. *Science of The Total Environment*. 2009;407(14):4189-206.
16. Zhang Y, Geißen S-U, Gal C. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*. 2008;73(8):1151-61.

17. Cunningham VL, Perino C, D'Aco VJ, Hartmann A, Bechter R. Human health risk assessment of carbamazepine in surface waters of North America and Europe. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2010;56(3):343-51.
18. Dai C-m, Geissen S-U, Zhang Y-l, Zhang Y-j, Zhou X-f. Performance evaluation and application of molecularly imprinted polymer for separation of carbamazepine in aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*. 2010;184(1-3):156-63.
19. Eric vB. Municipal Waste Water Treatment Plant (WWTP) Effluents a Concise Overview of the Occurrence of Organic Substances. Amsterdam: Association of River Waterworks-RIWA; 2007. p. 9.
20. Doll TE, Frimmel FH. Fate of pharmaceuticals—photodegradation by simulated solar UV-light. *Chemosphere*. 2003;52(10):1757-69.
21. Mohapatra DP, Brar SK, Tyagi RD, Picard P, Surampalli RY. A comparative study of ultrasonication, Fenton's oxidation and ferro-sonication treatment for degradation of carbamazepine from wastewater and toxicity test by Yeast Estrogen Screen (YES) assay. *Science of The Total Environment*. 2013;447(0):280-5.
22. Braeutigam P, Franke M, Schneider RJ, Lehmann A, Stolle A, Ondruschka B. Degradation of n environmentally relevant concentrations in water by Hydrodynamic-Acoustic-Cavitation (HAC). *Water Research*. 2012;46(7):2469-77.
23. Contardo-Jara V, Lorenz C, Pflugmacher S, Nützmann G, Kloas W, Wiegand C. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology*. 2011;105(3-4):428-37.
24. S F. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO, MUERTE CELULARY RESPUESTA ANTITUMORAL. In: A B, editor. Facultad de Ciencias, Pontificia UniversidadJaveriana. Carrera 7 # 43-82. Bogotá, Colombia: Revista de la Facultad de Ciencias; 2007.
25. Matalon S, Schechtman S, Goldzweig G, Ornoy A. The teratogenic effect of carbamazepine: a meta-analysis of 1255 exposures. *Reproductive Toxicology*. 2002;16(1):9-17.
26. Suwalsky M, Mennickent S, Norris B, Villena F, Sotomayor CP. Effects of the antiepileptic drug carbamazepine on human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*. 2006;20(8):1363-9.
27. Vernouillet G, Eullaffroy P, Lajeunesse A, Blaise C, Gagné F, Juneau P. Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels. *Chemosphere*. 2010;80(9):1062-8.
28. Jos A, Repetto G, Rios JC, Hazen MJ, Molero ML, del Peso A, et al. Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints. *Toxicology in Vitro*. 2003;17(5-6):525-32.
29. Donner E, Kosjek T, Qualmann S, Kusk KO, Heath E, Revitt DM, et al. Ecotoxicity of carbamazepine and its UV photolysis transformation products. *Science of The Total Environment*. 2013;443(0):870-6.
30. Gros M, Petrović M, Barceló D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*. 2006;70(4):678-90.
31. Queiroz RHC, Bertucci C, Malfará WR, Dreossi SAC, Chaves AR, Valério DAR, et al. Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;48(2):428-34.
32. Mowafy HA, Alanazi FK, El Maghraby GM. Development and validation of an HPLC–UV method for the quantification of carbamazepine in rabbit plasma. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2012;20(1):29-34.

33. Meritxell Gross, Mira Petrovic, Barcelo D. Tracing Pharmaceutical residues of different therapeutic clases in enviromental waters by using liquid cromatography/ quadropole-linear ion tramp mass spectrometry and automated library searching (Anal Chem [Internet]. 2009; 81:[81, 898-912 pp.].
34. Pawliszyn J. 1 - Solid-Phase Microextraction in Perspective. In: Janusz P, editor. Handbook of Solid Phase Microextraction. Oxford: Elsevier; 2012. p. 1-12.
35. Pilar RCMd. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de Triclosán y Parabenos aplicación al estudio de su distribución en muestras ambientales Universidad de Santiago de Compostela.
36. Magnér J, Filipovic M, Alsberg T. Tracing Pharmaceutical residues of different therapeutic clases in enviromental waters by using liquid cromatography/ quadropole- linear ion tramp mass spectrometry and automated library searching. Anal Chem. 2009;81:898-912.
37. A. SD. Principios de análisis instrumental. quinta edición editorial. McGRAW-HILL/INTERAMERICANA DE ESPAÑA SAU; 2001.
38. Schüssler W, Nitschke L. Death of fish due to surface water pollution by liquid manure or untreated wastewater: analytical preservation of evidence by HPLC. Water Research. 1999;33(12):2884-7.