UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO Y VIDA MEDIA DE CARBAMAZEPINA, TRIMETOPRIMA Y 17-α-ETINILESTRADIOL EN SOLUCIÓN ACUOSA BAJO RADIACIÓN DE LUZ UV, H_2O_2 Y TiO_2 Y EVALUACIÓN DE SU TOXICIDAD

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

M. en C.Q. MARÍA EUGENIA BECERRIL ORTIZ

Director de tesis:
DR. JORGE JAVIER RAMÍREZ GARCÍA
Co-asesores:
DR. ARMANDO RAMÍREZ SERRANO
DRA. HARIZ ISLAS FLORES

Toluca, Estado de México 23 de Febrero de 2023

Índice

Índice de figuras 4

Índice de tablas 6

Nomenclatura 7

Índice de Anexos 8

Agradecimientos 10

Resumen 13

Abstract 14

1. JUSTIFICACIÓN 16

2. Antecedentes 18

2.1. Fármacos en el medio ambiente 18

2.1.1. Carbamazepina. 19

a) Propiedades fisicoquímicas 20

b) Toxicidad 21

2.1.2. Trimetoprima (TMT). 21

a) Propiedades fisicoquímicas 22

b) Toxicidad 22

2.1.3. 17-α-etinilestradiol (EE2) 22

a) Propiedades fisicoquímicas 24

b) Toxicidad 24

2.2. Técnicas de remoción de fármacos 24

2.2.1. Métodos de oxidación avanzada 25

2.3. Evaluación de toxicidad de los fármacos en el medio ambiente 29

2.3.1. Prueba FETAX 29

2.4. Modelo cinético de reacción 30

2.4.1. Cinética de reacciones homogéneas 30

2.4.2. Cinética de reacciones heterogéneas 30

2.5. Cuantificación de fármacos 32

3. Hipótesis 35

4. Objetivos 35
4.1. General 35
4.2. Específicos 35
5. Metodología 37
5.1. Caracterización de los fármacos 38
5.1.1. Identidad por radiación infrarroja (IR). 38
5.1.2. Absorbancia máxima por Ultravioleta (UV). 38
5.2. Optimización del método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). .. 38
5.3. Validación de método analítico 39
5.4. Degradación de los fármacos por radiación de luz UV. 39
5.5. Seguimiento de la degradación de los fármacos: 40
5.6. Determinación de cinética de fotodegradación y vida media de los fármacos 40
5.7. Evaluación de toxicidad 40
6. Resultados 42
6.1. Caracterización de los fármacos 42
6.1.1. Identidad por radiación infrarroja (IR). 42
6.1.2. Absorbancia máxima por Ultravioleta (UV). 44
6.2. Método analítico para cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución 45
6.3. Validación de método 46
6.4. Degradación de fármacos 47
6.4.1. Degradación con radiación UV 47
6.5. Degradación con H_2O_2 y radiación UV 47
6.5.1. Efecto de la cantidad de H_2O_2 utilizada en la degradación 47
6.5.2. Efecto de la variación de la radiación UV en la degradación 53
6.5.3. Efecto de la variación de la concentración inicial del fármaco en la degradación con H_2O_2 54
6.5.4. Efectos en la solución remanente después de aplicar tratamiento con UV-C/H_2O_2 55
6.6. Cinética de degradación UV/H_2O_2 61
6.6.1. CBZ 61
6.7. Degradación con TiO_2 y radiación UV 71
6.7.1. Efecto de la cantidad de TiO_2 utilizada en la degradación 71

6.7.2. Efecto de la variación de la concentración inicial del fármaco en la degradación con TiO_2 75
6.7.3. Efectos en la solución remanente después de aplicar tratamiento con UV-C/TiO_2 76
6.8. Cinética de degradación UV-C/ TiO_2 82
6.8.1. CBZ 82
6.8.2. TMT 87
6.9. Evaluación de toxicidad de la solución remanente 90
6.9.1. Especímenes de prueba 90
6.9.2. Soluciones prueba 90
6.9.3. Fertilización 91
6.9.4. Exposición 91
6.9.5. Monitoreo de cultivos 91
6.9.6. Examinación de larvas 91
6.9.7. Resultados 92
a) Mortalidad 92
b) Tamaño 93
c) Malformaciones 94
6.9.8. Análisis de resultados 96
a) Mortalidad y malformaciones 96
b) Inhibición de crecimiento 99
7. Conclusiones 100
8. ANEXOS 102
9. Referencias 124

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de un fármaco en el medio ambiente (Jiménez, 2011)..... 18
Figura 2. Principales fármacos detectados a nivel global en efluentes acuáticos (aus der Beek *et al.*, 2016) .. 19
Figura 3. Estructura química de carbamazepina (Nombre IUPAC benzo [b][1]benzazepine-11-carboxamide), (National Center for Biotechnology, 2015). 19
Figura 4. Tendencia en el consumo global de carbamazepina diferenciadas entre continentes (Oldenkamp, Beusen and Huijbregts, 2019) 20
Figura 5. Estructura química de trimetoprima (Nombre IUPAC: 5-[(3,4,5-trimetoifenil) metil] pirimidin-2,4-diamina) (National Center for Biotechnology, 2015). 21
Figura 6. Consumo de principales antibióticos, durante el año 2010 y su proyección de consumo en el año 2030 (Center for Disease Dynamics Economics & Policy, 2015). 22
Figura 7. Estructura química de 17-α-etinilestradiol (Nombre IUPAC: 8R,9S,13S,14S,17R)-17-etinil-13-metil-7,8,9,11,12,14,15,16-octahidro-6H-ciclopenta[a]fenantrene-3,17-diol) (Drug Bank, 2005). 23
Figura 8. Uso de anticonceptivos a nivel mundial (Jurgens et al., 2002). 23
Figura 9. Clasificación de procesos de oxidación avanzada (AOP`s) (Amor *et al.*, 2019)..... 26
Figura 10. Reacción de óxido- reducción en la superficie del TiO_2 (DELSAN ingenieros, 2019)..... 28
Figura 11. Ensayo FETAX (Gad, 2011)..... 29
Figura 12. Representación del mecanismo Langmuir-Hinshelwood (Dai *et al.*, 2012)..... 31
Figura 13. Diagrama de flujo de metodología..... 37
Figura 14. Equipo de degradación por luz UV. 39
Figura 15. Espectro IR de CBZ 42
Figura 16. Espectro IR de TMT. 43
Figura 17. Espectro IR de EE2. 44
Figura 18. Espectro UV de CBZ, TMT y EE2. 45
Figura 19. Tiempos de retención (t_R) de CBZ, TMT y EE2 46
Figura 20. Perfil de degradación UV/H_2O_2 de CBZ..... 47
Figura 21. Cromatogramas de degradación UV/H_2O_2 de CBZ (H_2O_2: 0.5 mol L^{-1}). a) Cromatograma inicial de CBZ; b) Cromatograma fina de CBZ después de concluir su degradación 48
Figura 22. Perfil de degradación UV/H_2O_2 de TMT 48
Figura 23. Cromatogramas de degradación UV/H_2O_2 de TMT (H_2O_2: 0.5 mol L^{-1}). a) Cromatograma inicial; b) Cromatograma final después de concluir su degradación 49
Figura 24. Perfil de degradación UV/H_2O_2 de EE2..... 50
Figura 25. Cromatogramas de degradación UV/H_2O_2 de EE2 (H_2O_2: 0.5 mol L^{-1}). a) Cromatograma inicial; b) Cromatograma final 50
Figura 26. Porcentaje de degradación de CBZ con UV/H_2O_2 52
Figura 27. Porcentaje de degradación TMT con UV/H_2O_2 52
Figura 28. Degradación de CBZ, TMT y EE2 con UV/H_2O_2..... 53
Figura 29. Degradación de CBZ UVA, UV-B y UV-C- con H_2O_2 53
Figura 30. Degradación de TMT UVA, UV-B y UV-C- con H_2O_2..... 54
Figura 31. UV/H_2O_2 de CBZ..... 54
Figura 32. UV/H_2O_2 de TMT 55
Figura 33. Cromatograma final de degradación UV/H_2O_2 de CBZ (H_2O_2: 0.5 mol L^{-1})..... 56
Figura 34. Productos derivados de la degradación UV/H_2O_2 de CBZ..... 56
Figura 35. Comportamiento de DP_1 UV/H_2O_2 de CBZ..... 57
Figura 36. Ruta de degradación de CBZ inducida por UV/H_2O_2 (Vogna *et al.*, 2004). 58
Figura 37. Estructura química de acridina ($C_{13}H_9N$, 9-Azaantraceno, Dibenzo [b, e] piridina)..... 58
Figura 38. Cromatogramas de degradación UV/H_2O_2 de TMT (H_2O_2: 0.5 mol L^{-1})..... 59
Figura 39. Productos derivados de la degradación UV/H_2O_2 de TMT. 60
Figura 40. Comportamiento de los productos derivados de la degradación UV/H_2O_2 de TMT. 60
Figura 41. Ruta de degradación de TMT inducida por UV/H_2O_2 (Wang *et al.*, 2019). 61
Figura 42. Ruta de degradación de TMT inducida por UV/H_2O_2 (Zhang, Yang, C. H. Huang, *et al.*, 2016)... 61
Figura 43. Cinética de degradación H_2O_2 / UV-C de CBZ a diferentes $[H_2O_2]_0$..... 62
Figura 44. Relación de k_{ap} vs H_2O_2 63
Figura 45. Cinética de degradación UV/H_2O_2 de CBZ a diferentes CBZ_0 64
Figura 46. Relación de k_{ap} vs CBZ_0..... 64
Figura 47. Modelo cinético de degradación de H_2O_2/ UV-C..... 66
Figura 48. Cinética de degradación de UV-C /H_2O_2 de TMT a diferentes $[H_2O_2]_0$..... 67
Figura 49. Cinética de degradación de UV-C /H_2O_2 de TMT a diferentes $[H_2O_2]_0$..... 67

Figura 50. Cinética de degradación UV/H_2O_2 de TMT a diferentes TMT_0 68
Figura 51. Relación de k_{ap} vs TMT_0 68
Figura 52. Modelo cinético de degradación de TMT con H_2O_2/ UV-C 70
Figura 53. Cromatograma de degradación de CBZ con TiO_2/ UV-C 71
Figura 54. Degradación de CBZ con TiO_2/ UV-C 71
Figura 55. Porcentaje de degradación de CBZ con TiO_2/ UV-C 72
Figura 56. Cromatograma de degradación de TMT con TiO_2/ UV-C 72
Figura 57. Degradación de TMT con TiO_2/ UV-C 73
Figura 58. Porcentaje de degradación de TMT con TiO_2/ UV-C 73
Figura 59. Cromatograma de degradación de EE2 con TiO_2/ UV-C 74
Figura 60. Degradación de EE2 con TiO_2/ UV-C 74
Figura 61. Comparación de la degradación de CBZ, TMT y EE2 con TiO_2/ UV-C 75
Figura 62. UV/TiO_2 de CBZ 76
Figura 63. UV/TiO_2 de TMT 76
Figura 64. Cromatograma de degradación de CBZ después de aplicar 0.015 g L^{-1} TiO_2/ UV-C 77
Figura 65. Subproductos de CBZ en la degradación con UV-C/TiO_2 77
Figura 66. Subproductos de degradación CBZ con UV-C/TiO_2 78
Figura 67. Subproductos de degradación UV/TiO_2 (Franz *et al.*, 2020). 78
Figura 68. Subproductos de degradación UV-C/TiO_2 (Martínez *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2012) 79
Figura 69. Cromatograma de degradación de TMT después de aplicar 0.03 g L^{-1} TiO_2/ UV-C 79
Figura 70. Subproductos de degradación UV/TiO_2 80
Figura 71. Ruta de degradación de TMT por UV-C/TiO_2 (Samy *et al.*, 2020) 80
Figura 72. Cinética de degradación de CBZ con TiO_2/ UV-C al variar $[TiO_2]_0$ 82
Figura 73. Relación de k_{ap} con la concentración de TiO_2 en la degradación de CBZ con TiO_2/UV-C 83
Figura 74. Cinética degradación de CBZ con TiO_2/UV-C 84
Figura 75. Relación de k_{ap} con $[CBZ]_0$ en la degradación con TiO_2/UV-C 85
Figura 76. Relación $1/k_{ap}$ con $[CBZ]_0$ en la degradación con TiO_2/UV-C 85
Figura 77. Modelo cinético de degradación de CBZ con TiO_2/UV-C 86
Figura 78. Cinética de degradación de TMT con TiO_2/ UV-C al variar $[TiO_2]_0$ 87
Figura 79. Cinética degradación de TMT con TiO_2/UV-C 88
Figura 80. Cronología del desarrollo embrionario de *Xenopus Laevis* – NF etapas según Nieuwkoop y Faber y por horas después de la fertilización (hpf) 91
Figura 81. Mortalidad de embriones expuestos a las soluciones de tratamiento de CBZ después de 96 h de exposición 93
Figura 82. Mortalidad de embriones expuestos a las soluciones de tratamiento de TMT después de 96 h de exposición 93
Figura 83. Longitud promedio de larvas *Xenopus Laevis* expuestos a las soluciones testigo y de tratamiento de CBZ y TMT después de 96 h de exposición, se indican las diferencias significativas relativas a la solución testigo (*) y la solución CBZ UV-C /H_2O_2 con respecto a la solución CBZ UV-C/TiO_2 (+), donde $p<0.05$. .. 94
Figura 84. Histograma de frecuencia de malformaciones de los embriones *Xenopus Laevis* expuestos a las soluciones de tratamiento de CBZ y TMT con UV-C/H_2O_2 y UV-C/TiO_2. 95
Figura 85. Representación de malformaciones de los embriones en *X. Laevis* expuestos a las soluciones: A) Testigo, 96 h; B) Control 1, 96 h; C) Control 2, 72 h; D) CBZ sin tratamiento de degradación, 24 h; E) CBZ expuesto a UV, 24 h; F) TMT sin tratamiento de degradación, 24 h; G) TMT expuesto a UV, 24 h; H) CBZ con tratamiento UV-C/H_2O_2, 96 h; I) CBZ con tratamiento UV-C/TiO_2, 96 h; J) TMT con tratamiento UV-C/H_2O_2, 96 h; K) TMT con tratamiento UV-C/TiO_2, 96 h. Donde Ae: Edema abdominal, Bf: Malformación axial en aleta, Bn: Malformación axial en notocordio, Bt: Malformación axial en cola; Ce: Edema cardiaco; Ea: Malformación en ojo; EWD: Embrión sin desarrollo; Fa: Malformación en cara; Gt: Malformación en tracto gastrointestinal; Mcp: microcefalia; R: Malformación en recto; SB: Enanismo, YT: Taponamiento de yema. 96
Figura 86. Linealidad CBZ 106
Figura 87. Linealidad TMT 107
Figura 88. Linealidad EE2 108
Figura 89. CBZ 100 mg L^{-1} 108
Figura 90. CBZ 0.01 mg L^{-1} 109
Figura 91. TMT 100 mg L^{-1} 109
Figura 92. TMT 0.001 mg L^{-1} 110
Figura 93. EE2 100 mg L^{-1} 110

Figura 94. EE2 0.1 mg L^{-1} 111
Figura 95. Distribución normal de la muestra 121

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de carbamazepina (National Center for Biotechnology, 2015). 20
Tabla 2. Movilidad, persistencia y bioconcentración de carbamazepina (National Center for Biotechnology, 2015)..... 20
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de trimetoprima (National Center for Biotechnology, 2015). 22
Tabla 4. Movilidad, persistencia y bioconcentración de trimetoprima (National Center for Biotechnology, 2015)..... 22
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de 17-α-etinilestradiol (Drug Bank, 2005). 24
Tabla 6. Movilidad, persistencia y bioconcentración de 17-α etinilestradiol (Drug Bank, 2005). 24
Tabla 7. Comparación de potenciales de oxidación estándar de agentes oxidantes comúnmente utilizados en AOP`s (Guo, Qi and Liu, 2017; Amor *et al.*, 2019). 25
Tabla 8. Grupos funcionales susceptibles a generar una reacción fotoquímica (Griesbeck *et al.*, 2012) 26
Tabla 9. Proceso de fotólisis (Tønnesen, 2004)..... 27
Tabla 10. Parámetros de desempeño a estudiar en un método analítico (CNQFB, 2002) 32
Tabla 11 Lámparas utilizadas en los experimentos de degradación: 39
Tabla 12. Interpretación de espectro infrarrojo de CBZ 42
Tabla 13. Interpretación de espectro infrarrojo de TMT. 43
Tabla 14. Interpretación de espectro infrarrojo de EE2. 44
Tabla 15. Condiciones cromatográficas para la determinación de CBZ, TMT y EE2 45
Tabla 16. Resultados de validación del método analítico CLAR. 46
Tabla 17. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ de CBZ para H_2O_2/ UV-C variando $[H_2O_2]_0$ 62
Tabla 18. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ de CBZ para H_2O_2/ UV-C variando CBZ_0 63
Tabla 19. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ de TMT para H_2O_2/ UV-C variando $[H_2O_2]_0$ 66
Tabla 20. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ para H_2O_2/ UV-C variando TMT_0 68
Tabla 21. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ de CBZ para TiO_2/ UV-C al variar $[TiO_2]_0$ 82
Tabla 22. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ de CBZ para TiO_2/ UV-C al variar $[CBZ]_0$ 84
Tabla 23. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ de TMT para TiO_2/ UV-C al variar $[TiO_2]_0$ 87
Tabla 24. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ para TiO_2/ UV-C al variar $[TMT]_0$ 88
Tabla 25. Comparación del comportamiento de la degradación de los fármacos con H_2O_2 y TiO_2. 89
Tabla 26. Soluciones control de la prueba FETAX 90
Tabla 27. Soluciones prueba de CBZ de la prueba FETAX 90
Tabla 28. Soluciones prueba de TMT de la prueba FETAX 90
Tabla 29. Mortalidad de embriones expuestos a las soluciones de tratamiento de CBZ y TMT 92
Tabla 30. Distribución t de Student conforme a grados de libertad. 103
Tabla 31. Resultados CBZ de adecuabilidad del sistema. 104
Tabla 32. Resultados TMT de adecuabilidad del sistema. 104
Tabla 33. Resultados EE2 de adecuabilidad del sistema. 104
Tabla 34. Adecuabilidad. 105
Tabla 35. Precisión del sistema. 105
Tabla 36. Análisis de la linealidad CBZ. 106
Tabla 37. Resultados Análisis de la linealidad CBZ. 106
Tabla 38. Análisis de la linealidad TMT 106
Tabla 39. Resultados Análisis de la linealidad TMT. 107
Tabla 40. Análisis de la linealidad EE2 107
Tabla 41. Resultados Análisis de la linealidad EE2. 107
Tabla 42. Resultados de límite de detección y cuantificación CBZ 109
Tabla 43. Resultados de límite de detección y cuantificación TMT 110
Tabla 44. Resultados de límite de detección y cuantificación EE2 111
Tabla 45. Resultados del límite de detección y cuantificación. 111
Tabla 46. Longitud de embrión (L en mm) en muestras testigo 112
Tabla 47. Longitud de embrión (L en mm) de muestras control 1(metanol) 113
Tabla 48. Longitud de embrión (L en mm) de muestras expuestas a tratamiento de $CBZ+H_2O_2$ 114
Tabla 49. Longitud de embrión (L en mm) de muestras expuestas a $CBZ+T_iO_2$ 115
Tabla 50. Resultados muestras expuestas a tratamiento de $TMT+T_iO_2$ 117
Tabla 51. Análisis de distribución de muestra: Kolmogorov-Smirnov Test 121
Tabla 52. Analisis ANOVA 121

Tabla 53. Test LSD (Least significant difference) de Fisher 95.0 %..... 122

Índice de anexos

Anexo 1. Fórmulas para realizar los cálculos de validación del método analítico 102
Anexo 2. Tabla estadística de la distribución t de Student 103
Anexo 3. Adecuabilidad del sistema 104
Anexo 4. Precisión del sistema..... 105
Anexo 5. Linealidad del sistema..... 106
Anexo 6. Límite de detección y cuantificación 108
Anexo 7. Evidencia de larvas sobrevivientes a la prueba FETAX 112
Anexo 8. Análisis estadístico de crecimiento de larvas FETAX 121

Nomenclatura

A ..... Absorbancia

b_1 ..... Pendiente

b_0 ..... Ordenada al origen

BCF ..... Factor de bioconcentración

$[CBZ]_0$ ..... Concentración de carbamazepina en mg L^{-1}

[CBZ] ..... Concentración de carbamazepina en mg L^{-1}

CV ..... Coeficiente de Variación o desviación estándar relativa

CVy/x ..... Coeficiente de Variación de la regresión

DP_n ..... Producto de degradación

$[EE2]_0$ ..... Concentración de 17-α etinilestradiol en mg L^{-1}

[EE2] ..... Concentración de 17-α etinilestradiol en mg L^{-1}

F..... Cociente de dos varianzas

$[H_2O_2]$..... Concentración de peróxido de hidrogeno en mol L^{-1}

k_A ..... Constante de velocidad de reacción

k_{ap} ..... Coeficiente cinético aparente de la velocidad de reacción en min^{-1}

K..... Grados Kelvin

K'..... Factor de capacidad

$K_{farmaco}$ ..... Constante de adsorción de equilibrio del fármaco de Langmuir-Hinshelwood

Koc ..... Coeficiente adsorción en suelo-agua

Kow ..... Coeficiente de partición octanol-agua

IC (β_1)..... Intervalo de Confianza correspondiente a la pendiente

IC (β_0)..... Intervalo de Confianza correspondiente a la ordenada

LC..... Límite de Cuantificación

LD ..... Límite de Detección

LSD ..... Diferencia mínima significativa (Least significant difference)

n..... Número de mediciones

N..... Número de platos teóricos

$OH\cdot$ ..... Radical hidroxilo

pKa ..... Coeficiente de disociación

r_A ..... Velocidad de reacción en mol $L^{-1}min^{-1}$

r^2 ..... Coeficiente de determinación

S..... Desviación estándar

Sb_0 ..... Desviación estándar de la ordenada al origen

Sb_1 ..... Desviación estándar de la pendiente

Sy/x ..... Desviación estándar de la regresión

t 0.975,gl.....

Valor de la distribución t de Student asociado a una confianza del 95% y a grados de libertad (gl) establecidos

T ..... Factor de coleo

t..... Tiempo en min

$[TiO_2]$ ..... Concentración de dióxido de titanio en mg L^{-1}

$[TMT]_0$ ..... Concentración de trimetoprima en mg L^{-1}

[TMT]..... Concentración de trimetoprima en mg L^{-1}

UA ..... Unidades de área

t_R ..... Tiempo de retención en min

$t_{1/2}$ ..... Vida media en min

$\bar{x}$ ..... Media Aritmética de x

$\bar{y}$ ..... Media Aritmética de y

Letras griegas

α..... orden de la reacción

λ ..... Longitud de onda nm

Acrónimos

ANOVA ..... Análisis de varianza

ASTM..... Sociedad Estadounidense para Pruebas y Materiales, por sus siglas en inglés (American Society for Testing and Materials)

AOP's..... Tratamientos de oxidación avanzada

CNQFB..... Colegio Nacional Químicos Farmacéuticos Biólogos

CLAR ..... Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

CBZ ..... Carbamazepina

EE2..... 17-α-etinilestradiol

FETAX ..... Ensayo de teratogénesis de embriones de rana *Xenopus Laevis*

FTIR ..... Transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier

IR ..... Radiación Infrarroja

ICH..... International Conference on Harmonisation

IUPAC ..... International Union of Pure and Applied Chemistry

TMT ..... Trimetoprima

UV .....Radiación ultravioleta

UV-A ..... Radiación ultravioleta tipo A

UV-B .....Radiación ultravioleta tipo B

UV-C .....Radiación ultravioleta tipo C

UV/H_2O_2.....Degradación con radiación ultravioleta y H_2O_2

UV/TiO_2.....Degradación con radiación ultravioleta y TiO_2

Agradecimientos

Resumen

La identificación, cuantificación y control de contaminantes emergentes en los recursos acuosos es una preocupación continua para la seguridad y salud pública. Los fármacos como el carbamazepina, trimetoprima y 17-α-etinilestradiol han sido identificados como medicamentos de alto consumo por lo que se han detectado en agua residual tratada, siendo esta un medio de exposición para la población, ya que los activos farmacéuticos aún en bajas concentraciones pueden provocar efectos negativos en el humano y animales.

Las plantas tratadoras de agua convencionales existentes no fueron diseñadas para este tipo de contaminantes por lo que se han desarrollado propuestas de diferentes procesos y técnicas de tratamiento para eliminar este tipo de contaminantes con eficiencias de remoción altas. Sin embargo, no se ha determinado si estos métodos están removiendo al fármaco o a sus productos de degradación.

En este trabajo se analizará el comportamiento cinético de una mezcla acuosa de carbamazepina, trimetoprima y 17-α-etinilestradiol bajo condiciones de oxidación avanzada con luz UV para determinar su vida media, evidenciar la formación de sus productos de degradación y la estabilidad de estos últimos a través de métodos de cromatografía de líquidos, datos para complementación de los estudios de remoción de fármacos de aguas residuales. Además, de evaluar la toxicidad con la que quedan después del tratamiento.

.

Abstract

The identification, quantification, and control of emerging contaminants in water resources is a continuing concern for public health and safety. Drugs such as carbamazepine, trimethoprim and 17-α-ethinylestradiol have been identified as high-consumption drugs, which is why they have been detected in treated wastewater, this being a means of exposure for the population, since pharmaceutical assets are still low. Concentrations can cause negative effects in humans and animals.

The existing conventional water treatment plants did not work for this type of contaminants, so proposals for different treatment processes and techniques have been developed to eliminate this type of contaminants with high removal efficiencies. However, it has not been determined whether these methods are removing the drug or its degradation products.

In this work, the kinetic behavior of an aqueous mixture of carbamazepine, trimethoprim and 17-α-ethinylestradiol will be analyzed under advanced oxidation conditions with UV light to determine its half-life, demonstrate the formation of its degradation products and the stability of the latter. through liquid chromatography methods, data to complement the studies of removal of drugs from wastewater. In addition, to evaluate the toxicity with which they remain after treatment.

Justificación

1. Justificación

La disposición inadecuada de fármacos caducos o no utilizados y una ineficiente remoción de estos materiales de las aguas residuales de la industria farmacéutica, hospitales e instituciones de investigación genera que estos se incorporen al medio ambiente. A pesar de que sus concentraciones en el agua son relativamente bajas, estudios recientes demuestran que su presencia y contacto con especies acuáticas pueden causar toxicidad (Wang y Hu, 2014). Por lo cual se han propuesto diferentes procesos y técnicas de tratamiento para eliminar este tipo de contaminantes que incluyen tratamientos fisicoquímicos, de oxidación avanzada y biológica. Estos han demostrado eficiencias de remoción altas. Sin embargo, no se ha determinado si este tipo de técnicas está removiendo al fármaco o a sus productos de degradación.

Las técnicas de oxidación avanzada han demostrado tener tasas de remoción alta para fármacos (por arriba del 90%), actuando a través de reacciones químicas que dan paso a la formación de radicales libres que cumplen la función de actuar sobre el enlace químico de la molécula para degradarlo. Por lo que es necesario estudiar si los productos derivados de esta reacción tienen un efecto menor en el medio ambiente o presentan menor o mayor índice de toxicidad y/o estabilidad.

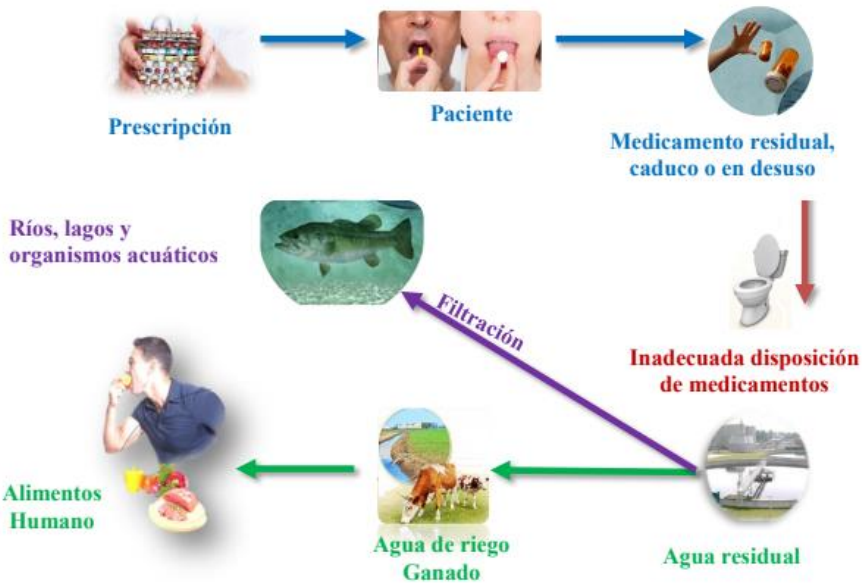
En este trabajo se pretende estudiar a tres fármacos que presentan resistencia a la fotolisis a través del comportamiento cinético de la reacción de degradación de dos procesos fotoquímico de oxidación avanzada homogéneos (UV y UV/H_2O_2) y uno heterogéneo (UV/TiO_2), para evidenciar la formación, y estabilidad de sus productos de degradación, predecir su porcentaje de descomposición y la vida media de los fármacos bajo estas condiciones, así como la toxicidad de la solución después de haber aplicado un tratamiento de remoción .

Antecedentes

1. Antecedentes

1.1. Fármacos en el medio ambiente

La detección continua de los fármacos en efluentes acuáticos y las afectaciones físicas observadas en la flora y fauna que ha entrado en contacto con este tipo de compuestos (Jiménez, 2011), ha dado pauta a que sean considerados como contaminantes emergentes (Loera *et al.*, 2016). Este término es utilizado para describir como contaminantes ambientales a aquellos componentes químicos o moléculas que anteriormente no eran conocidas, y a los ya existentes pero que no se habían estudiado como tales (Desrosiers and Assessment, 2014). En la Figura 1 se describe el ciclo de vida de este tipo de contaminantes donde se percibe que la introducción en la cadena alimenticia se debe a un incremento en el consumo de estos compuestos y a un inadecuado manejo de sus residuos, dando paso al ingreso en el ecosistema y a la interacción con plantas y animales (Jiménez, 2011).



.

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

La constante producción y el incremento en el consumo de fármacos ha provocado la dispersión en el ecosistema de sus residuos o subproductos derivados de su degradación puesto que la mayoría son no biodegradables, y tienden a acumularse en aguas superficiales, efluentes sanitarios, aguas subterráneas y suelos (Frank-Andreas Weber *et al.*, 2014).

Aunque algunos fármacos se degradan al momento de ingresar al medio ambiente se ha identificado que clases terapéuticas como analgésicos, antibióticos, medicamentos para la reducción de lípidos, beta-bloqueadores y estrógenos sintéticos tienden a ser resistentes, o en su caso que sus productos de degradación son aún más persistentes (BIO Intelligence Service, 2013) por lo que permanecen por largo tiempo en el ecosistema a concentraciones a nivel µg L^{-1} o ng L^{-1} (Tejada, Quiñones and Peña, 2014); las cuales han sido evaluadas en estudios de exposición en plantas y animales; obteniendo resultados que muestran efectos tóxicos, modificaciones endocrinas, citotoxicidad, teratogénesis e inhibición de su crecimiento (Ferrari *et al.*, 2003).

Los tres fármacos evaluados en este estudio son carbamazepina (CBZ), trimetoprima (TMT) y 17 α-etinil estradiol (EE2); y como se muestra en la Figura 2 pertenecen al grupo de moléculas que han sido detectadas con mayor frecuencia en efluentes acuáticos.

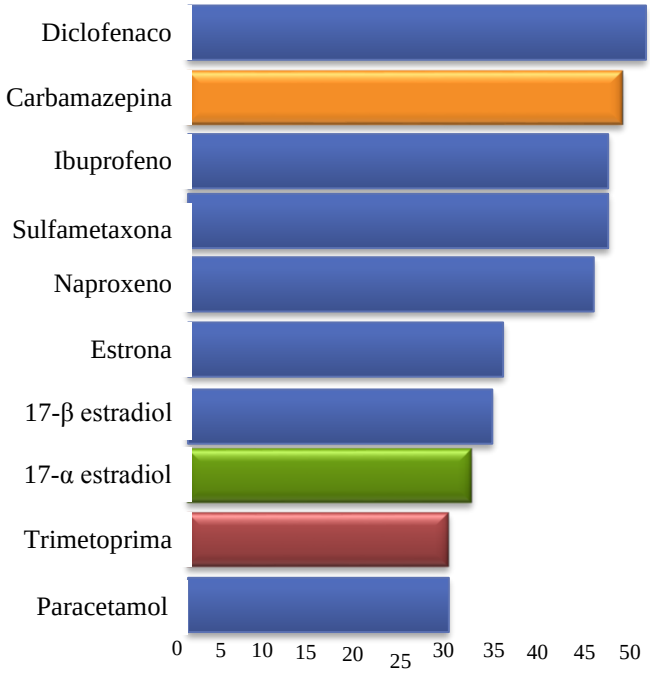


Figura 2. Principales fármacos detectados a nivel global en efluentes acuáticos (aus der Beek *et al.*, 2016)

Debido a que estas moléculas presentan resistencia ante la fotólisis y alta estabilidad, han tenido presencia continua en los ecosistemas, por lo que para su remoción de un efluente acuático es necesario aplicar técnicas más complejas que las técnicas tradicionales como es el caso de los tratamientos de oxidación avanzada (AOP's).

Los aspectos generales de los fármacos estudiados se describen a continuación:

1.1.1. Carbamazepina.

La carbamazepina (CBZ, $C_{15}H_{12}N_2O$) es un fármaco antiepiléptico y psicotrópico usado para controlar convulsiones (Zhang, Geißen and Gal, 2008), y es usado en tratamientos de dolores severos asociados con padecimientos neurológicos (Kosjek and Heath, 2008), su estructura química se muestra en la Figura 3; la cual consta de una subunidad de urea, siendo un derivado de dibenzepina, el cual es un antidepresivo tricíclico (Ran *et al.*, 2020).

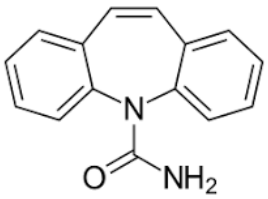


Figura 3. Estructura química de carbamazepina (Nombre IUPAC benzo [b][1]benzazepine-11-carboxamide), (National Center for Biotechnology, 2015).

La Figura 4 muestra que el consumo de este fármaco durante las dos últimas décadas se ha incrementado; tan solo durante el año 2015 se utilizaron alrededor de 1200 toneladas a nivel mundial, siendo Asia y Europa los principales consumidores (Oldenkamp, Beusen and Huijbregts, 2019).

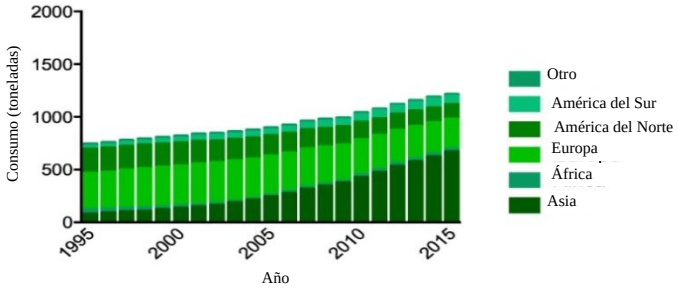


Figura 4. Tendencia en el consumo global de carbamazepina diferenciadas entre continentes (Oldenkamp, Beusen and Huijbregts, 2019)

a) Propiedades fisicoquímicas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de carbamazepina (National Center for Biotechnology, 2015).

Fórmula	$C_{15}H_{12}N_2O$
No. CAS	298-46-4
Peso molecular	236.095 g mol^{-1}
Apariencia	Polvo cristalino blanco a blanco crema
Estado físico	Sólido
Punto de fusión	204-206 °C

Tabla 2. Movilidad, persistencia y bioconcentración de carbamazepina (National Center for Biotechnology, 2015).

Movilidad ambiental				Persistencia			Bioconcentración y bioacumulación	
K_{oc}	Presión de vapor	Solubilidad en agua a 25 °C	pKa	Fotólisis	Biodegradación	Hidrólisis	log K_{ow}	BCF
2692	1.84 x 10^{-7} mm Hg 25 °C	17.7 mg L^{-1}	13.9	+	-	-	2.45	1.41-0.16

b) Toxicidad

Carbamazepina es un fármaco que muestra propiedades de baja absorción y alta resistencia a la biodegradación (Kosjek and Heath, 2008). Estos factores han hecho que su presencia en aguas residuales sea continua; ha sido detectada dentro de un rango de concentración que va de 54 a 1694 ng L^{-1} (Kent and Tay, 2019) El uso de métodos tradicionales de tratamiento de aguas residuales con presencia de este fármaco han resultado inefectivos. Por ejemplo aplicando la técnica de lodos activados se ha alcanza una tasa de remoción por debajo del 10 % (Zhang, Geißen and Gal, 2008).

Algunos efectos adversos como deformaciones físicas se observaron en peces como la trucha arcoíris *(Oncorhynchus mykiss)* y el pez cebra (*Danio Rerio*).

1.1.2. Trimetoprima (TMT).

Es un antibiótico inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa, se prescribe de manera conjunta con sulfamidas para el tratamiento de enfermedades infecciosas respiratorias, urinarias en humanos y animales (Jewell *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017). Pertenece a la familia de 2,4 diaminopiridina sintéticas con actividad microbicida para una amplia variedad de baterías. cuya estructura consiste en 2,4 diamina y 1,2,3-trimetoxibenceno unidos por un puente metileno, ver Figura 5, (National Center for Biotechnology, 2015).

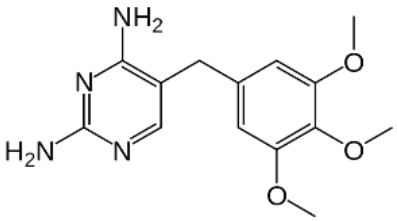


Figura 5. Estructura química de trimetoprima (Nombre IUPAC: 5-[(3,4,5-trimetoifenil) metil] pirimidin-2,4-diamina) (National Center for Biotechnology, 2015).

Los antibióticos son uno de los medicamentos más consumidos a nivel mundial (Woolhouse *et al.*, 2016); dentro de los cuales la trimetoprima y sus combinaciones ocupan el cuarto lugar, como se muestra en la Figura 6. México junto con Brasil es uno de los países latinoamericanos que principalmente emplea este grupo terapéutico, ocupando el octavo lugar de consumo a nivel global (Center for Disease Dynamics Economics & Policy, 2015).

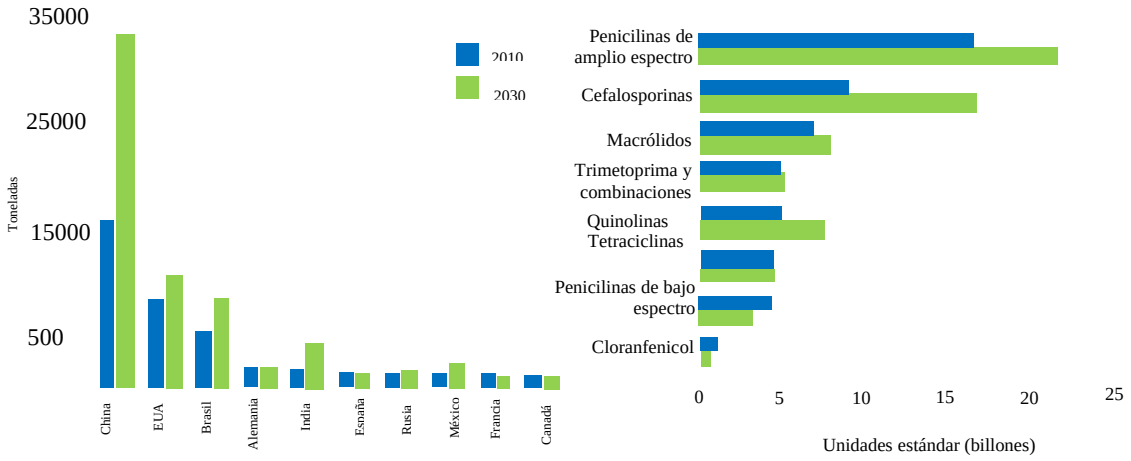


Figura 6. Consumo de principales antibióticos, durante el año 2010 y su proyección de consumo en el año 2030 (Center for Disease Dynamics Economics & Policy, 2015).

a) Propiedades fisicoquímicas

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

Fórmula	$C_{14}H_{18}N_4O_3$
No. CAS	73384-59-5
Peso molecular	290.323 g mol^{-1}
Apariencia	Polvo cristalino blanco a blanco crema
Estado físico	Sólido
Punto de fusión	199-203 °C

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

Movilidad ambiental				Persistencia			Bioconcentración y bioacumulación	
K_{oc}	Presión de vapor	Solubilidad en agua a 25 °C	pKa	Fotólisis	Biodegradación	Hidrólisis	log K_{ow}	BCF
2692	9.9 x 10^{-9} mm Hg 25 °C	400 mg L^{-1}	7.12	+	-	-	0.91	1.41-0.16

b) Toxicidad

Trimetoprima es en general tóxico para humanos y mamíferos por administración oral a corto y largo plazo; puede ser teratogénico y modificar el desarrollo embriológico de las especies expuestas (Kim, Kim and Yu, 2015). Es un compuesto muy estable, no puede ser biodegradado, es altamente soluble en agua y tiende a degradarse a través de una fotodegradación incompleta que da pauta a la formación de compuestos que pueden ser menos estables o más tóxicos. Esta molécula ha sido detectada en concentraciones menores a 10 ng L^{-1} en efluentes acuáticos (Wu *et al.*, 2016), su presencia continua en el ecosistema representa un peligro, ya que al ser un antibiótico ha ocasionado la aparición de patógenos y bacterias resistentes a este tipo medicamentos (Wu, Chen and Kookana, 2011).

1.1.3. 17-α-etinilestradiol (EE2).

Es un estrógeno esteroídico sintético, derivado del estradiol, para administración oral. Se caracteriza por la presencia de un grupo etinilo en la posición 17 alfa en la molécula del estrógeno, su estructura química se indica en la Figura 7 (Micevych *et al.*, 2007).

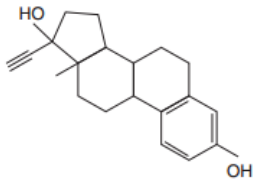


Figura 7. Estructura química de 17-α-etinilestradiol (Nombre IUPAC: 8R,9S,13S,14S,17R)-17-etinil-13-metil-7,8,9,11,12,14,15,16-octahidro-6H-ciclopenta[a]fenantrene-3,17-diol) (Drug Bank, 2005).

Al igual que el estradiol, constituye el principal ingrediente activo de medicamentos anticonceptivos, se utiliza en las terapias de reemplazamiento estrogénico, y para prevenir o reducir los síntomas asociados a la menopausia (Orepesa, 2008).

Está identificado como uno de los compuestos disruptores endócrinos estrogénicos (e-EDCs) que pueden ser hormonalmente activos a bajas concentraciones y provocar efectos negativos en el sistema endócrino de humanos y animales. La Figura 8 muestra que durante los últimos 20 años el uso de medicamentos con este activo se ha incrementado, dando paso a un aumento de residuos liberados al ecosistema (Jurgens *et al.*, 2002). A pesar de que zonas como Norteamérica y Oceanía han disminuido su consumo, este no ha sido representativo a nivel global ya que el incremento de consumo en lugares como África ha sido muy alto con un valor de 56.1%, con respecto a los porcentajes mostrados por las dos anteriores.

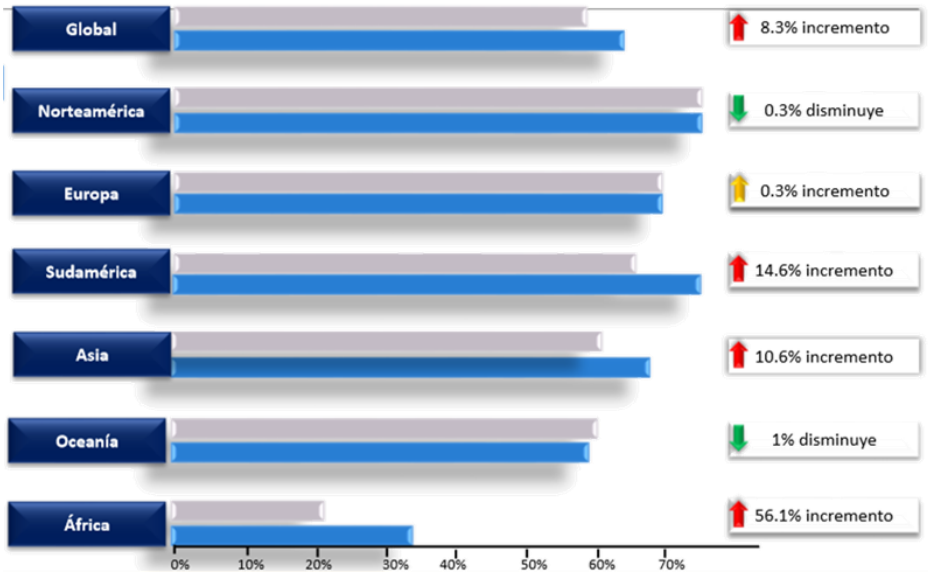


Figura 8. Uso de anticonceptivos a nivel mundial (Jurgens et al., 2002).

a) Propiedades fisicoquímicas

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de 17-α-etinilestradiol (Drug Bank, 2005).

Fórmula	$C_{20}H_{24}O_2$
No. CAS	50-63-6
Peso molecular	296.403 g mol^{-1}
Apariencia	Polvo cristalino fino blanco a blanco crema.
Estado físico	Sólido
Punto de fusión	142 °C- 144 °C.

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

Movilidad ambiental				Persistencia			Bioconcentración y bioacumulación	
K_{oc}	Presión de vapor	Solubilidad en agua a 25 °C	pKa	Fotólisis	Biodegradación	Hidrólisis	log K_{ow}	BCF
6310	1.95 x 10^{-9} mm Hg a 25 °C	11.3 mg L^{-1}	10.33	+	-	-	3.67	3.88

b) Toxicidad

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

1.2. Técnicas de remoción de fármacos

Los tratamientos tradicionales de aguas residuales, como la cloración, lodos activados y la biofiltración no están enfocados en la remoción de fármacos. Su aplicación en efluentes con este tipo de compuestos ha demostrado ser poco eficiente para la eliminación de este tipo de contaminantes. La tasa promedio de remoción de los fármacos ofrecida por estos métodos es aproximadamente del 20 al 40%, lo cual significa que la mayor cantidad de estos compuestos permanecen en el efluente después de aplicar este tipo de técnicas (Magureanu *et al.*, 2015).

Derivado de esto se han generado nuevas propuestas que han demostrado tener mayor eficiencia, como tratamientos físicos, biológicos y químicos. Por ejemplo procesos que emplean luz UV, H_2O_2, catalizadores o métodos físicos como zeolitas y electroquímicos, que han demostrado tener tasas de remoción superiores a los tratamientos convencionales (Guo, Qi and Liu, 2017). La selección de la técnica a utilizar depende de las propiedades fisicoquímicas del fármaco, así como de su toxicidad y de su estabilidad.

1.2.1. Métodos de oxidación avanzada

Debido a valores de eficiencia para la eliminación de contaminantes emergentes por debajo del 10%, que han mostrado los métodos convencionales de tratamiento de agua residual mencionados previamente, se han generado nuevas propuestas que han mostrado porcentajes de eliminación superiores al 90%. Una de las alternativas con gran potencial para la remoción de los fármacos a altas y bajas concentraciones han sido los denominados métodos de oxidación avanzada (AOP´s, Advanced Oxidation Process), los cuales consideran que el fármaco puede ser degradado por radicales libres que inducen la destrucción de los enlaces químicos para dar paso a la desintegración del fármaco (Alharbi *et al.*, 2017).

Se basan en el uso de especies activas como el radical hidroxilo (OH·), el cual es extremadamente reactivo (potencial de oxidación 2.8, ver Tabla 7), el anión superòxido ($0_2^{-}\cdot$), el hidroxiperoxilo ($H_2O^{-}\cdot$), el radical sulfato ($SO^{-}_4\cdot$); o moléculas como O_3 o el H_2O_2 con potenciales de oxidación similares, ver Tabla 7 (Amor *et al.*, 2019). Todas estas moléculas han mostrado ser efectivas para la eliminación de una amplia variedad de compuestos tóxicos como los fármacos.

Tabla 7. Comparación de potenciales de oxidación estándar de agentes oxidantes comúnmente utilizados en AOP`s (Guo, Qi and Liu, 2017; Amor *et al.*, 2019).

Oxidante	Potencial de oxidación, E^o (V)
Fluorina (F_2)	2.87
Radical hidroxi (OH·)	2.80
Radical sulfato ($SO^{-}_4\cdot$)	2.60
Ozono (O_3)	2.08
Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)	1.78

Debido a que no todos los fármacos pueden ser degradados por un agente oxidante en común existe una diversidad de técnicas que emplean diferentes compuestos para la generación de los radicales libres necesarios para el ataque de la molécula. La Figura 9 muestra un resumen de los diferentes tipos de AOP´s aplicados comúnmente para la degradación de activos farmacéuticos.

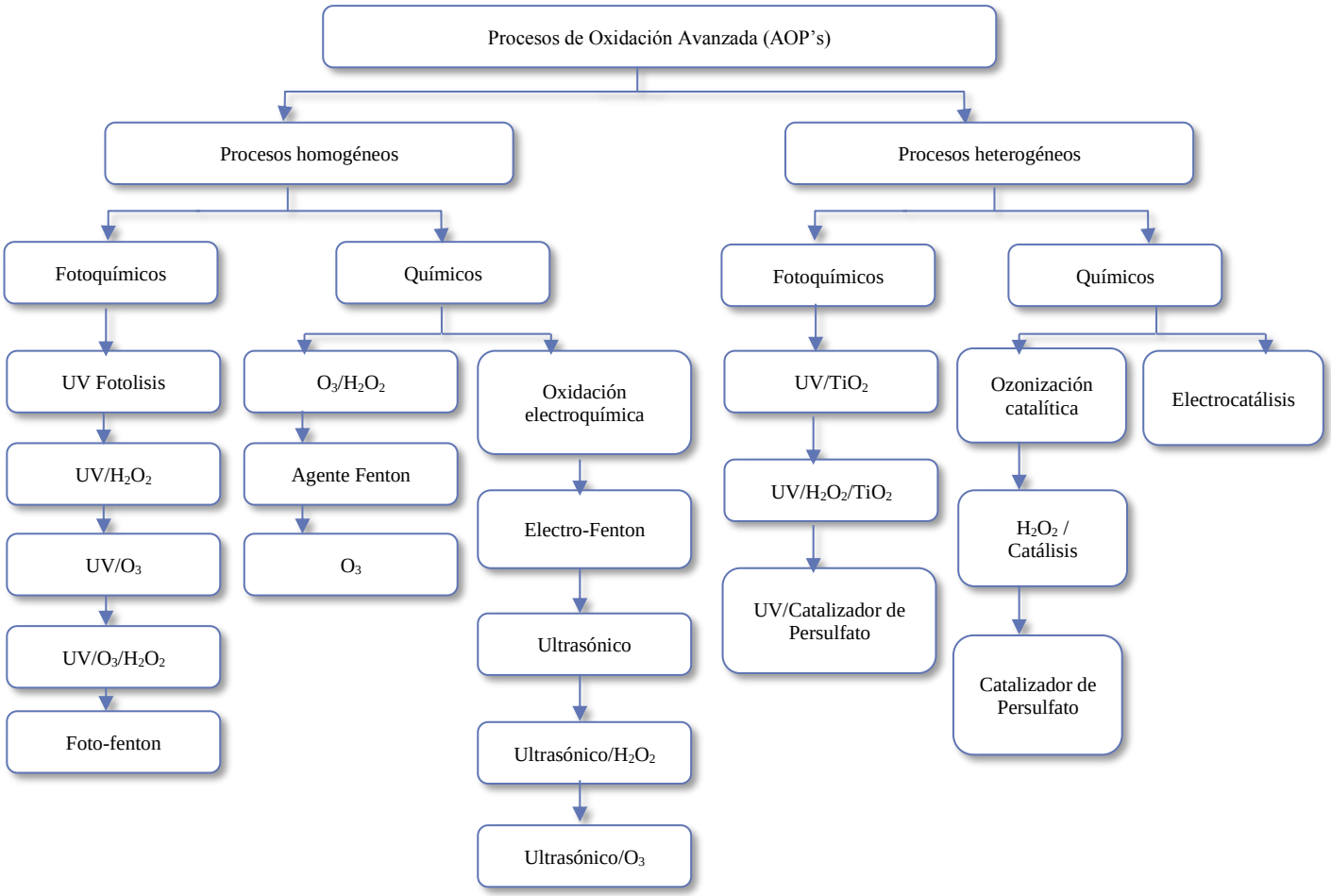


Figura 9. Clasificación de procesos de oxidación avanzada (AOP`s) (Amor *et al.*, 2019)

a) UV fotólisis

Como se observa en la Figura 9, los métodos clasificados como fotoquímicos utilizan la radiación ultravioleta (UV) como fuente de energía para promover una reacción fotoquímica que degrade al fármaco (Ma *et al.*, 2015). Este tipo de radiación se divide en tres tipos: UV-A (320–400 nm), UV-B (290–320 nm) y UV-C (200–290 nm), los cuales tienen diferente potencia y efectos sobre las especies químicas, siendo el sol su principal fuente (Griesbeck *et al.*, 2012).

La Tabla 8 muestra los principales grupos funcionales presentes en las moléculas de los fármacos que son susceptibles a generar una reacción fotoquímica por efecto de la incidencia de radiación UV.

Tabla 8. Grupos funcionales susceptibles a generar una reacción fotoquímica (Griesbeck *et al.*, 2012)

Grupo funcional	Reacción fotoquímica
Doble enlace C=C	Oxidación/ Isomerización
Carbonilo C=O	Reducción/Fragmentación
Cloruro de arilo $C_6H_4Cl_2$	Homolítica/ Heterolítica desclorinación
Grupo nitro aromático $–C_6H_4NO_2$	Sustracción de hidrógeno / reordenamiento de éster de nitrito

Enlace C-H débil	Fragmentación foto inducida mediante transferencia de átomos de hidrógeno o transferencia de electrones y protones

Como se describe en la Tabla 9, el proceso de fotólisis involucra un proceso de absorción de fotones a una longitud de onda específica dentro del rango de radiación UV, Ecuación 1; y la disipación de energía por fluorescencia o por modificaciones en la estructura interna de la molécula, que da paso a la formación de radicales libres que generen la formación de productos finales, Ecuación 2-3.

Tabla 9. Proceso de fotólisis (Tønnesen, 2004)

Reacción		Etapa
$\mathbf{A_0} \xrightarrow{h\nu} \mathbf{A^1}$	Ecuación 1	Estado excitado: absorción de energía
$\mathbf{A_0} + \mathbf{A^1} \rightarrow \mathbf{A}^{\cdot ò + ò-}$	Ecuación 2	Formación de radicales
$\mathbf{2A}^{\cdot ò + ò-} \rightarrow \mathbf{B}$	Ecuación 3	Productos finales

b) UV/ H_2O_2

Las técnicas que derivan del uso de radiación UV consideran la adición de compuestos que involucran la generación de radicales hidroxilo, OH·, precursores de la destrucción de los enlaces químicos. Siendo la combinación de UV/H_2O_2 una de las primeras que se aplicaron para el tratamiento de los fármacos en el agua residual (Maroneze *et al.*, 2014). El H_2O_2 al ser irradiado con luz UV puede fácilmente generar radicales OH· (Ali *et al.*, 2018), el cual actúa sobre la molécula para promover su degradación, como se describe en las Ecuaciones 4 a 6 (Zhang *et al.*, 2010).

$$H_2O_2 \xrightarrow{h\nu} 2OH\cdot \quad \text{.....Ecuación 4}$$

$$OH\cdot + \text{Fármaco} \rightarrow \text{Intermediario} \quad \text{.....Ecuación 5}$$

$$OH\cdot + \text{Intermediario} \rightarrow \text{Productos de degradaciòn} \quad \text{....Ecuación 6}$$

La combinación de UV/H_2O_2 ha demostrado tener tasas de remoción por arriba del 90% en compuestos como hormonas y antibióticos que han tenido resistencia a la degradación por la aplicación aislada de radiación UV (Pereira *et al.*, 2007).

c) UV/ TiO_2

Los métodos de AOP's heterogéneos fotoquímicos han sido considerados como una alternativa eficiente y segura para la degradación de diversos contaminantes emergentes presentes en el agua. Este tipo de tratamientos utilizan catalizadores para aumentar la eficiencia de remoción y disminuir la formación de subproductos que podrían ser más tóxicos que la molécula inicial (Franz *et al.*, 2020). A pesar de que diferentes compuestos pueden ser aplicados con este propósito (ZnO, MgO, TiO_2, WO_3, etc.) el óxido de titanio (TiO_2) ha sido el fotocatalizador más utilizado para el tratamiento de residuos farmacéuticos, debido a que es un material de bajo costo, fotoestable, no tóxico y puede ser activado por radiación solar (Alaani, Hashem and Karabet, no date).

Cuando el fotocatalizador es irradiado con luz que tiene una energía mayor a la energía de su ancho de banda (E_{bg}), el semiconductor absorbe los fotones, los cuales promueven electrones de la banda de valencia

(generando huecos, h_{VB}^{+}) hacia la banda de conducción, e_{CB}^{-}. Los pares h_{VB}^{+}/e_{CB}^{-} producen radicales hidroxilos (OH·) los cuales son los responsables de la oxidación de la materia orgánica

El mecanismo de la fotocatálisis propuesto generalmente en la literatura implica los siguientes pasos (Yang, Yu and Ray, 2008; Moreira *et al.*, 2010; Augugliaro *et al.*, 2012):

$TiO_2 + hv \rightarrow e_{CB}^{-} + h_{VB}^{+}$ ..... Ecuación 7

$h_{VB}^{+} + H_2O \rightarrow OH\cdot + H^{+}$ ..... Ecuación 8

$h_{VB}^{+} + OH^{-} \rightarrow OH\cdot$ ..... Ecuación 9

$h_{VB}^{+} + materia\ org\acute{a}nica \rightarrow Productos$ ..... Ecuación 10

$e_{CB}^{-} + O_2 \rightarrow O_2^{-}\cdot$ ..... Ecuación 11

$O_2^{-}\cdot + H^{+} \rightarrow \cdot HO_2$ ..... Ecuación 12

$2\cdot HO_2 \rightarrow O_2 + H_2O_2$ ..... Ecuación 13

$H_2O_2 + \cdot O_2^{-} \rightarrow OH^{-} + \cdot OH + O_2$ ..... Ecuación 14

$materia\ org\acute{a}nica + (\cdot OH + \cdot O_2^{-}, etc) \rightarrow Productos$ ..... Ecuación 15

Como se describe en la Figura 10 este material al ser expuesto a fotones genera una reacción de óxido- reducción en su superficie, formando hidroxil/peroxi radicales que interactúan con las moléculas del fármaco para degradarlo (Hashim, Natarajan and Ray, 2014).

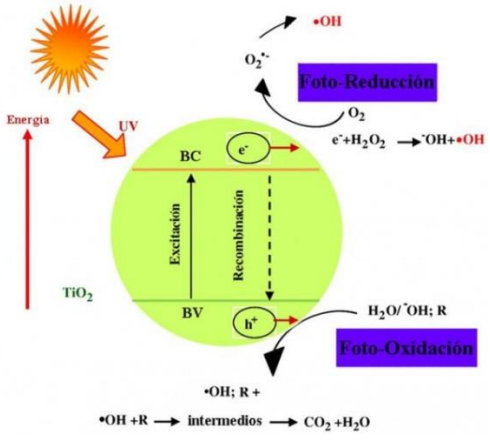


Figura 10. Reacción de óxido- reducción en la superficie del TiO_2 (DELSAN ingenieros, 2019)

Estudios de degradación utilizando TiO_2 con azocolorantes, compuestos orgánicos clorados, y fármacos como el paracetamol y la progesterona han demostrado que este fotocatalizador tiene un mayor impacto en su degradación comparado con otros métodos de oxidación avanzada (Alaani, Hashem and Karabet, no date; Yang, Yu and Ray, 2008; Hernández Enríquez *et al.*, 2011).

1.3. Evaluación de toxicidad de los fármacos en el medio ambiente

Las técnicas descritas anteriormente involucran el uso de radicales libres para la degradación del fármaco. Sin embargo, esto implica la formación de subproductos derivados de las especies activas que pueden tener menor o mayor estabilidad que el fármaco en solución acuosa y/o presentar un índice de toxicidad mayor o menor. Siendo este último un parámetro utilizado para observar los efectos adversos que una especie pueda presentar a exposiciones controladas de ciertos compuestos (Gad, 2011).

Las pruebas de ecotoxicidad, consisten en exponer a un organismo de prueba a un medio ambiental; aire, agua, sedimento o suelo, y evaluar los efectos que ocurren en su crecimiento, reproducción y comportamiento (Valavanidis and Vlachogianni, 2015).

Los resultados de estos estudios ayudan a determinar si las concentraciones de contaminantes de un sitio son lo suficientemente altas como para causar efectos letales, subletales o en general si son adversos en los organismos. Además pueden contribuir a las evaluaciones de riesgo ecológico al demostrar si los contaminantes químicos están biodisponibles y si tienen el potencial de causar daño bioquímico a los tejidos y órganos biológicos de los organismos.

Actualmente existen diferentes propuestas para evaluar el riesgo de los compuestos químicos, estas incluyen metodologías de toxicología predictiva, extrapolación de datos y pruebas de toxicidad utilizando embriones. (Yan *et al.*, 2019)

1.3.1. Prueba FETAX

El ensayo de teratogénesis de embriones de rana *Xenopus Laevis*, por sus siglas en inglés FETAX, evalúa los efectos de sustancias químicas sobre el crecimiento embrionario de *Xenopus Laevis*, durante un periodo de 96 horas (Gad, 2011) y su desarrollo se realiza acorde a lo establecido en la guía ASTM E1439-19 donde se describen las condiciones a considerar en el diseño de la prueba. Siendo la mortalidad, malformación y crecimiento de las larvas los principales puntos que evalúa (Hu *et al.*, 2015).

Consiste en utilizar huevos en etapa de blástula media de *Xenopus Laevis* fertilizados durante el período de organogénesis, exponiéndolos al medio con el químico a evaluar (Boğa, Binokay and Sertdemir, 2009). Involucra pasos que van desde la preparación de las especies para la fecundación in vitro hasta el seguimiento del crecimiento del embrión, para observar los cambios que ocurran durante un periodo de 96 horas (Albert, 1985). La Figura 11 representa el proceso general de este ensayo donde se indica la actividad y el tiempo aproximado en el que se realiza, siendo T_0 el tiempo en el que ocurre la fecundación y el embrión comienza a formarse y T el tiempo en el que se efectúa la actividad (Gad, 2011).

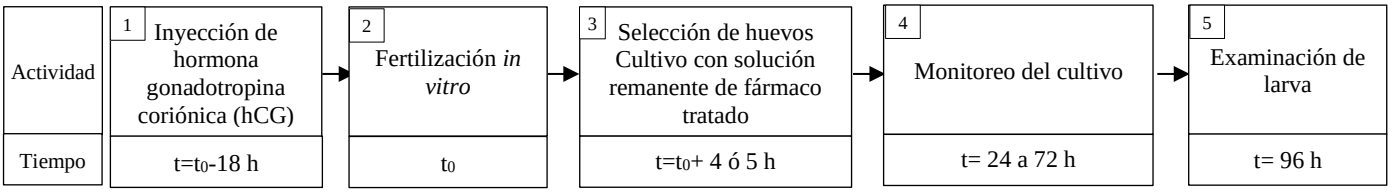


Figura 11. Ensayo FETAX (Gad, 2011)

Al final del ensayo, considerando los resultados de examinación de la larva; la toxicidad de las soluciones se calcula a través del índice teratogénico (IT), mediante la determinación de la concentración letal media (CL_{50}) y la concentración media de malformación (CE_{50}), Ecuación 16.

$$IT = \frac{CL_{50}}{CE_{50}} \quad \text{.....Ecuación 16}$$

1.4. Modelo cinético de reacción

Una reacción química consiste en la conversión de dos sustancias , reactivos, A y B; en otro tipo de compuestos (productos, C y D) (Transfer, 2014), y puede ser representada por la ecuación 17; donde a, b, c y d son los coeficientes estequiométricos:

$aA + bB \rightarrow cC + dD$ ..... Ecuación 17

Las reacciones pueden ser clasificadas como heterogéneas y homogéneas. Siendo estas últimas las que se llevan cabo en una sola fase, y la reacción toma lugar en el volumen ocupado por el sistema. Mientras que los sistemas heterogéneos son aquellos donde se incluye más de una fase, y generalmente en su interfase ocurre la reacción (Synthesis, no date).

1.4.1. Cinética de reacciones homogéneas

La velocidad de reacción ($-r_A$), es el cambio de concentración con respecto al tiempo de los productos o de los reactivos. Siendo la ley de velocidad la ecuación algebraica que relaciona a $-r_A$ con las especies reaccionantes, Ecuación 18. Consiste en el producto de una constante de velocidad de reacción a una temperatura determinada $k_A(T)$ y una función de las concentraciones de las especies participantes, (Scott Fogler, 2002):

$-r_A = [k_A(T)][fn(C_A, C_B)]$ ..... Ecuación 18

La ley de velocidad de una reacción se determina de manera experimental, y esta puede o no seguir modelos de leyes de velocidad simples, dependiendo de su orden de reacción (α); lo cual define si es una reacción elemental o no elemental.

La evaluación de los parámetros esta ecuación, se llevan a cabo midiendo la concentración en función del tiempo. Finalmente, usando un método de análisis de datos diferencial, integral o de regresión no lineal se determina el orden de reacción (α) y la constante de velocidad de reacción k_A (Scott Fogler, 2002).

1.4.2. Cinética de reacciones heterogéneas

Una reacción heterogénea involucra más de una fase, siendo una reacción con un catalizador sólido un ejemplo de este caso. Por lo anterior en la descripción de su ecuación de velocidad se deben de incluir los parámetros que evalúen la transferencia de masa de una fase a otra (Levenspiel, 1999). Para determinarla se sugiere el mecanismo que incluya los pasos de adsorción, reacción superficial y desorción de las sustancias y a su vez se establecen los pasos limitantes. Siendo el más lento igual a la velocidad de reacción global (Scott Fogler, 2002). Se considera que las reacciones de este tipo ocurren en cinco etapas consecutivas:

a) Difusión de las moléculas de reactivo a la superficie
b) Adsorción sobre la superficie
c) Reacción sobre la superficie (formación de productos)

d) Desorción de los productos

e) Difusión de los productos no adsorbidos lejos de la superficie

Generalmente se pueden emplear modelos para determinar las leyes de velocidad, siendo el de Langmuir-Hinshelwood uno de los más comunes para describir el mecanismo de estas reacciones (Kumar, Porkodi and Rocha, 2008). Este modelo considera que dos moléculas se adsorben sobre la superficie e interactúan una con otra hasta la formación del producto, el cual se desorbe. Tal cual como se representa en la Figura 12 y en las Ecuaciones 19-21 (Zhou, Liang and Hu, 2014).

$A + S \rightarrow AS_{ads}$ ..... Ecuación 19

$B + S \rightarrow BS_{ads}$ ..... Ecuación 20

$AS_{ads} + BS_{ads} \rightarrow Producto$ ..... Ecuación 21

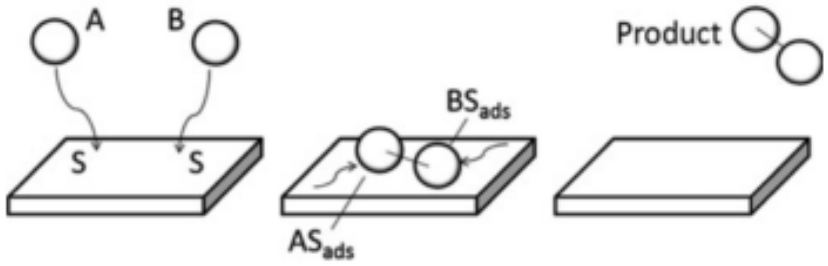


Figura 12. Representación del mecanismo Langmuir-Hinshelwood (Dai *et al.*, 2012)

1.5. Cuantificación de fármacos

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es una de las técnicas analíticas más empleadas para la identificación, cuantificación de los componentes principales de una mezcla. Juega un rol importante dentro del análisis de fármacos, debido a que ayuda a elucidar la estructura y cuantificación de impurezas y sus productos de degradación (Rasool Hassan, 2012).

Es una técnica analítica que usa una fase móvil líquida y una columna que contiene una fase estacionaria. La detección de los compuestos separados se logra mediante el uso de detectores de absorbancia para los compuestos orgánicos y por medio de la conductividad o de detectores electroquímicos para los compuestos metálicos e inorgánicos.

Un análisis por CLAR involucra la consideración de diferentes parámetros de operación, eluyentes, columnas y equipos. La determinación de las consideraciones finales para el análisis involucra establecer las condiciones iniciales de operación, la optimización de ellas y consecuentemente la validación del método analítico.

Siendo la validación la evidencia documental generada a través de la recopilación y evaluación científicas de los datos de pruebas específicas, que demuestra la funcionalidad, consistencia y robustez del método analítico (NOM-059)

Los parámetros de desempeño a estudiar en la validación del método analítico se muestran a continuación en la Tabla 10:

Tabla 10. Parámetros de desempeño a estudiar en un método analítico (CNQFB, 2002)

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

*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

Los parámetros a evaluar durante la validación del método analítico, deberán estudiarse dependiendo de la clasificación del método, y teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

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

Hipótesis y objetivos

2. Hipótesis

La presencia de radicales libres presentes en los procesos fotoquímicos de oxidación avanzada homogéneos (UV y UV/H_2O_2) y en un heterogéneo (UV/TiO_2), de los fármacos carbamazepina, trimetoprima y 17-α-etinilestradiol dan paso a la formación de productos de degradación que generan mayor toxicidad en la solución después del tratamiento.

3. Objetivos

3.1. General

Determinar el comportamiento cinético de la reacción de degradación de dos procesos fotoquímicos de oxidación avanzada homogéneos (UV y UV/H_2O_2) y uno heterogéneo (UV/TiO_2) en los fármacos carbamazepina, trimetoprima y 17-α-etinilestradiol.

3.2. Específicos

- Caracterizar los estándares y fármacos a utilizar mediante las técnicas analíticas de UV Visible e Infrarrojo.
- Optimizar métodos analíticos por cromatografía de líquidos (CLAR) para la identificación y cuantificación de los fármacos carbamazepina, trimetoprima y 17-α-etinilestradiol.
- Realizar la prueba de fotodegradación bajo radiación tipo UV-A, UV-B y UV-C de los fármacos carbamazepina, trimetoprima y 17-α-etinilestradiol.
- Realizar la prueba de fotodegradación bajo radiación UV-A, UV-B y UV-C y H_2O_2 de los fármacos carbamazepina, trimetoprima y 17-α-etinilestradiol.
- Realizar la prueba de fotodegradación bajo radiación UV-A, UV-B y UV-C y TiO_2 de los fármacos carbamazepina, trimetoprima y 17-α-etinilestradiol.
- Determinar la cinética de degradación y vida media de los fármacos por cromatografía de líquidos (CLAR) para las tres condiciones evaluadas (radiación UV, H_2O_2 y TiO_2).
- Evidenciar y determinar la estabilidad de los productos de degradación de los fármacos en medio acuoso por Cromatografía de líquidos (CLAR).
- Evaluar la toxicidad de la solución para las tres condiciones evaluadas (radiación UV, H_2O_2 y TiO_2), después de aplicar el tratamiento.

Metodología

4. Metodología

El desarrollo experimental se realizó considerando las actividades mostradas en el diagrama de flujo de la Figura 13. Se inició con la caracterización de los fármacos y la validación del método analítico, finalizando con los experimentos de fotodegradación y el análisis de los resultados.

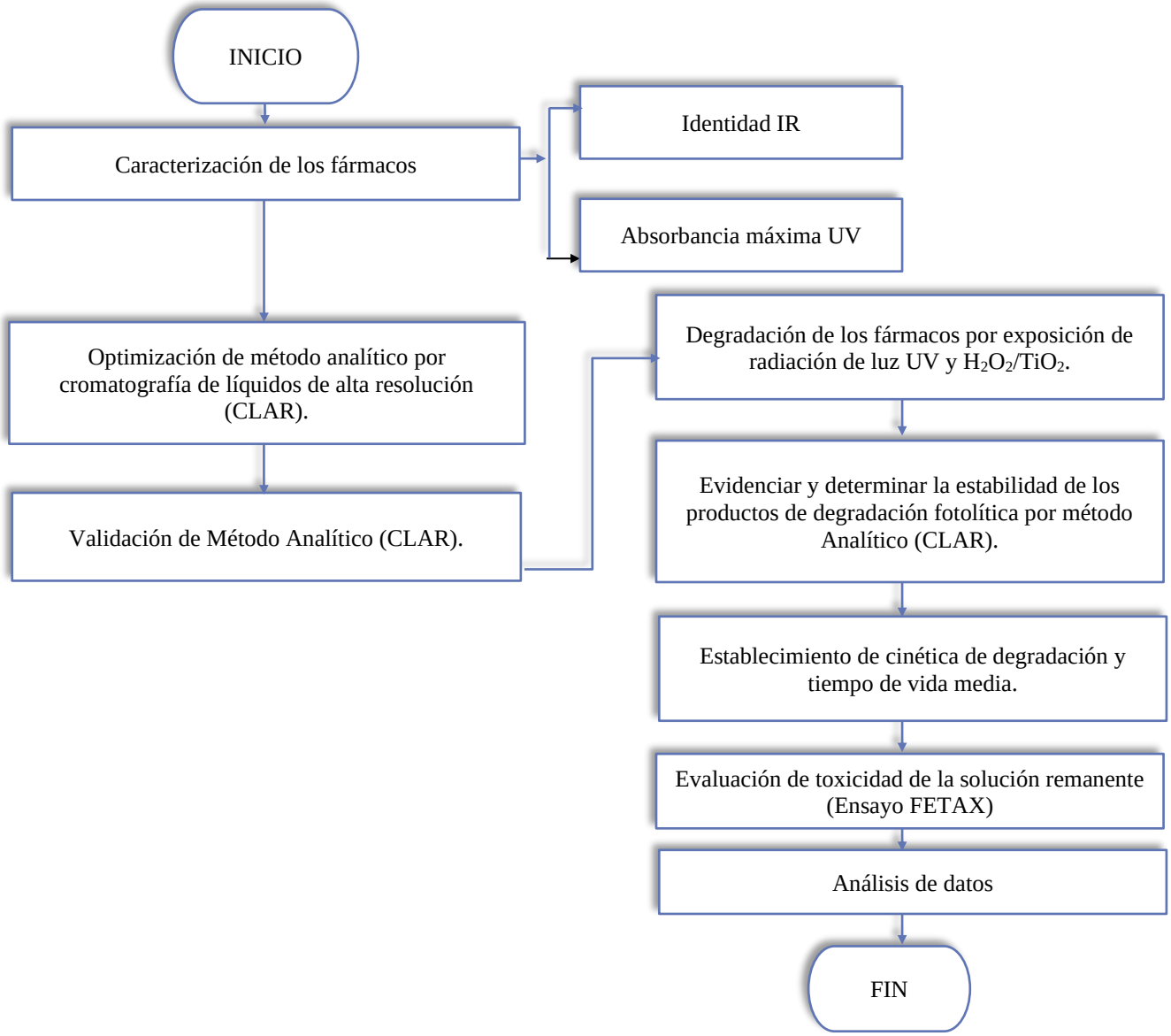


Figura 13. Diagrama de flujo de metodología

4.1. Caracterización de los fármacos

Los fármacos utilizados corresponden a carbamazepina, trimetoprima y 17-α etinilestradiol de la marca Sigma Aldrich con 98% de pureza grado estándar.

4.1.1. Identidad por radiación infrarroja (IR).

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

4.1.2. Absorbancia máxima por Ultravioleta (UV).

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

Las soluciones se prepararon realizando una dilución de una solución de 100 mg L^{-1} con agua desionizada tipo 1 grado Milli-Q. Los fármacos se diluyeron previamente con metanol.

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

4.2. Optimización del método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Se propuso la metodología descrita a continuación, para la determinación de carbamazepina, trimetoprima y 17-α-etinilestradiol por CLAR.

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

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

Condiciones cromatográficas:

Columna: Columna Eclipse XDB- C18 5 μm 4.6 x 250 mm

Flujo: 1.0 mL min-1

Fase móvil: Acetonitrilo: Acido fórmico 0.1% (v/v) 70:30

Volumen de inyección: 20 μL

Temperatura de columna: ambiente

Longitud de onda: 280 nm.

4.3. Validación de método analítico

La validación del método analítico se realizará conforme a lo indicado en la Guía de Validación de Métodos Analíticos emitida por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (CNQFB) y las directrices ICH (International Conference on Harmonisation), los parámetros se resumen en la Tabla 10 antes mencionada.

4.4. Degradación de los fármacos por radiación de luz UV.

Se utilizó una celda fotolítica con agitación consistente en un reactor tipo batch equipado con aditamento para lámpara intercambiable; con un sistema de reflujo para mantener la temperatura constante de 298 K y una parrilla de agitación magnética a 700 rpm aproximadamente, el reactor se encuentra aislado de la luz exterior; el sistema descrito se representa en la Figura 14.

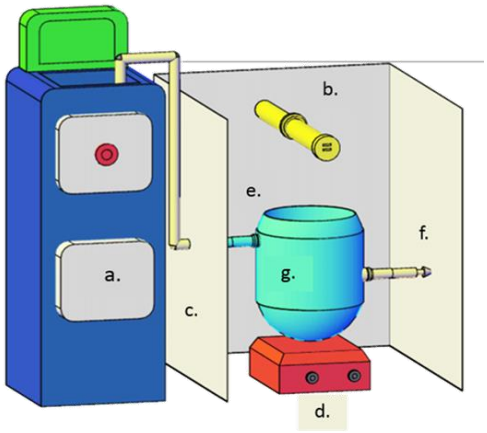


Figura 14. Equipo de degradación por luz UV.

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

Las características de las lámparas utilizadas en los experimentos se describen en la Tabla 11.

Tabla 11 Lámparas utilizadas en los experimentos de degradación:

Tipo de lámpara	Rango de longitud de onda	Potencia
UV-A	320 a 400 nm	15 W
UV-B	290 a 320 nm	15 W
UV-C	200 a 290 nm	15 W

a) Degradación de los fármacos con radiación UV

La degradación se realizó con el sistema mostrado en la Figura 14 utilizando una solución de 10 mg L^{-1} para cada uno de los fármacos, manteniendo las soluciones en agitación a 700 rpm y a temperatura constante de 298 K. Se sometieron cada una de las soluciones a radiación UV con las lámparas tipo UV-A, UV-B y UV-C descritas en la Tabla 11.

b) Degradación de los fármacos con radiación UV y H_2O_2:

La degradación se realizó con el sistema mostrado en la Figura 14 utilizando una solución de 10 mg L^{-1} para cada uno de los fármacos, manteniendo las soluciones en agitación a 700 rpm y a temperatura constante de 298

K. En el tiempo cero se adicionó una solución de H_2O_2 y se sometieron a radiación UV con las lámparas tipo UV-A, UV-B y UV-C descritas en la Tabla 11.

c) Degradación de los fármacos con radiación UV y TiO_2:

La degradación se realizó con el sistema mostrado en la Figura 14 utilizando una solución de 10 mg L^{-1} para cada uno de los fármacos y manteniendo las soluciones en agitación a 700 rpm y a temperatura constante de 298 K. En el tiempo cero se adicionó TiO_2 comercial (TiO_2 DP 25 comercial) y se sometieron a radiación UV con las lámparas tipo UV-A, UV-B y UV-C descritas en la Tabla 11.

4.5. Seguimiento de la degradación de los fármacos:

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

4.6. Determinación de cinética de fotodegradación y vida media de los fármacos

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

4.7. Evaluación de toxicidad

La evaluación de la toxicidad se desarrolló a través del ensayo de teratogénesis de embriones de rana *Xenopus Laevis*, por sus siglas en inglés FETAX. El cual evalúa los efectos de sustancias químicas sobre el crecimiento embrionario de *Xenopus Laevis*. El estudio se realizó en concordancia con los procedimientos de la guía estándar de la American Society for Testing Materials (ASTM E 1439-19) para Organismos de prueba.

Resultados

5. Resultados

5.1. Caracterización de los fármacos

5.1.1. Identidad por radiación infrarroja (IR).

a) Carbamazepina (CBZ)

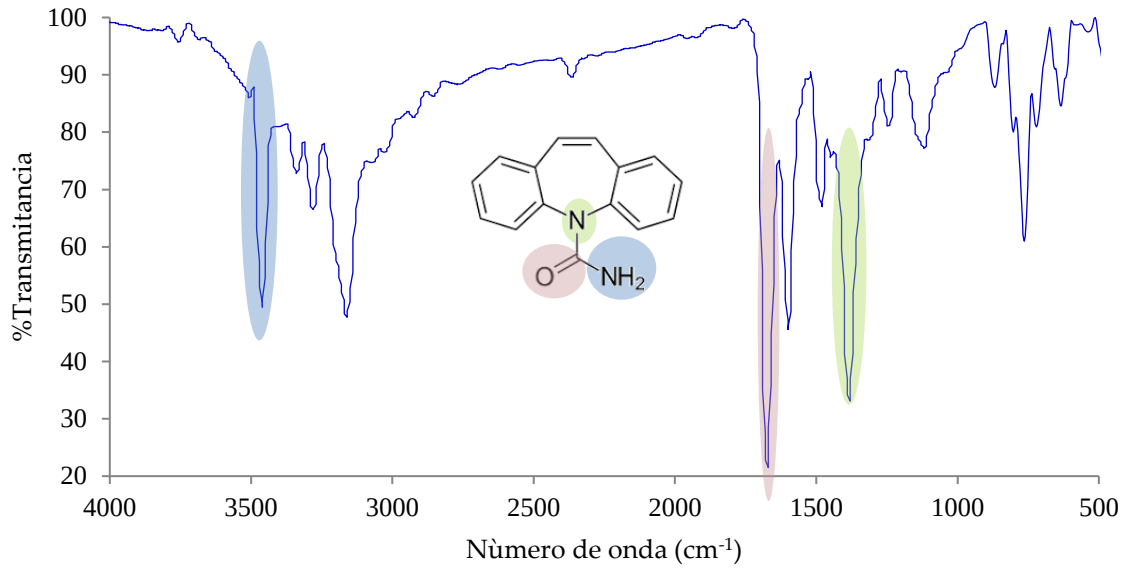


Figura 15. Espectro IR de CBZ

Tabla 12. Interpretación de espectro infrarrojo de CBZ

Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional
3500-3250	N-H alargamiento
3000-2700	$-CH_2-$, C-H alargamiento
3000- 2500	H-C=O alargamiento
1900-1650	C=O alargamiento
1475-1300	-CH- flexión N-H deformación del anillo
1000-650	Ar-H flexión

En la Figura 15 y en la Tabla 12 se muestran las señales del espectro IR de CBZ. Mostrándose los principales picos alrededor de 3500 (-NH), (1650) (-C=O) y 1380 (-NH deformación del anillo aromático). Los datos coinciden con el espectro FTIR de Spectral Database Organic Compounds SDBS No.: 16056 y lo reportado en trabajos donde se caracterizó este compuesto (Krstić *et al.*, 2015; Alrashood, 2016).

b) Trimetoprima (TMT)

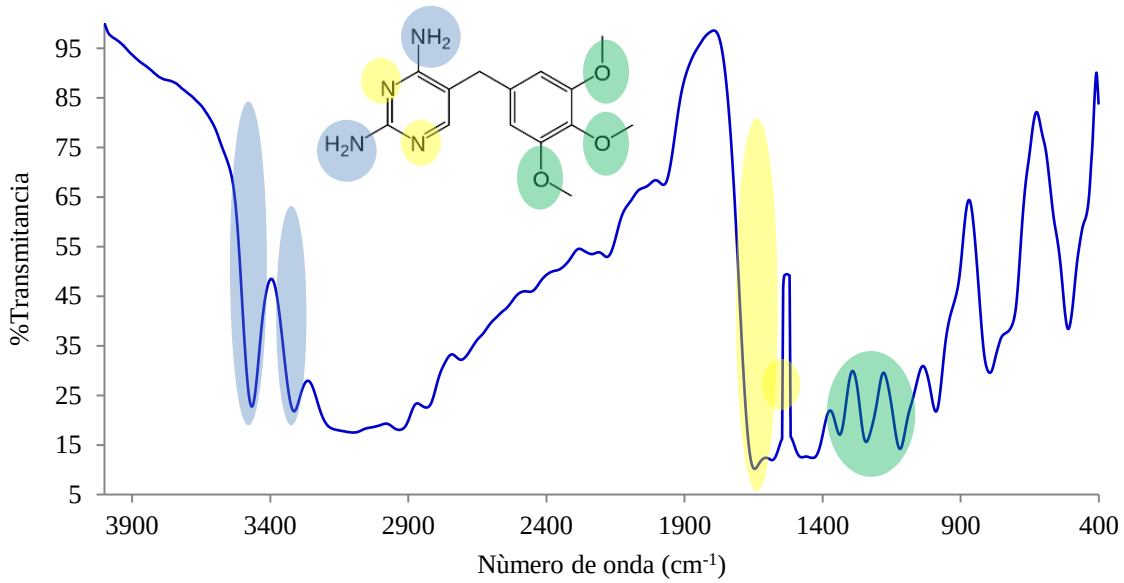


Figura 16. Espectro IR de TMT.

Tabla 13. Interpretación de espectro infrarrojo de TMT.

Número de onda	Grupo funcional
3500	N-H_2 Alargamiento asimétrico
3400	N-H_2 Alargamiento simétrico
3300-2900	Ar-H alargamiento
3000-2700	-CH_2-, C-H alargamiento
1620-1590	N-H_2 deformación por sobreposición con anillo aromático
1500-1400	CH Anillo aromático flexión
1400-1300	CH flexión
1200-1100	Metoxi aromático flexión
1000-650	Ar-H flexión

La Figura 16 y la Tabla 13 indican los principales picos de absorción a 3500 y 3400 cm^{-1} debido a la presencia del grupo amino primario (– NH), 1575.31 cm^{-1} debido a iones carboxilo (– C = O). Los datos coinciden con lo reportado en la literatura (Manius, 1978; Hernández *et al.*, 2018).

c) 17-α etinil estradiol (EE2)

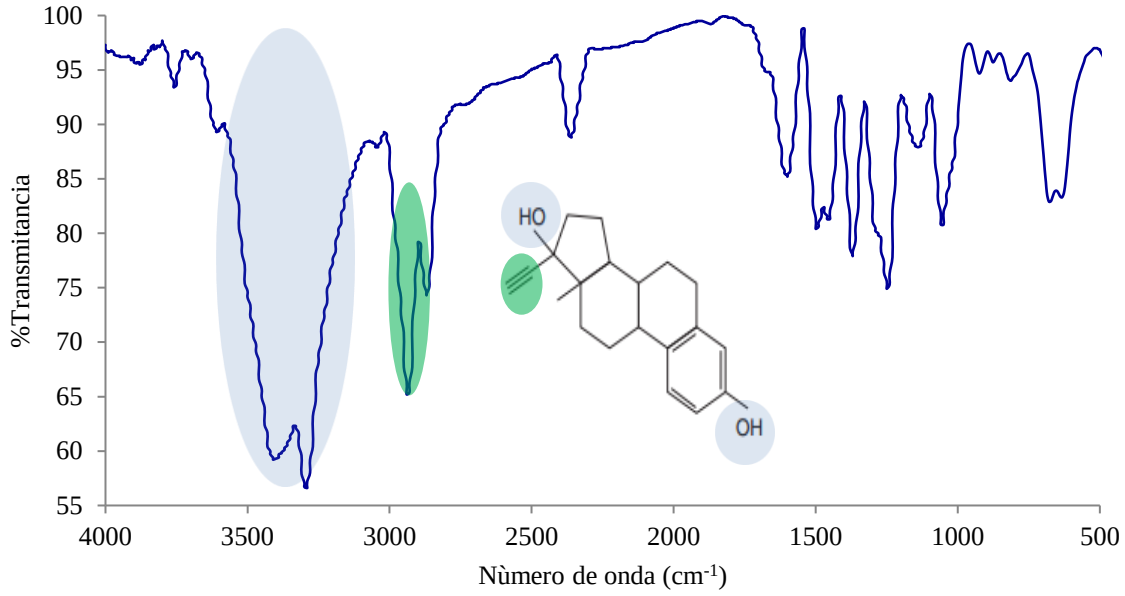


Figura 17. Espectro IR de EE2.

Tabla 14. Interpretación de espectro infrarrojo de EE2.

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

En la Figura 17 y en la Tabla 14 se muestran las principales señales del espectro IR de EE2 con una señal dentro del intervalo de 3350-3250 cm^{-1}, la cual representa un grupo de alcohol (OH). Otra señal se encuentra en 2980-2580 cm^{-1}, indicando la presencia del grupo alquilo. Los datos coinciden con el espectro FTIR de Spectral Database Organic Compounds SDBS No.: 10994.

5.1.2. Absorbancia máxima por Ultravioleta (UV).

Se encontró que la longitud de onda con máxima absorbancia para los tres fármacos en estudio es de 280 nm, como se muestra en la Figura 18. Esta corresponde a la absorción del doble enlace del anillo aromático que constituye a la molécula de cada uno de los fármacos, esta longitud de onda se utilizó como referencia para el método analítico de CLAR.

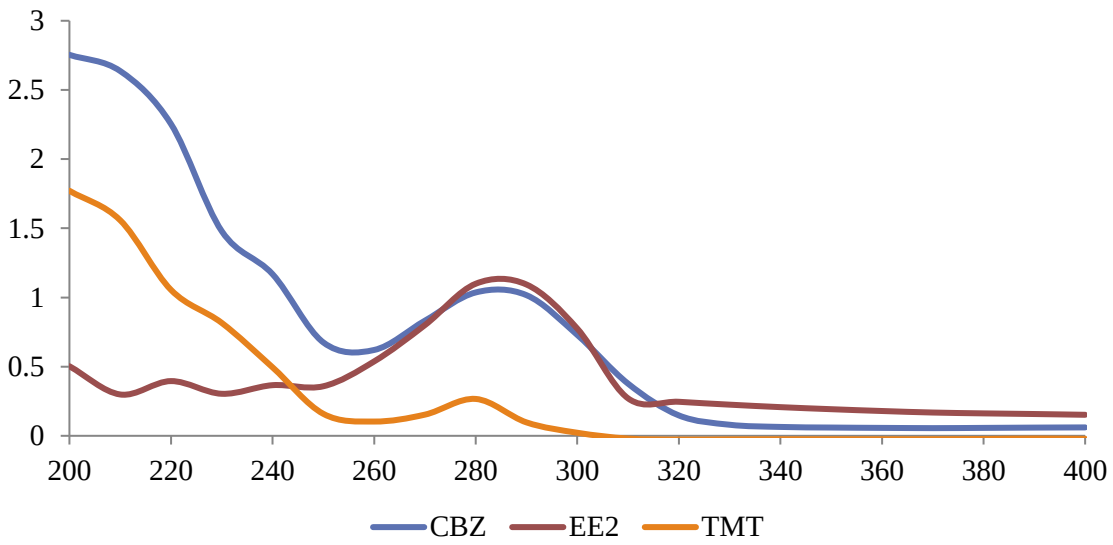


Figura 18. Espectro UV de CBZ, TMT y EE2.

5.2. Método analítico para cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución

Se inyectó una solución de 10 mg L^{-1} de cada estándar en un cromatógrafo Waters con detector tipo ABS dual, modelo 2487 y bomba de flujo isocrático modelo 515 con detector UV bajo las condiciones cromatográficas descritas en la Tabla 15.

Tabla 15. Condiciones cromatográficas para la determinación de CBZ, TMT y EE2

Columna	Eclipse XDB- C18 5 µm 4.6 x 250 mm
Flujo	1.0 mL min^{-1}
Fase móvil	A: acetonitrilo: B: ácido fórmico 0.1% 70:30 (v/v)
Volumen de inyección	20 µL
Temperatura de columna	Temperatura ambiente
Longitud de onda	280 nm
Equipo	Cromatógrafo de líquidos marca Waters Detector espectrofotométrico de onda dual modelo 2487 Bomba isocrática modelo 515 Sistema de inyección automática modelo 717 Software Waters Breeze

Los tiempos de retención se reportan se muestran en el cromatograma de la Figura 19:

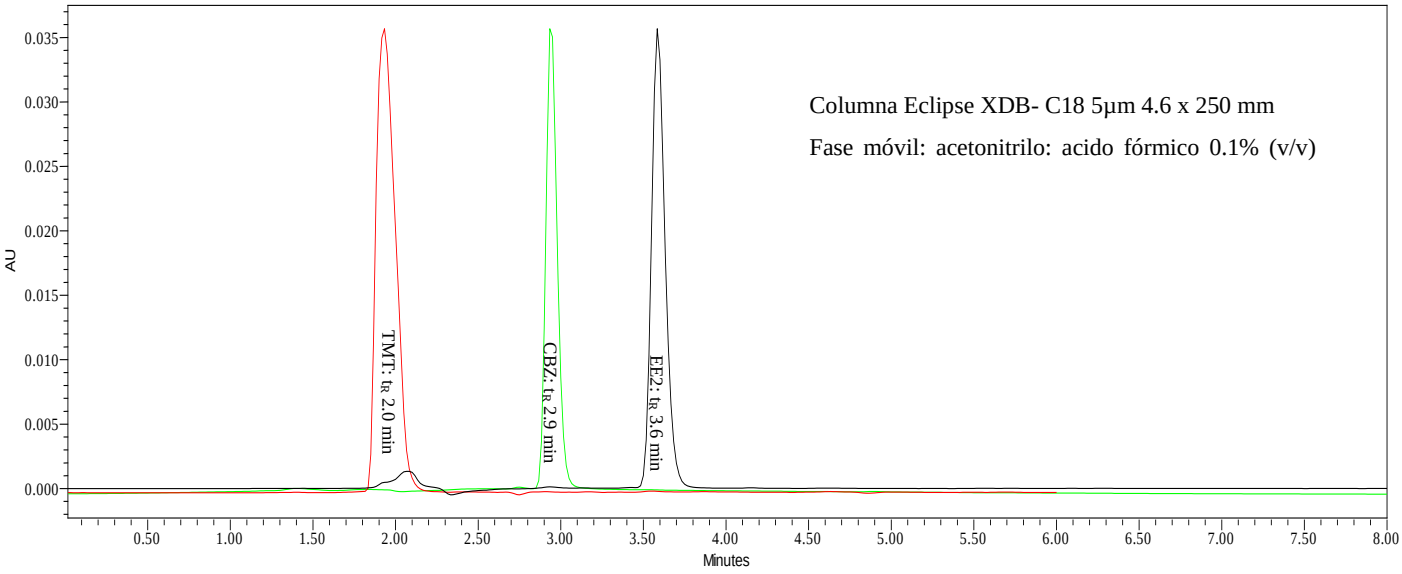


Figura 19. Tiempos de retención (t_R) de CBZ, TMT y EE2

5.3. Validación de método

La validación del método analítico se realizó conforme a lo indicado en Guía de Validación de métodos analíticos editada por el Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México. Los resultados de la validación se reportan en la Tabla 16, indicado que los métodos analíticos son exactos, precisos, lineales y los resultados son reproducibles para cada una de las pruebas analíticas. En los Anexos del 1 al 6 se describe la obtención de los parámetros para la validación.

Tabla 16. Resultados de validación del método analítico CLAR.

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Resultado CBZ	Resultado TMT	Resultado EE2
Adecuabilidad del sistema	CV ≤ 2.0%	CV =0.5 %	CV = 1.3 %	CV = 0.7 %
Precisión del sistema	CV ≤ 1.5%	CV=1.0%	CV = 1.3%	CV = 0.8 %
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 98.0$ IC (β_1) No debe incluir el cero	r^2=99.7 IC (β_1) No incluye el cero	r^2 = 99.2 IC (β_1) No incluye el cero	r^2 = 99.1 IC (β_1) No incluye el cero
Límite de detección		0.01 mg L^{-1}	0.001 mg L^{-1}	0.01 mg L^{-1}
Límite de cuantificación		0.1 mg L^{-1}	0.01 mg L^{-1}	0.1 mg L^{-1}

5.4. Degradación de fármacos

5.4.1. Degradación con radiación UV

Al realizar la degradación de 10 mg L^{-1} CBZ, TMT y EE2 bajo tres diferentes longitudes de onda 254 nm, 313 nm, 340 nm y en ausencia de luz UV a una temperatura constante de 298 K, se observa que no hay cambio en la concentración inicial de las soluciones para las cuatro condiciones, indicando que la degradación de estas moléculas por fotolisis no es viable y se confirma que es necesario aplicar un método más riguroso para degradarlas, toda vez que son compuestos con alta estabilidad y con valores de vida ($t_{½}$) media elevados. CBZ posee una $t_{½}$ de alrededor de 121 días bajo la exposición de luz solar (Andreozzi *et al.*, 2002), mientras que para EE2 se estimó de 108 días (Zuo, Zhang and Zhou, 2013) y para TMT de aproximado a 100 días (Straub, 2013).

5.5. Degradación con H_2O_2 y radiación UV

5.5.1. Efecto de la cantidad de H_2O_2 utilizada en la degradación

Dados los resultados de la degradación por fotolisis se realizaron experimentos para la eliminación de los tres fármacos utilizando H_2O_2 como agente oxidante, se variaron las concentraciones de este de 0.1 a 0.9 mol L^{-1}. Como se muestra en el perfil de degradación de las figuras 20 y 22, la presencia de H_2O_2 a diferentes concentraciones modifica la concentración inicial de las soluciones, obteniéndose una reducción de la presencia de los fármacos, como lo evidencian los cromatogramas de inicio y fin de las reacciones de CBZ y TMT, de las figuras 21 y 23; demostrando que este es un método más eficiente para la degradación de CBZ y TMT en comparación con la fotolisis. Conviene destacar, que EE2 no logra degradarse totalmente bajo estas condiciones, como se observa en el perfil de degradación de la Figura 24, donde se observa que solo se degrada por debajo del 60% a un mayor tiempo y a una concentración superior al H_2O_2 usado en los otros dos fármacos. Por ende, se puede considerar que la degradación por este método no es viable para él, como se muestra en el cromatograma de la Figura 25, sigue presente después de ser expuesto a las mismas condiciones donde sí se degradaron los otros dos fármacos.

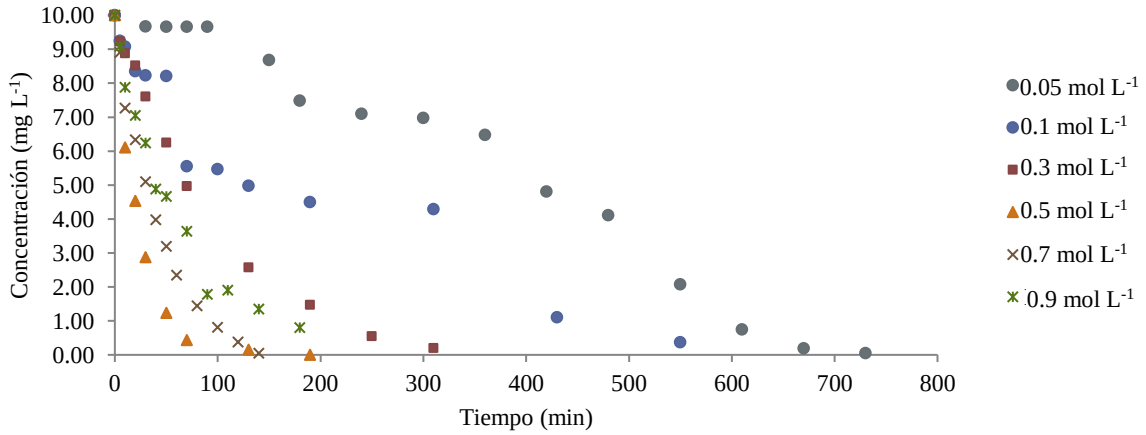


Figura 20. Perfil de degradación UV/H_2O_2 de CBZ

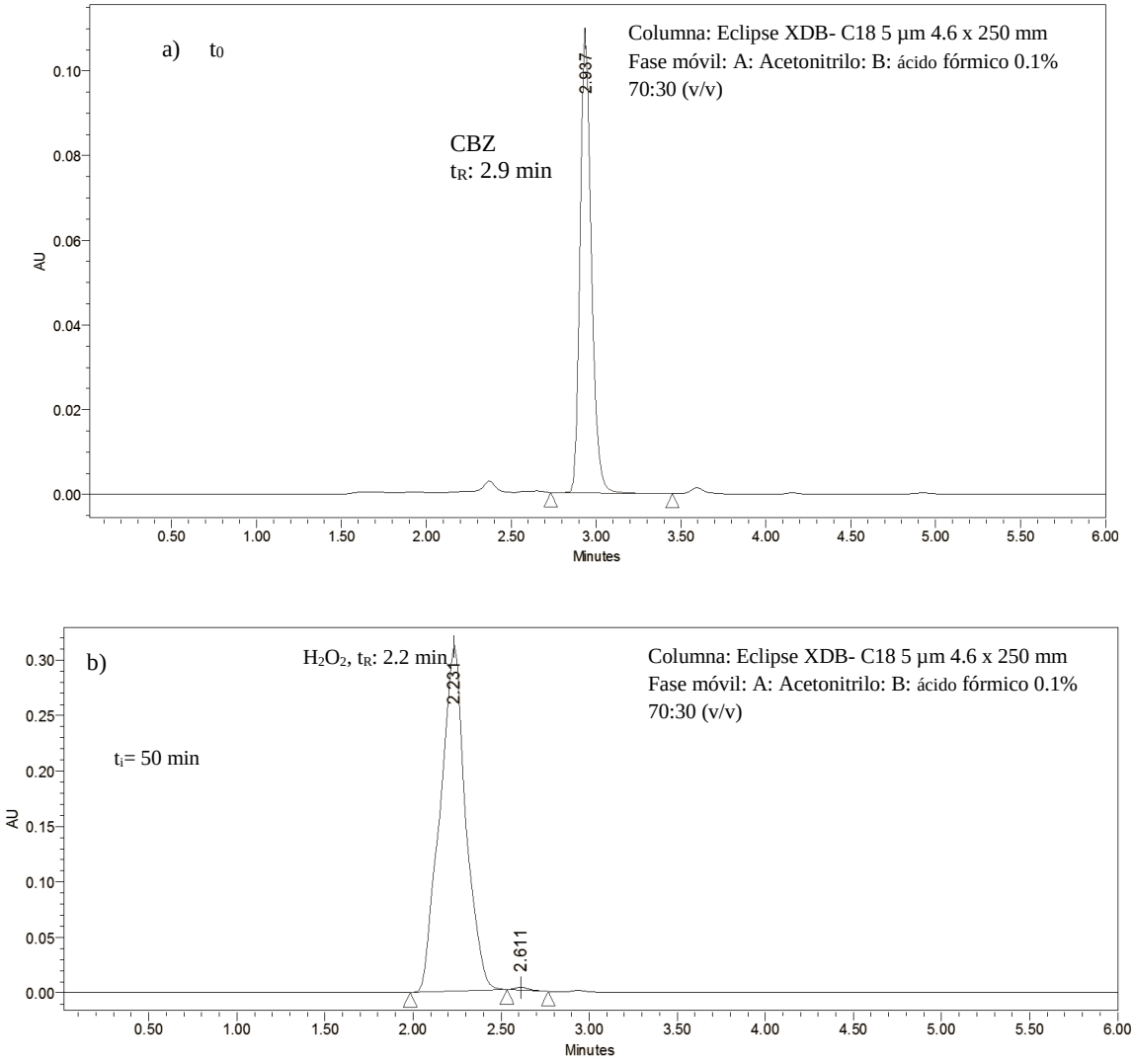


Figura 21. Cromatogramas de degradación UV/H_2O_2 de CBZ (H_2O_2: 0.5 mol L^{-1}). a) Cromatograma inicial de CBZ; b) Cromatograma fina de CBZ después de concluir su degradación

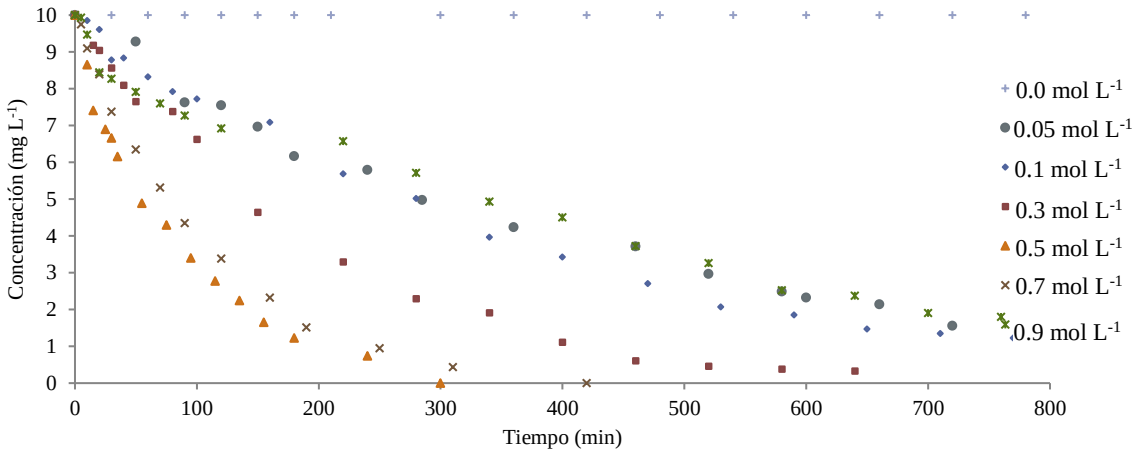


Figura 22. Perfil de degradación UV/H_2O_2 de TMT

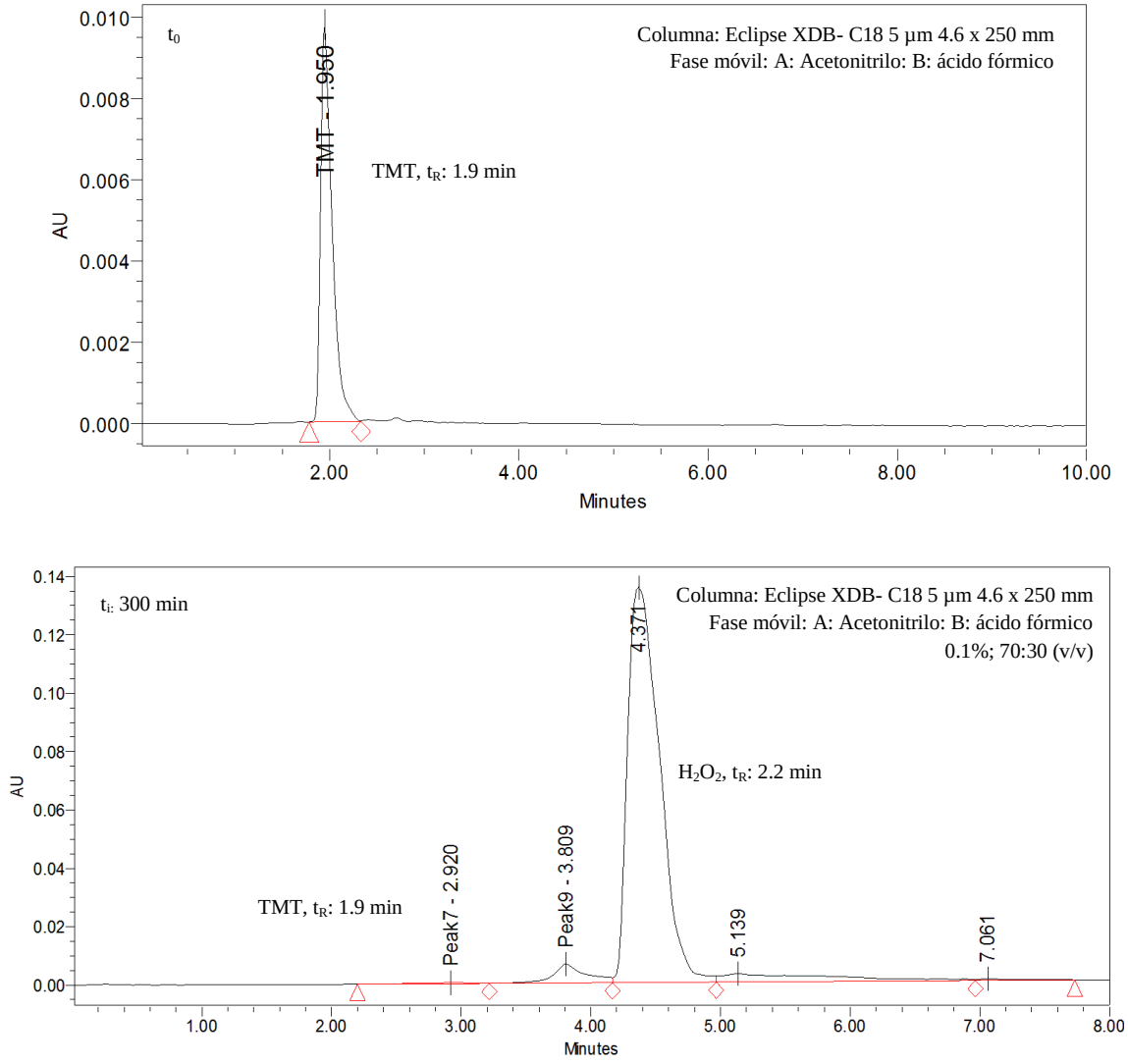


Figura 23. Cromatogramas de degradación UV/H_2O_2 de TMT (H_2O_2: 0.5 mol L^{-1}). a) Cromatograma inicial; b) Cromatograma final después de concluir su degradación

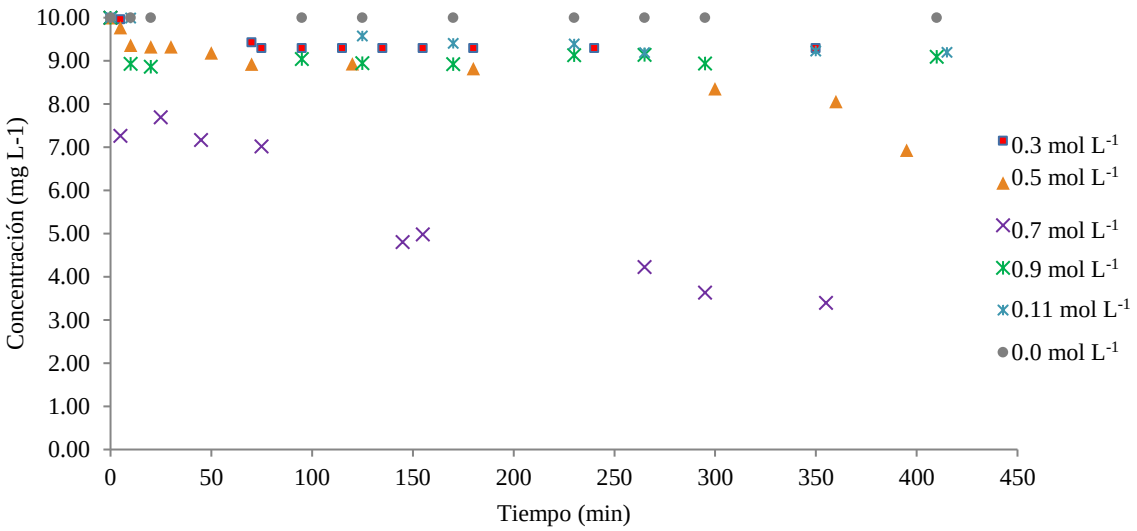


Figura 24. Perfil de degradación UV/H_2O_2 de EE2

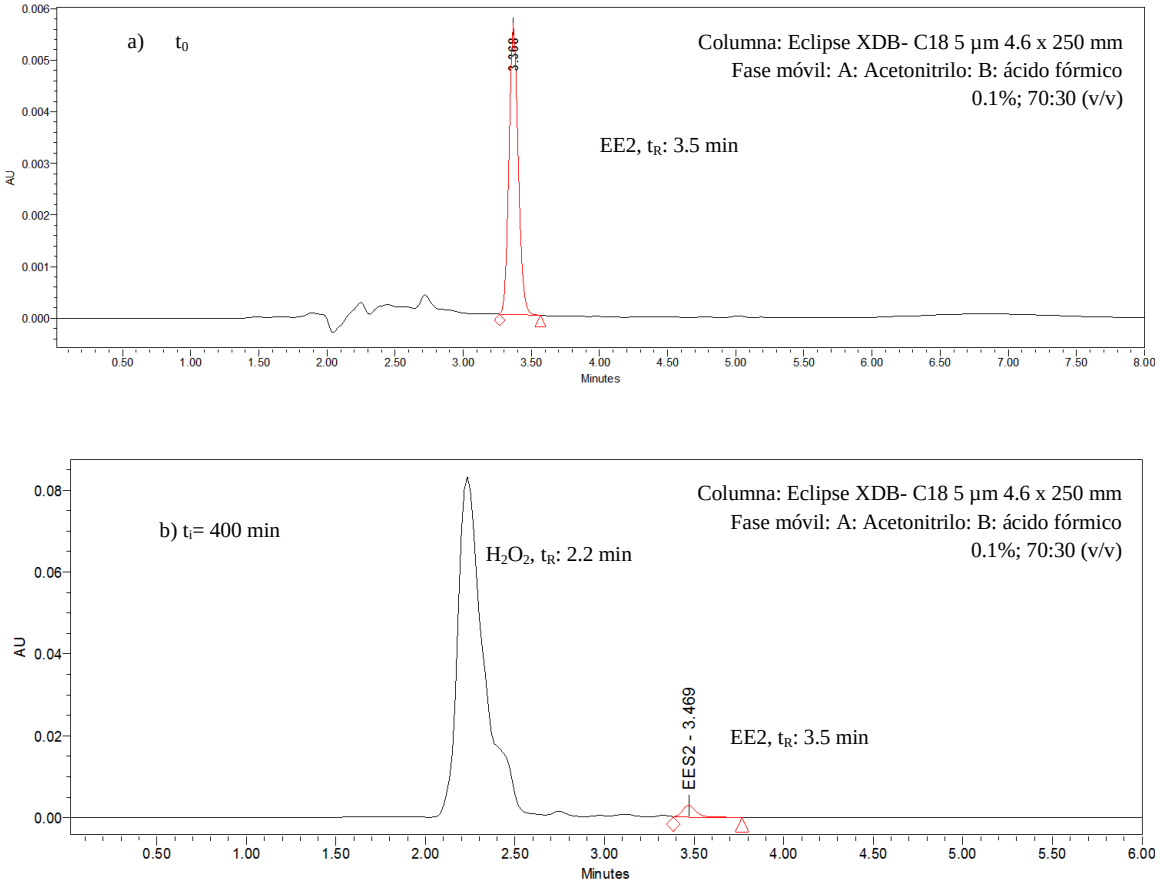


Figura 25. Cromatogramas de degradación UV/H_2O_2 de EE2 (H_2O_2: 0.5 mol L^{-1}). a) Cromatograma inicial; b) Cromatograma final

Tomando en cuenta el efecto de la cantidad utilizada de H_2O_2 en la reacción de CBZ y TMT, se puede observar en los perfiles de las figuras 20 y 22 que dentro de un rango de 0.1 a 0.5 mol L^{-1} la degradación se ve favorecida al aumentar la cantidad del oxidante; por consiguiente, los tiempos de degradación disminuyeron. El tiempo para CBZ paso de 700 minutos con una concentración de 0.05 mol L^{-1}; a alrededor de 100 minutos usando una concentración de 0.5 mol L^{-1}.En TMT el tiempo disminuyo a la mitad, reduciéndose de 600 minutos usando 0.3 mol L^{-1} de H_2O_2 a 300 minutos con 0.5 mol L^{-1}. Por otro lado, en EE2 los cambios de concentración solo se observaron con mayor intensidad a partir de 7 mol L^{-1} de H_2O_2.

Al utilizar concentraciones superiores a los 0.5 mol L^{-1} las degradaciones no ocurrieron con la tendencia observada en las 3 primeras concentraciones de 0.1, 0.3 y 0.5 mol L^{-1}, puesto que lo tiempos requeridos para completar la degradación fueron superiores al tiempo de degradación alcanzado por esta concentración.

La razón de este comportamiento es debido a que al incrementarse la cantidad de H_2O_2 se genera un excedente de radicales hidroxilos (OH·), que da paso a una reacción secundaria de formación de H_2O descritas en la Ecuación 22-25. La cantidad de OH· disponibles para degradar disminuyen, ocasionando una eficiencia de degradación menor, que se ve reflejada en incrementos del tiempo de degradación y porcentajes de eliminación por debajo de los valores alcanzados por concentraciones menores.

$$H_2O_2 \xrightarrow{hv} 2 \cdot OH$$ .....Ecuación 22

$$\cdot OH + CBZ \rightarrow Intermediate$$ .....Ecuación 23

$$H_2O_2 + OH \rightarrow HO_2 + H_2O$$ .....Ecuación 24

$$\cdot OH + HO_2 \cdot \rightarrow O_2 + H_2O$$ .....Ecuación 25

Evaluando los tiempos requeridos para la degradación de CBZ y TMT, se puede decir que la concentración de 0.5 mol L^{-1} fue la condición más eficiente. Por el contrario, en EE2 la degradación de H_2O_2 no es viable debido a que los tiempos y la cantidad requerida para alcanzar la degradación total fueron muy superiores a la tendencia observada por los otros dos fármacos.

En CBZ la Figura 26 muestra que el 90 % de la degradación se alcanza alrededor de los 70 min; cabe señalar que en condiciones con menor cantidad de H_2O_2 el porcentaje alcanzado fue por debajo del 50% y a concentraciones superiores a 0.5 mol L^{-1} los valores fueron inferiores al 70%. Demostrando que a pesar de la existencia de más radicales OH·, estos no se utilizan directamente en la degradación y generan una reacción con menor tasa de eficiencia.

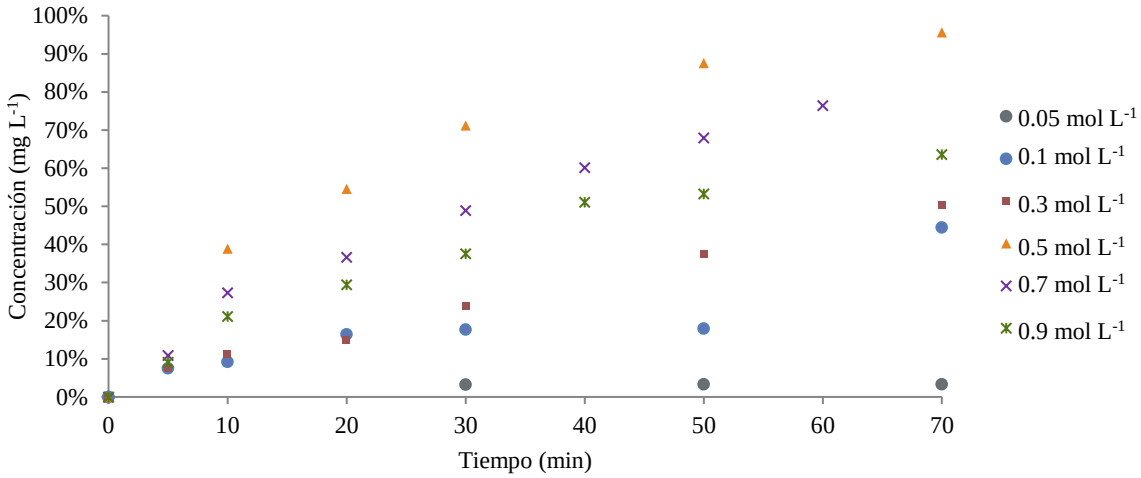


Figura 26. Porcentaje de degradación de CBZ con UV/H_2O_2

En el caso de TMT, la Figura 27 indica que para alcanzar el 90 % de la degradación se requiere de al menos 350 min; siendo 5 veces más que el tiempo requerido para degradar CBZ en la misma proporción, bajo las mismas condiciones, 0.5 mol L^{-1} de H_2O_2 radiación UV-C. Análogamente, en condiciones con menor cantidad de H_2O_2 el porcentaje alcanzado fue menor al 50% y a concentraciones superiores a 0.5 mol L^{-1} los valores fueron inferiores al 80%, indicando que del mismo modo que en CBZ, un aumento de la eficiencia de remoción depende de no sobrepasar el exceso de radicales OH·.

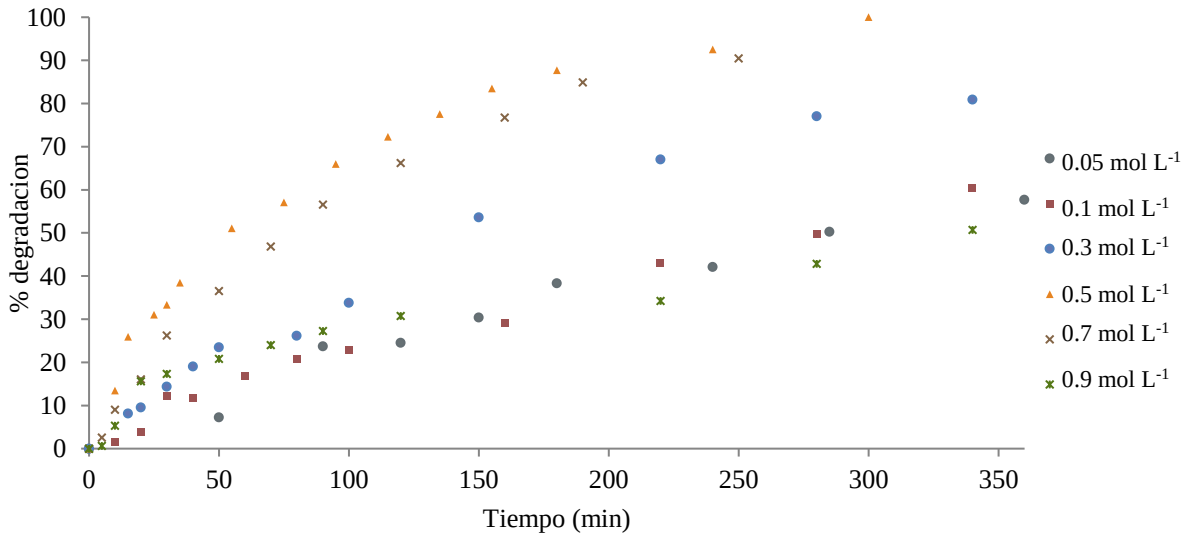


Figura 27. Porcentaje de degradación TMT con UV/H_2O_2

La Figura 28 muestra la comparación de la degradación de los tres fármacos, siendo que TMT requiere mayor tiempo que CBZ, y es más estable bajo las condiciones de degradación con H_2O_2 y radiación UV-C, pero en menor grado que EE2, siendo este el más resistente a esta condición, de lo que se concluye que no es viable degradarlo con este método.

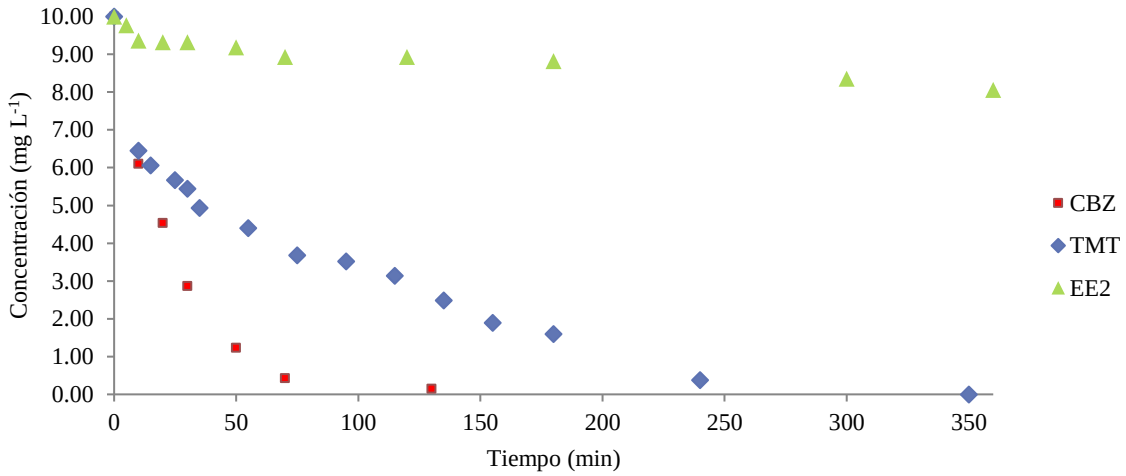


Figura 28. Degradación de CBZ, TMT y EE2 con UV/H_2O_2

5.5.2. Efecto de la variación de la radiación UV en la degradación

Siendo la condición de 0.5 mol L^{-1} de H_2O_2 con radiación tipo UV-C la más eficiente para la degradación de CBZ y TMT, se alcanza un porcentaje de degradación más alto en menor tiempo. Se procedió a variar la radiación UV, aplicando longitudes de onda de 320 nm (UV-B) y 340 nm (UV-A).

Las figuras 29 y 30 muestran que solo la radiación tipo UV-C logró degradar a CBZ y TMT en menor tiempo. Por el contrario, la radiación UV-B en CBZ solo degrado por debajo del 5% y la UV-A obtuvo un porcentaje menor al 1 %, al igual que en TMT para las tres condiciones restantes, esto debido a que se encuentran fuera del rango de la longitud de onda donde poseen máxima absorbancia. La condición H_2O_2 en ausencia de radiación UV no genero cambios en la concentración inicial, indicando que solo la radiación UV-C emite la energía necesaria para poder generar la cantidad suficiente de radicales OH· para la degradación de los compuestos.

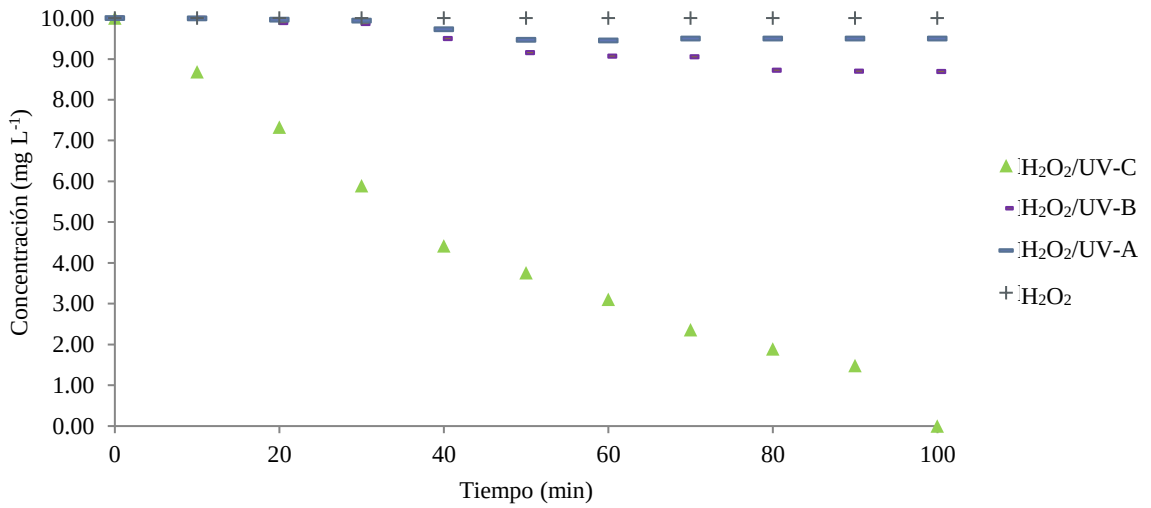


Figura 29. Degradación de CBZ UVA, UV-B y UV-C- con H_2O_2

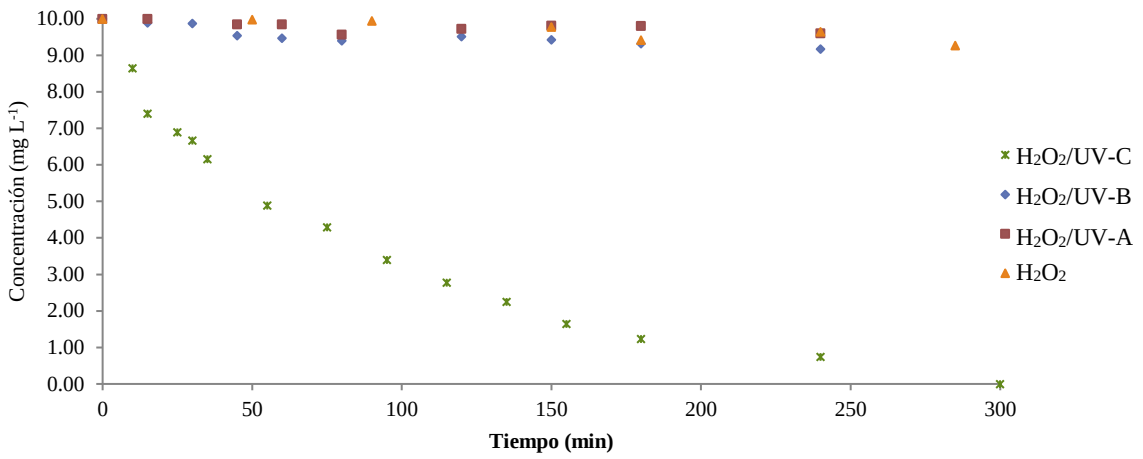


Figura 30. Degradación de TMT UVA, UV-B y UV-C- con H_2O_2

5.5.3. Efecto de la variación de la concentración inicial del fármaco en la degradación con H_2O_2

Se degradaron cinco concentraciones iniciales diferentes de los fármacos 2, 4, 6, 8 y 10 mg L^{-1}; bajo la combinación de radiación UV-C con H_2O_2 a una concentración de 0.5 mol L^{-1}.

a) CBZ

La Figura 31 describe que al disminuir la concentración inicial de CBZ, los tiempos necesarios para alcanzar un porcentaje de degradación por arriba del 90 %, disminuyen de 100 min para 10 mg L^{-1} a alrededor de 40 minutos para 2 mg L^{-1}; siendo que para la concentración de 4 y 6 mg L-^{1} se requirió cerca de 60 y 80 minutos para conseguir ese valor.

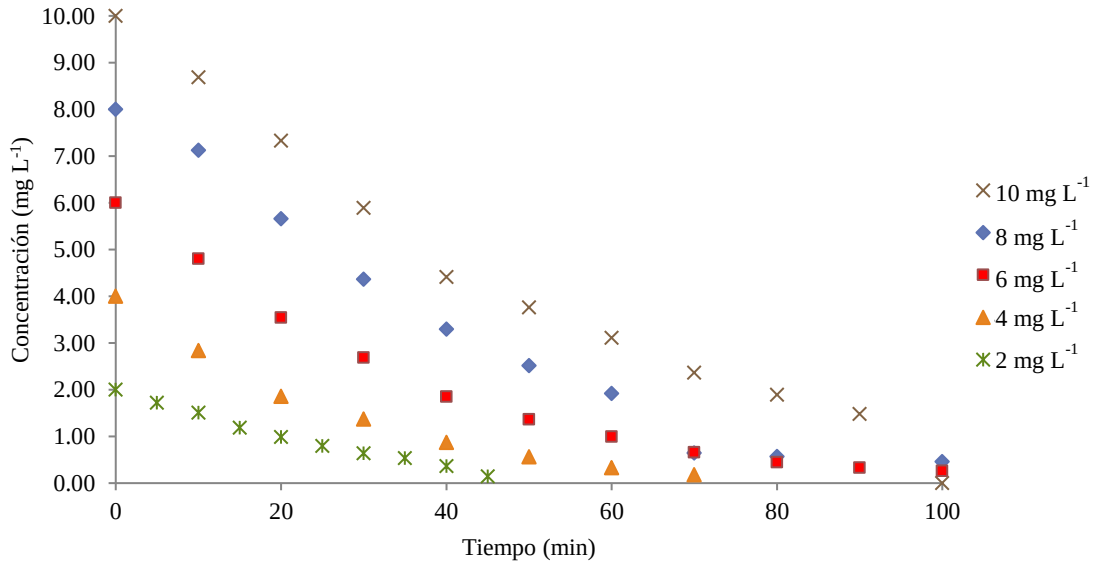


Figura 31. UV/H_2O_2 de CBZ

b) TMT

La Figura 32 describe que al disminuir la concentración inicial de CBZ, los tiempos necesarios para alcanzar un porcentaje de degradación por arriba del 90 %, disminuyen de 100 min para 10 mg L^{-1} a alrededor de 40 minutos para 2 mg L^{-1}; siendo que para la concentración de 4 y 6 mg L^{-1} se requirió cerca de 60 y 80 minutos para conseguir ese valor.

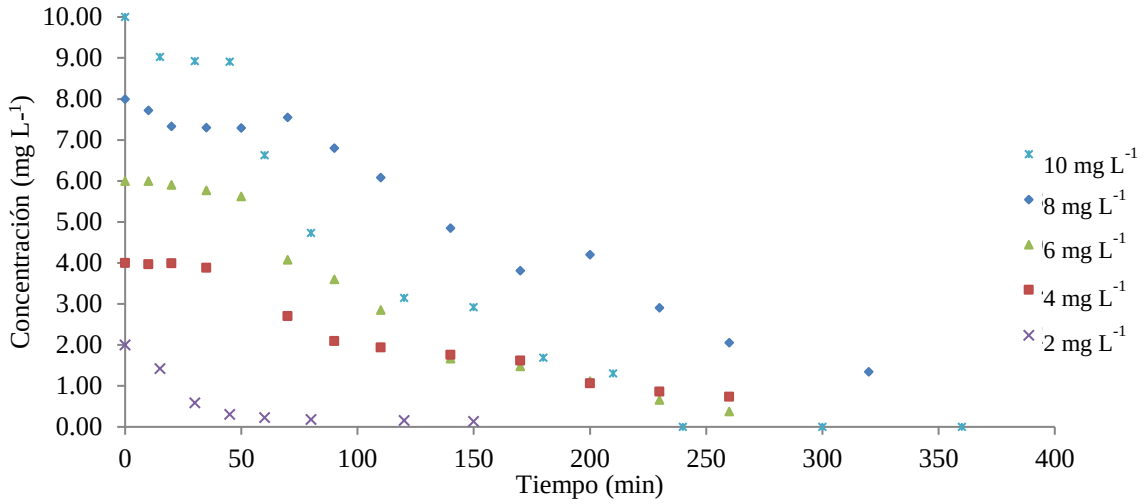


Figura 32. UV/H_2O_2 de TMT

El comportamiento anterior se debe a que al existir una menor cantidad de partículas de los fármacos se incrementa la probabilidad de que interactúen con mayor frecuencia con los radicales OH disponibles, ocasionando que se efectúe la reacción en menor tiempo y además al existir menor cantidad de partículas el paso de la radiación hacia la solución se ve menos interferido que con las soluciones con mayor concentración, por lo que los tiempos de reacción disminuyen.

5.5.4. Efectos en la solución remanente después de aplicar tratamiento con UV-C/H_2O_2

En resumen, los resultados anteriores confirman que después de aplicar un tratamiento con UV-C /H_2O_2 la cantidad final de los fármacos estudiados presentes en las soluciones remanentes será mucho menor. Sin embargo, este tipo de técnica se clasifica como un proceso de oxidación avanzada (AOP) basado en la degradación de un compuesto a través de radicales libres que da origen a una serie de reacciones que tienen como resultado la formación de radicales de la molécula original que dan paso a subproductos, por lo que las soluciones remanentes consisten en una mezcla de subproductos.

a) CBZ

De los experimentos realizados el cromatograma de la Figura 33 muestra que durante la degradación de 10 mg L^{-1} de CBZ con 0.5 mol L^{-1} de H_2O_2 y radiación tipo UV-C se forma un subproducto (DP_1, tiempo de retención, t_R =2.6 min) con gran estabilidad que permanece presente durante toda la reacción de degradación, hasta después de la desaparición de CBZ.

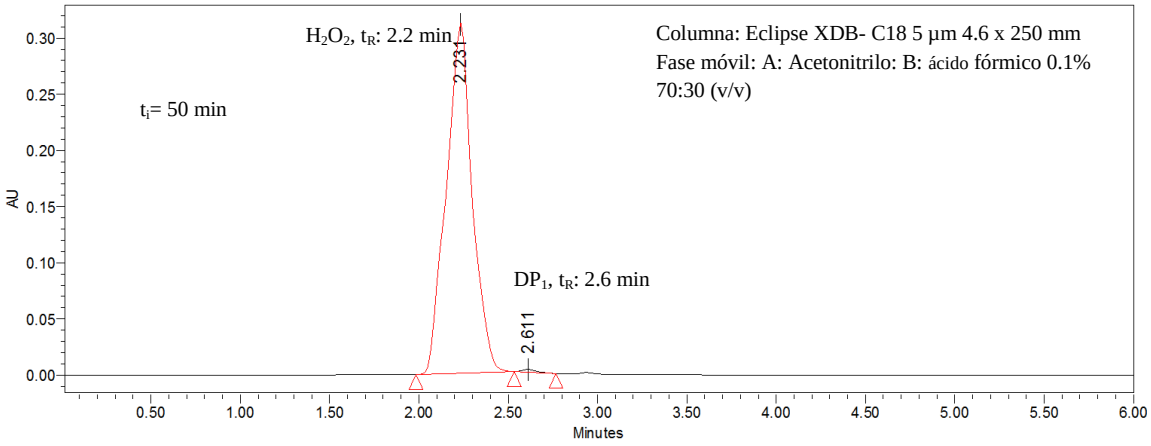


Figura 33. Cromatograma final de degradación UV/H_2O_2 de CBZ (H_2O_2: 0.5 mol L^{-1})

La figuras 34 y 35 muestran que este compuesto se encuentra en menor proporción que CBZ y se forma alrededor de 10 minutos después de haber iniciado el tratamiento y desaparece alrededor de los 90 minutos, indicando que para su desintegración se requiere continuar con la aplicación del tratamiento aun después de la eliminación de CBZ y que posee una estabilidad similar a CBZ, porque, aunque se presente en menor proporción se encuentra durante todo el tiempo de degradación. A pesar, de que solo se detecta un subproducto y este se elimina dentro del mismo proceso de oxidación con UV-C /H_2O_2 es necesario considerar que la solución final ya sin presencia del fármaco ni del subproducto queda con H_2O_2 residual.

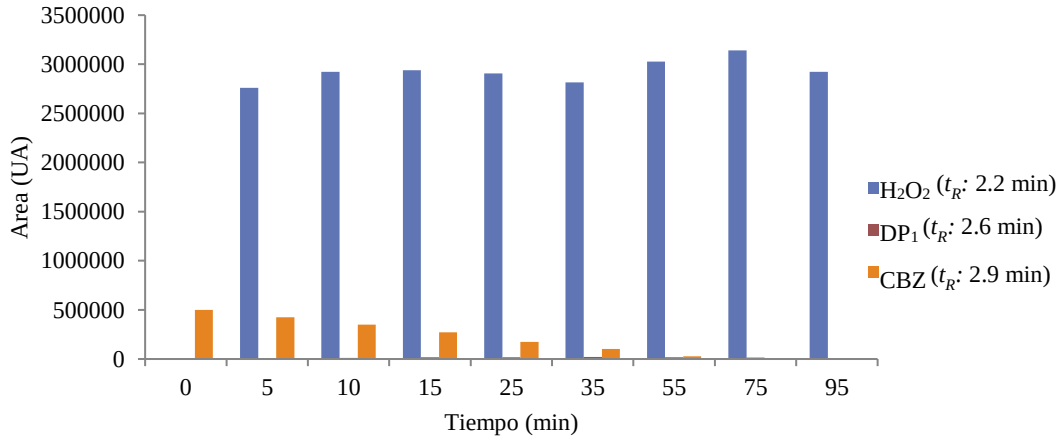


Figura 34. Productos derivados de la degradación UV/H_2O_2 de CBZ

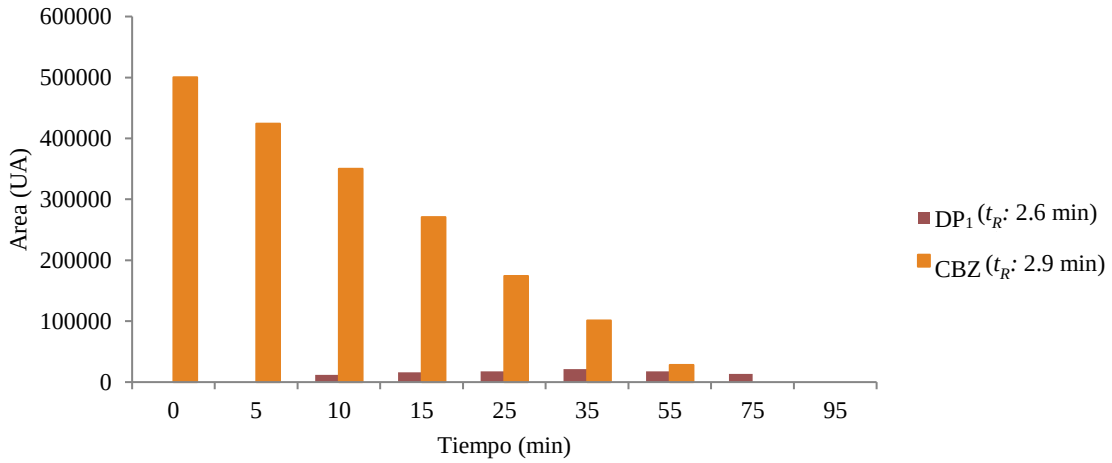


Figura 35. Comportamiento de DP_1 UV/H_2O_2 de CBZ

Se ha encontrado que al tratar CBZ con este tipo de técnicas la formación de intermediarios y subproductos derivan de la reacción de oxidación de la molécula por efecto del ataque del radical OH· hacia los anillos aromáticos de la molécula, como se muestra en la ruta de degradación de la Figura 36 (Vogna *et al.*, 2004). Siendo que en reacciones con UV/H_2O_2 los principales subproductos son acridina y sus derivados ácido 2-amino benzoico, ácido 2- hidroxi benzoico, 1-Hidroxiacridina y 2 Hidroxiacridina (Vogna *et al.*, 2004; Kudlek, 2018). Pudiéndose originar compuestos adicionales derivados de las condiciones específicas de cada experimento; por lo que al finalizar el tratamiento la solución remante será una mezcla de subproductos en diferentes proporciones.

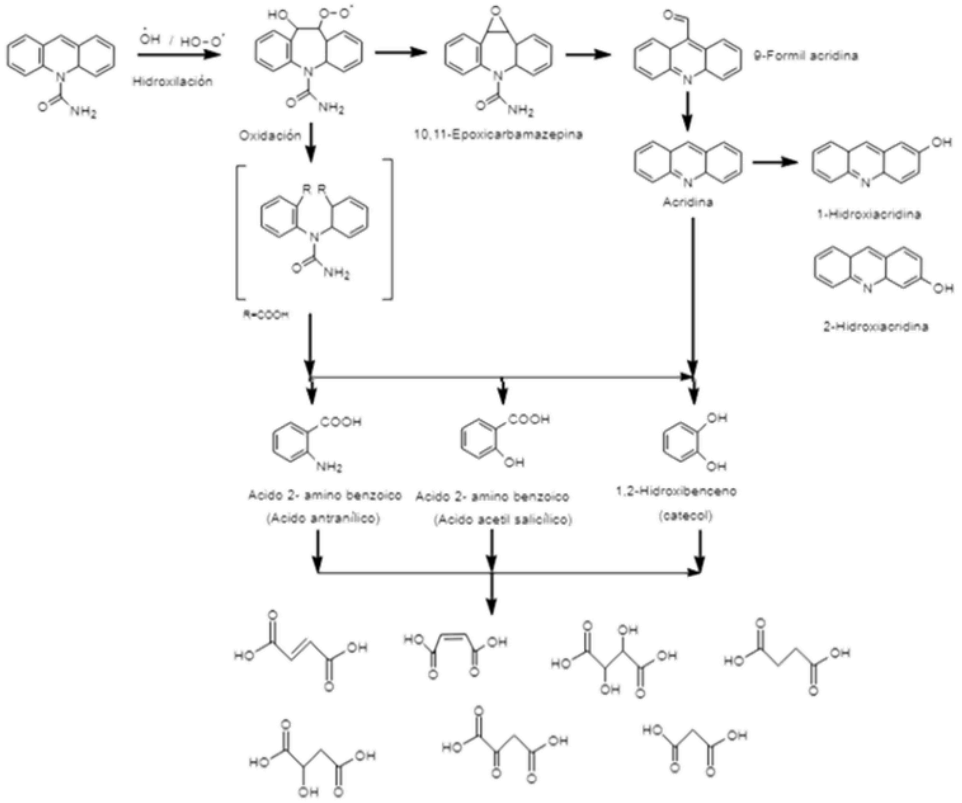


Figura 36. Ruta de degradación de CBZ inducida por UV/H_2O_2 (Vogna *et al.*, 2004).

Según lo reportado por Vogna *et al.*, 2004 , uno de los pasos iniciales de la degradación de CBZ es una reacción de hidroxilación en la posición 10 para dar un intermedio radical que da paso a la formación de 10,11-epoxicarbamazepina. Posteriormente el anillo epóxido sufre una apertura y origina al compuesto 9-Formilacridina. Este este último se descompone para producir acridina. Furst y Uetrecht, 1993, alternativamente mencionan que puede ocurrir una oxidación de carbamazepina por radicales OH· a través del ataque inicial a los restos del anillo aromático dando lugar a derivados hidroxilados que pueden ser propensos a la descomposición a través de ácido antranílico (Ácido 2- amino benzoico), ácido salicílico (Ácido 2- hidroxi benzoico), catecol (1,2 hidroxibenceno) y otros intermedios.

De los varios compuestos originados de la degradación con UV/H_2O_2, se ha reportado en diversos estudios a acridina como un subproducto comúnmente hallado después de la aplicación de diferentes tipos de AOP´s en efluentes con este fármaco. Esta se encuentra clasificado dentro del grupo de los azaarenos, los cuales son moléculas con bases heterocíclicas polinucleares que contienen un solo átomo de nitrógeno dentro de 2,3,4 o más sistemas de anillos aromáticos (Southworth, Parkhurst and Beauchamp, 1979). La Figura 37 muestra su estructura química.

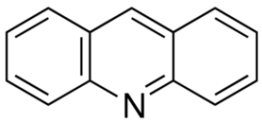


Figura 37. Estructura química de acridina ($C_{13}H_9N$, 9-Azaantraceno, Dibenzo [b, e] piridina)

La acridina ha sido principalmente detectada como contaminante atmosférico resultado de la combustión de hidrocarburos (Negrón-Encarnación and Arce, 2007), así como en efluentes acuáticos (Vogna *et al.*, 2004). Se ha demostrado que genera efectos mutagénicos y actividad carcinogénica similares a los hidrocarburos poliaromáticos (Shinohara *et al.*, 1983), en especies como virus, bacterias, levaduras, Drosophilia (*Bombix mori*) y células mamíferas (Nasim and Brychcy, 1979; Ferguson R., Lynnete; Denny A., 1991). El comportamiento de este subproducto genera un riesgo potencial para al medio ambiente, por lo que es necesario asegurar su completa degradación y monitorear a sus derivados.

b) TMT

En el caso de TMT se formaron tres productos de degradación mayoritarios, con menor estabilidad que el fármaco; ya que se comenzaron a detectar 25 minutos después de haber iniciado el tratamiento y disminuyeron alrededor de dos horas después, ocasionando que la solución remanente sea en su mayor proporción H_2O_2 residual, como lo evidencia el cromatograma la Figura 38.

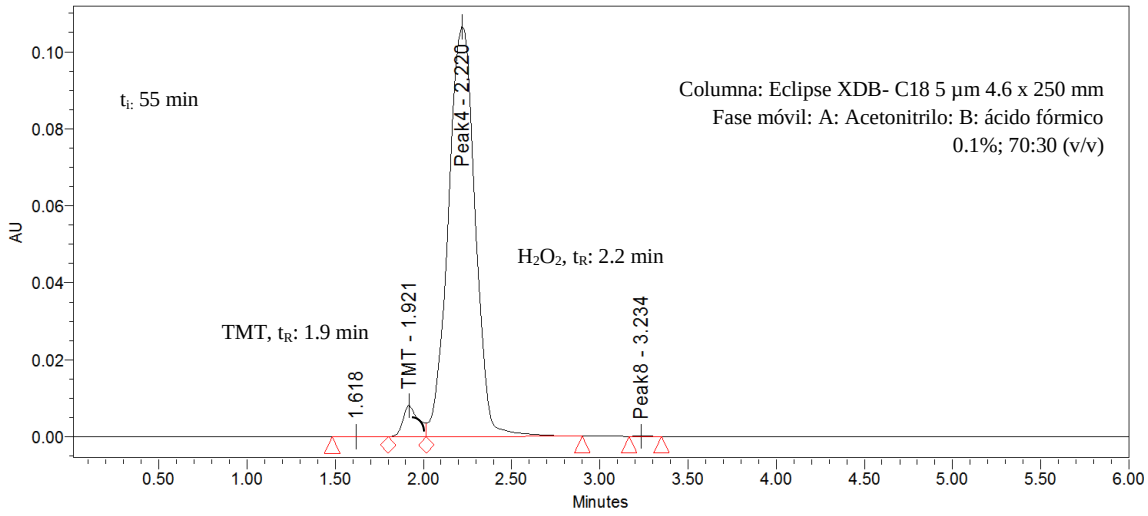


Figura 38. Cromatogramas de degradación UV/H_2O_2 de TMT (H_2O_2: 0.5 mol L^{-1})

El perfil del comportamiento de formación de los tres productos de degradación se muestra en la Figura 39, donde se aprecian los intervalos de tiempo en donde comenzaron a detectarse en mayor y menor proporción.

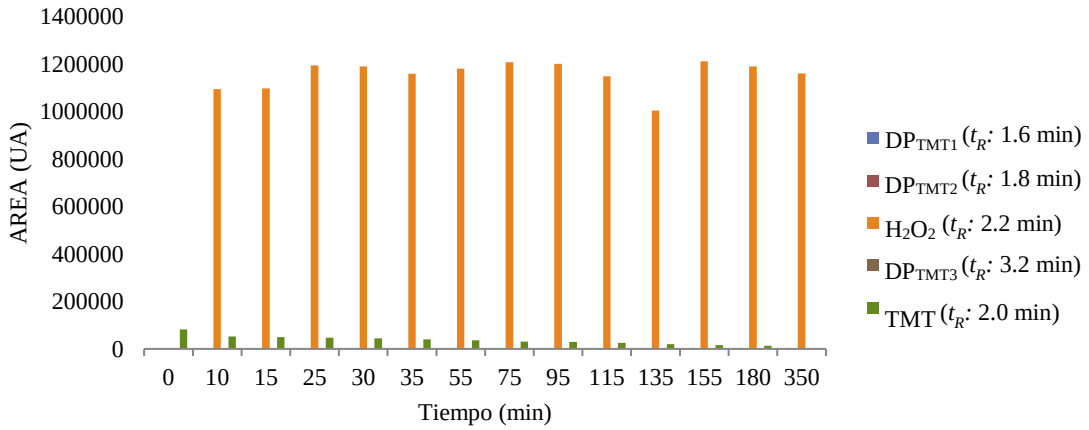


Figura 39. Productos derivados de la degradación UV/H_2O_2 de TMT.

La Figura 40 describe que estos compuestos se encuentran en menor proporción que TMT y poseen una estabilidad inferior, siendo DP_{TMT2} el mayoritario durante los primeros 30 minutos, y a partir de los 50 minutos aparecen los subproductos DP_{TMT1} y DP_{TMT3} con un tiempo de vida similar solo variando en la proporción durante los 85 a 95 minutos donde DP_{TMT1} es el predominante.

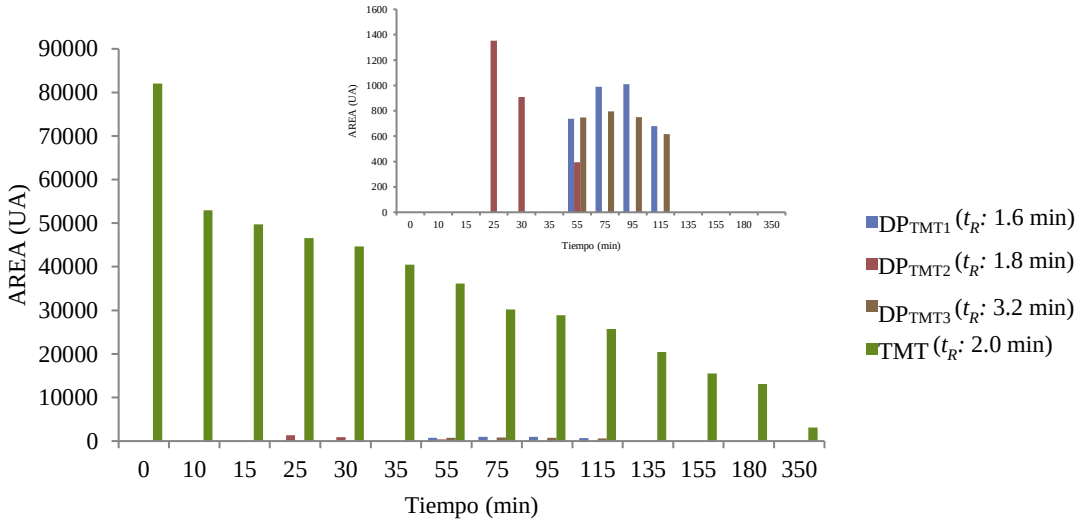


Figura 40. Comportamiento de los productos derivados de la degradación UV/H_2O_2 de TMT.

Según lo reportado por Wang *et al.*, 2019 la formación de estos subproductos se debe a la reacción de TMT con los radicales hidroxilos por un mecanismo predominante de hidroxilación, acompañado por un mecanismo de desmetilación, oxidación y carbonilacion, que da paso a la adición del grupo carbonilo en la posición 7 de la molécula; como lo indican las rutas de degradación propuestas de la Figura 41. Siendo los subproductos $C_{14}H_{19}N_4O_4$ con m/z 307 y $C_{14}H_{19}N_4O_4$ con m/z 305 los más abundantes y frecuentemente detectados en experimentos similares que derivan de una serie de reacciones donde ocurre un ataque de radicales OH·. Zhang, Yang, C.-H. Huang, *et al.*, 2016 , reportan que la formación de estas moléculas provienen de la generación de intermediarios sensibles a la oxidación y a carbonilacion, reacciones mostradas en el mecanismo de la Figura 42. Siendo estas moléculas objetivo para análisis específicos de toxicidad, ya que hasta este momento no hay

un reporte individual de su efecto en el medio ambiente o interacciones con las especies, por lo que es necesario evaluar y comparar contra los efectos de TMT.

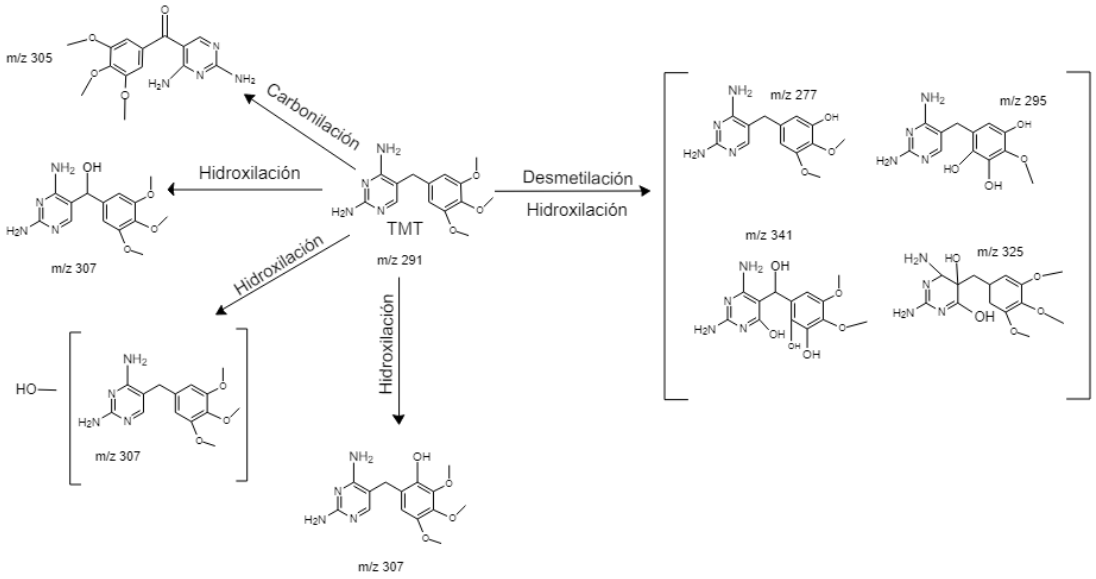


Figura 41. Ruta de degradación de TMT inducida por UV/H_2O_2 (Wang *et al.*, 2019).

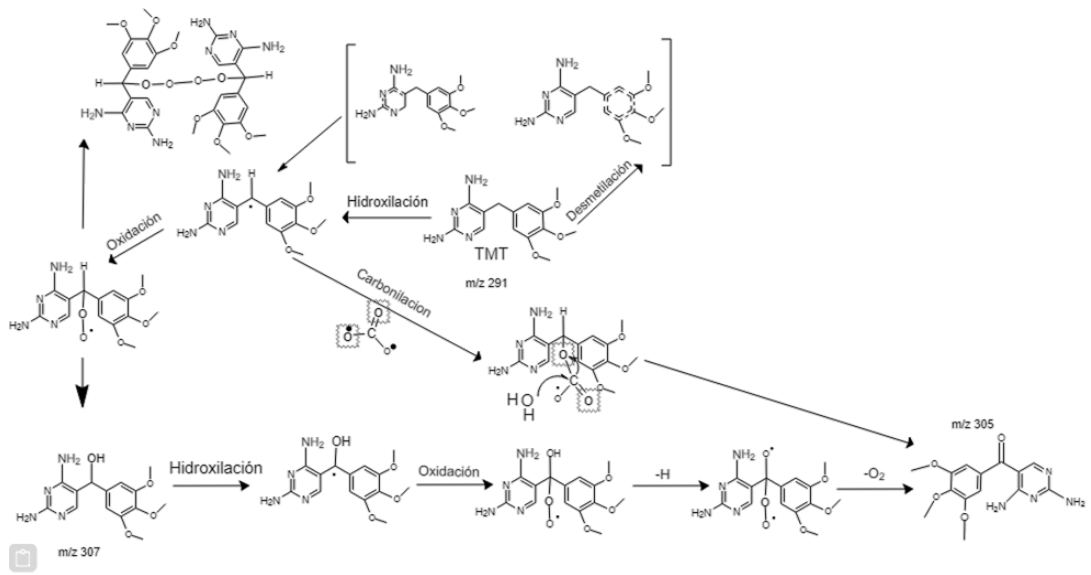


Figura 42. Ruta de degradación de TMT inducida por UV/H_2O_2 (Zhang, Yang, C. H. Huang, *et al.*, 2016)

5.6. Cinética de degradación UV/H_2O_2

5.6.1. CBZ

a) Relación de la cinética de degradación con la concentración inicial de H_2O_2

Con el propósito de determinar la cinética de degradación de las reacciones de CBZ y TMT se evaluó su comportamiento bajo diferentes concentraciones de H_2O_2 con radiación tipo UV-C a 298 K. A partir de los resultados se obtuvo que ambas reacciones siguen una cinética de pseudo- primer orden.

La Figura 43 muestra el grafico de los valores de *ln* CBZ/CBZ$_0$ en función del tiempo de reacción, de donde se obtiene la estimación de la constante cinética aparente (k_{ap}, min^{-1}) a partir del modelo de la Ecuación 26. Los valores de vida media ($t_{1/2}$, min) fueron estimados con la Ecuación 27 y se muestran en la Tabla 17.

$$-\frac{dCBZ}{dt} = k_{ap} Farmaco \quad \text{.....Ecuación 26}$$

$$t_{1/2} = -\frac{\ln 0.5}{k_{ap}} \quad \text{.....Ecuación 27}$$

Tabla 17. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ de CBZ para H_2O_2/ UV-C variando $[H_2O_2]_0$

H_2O_2 mol L^{-1}	k_{ap} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	r^2
0.05	0.002	346.6	0.91
0.1	0.005	138.6	0.92
0.3	0.012	57.8	0.99
0.5	0.036	19.3	0.96
0.7	0.025	27.7	0.99
0.9	0.015	46.2	0.97

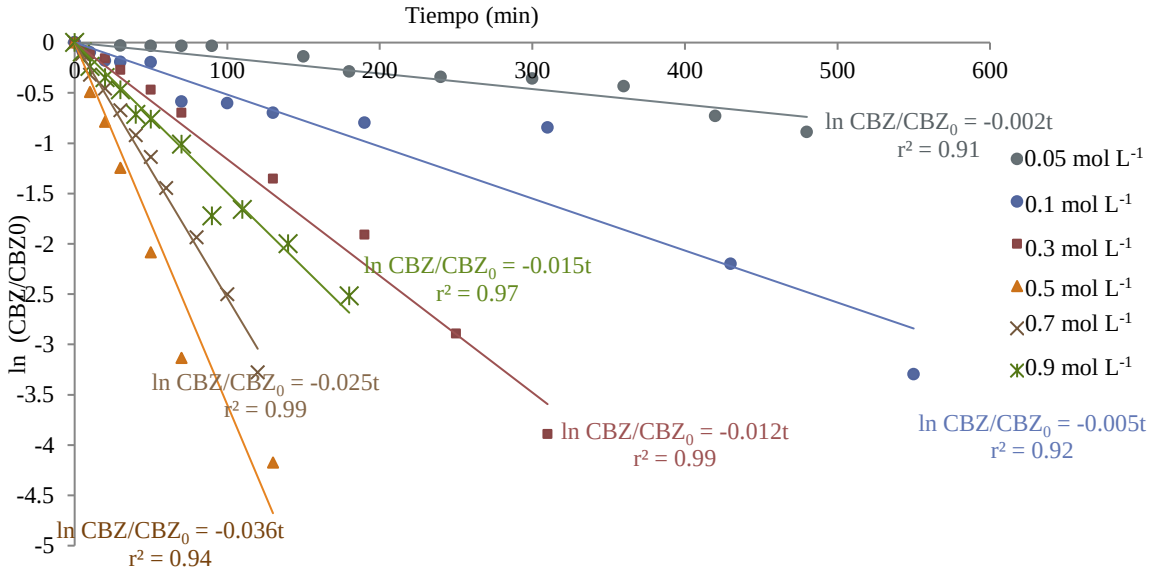


Figura 43. Cinética de degradación H_2O_2 / UV-C de CBZ a diferentes $[H_2O_2]_0$

De los resultados de la Tabla 17 se obtuvo la relación de la concentración inicial aplicada de $[H_2O_2]_0$ con respecto a la k_{ap}. Siendo que el Ln k_{ap} incrementa linealmente con el incremento del Ln $[H_2O_2]_0$, como se muestra en la Figura 44 y la ecuación 28. Los datos considerados para el modelo estimado fueron del intervalo de concentración fueron de 0 a 7 mol L^{-1} ya que el valor de k_{ap} de la concentración de 9 mol L^{-1} no se encuentra dentro de esta tendencia debido a que el efecto de la reacción secundaria de formación de H_2O_2 impacta en una disminución significativa al valor esperado.

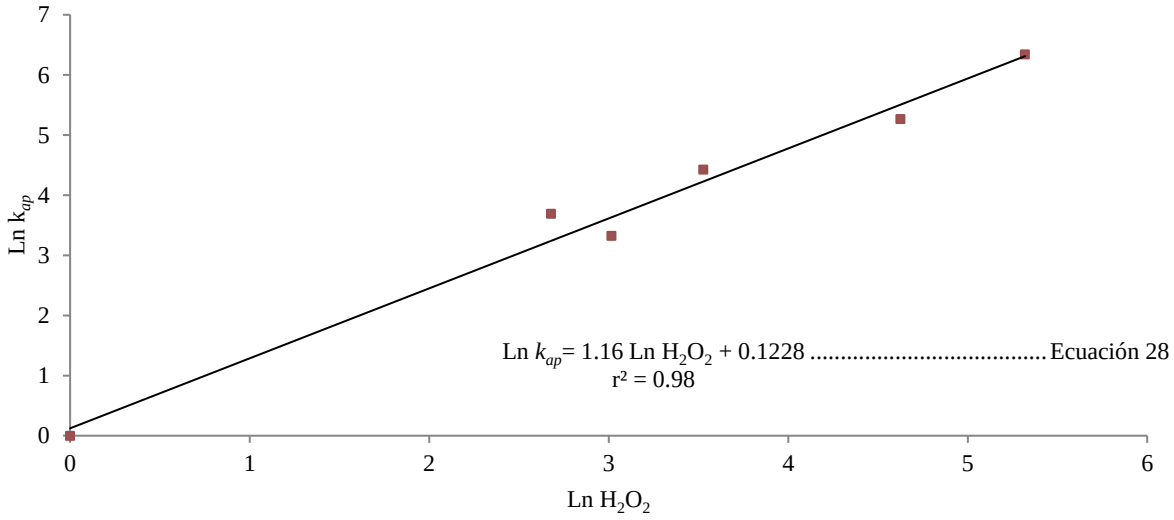


Figura 44. Relación de k_{ap} vs H_2O_2

b) Relación de la cinética de degradación con la concentración inicial de CBZ

Se evaluó la cinética de degradación de la reacción de CBZ bajo las concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 mg L^{-1} de CBZ_0 con radiación tipo UV-C a 298 K y 0.5 mol L^{-1} de H_2O_2. Las reacciones siguen una cinética de pseudo-primer orden. La Figura 45 muestra el grafico de los valores de *ln* CBZ/CBZ_0 en función del tiempo de reacción, de donde se obtiene k_{ap}, min^{-1} a partir de la Ecuación 26. Los valores de $t_{1/2}$, min fueron estimados con la Ecuación 27 y se indican en la Tabla 18.

Tabla 18. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ de CBZ para H_2O_2/ UV-C variando CBZ_0

CBZ_0 mol L^{-1}	k_{ap} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	r^2
10	0.020	34.6	0.99
8	0.023	30.2	0.98
6	0.030	23.1	0.99
4	0.037	18.7	0.99
2	0.043	16.2	0.90

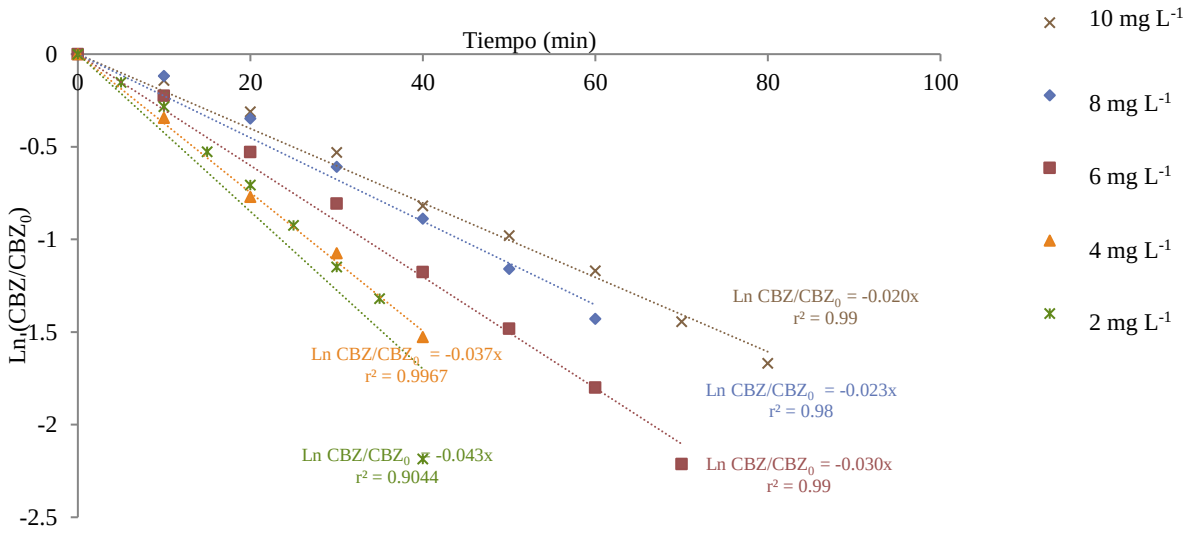
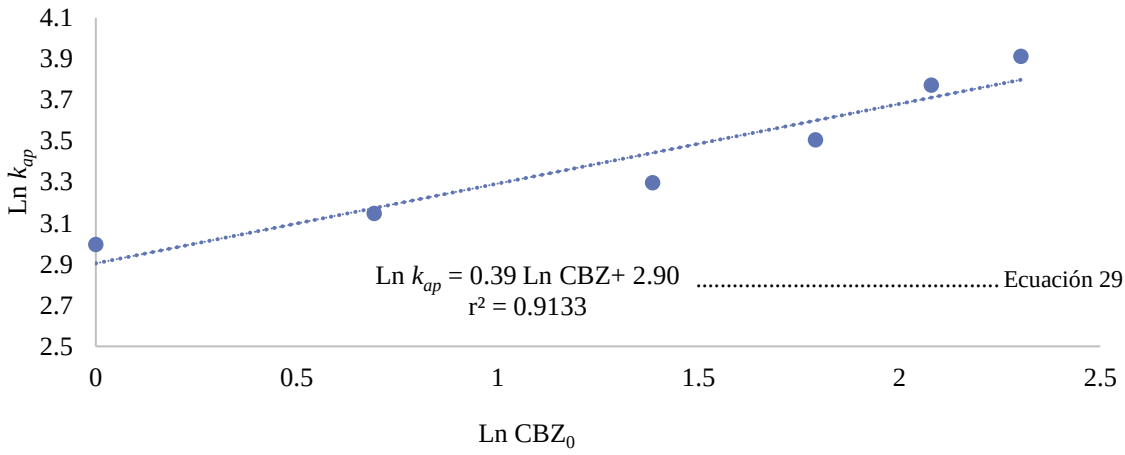


Figura 45. Cinética de degradación UV/H_2O_2 de CBZ a diferentes CBZ_0

De los resultados anteriores se establece la relación de la concentración inicial de CBZ con respecto a k_{ap}, siendo que el Ln k_{ap} incrementa linealmente con el incremento del Ln CBZ_0, como se muestra en la Figura 46 y la ecuación 29.



Ecuación 29

Figura 46. Relación de k_{ap} vs CBZ_0

c) Modelo cinético de degradación de CBZ con UV/H_2O_2

La reacción de degradación de CBZ bajo el sistema de UV con H_2O_2 se puede describir bajo el modelo de la ecuación 30, la cual incluye la velocidad de reacción ocasionada por el efecto oxidante del H_2O_2, la reacción por el efecto de la fotolisis con luz UV y la reacción por el efecto de la combinación de H_2O_2 con luz UV (Zhang *et al.*, 2010).

$$-\frac{d[CBZ]}{dt} = k_1[H_2O_2]_0^a[Farmaco]_0^c[Farmaco] + k_2 I_0^b[Farmaco]_0^c[Farmaco] + k_3 I_0^m[H_2O_2]_0^n[Farmaco]_0^c[Farmaco]$$ ..... Ecuación 30

Donde k_1 es la constante cinética de la reacción sólo con H_2O_2 (L^{a+c} mol^{a+c} min^{-1}), k_2 es la constante cinética de la reacción por fotolisis (L^{c} mol^{-c} m^{2b} W^{-b} min^{-1}), k_1 es la constante cinética de la reacción de UV con H_2O_2 (L^{c+n} $mol^{-(c+n)}$ m^{2m} W^{-m} min^{-1}), I_0 la intensidad de la luz UV, a, b, c, m y n los órdenes de reacción. Debido a que los experimentos previos en ausencia de luz UV y sólo H_2O_2 mostraron que la degradación de CBZ no ocurre, se puede considerar que la $k_1 \approx 0$. Para el caso de la fotolisis directa los resultados indican que la degradación no ocurre por este método por lo que se puede considerar que $k_2 \approx 0$

De los experimentos realizados a diferentes concentraciones iniciales de CBZ bajo luz UV-C (Intensidad =2.669 W m^{-2}) y concentración de 0.5 mol L^{-1} de H_2O_2 se obtuvo la relación lineal mostrada en la Figura 46 y la ecuación 29, siendo el orden de reacción c el valor de 0.39

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores el modelo de la degradación de CBZ, ecuación 31, involucra la degradación ocasionada por la combinación de UV/H_2O_2:

$$-\frac{d[CBZ]}{dt} = \boldsymbol{k_3 I_0^m [H_2O_2]_0^n [CBZ]_0^c [CBZ]} \quad \text{Ecuación 31}$$

Debido a que los experimentos se llevaron a cabo bajo una intensidad fija de 2.669 W m^{-2} podemos considerar el valor de la constante $k_{a_{UV/H_2O_2}}$ en la ecuación 32.

$$\boldsymbol{k_{a_{UV/H_2O_2}} = k_3 I_0^m [H_2O_2]_0^n [CBZ]_0^c} \quad \text{Ecuación 32}$$

Siendo los valores de $k_{a_{UV/H_2O_2}}$ obtenidos del grafico de ln CBZ/CBZ_0 en función del tiempo de irradiación a diferentes concentraciones iniciales de H_2O_2 bajo luz UV-C de la Figura 43. De los experimentos realizados a diferentes concentraciones iniciales de CBZ bajo luz UV-C (Intensidad =2.669 W m^{-2}) y concentraciones iniciales de H_2O_2 se obtuvo la relación lineal mostrada en la Figura 44 y la ecuación 28, siendo el orden de reacción n el valor de 1.16

Sustituyendo los valores en la ecuación 10 se tiene el modelo de la ecuación 33:

$$-\frac{d[CBZ]}{dt} = \boldsymbol{k_{UV/H_2O_2} [H_2O_2]_0^{1.17} [CBZ]_0^{0.39} [CBZ]} \quad \text{Ecuación 33}$$

Considerando una concentración inicial de H_2O_2 0.5 mol L^{-1} y una concentración inicial de CBZ de 10 mg L^{-1} equivalente a 3.4 x 10^{-3} mol L^{-1} el valor de k_{UV/H_2O_2} es de 0.036.

$$-\frac{d[CBZ]}{dt} = \boldsymbol{0.036 [0.5]_0^{1.17} [2.36]_0^{0.39} [CBZ]} \quad \text{Ecuación 34}$$

Para verificar el comportamiento del modelo se establecieron cuatro condiciones para comprobar la coincidencia de los datos experimentales con la propuesta. Obteniendo la relación de los valores de la constante cinética experimentales y el modelo de la Figura 47, podemos confirmar que la relación tiene un comportamiento lineal al obtener coeficiente de correlación de 0.99, por lo que la propuesta puede ser utilizada para predecir el comportamiento de la degradación del fármaco bajo luz UV-C y H_2O_2.

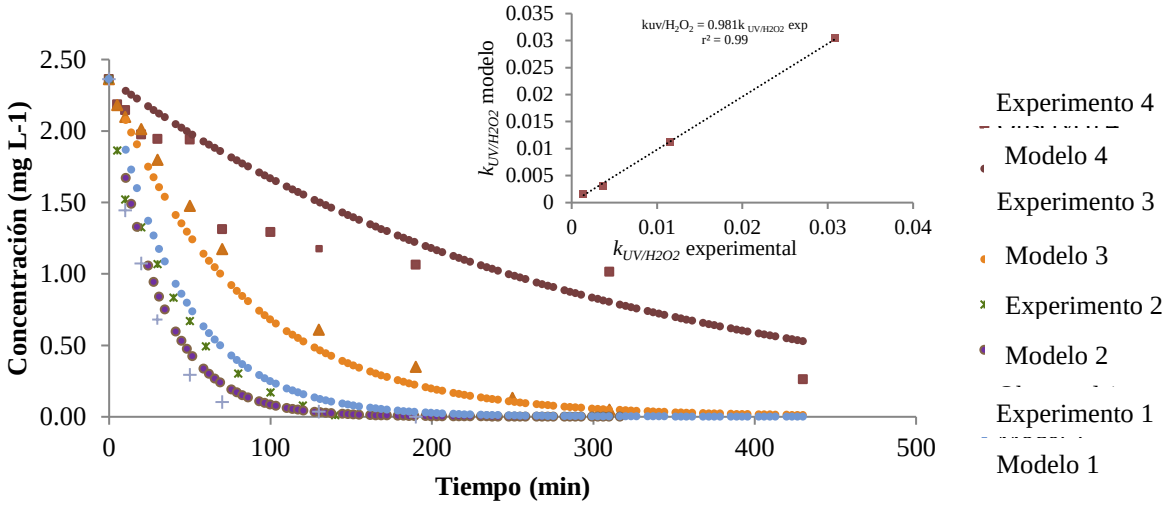


Figura 47. Modelo cinético de degradación de H_2O_2/ UV-C

5.6.2. TMT

a) Relación de la cinética de degradación con la concentración inicial de H_2O_2

La Figura 48 muestra el grafico de los valores de *ln* TMT/TMT_0 en función del tiempo de reacción, de donde se obtiene el valor de k_{ap}, min^{-1} a partir del modelo de la Ecuación 26. Los valores de $t_{1/2}$, fueron estimados con la Ecuación 27 y se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ de TMT para H_2O_2/ UV-C variando $[H_2O_2]_0$

H_2O_2 mol L^{-1}	k_{ap} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	r^2
0.05	0.0024	289	0.99
0.1	0.0028	248	0.99
0.3	0.0056	124	0.99
0.5	0.0113	61	0.99
0.7	0.0094	74	0.99
0.9	0.0023	301	0.98

La relación de la concentración inicial aplicada de $[H_2O_2]_0$ con respecto a la k_{ap}. Siendo que el Ln k_{ap} incrementa linealmente con el incremento del Ln $[H_2O_2]_0$, como se muestra en la Figura 49 y la ecuación 35. Los datos considerados para el modelo estimado fueron del intervalo de concentración fueron de 0 a 7 mol L^{-1} ya que el valor de k_{ap} de la concentración de 9 mol L^{-1} no se encuentra dentro de esta tendencia debido a que el efecto de la reacción secundaria de formación de H_2O_2 impacta en una disminución significativa al valor esperado.

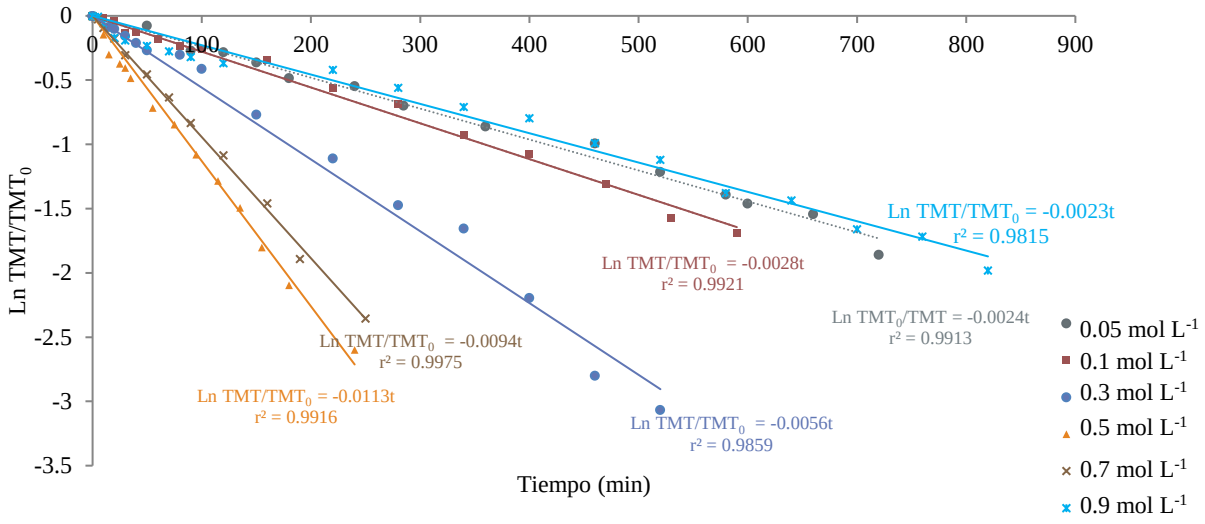


Figura 48. Cinética de degradación de UV-C /H_2O_2 de TMT a diferentes $[H_2O_2]_0$

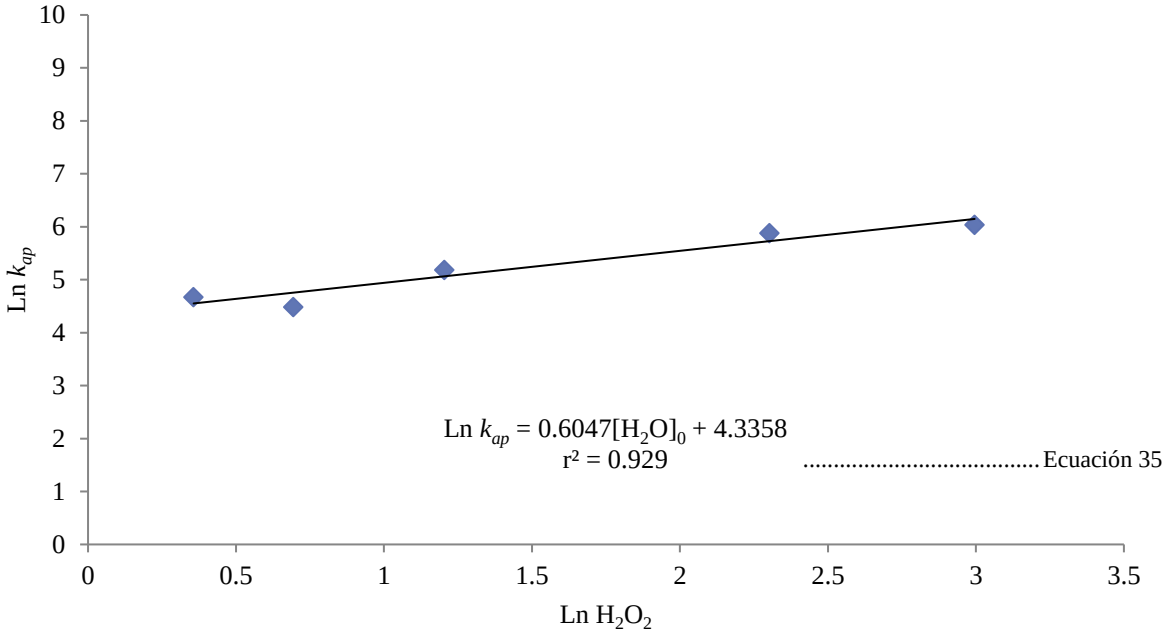


Figura 49. Cinética de degradación de UV-C /H_2O_2 de TMT a diferentes $[H_2O_2]_0$

b) Relación de la cinética de degradación con la concentración inicial de TMT

Se evaluó la cinética de degradación de la reacción bajo las concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 mg L^{-1} de TMT_0 con radiación tipo UV-C a 298 K y 0.5 mol L^{-1} de H_2O_2. Las reacciones siguen una cinética de pseudo- primer orden. La Figura 50 muestra el grafico de los valores de *ln* TMT/TMT_0 en función del tiempo de reacción, de donde se obtiene k_{ap}, min^{-1} a partir de la Ecuación 26. Los valores de $t_{1/2}$, min fueron estimados con la Ecuación 27 y se indican en la Tabla 20.

Tabla 20. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ para H_2O_2/ UV-C variando TMT_0

TMT_0 mol L^{-1}	k_{ap} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	r^2
10	0.0092	75.34	0.96
8	0.0117	59.24	0.98
6	0.0124	55.90	0.94
4	0.0143	48.47	0.91
2	0.0319	21.73	0.96

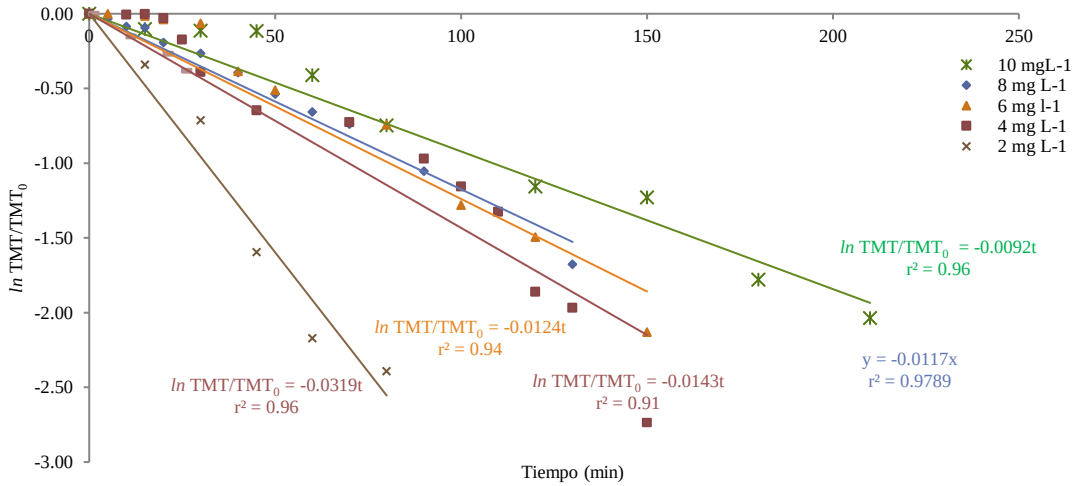


Figura 50. Cinética de degradación UV/H_2O_2 de TMT a diferentes TMT_0

De los resultados anteriores se establece la relación de la concentración inicial de CBZ con respecto a k_{ap}, siendo que el Ln k_{ap} incrementa linealmente con el incremento del Ln CBZ_0, como se muestra en la Figura 51 y la ecuación 36.

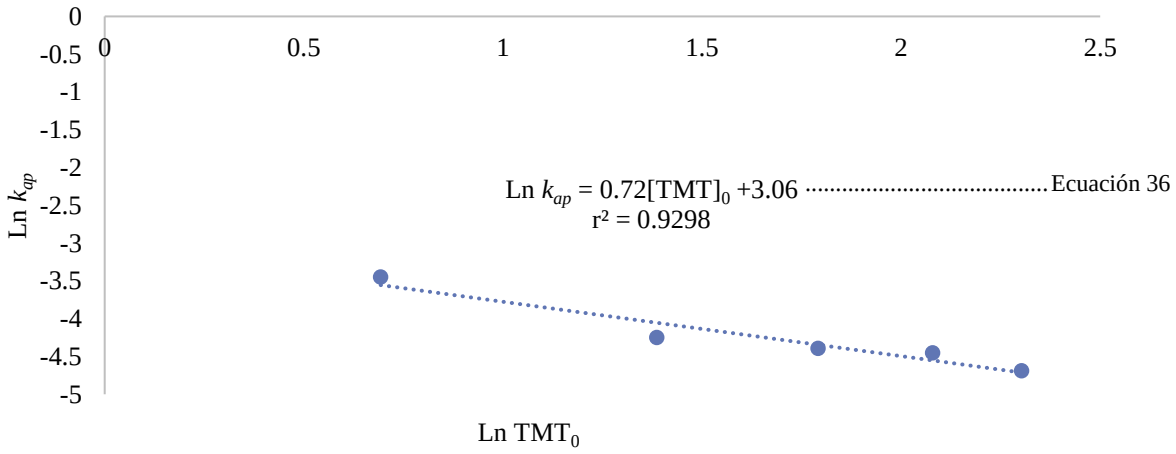


Figura 51. Relación de k_{ap} vs TMT_0

c) Modelo cinético de degradación de TMT con UV/H_2O_2

La reacción de degradación de TMT bajo el sistema de UV con H_2O_2 se puede describir bajo el modelo de la ecuación 30, la cual incluye la velocidad de reacción ocasionada por el efecto oxidante del H_2O_2, la reacción por el efecto de la fotolisis con luz UV y la reacción por el efecto de la combinación de H_2O_2 con luz UV (Zhang *et al.*, 2010).

De los experimentos realizados a diferentes concentraciones iniciales de TMT bajo luz UV-C (Intensidad =2.669 W m^{-2}) y concentración de 0.5 mol L^{-1} de H_2O_2 se obtuvo la relación lineal mostrada en la Figura 51 y la ecuación 36, siendo el orden de reacción c el valor de 0.72.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores el modelo de la degradación de TMT, ecuación 37, involucra la degradación ocasionada por la combinación de UV/H_2O_2:

$$-\frac{d[TMT]}{dt} = k_3 I_0^m [H_2O_2]_0^n [TMT]_0^c [TMT] \quad \text{Ecuación 37}$$

Debido a que los experimentos se llevaron a cabo bajo una intensidad fija de 2.669 W m^{-2} podemos considerar el valor de la constante $k_{a_{UV/H_2O_2}}$ en la ecuación 38.

$$k_{a_{UV/H_2O_2}} = k_3 I_0^m [H_2O_2]_0^n [TMT]_0^c \quad \text{Ecuación 38}$$

Siendo los valores de $k_{a_{UV/H_2O_2}}$ obtenidos del gráfico de ln TMT / TMT_0 en función del tiempo de irradiación a diferentes concentraciones iniciales de H_2O_2 bajo luz UV-C (Figura 48). De los experimentos realizados a diferentes concentraciones iniciales de TMT bajo luz UV-C (Intensidad =2.669 W m^{-2}) y concentraciones iniciales de H_2O_2 se obtuvo la relación lineal mostrada en la Figura 49 y la ecuación 35, siendo el orden de reacción n el valor de 0.60.

Sustituyendo los valores en la ecuación 10 obtenemos el modelo de la ecuación 39:

$$-\frac{d[\mathbf{TMT}]}{dt} = k_{UV/H_2O_2} [H_2O_2]_0^{0.72} [\mathbf{TMT}]_0^{0.60} [\mathbf{TMT}] \quad \text{Ecuación 39}$$

Considerando una concentración inicial de H_2O_2 0.5 mol L^{-1} y una concentración inicial de TMT de 10 mg L^{-1} equivalente a 3.4x10^{-5} mol L^{-1} el valor de k_{UV/H_2O_2} es de 0.0113.

$$-\frac{d[\mathbf{TMT}]}{dt} = \mathbf{0.0113}[\mathbf{0.5}]_0^{0.72} [\mathbf{TMT}]_0^{0.69} [\mathbf{TMT}] \quad \text{Ecuación 40}$$

Para verificar el comportamiento del modelo se establecieron cuatro condiciones para comprobar la coincidencia de los datos experimentales con la propuesta. Obteniendo la relación de los valores de la constante cinética experimentales y el modelo de la Figura 52 podemos confirmar que la relación tiene un comportamiento lineal al obtener coeficiente de correlación de 0.96, por lo que la propuesta puede ser utilizada para predecir el comportamiento de la degradación del fármaco bajo luz UV-C y H_2O_2.

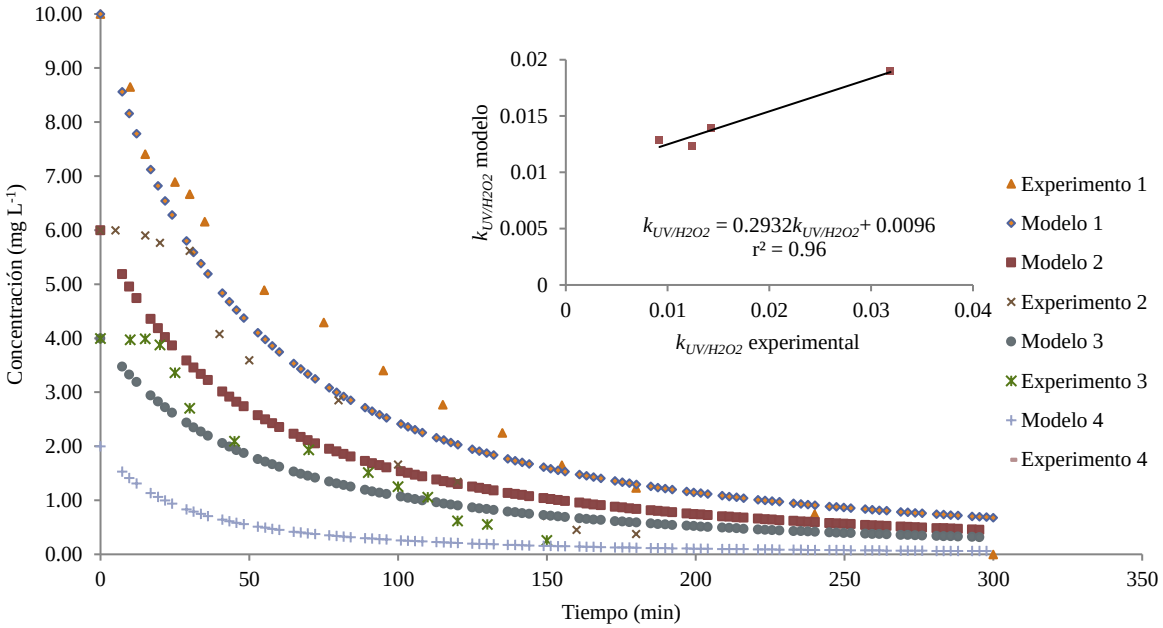


Figura 52. Modelo cinético de degradación de TMT con H_2O_2/ UV-C

5.7. Degradación con TiO_2 y radiación UV

5.7.1. Efecto de la cantidad de TiO_2 utilizada en la degradación

a) CBZ

Por otra parte, se realizaron experimentos de degradación utilizando radiación UV-C combinada con TiO_2 como catalizador.

Las concentraciones utilizadas de TiO_2 fueron de 0.05 g L^{-1} a 0.5 g L^{-1}. El cromatograma de la Figura 53 muestra que la presencia de TiO_2 modifica la concentración inicial de la solución, por lo que se puede considerar como una alternativa para la degradación de este compuesto.

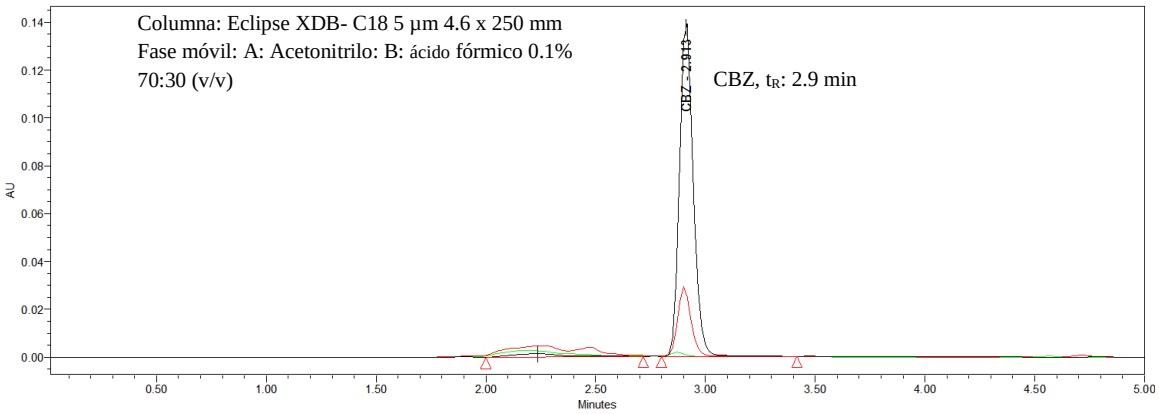


Figura 53. Cromatograma de degradación de CBZ con TiO_2/ UV-C

El efecto de la cantidad del catalizador utilizada en la reacción se puede observar en las figuras 54 y 55. Cabe destacar que la degradación de CBZ a la concentración de 0.15 g L^{-1} fue la que requirió de menos tiempo; tomo alrededor de 700 minutos para llegar a un porcentaje de degradación superior al 90 %; a diferencia de las demás concentraciones cuya eficiencia fue menor en ese intervalo de tiempo; para la concentración de 0.05 g L^{-1} el valor fue inferior al 10%; en 0.1 g L^{-1} fue de alrededor del 80%, para 0.2 g L^{-1} el valor fue aproximado al 40% y finalmente para 0.5 g L^{-1} el valor fue cercano al 70 %.

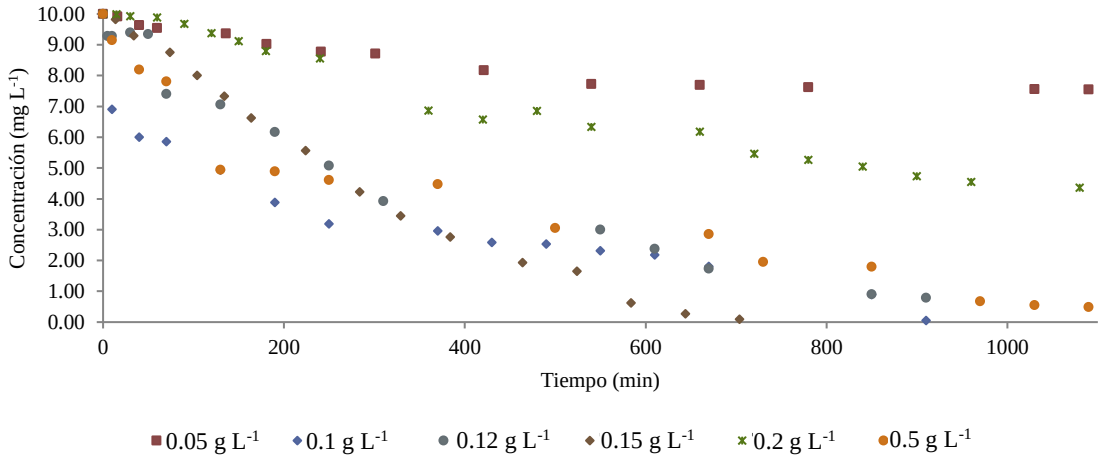


Figura 54. Degradación de CBZ con TiO_2/ UV-C

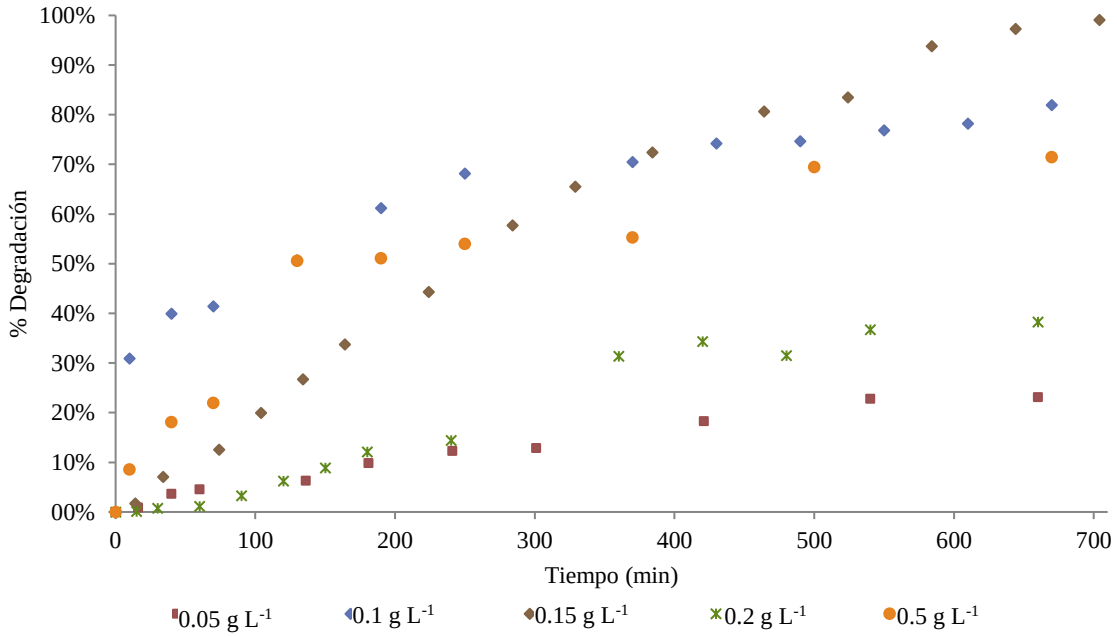


Figura 55. Porcentaje de degradación de CBZ con TiO_2/ UV-C

b) TMT

Por otra parte, los experimentos de TMT se llevaron a cabo usando un rango de concentraciones de TiO_2 de 0.1 g L^{-1} a 0.4 g L^{-1}. El cromatograma de la Figura 56 muestra que la presencia de TiO_2 modifica la concentración inicial de la solución, por lo que se puede considerar como una alternativa para la degradación de este fármaco.

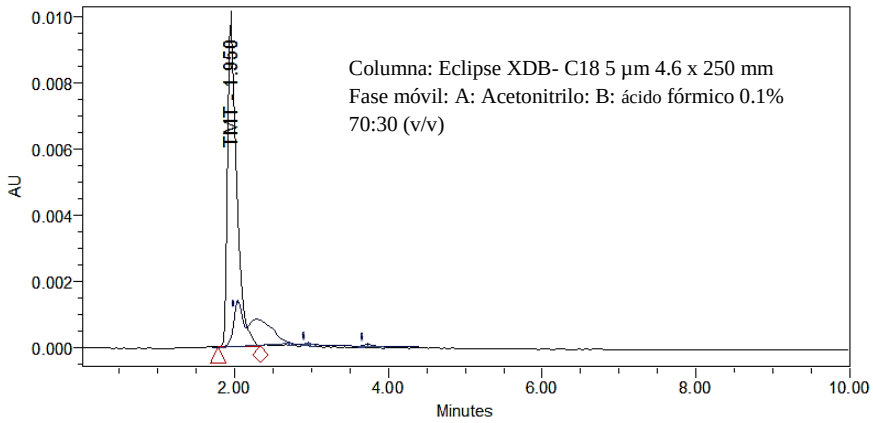


Figura 56. Cromatograma de degradación de TMT con TiO_2/ UV-C

Las figuras 57 y 58 muestran el comportamiento de la degradación bajo esas condiciones. En particular la concentración de 0.3 g L^{-1} fue la que requirió de menos tiempo para alcanzar un porcentaje de degradación superior al 90 %, siendo de alrededor 700 minutos. No obstante, las concentraciones inferiores y superiores a 0.3 g L^{-1} tuvieron porcentajes de degradación menores; para 0.1 g L^{-1} la degradación fue inferior al 36%; para

0.15 g L^{-1} fue de alrededor del 86%; 0.2 g L^{-1} el valor fue aproximado al 89% y para 0.4 g L^{-1} el % fue cercano al 53 %.

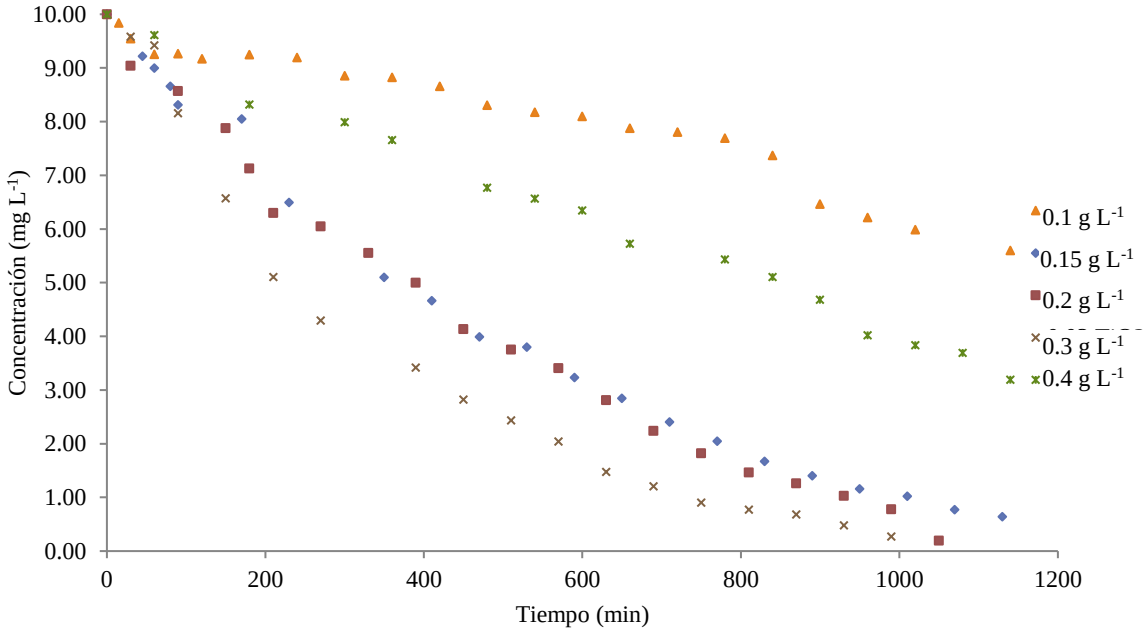


Figura 57. Degradación de TMT con TiO_2/ UV-C

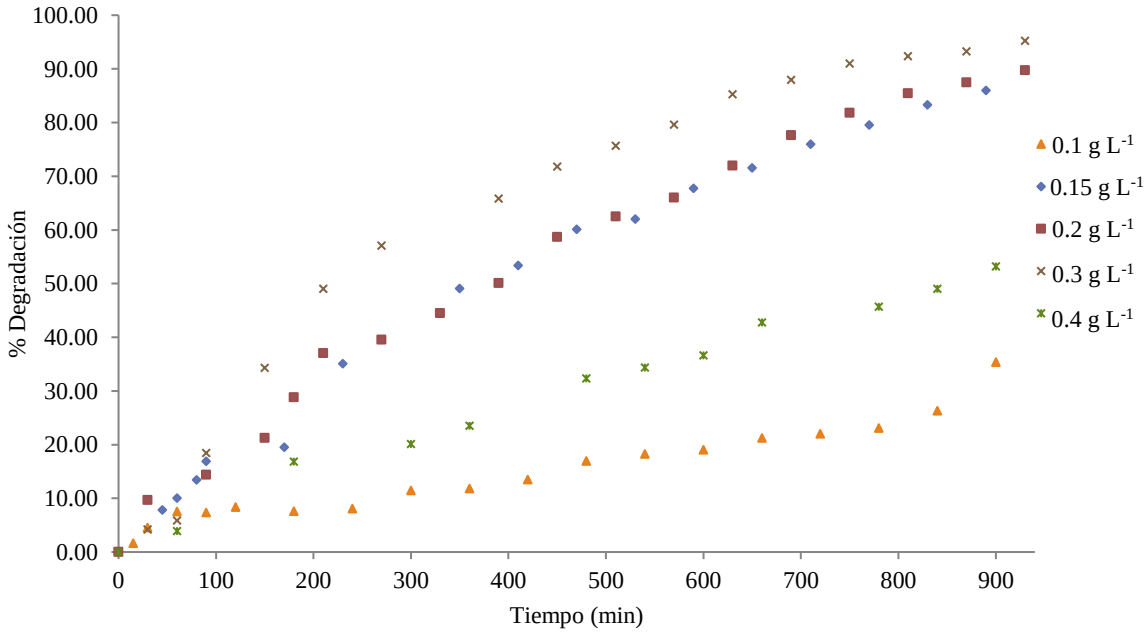


Figura 58. Porcentaje de degradación de TMT con TiO_2/ UV-C

c) EE2

Las concentraciones utilizadas de TiO_2 fueron de 0.2 g L^{-1} a 0.5 g L^{-1}. El cromatograma de la Figura 59 y el perfil de cambio de concentración de la Figura 60 muestran que la degradación por este método no es viable, ya que la variación entre la concentración inicial y la concentración a alrededor de las 44 horas (2600 minutos) es menor al 10%; para las condiciones evaluadas, no es posible considerar esta técnica para la degradación de EE2.

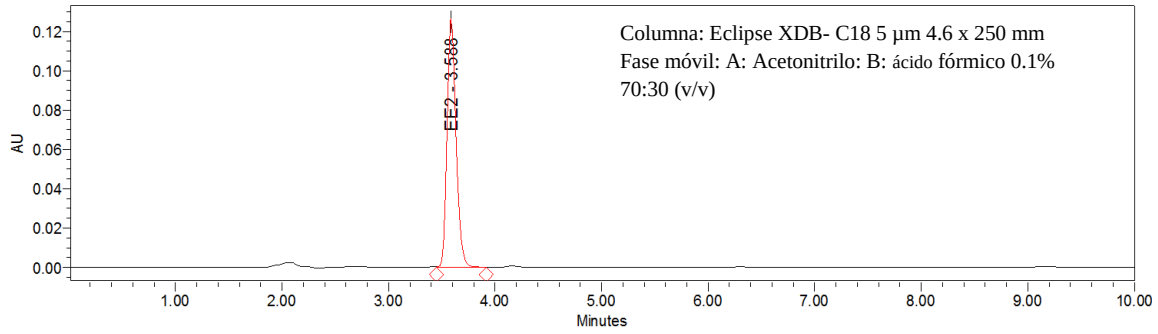


Figura 59. Cromatograma de degradación de EE2 con TiO_2/ UV-C

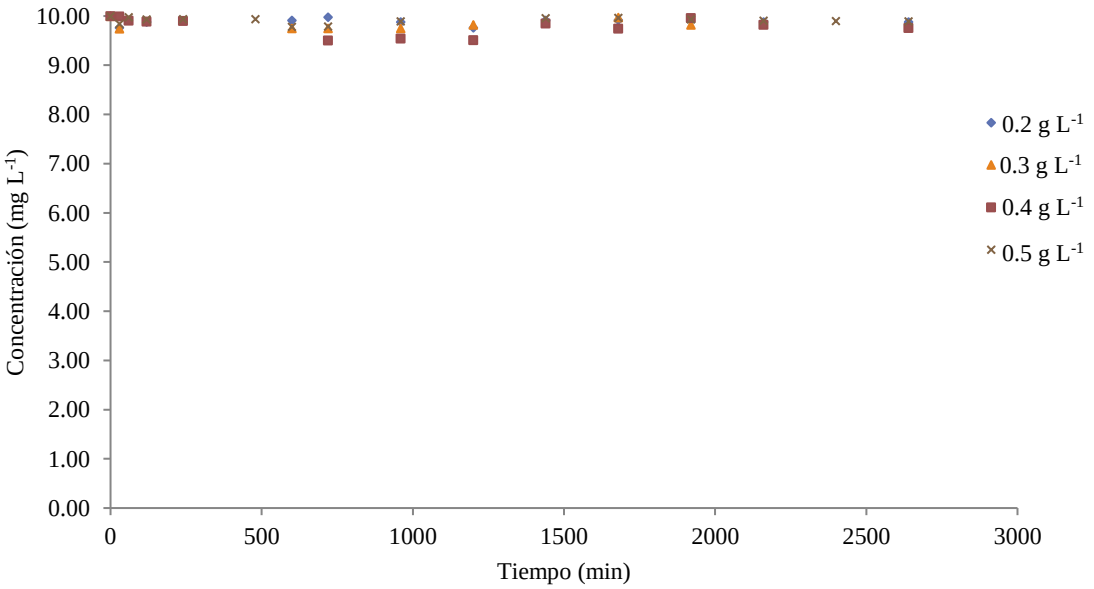


Figura 60. Degradación de EE2 con TiO_2/ UV-C

Como se describe en la Figura 61 CBZ y TMT requirieron de menor tiempo y cantidad de catalizador para en comparación con EE2. Del cual se puede mencionar que es estable bajo estas condiciones, por lo que requiere de un método de degradación más específico para esta molécula, ya que no es un método eficiente para su degradación. Las diferencias entre CBZ y TMT, implican en la diferencia de cantidad de catalizador, para

degradar TMT se requiere el doble de lo que se usa para CBZ y además implica una exposición más prolongada que CBZ.

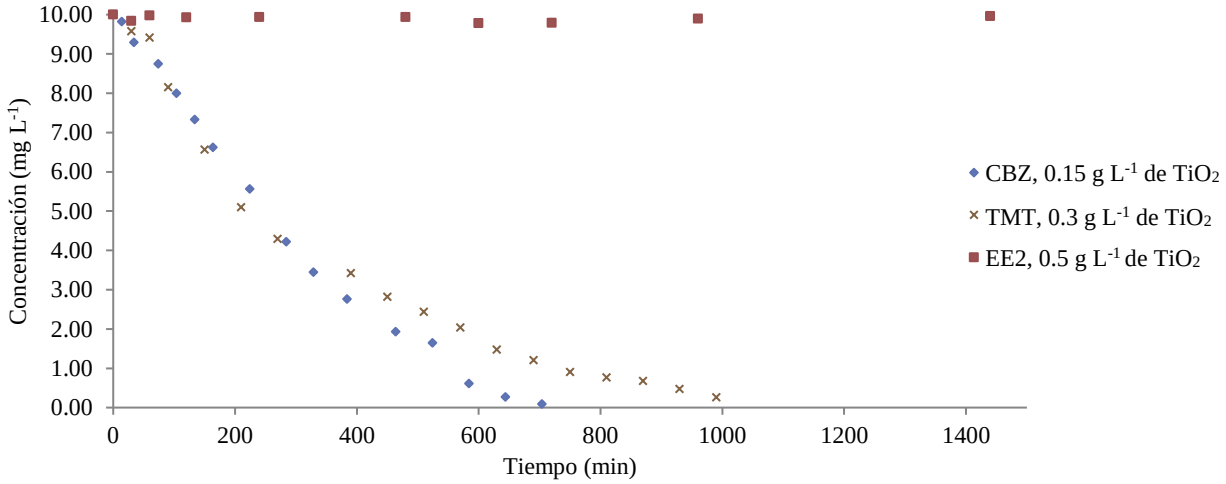


Figura 61. Comparación de la degradación de CBZ, TMT y EE2 con TiO_2/ UV-C

Los gráficos anteriores muestran el comportamiento de la degradación de los fármacos frente a diversas concentraciones del catalizador. En virtud de que en investigaciones anteriores se ha descrito que las variaciones de los porcentajes de degradación son función de la cantidad de TiO_2 presente; cuando hay un exceso de TiO_2 en la reacción las partículas de este interfieren con el paso adecuado de radiación, ocasionando un efecto pantalla que genera que la cantidad de energía aplicada sea menor a la necesaria para producir los suficientes radicales OH· para degradar al fármaco; así como en soluciones con una cantidad deficiente de TiO_2 se presenta poca interacción del fármaco con el catalizador causando que no ocurra la adsorción necesaria para la conjugación de los radicales libres con él.

5.7.2. Efecto de la variación de la concentración inicial del fármaco en la degradación con TiO_2

Paralelamente, se procedió a degradar siete concentraciones iniciales diferentes del fármaco (0.5, 1,2, 4, 6, 8 y 10 mg L^{-1}) utilizando la combinación de radiación UV-C con TiO_2 a una concentración de 0.015 g L^{-1} para CBZ y 0.03 g L^{-1} para TMT. Los perfiles de variación de la concentración de las figuras 62 y 63 muestran que los tiempos necesarios para alcanzar una degradación por arriba del 90 % disminuyen a la par de la concentración de los fármacos, alcanzándose tiempos menores a 100 min para las concentraciones inferiores a 2 mg L^{-1}. g

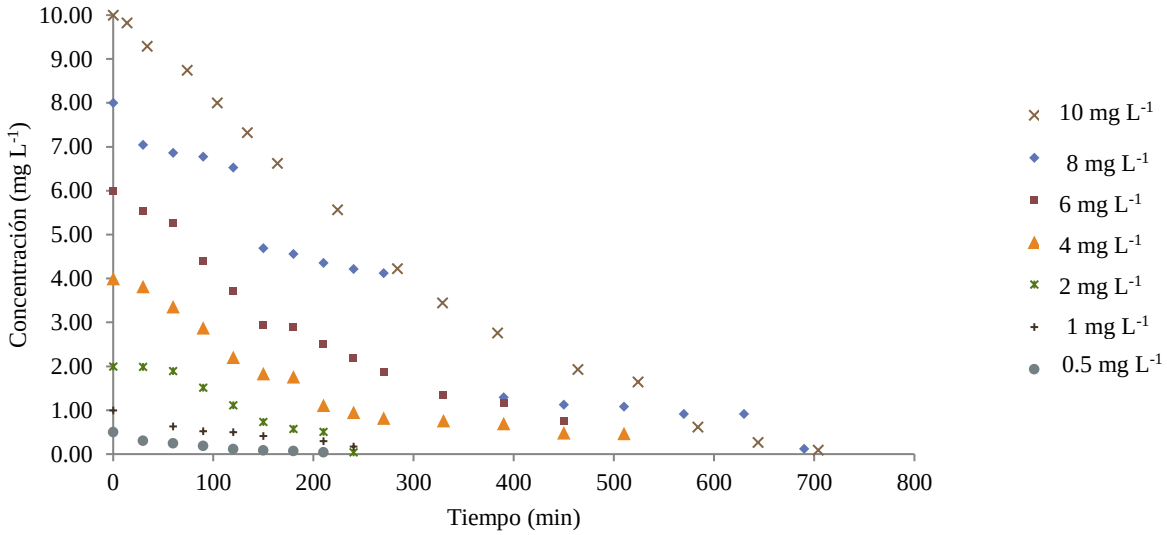


Figura 62. UV/TiO_2 de CBZ

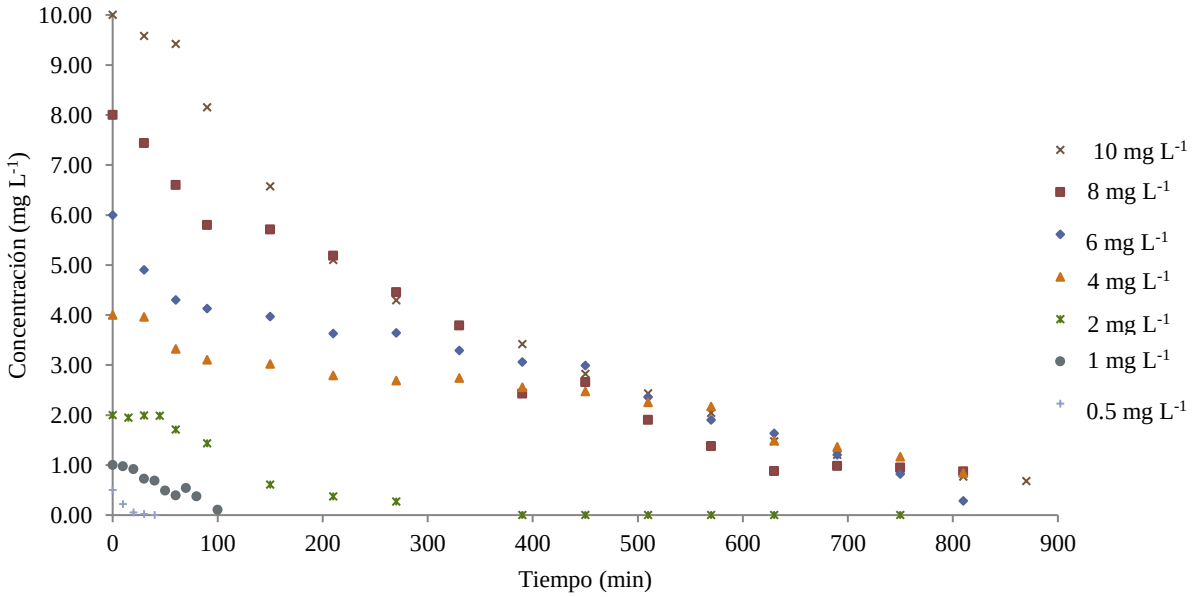


Figura 63. UV/TiO_2 de TMT

5.7.3. Efectos en la solución remanente después de aplicar tratamiento con UV-C/TiO_2

a) CBZ

Al aplicar a una solución de CBZ un tratamiento con UV-C /TiO_2 la concentración de CBZ disminuye. No obstante, este procedimiento se clasifica como de oxidación avanzada (AOP), por lo que da paso a la formación de subproductos, los cuales se evidencian en el cromatograma de la Figura 64.

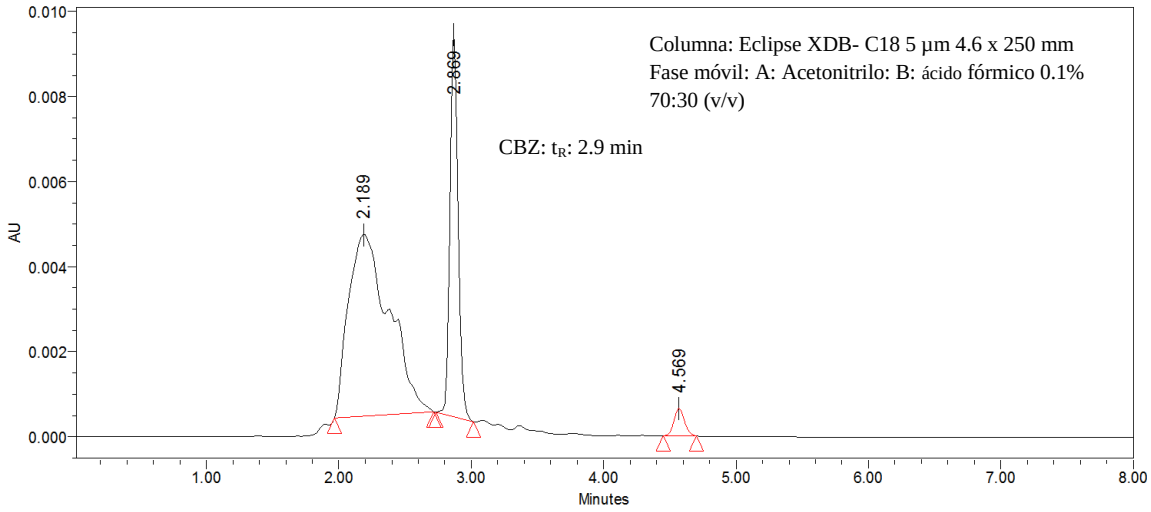


Figura 64. Cromatograma de degradación de CBZ después de aplicar 0.015 g L^{-1} TiO_2/ UV-C

Del proceso de degradación con 0.015 g L^{-1} de TiO_2 se obtuvo un perfil de los productos derivados de la reacción, las figuras 65 y 66 indican que 3 de ellos son los más predominantes, de los cuales el DP_{1TiO2}, t_R: 2.3 min fue el que se presentó con mayor frecuencia y concentración comparado con los otros dos. Para el caso del DP_{2TiO2}, t_R: 2.5 min, a pesar de que fue el primero que apareció en la reacción, posee menor estabilidad. Se genera alrededor de los 100 min y se degrada tras 6 horas de la aplicación del tratamiento.

Conviene señalar que, el subproducto $DP_{3TiO2,}$ t_R: 4.5 min fue el que se presentó en menor concentración y se apreció durante toda la degradación, por lo que es un compuesto estable.

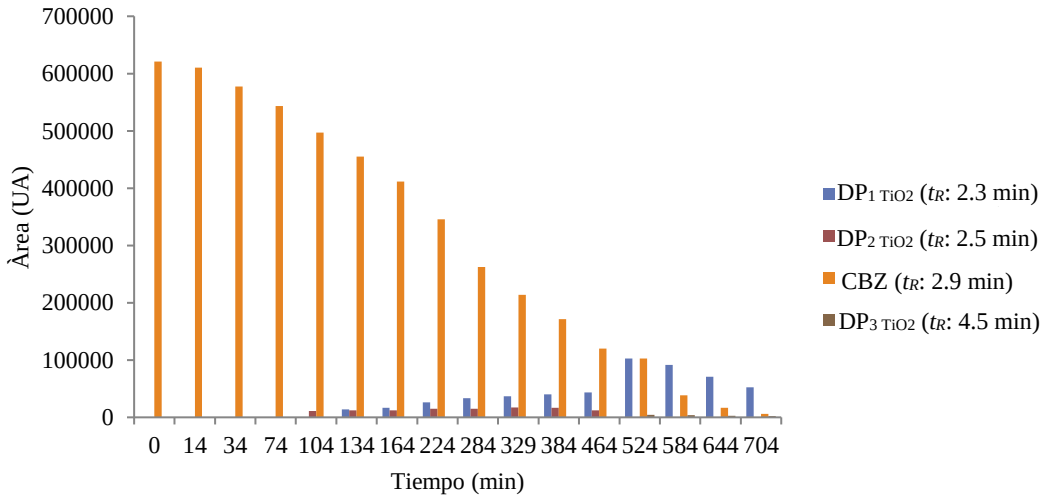


Figura 65. Subproductos de CBZ en la degradación con UV-C/TiO_2

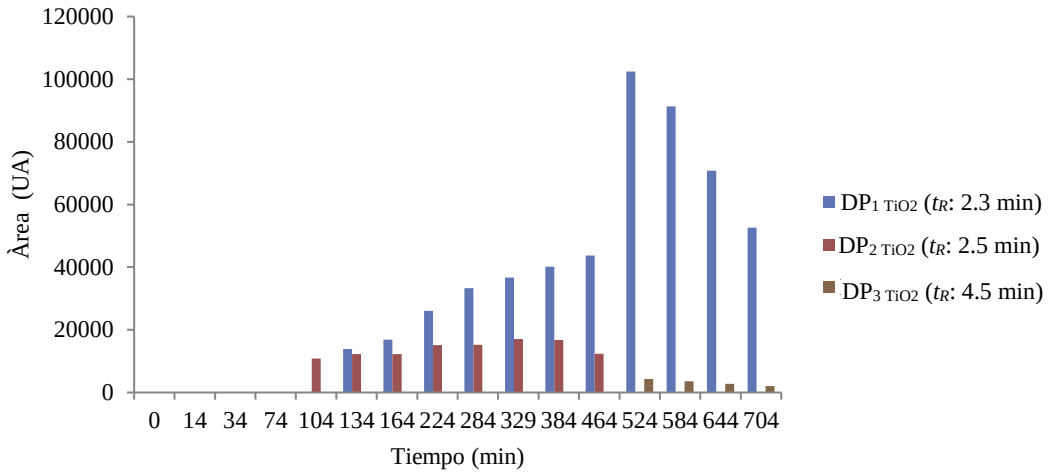


Figura 66. Subproductos de degradación CBZ con UV-C/TiO_2

Los productos de degradación observados se deben a la incompleta mineralización de CBZ; según lo reportado por Franz *et al.*, 2020 . En las Figura 67 se indica la ruta de degradación por fotocatálisis con TiO_2. El mecanismo de degradación da paso a tres posibles reacciones: i) oxidación consecutiva de CBZ en a) y posterior en b) que da origen a ii) una reacción de hidratación con el subproducto d); iii) una contracción de un anillo de siete miembros en un anillo de seis miembros para formar el compuesto c); siendo el resultado una mezcla de múltiples intermediarios derivados de las transformaciones.

Una vía alternativa de la degradación con TiO_2, es propuesto por Martínez *et al.*, 2011 & Dai *et al.*, 2012; descrito en la Figura 68; donde el compuesto 10,11-epoxicarbamazepina, tal como ocurre en la degradación con H_2O_2/UV-C, deriva de un intermediario inestable que proviene de una reacción de hidroxilación en la posición 10. Posteriormente el anillo epóxido sufre una apertura y origina al compuesto 9-formilacridina. Este este último se descompone para producir acridina (Furst y Uetrecht, 1993), la cual es susceptible a una oxidación conducida por la reacción de CBZ con HO• da origen a un epóxido (m/z = 253 g/mol), el cual sufre una hidrólisis que produce el compuesto con m/z = 271 g/mol. (Martínez *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2012).

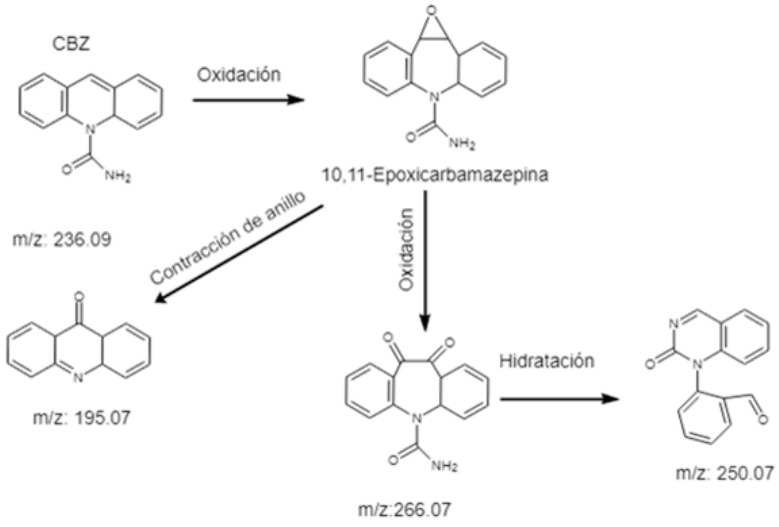


Figura 67. Subproductos de degradación UV/TiO_2 (Franz *et al.*, 2020).

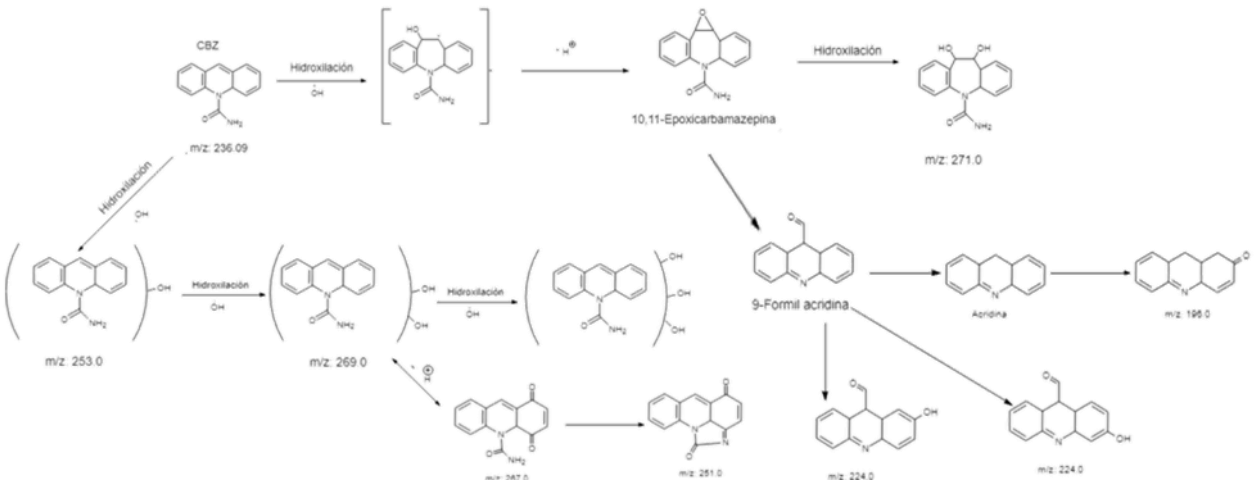


Figura 68. Subproductos de degradación UV-C/TiO_2 (Martínez *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2012)

b) TMT

De la aplicación de radiación UV-C con 0.03 g L^{-1} de TiO_2 se obtuvo la degradación del fármaco, con la formación de subproductos, que se evidencian en el cromatograma de la Figura 69.

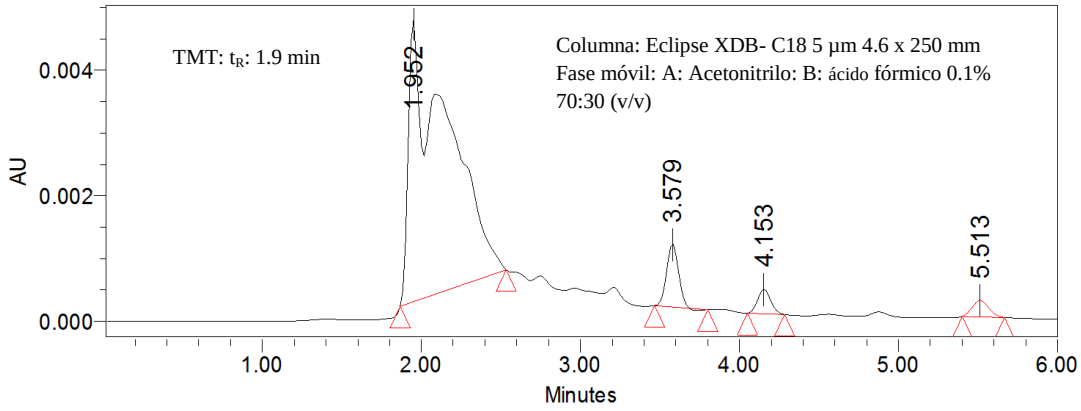


Figura 69. Cromatograma de degradación de TMT después de aplicar 0.03 g L^{-1} TiO_2/ UV-C

El perfil de los productos derivados de la reacción se muestra en la Figura 70, la cual indica la aparición de 4 subproductos predominantes. Donde DP_{1TiO2} (t_R: 2.1 min) es el de mayor frecuencia y concentración, siendo el primero en formarse durante la reacción, alrededor de los primeros 10 min, siendo estable al continuar con la aplicación del proceso. Los otros tres subproductos DP_{2TiO2} (t_R: 2.5 min), DP_{3TiO2} (t_R: 3.6 min) y DP_{4TiO2} (t_R: 5.5 min) aparecieron de manera consecutiva intermitentemente, a una concentración mucho más baja que DP_{1TiO2} (t_R: 2.1 min) , siendo compuestos inestables que disminuyen su presencia al concluir con el tratamiento.

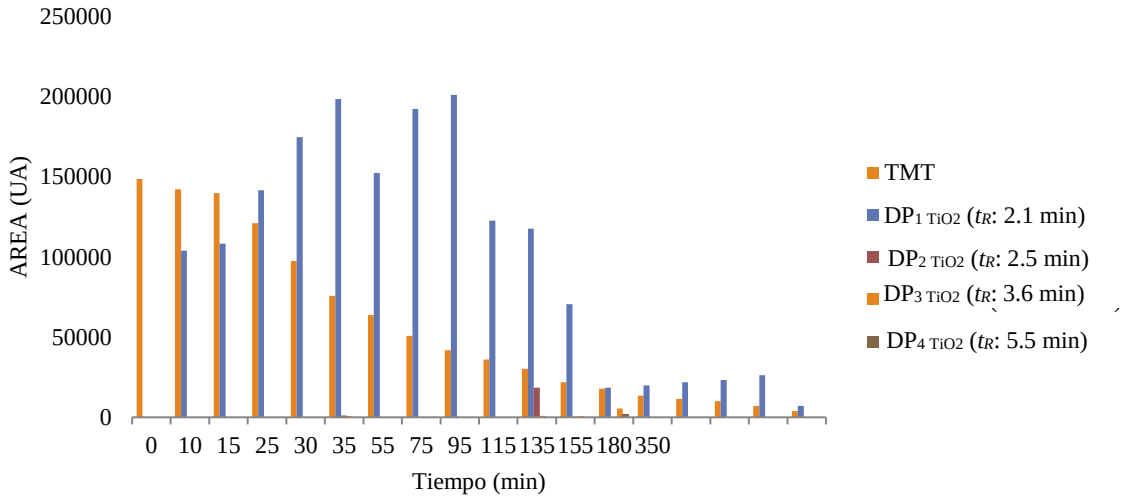


Figura 70. Subproductos de degradación UV/TiO_2

Según lo reportado en trabajos previos la formación de los diversos compuestos detectados se debe a las diversas rutas de degradación de TMT; correspondientes a las reacciones de hidroxilación, desmetilación y ruptura de la molécula. Como se indica en ruta de degradación de la Figura 71.

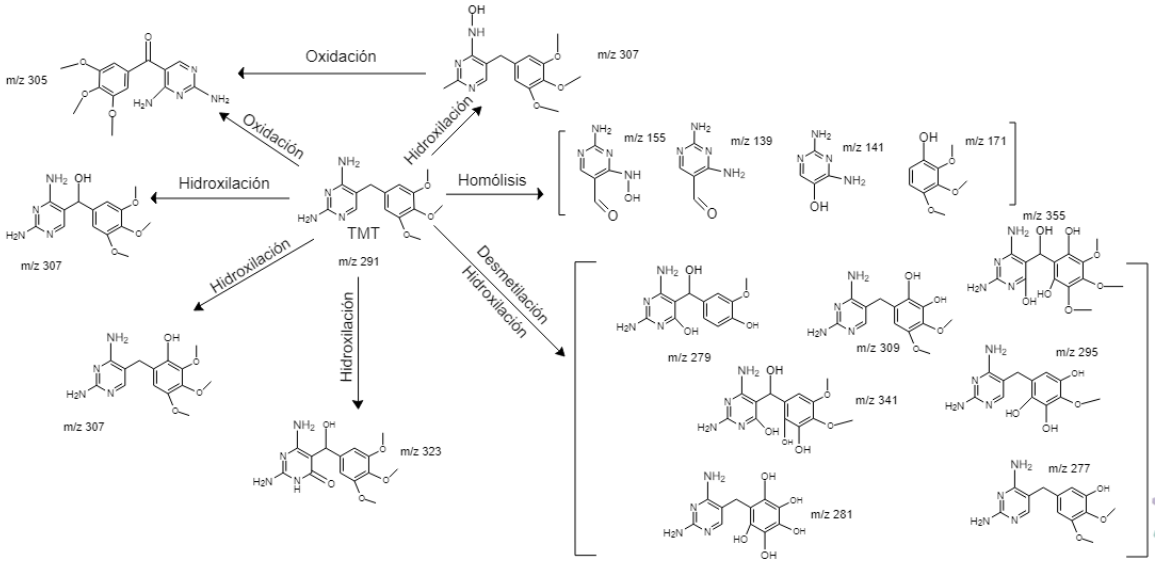


Figura 71. Ruta de degradación de TMT por UV-C/TiO_2 (Samy *et al.*, 2020)

Según Samy *et al.*, 2020 la hidroxilación es la ruta principal de degradación por este método. Da paso a la formación de subproductos con la fórmula general de $C_{14}H_{19}N_4O_{3+x}$ (x varía de 1 a 4); clasificados como mono, bi, tetra y pentahidroxilados dependiendo del valor de x. Los intermediarios α-hidroxi-trimetoprima (TMP-OH, monohidroxilado con m/z 307; $C_{14}H_{19}N_4O_4$) y el dihidroxilado (m/z 323; $C_{14}H_{19}N_4O_5$) son los predominantes. Derivado de la oxidación directa de TMT y de la oxidación secundaria del subproducto α-hidroxi-trimetoprima (TMP-OH, m/z 307; $C_{14}H_{19}N_4O_4$) se puede originar el compuesto α-cetotrimetoprima (TMP=O, m/z 305). Los

productos con fórmula C_{14-y} $H_{19-2y}N_4O_{3+x}$ (y varía de 1 a 3) se pueden generar a través de reacciones de desmetilación/hidroxilación. Siendo compuestos con (m/z 309; $C_{13}H_{17}N_4O_5$, m/z 341; $C_{13}H_{17}N_4O_7$, m/z 295; $C_{12}H_{15}N_4O_5$, m/z 279; $C_{12}H_{15}N_4O_4$, m/z 281; $C_{11}H_{13}N_4O_5$ y m/z 277; $C_{13}H_{16}N_4O_3$). Por último, los productos (m/z=139; $C_5H_6N_4O$, m/z 155; $C_5H_6N_4O_2$, m/z 171; $C_8H_{10}O_4$ y m/z 141; $C_5H_8N_4O$) se generan por la ruptura de la molécula principal.

Debido a la complejidad y numero de compuestos que se pueden formar en la reacción hasta el momento resulta un área de oportunidad descifrar su estructura y sus interacciones.

5.8. Cinética de degradación UV-C/ TiO_2

5.8.1. CBZ

a) Efecto de la concentración inicial de TiO_2 $[TiO_2]_0$

La cinética de degradación de la reacción de CBZ utilizando la combinación UV-C /TiO_2 siguió una cinética de pseudo- primer orden, la Figura 72 muestra el grafico de *ln* CBZ/CBZ_0 en función del tiempo de reacción, de donde se obtiene el valor de la constante cinética aparente (k_{ap}) correspondiente a la pendiente de la recta del modelo de la Ecuación 5. Los valores de vida media ($t_{1/2}$) fueron evaluados con la Ecuación 6; estos resultados se indican en la Tabla 21. La concentración de 0.15 g L^{-1} es la condición propicia para la degradación encontrando que al elevar o reducir la concentración de TiO_2 con respecto a ese valor la k_{ap} no se ven favorecidos y los tiempos de vida media para CBZ no se reducen.

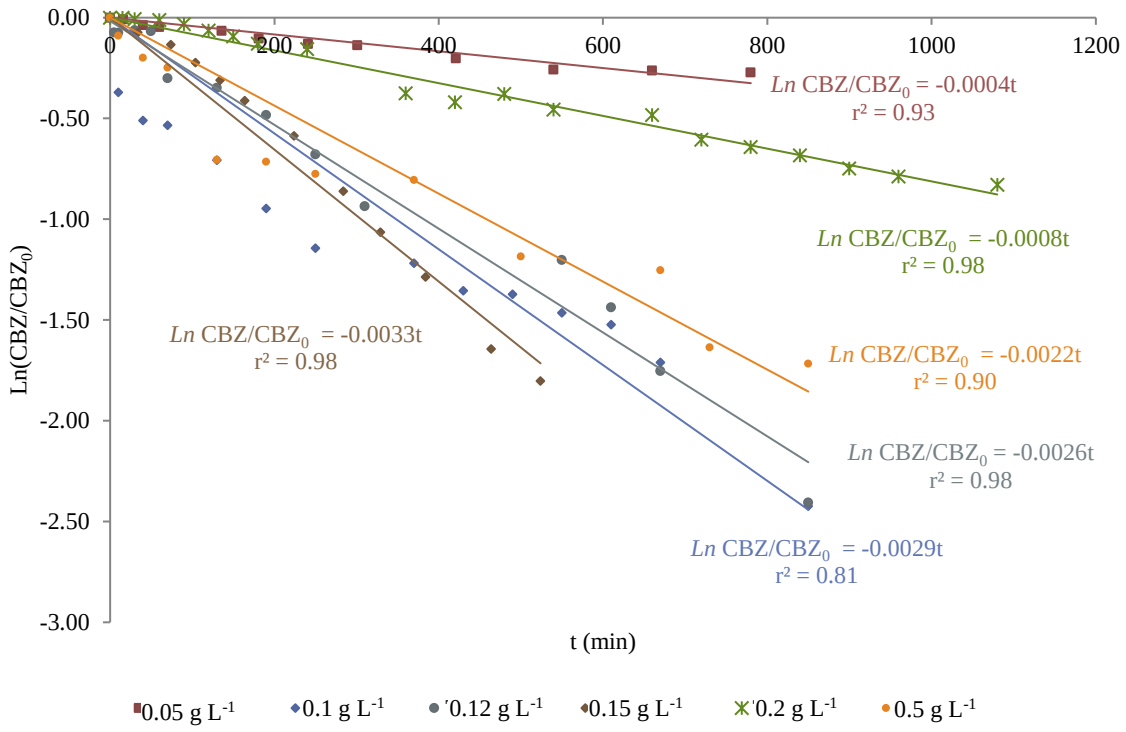


Figura 72. Cinética de degradación de CBZ con TiO_2/ UV-C al variar $[TiO_2]_0$

Tabla 21. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ de CBZ para TiO_2/ UV-C al variar $[TiO_2]_0$

Concentración TiO_2 (g L^{-1})	k_{ap} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	r^2
0.05	0.0004	1733	0.93
0.1	0.0029	239	0.81
0.12	0.0026	267	0.98
0.15	0.0033	210	0.98
0.2	0.0008	866	0.98

0.5	0.0022	315	0.90

La Figura 73 muestra la relación lineal de la concentración de TiO_2 con el valor de k_{ap} dentro del sistema de degradación de TiO_2/UV-C. Dentro del intervalo de 0 a 0.015 el incremento de la k_{ap} se ve promovido por el aumento de los sitios activos debido al cambio gradual de la concentración de TiO_2 (Zouagbi *et al.*, 2007). Sin embargo, esta tendencia no se observa en los valores de 0.02 y 0.5 ya que el aumento de la densidad de la solución por la presencia de un exceso de partículas interfiere en la adecuada adsorción de la radiación necesaria para la activación de los sitios activos y se refleja en un valor de k_{ap} menor a la tendencia esperada (Sauer *et al.*, 2002).

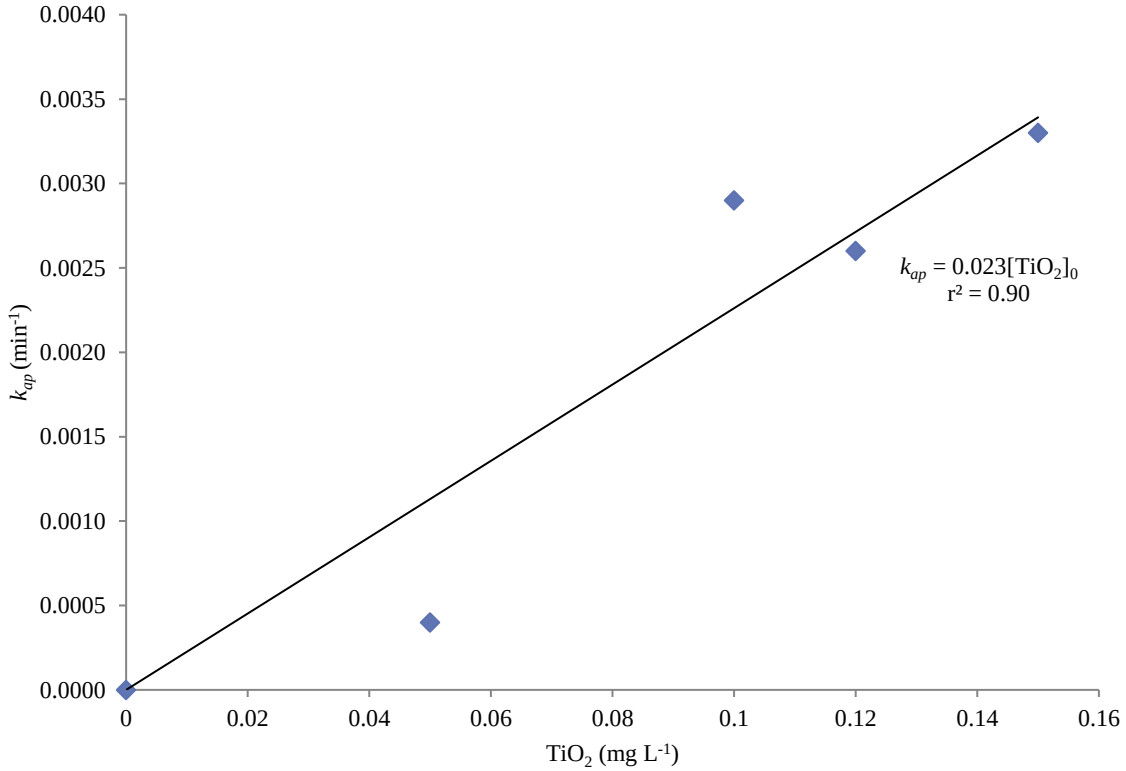


Figura 73. Relación de k_{ap} con la concentración de TiO_2 en la degradación de CBZ con TiO_2/UV-C

b) Efecto de la concentración inicial de CBZ

El comportamiento de la cinética de degradación de CBZ al variar CBZ_0 siguió una cinética de pseudo- primer orden, la Figura 74 muestra el grafico de *ln* CBZ/CBZ_0 en función del tiempo de reacción. Los valores de k_{ap} y vida media ($t_{1/2}$) evaluados bajo estas condiciones se indican en la Tabla 22.

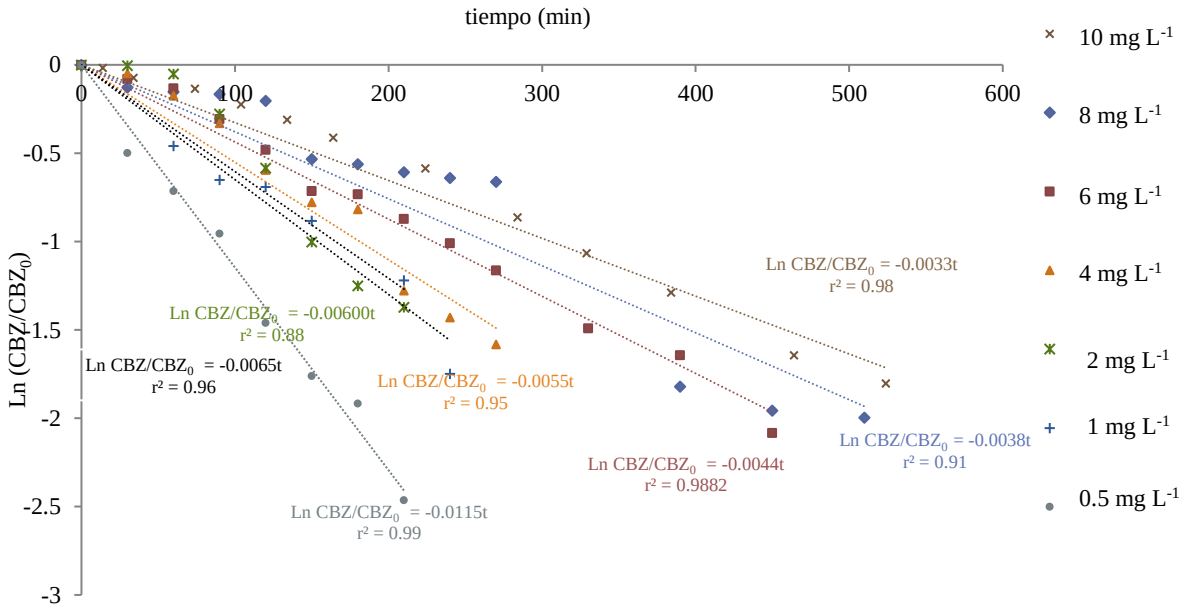


Figura 74. Cinética degradación de CBZ con TiO_2/UV-C

Tabla 22. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ de CBZ para TiO_2/ UV-C al variar $[CBZ]_0$

CBZ_0 (mg L^{-1})	k_{ap} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	
10	0.00330	210.0	0.98
8	0.00380	182.4	0.91
6	0.00440	157.5	0.99
4	0.00550	126.0	0.95
2	0.00600	115.5	0.88
1	0.00650	106.6	0.96
0.5	0.01150	60.3	0.99

Los resultados indican que la k_{ap} disminuye con el incremento de CBZ_0, esto debido a que al existir mayor cantidad de soluto disminuye la probabilidad de interacción de que todas las moléculas interaccionen con los sitios activos del catalizador disponibles paso a una competencia de adsorción que implica mayor tiempo del requerido cuando el soluto se encuentra en menor cantidad (Zouagbi *et al.*, 2007) . La relación lineal entre CBZ_0 y k_{ap} se muestra en la Figura 75.

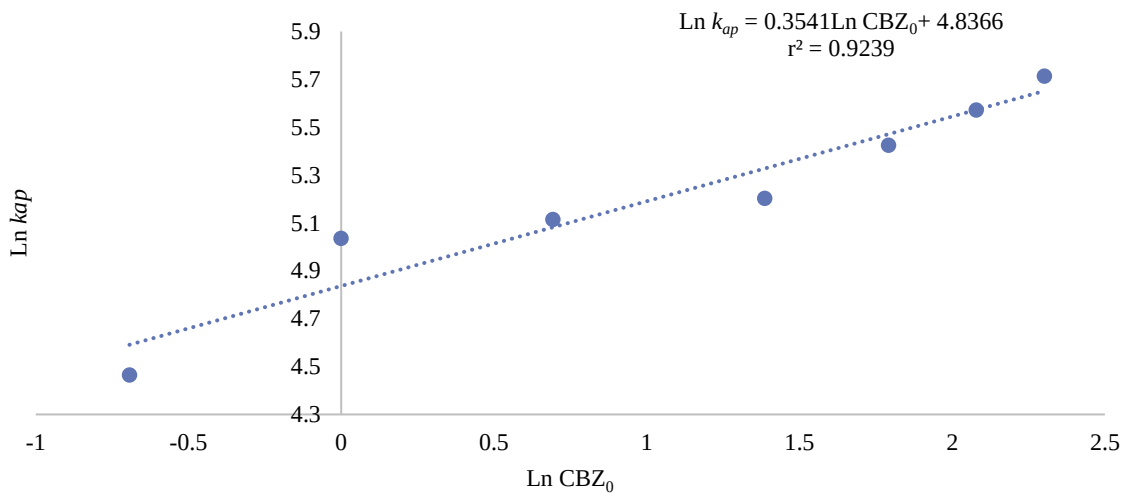


Figura 75. Relación de k_{ap} con $[CBZ]_0$ en la degradación con TiO_2/UV-C

c) Modelo cinético de degradación de CBZ, con TiO_2/UV-C

Debido a que el proceso de degradación con TiO_2 es un sistema heterogéneo que involucra dos procesos: i) fotoadsorción/desorción y ii) fotoexcitación (Zhou, Liang and Hu, 2014), se ha utilizado el modelo de Langmuir-Hinshelwood (L-H) para describir su cinética, siendo su expresión la Ecuación 41 (Zhou, Liang and Hu, 2014).

$$-\frac{dC_{CBZ}}{dt} = k_{ap}[CBZ] = \frac{kK_{CBZ}[CBZ]}{1+K_{CBZ}[CBZ]_0} \quad \text{Ecuación 41}$$

Donde K_{CBZ} es la constante de adsorción de equilibrio de CBZ de Langmuir-Hinshelwood y k la constante de velocidad de reacción en la superficie. La Figura 76 corresponde a una gráfica del inverso de la constante de velocidad observada $1/k_{ap}$, vs la concentración inicial de CBZ, $[CBZ]_0$.

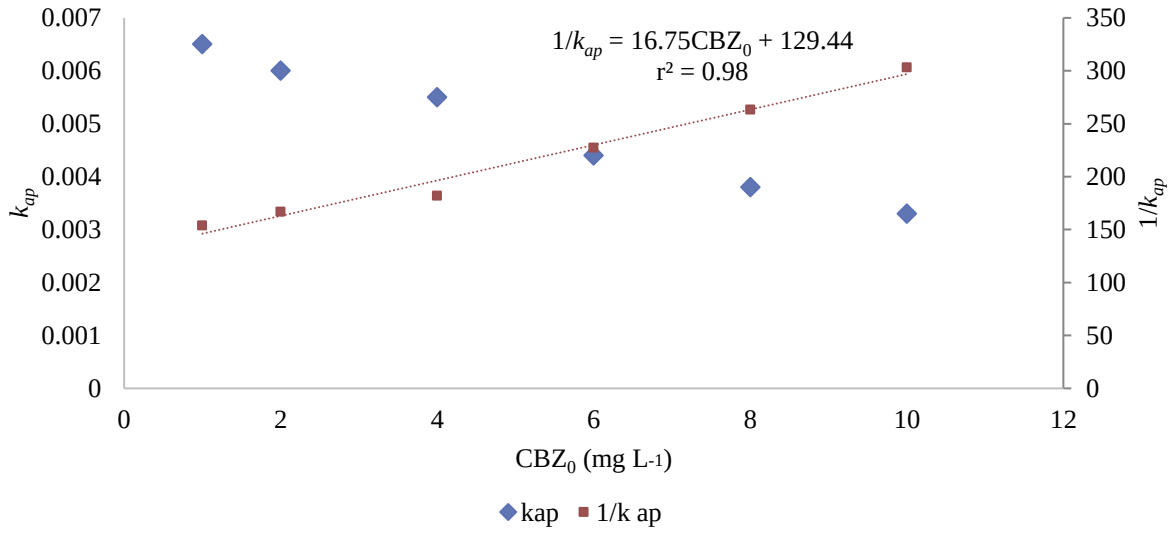


Figura 76. Relación $1/k_{ap}$ con $[CBZ]_0$ en la degradación con TiO_2/UV-C

De la relación descrita en la Figura 76 se obtiene una relación lineal que indica que la cinética se ajusta con la ecuación linealizada de Langmuir-Hinshelwood, Ecuación 42.

$$\frac{1}{k_{ap}} = \frac{1}{kK_{CBZ}} + \frac{1}{k}[CBZ]_0 \quad \text{Ecuación 42}$$

A partir de los valores del intercepto y la pendiente se calcula k y $K_{CBZ.}$, siendo k=0.059 mg L^{-1} min^{-1} y K_{CBZ}=0.129 L mg^{-1}. Indicando que la degradación de CBZ con TiO_2 ocurre al adsorberse las moléculas sobre la superficie del catalizador donde interaccionan para finalmente desorberce como producto. Siendo la ecuación 43 el modelo de la degradación de CBZ bajo el sistema TiO_2/UV-C.

$$-\frac{dC_{CBZ}}{dt} = k_{ap}[CBZ] = \frac{0.0077[CBZ]}{1+0.129[CBZ]_0} \quad \text{Ecuación 43}$$

Para verificar el comportamiento del modelo se establecieron 4 condiciones para comprobar la coincidencia de los datos experimentales con la propuesta. Obteniendo la relación de los valores de la constante cinética experimentales y el modelo de la Figura 77 podemos confirmar que la relación tiene un comportamiento lineal al obtener coeficiente de correlación de 0.96, por lo que la propuesta puede ser utilizada para predecir el comportamiento de la degradación del fármaco bajo luz UV-C y TiO_2.

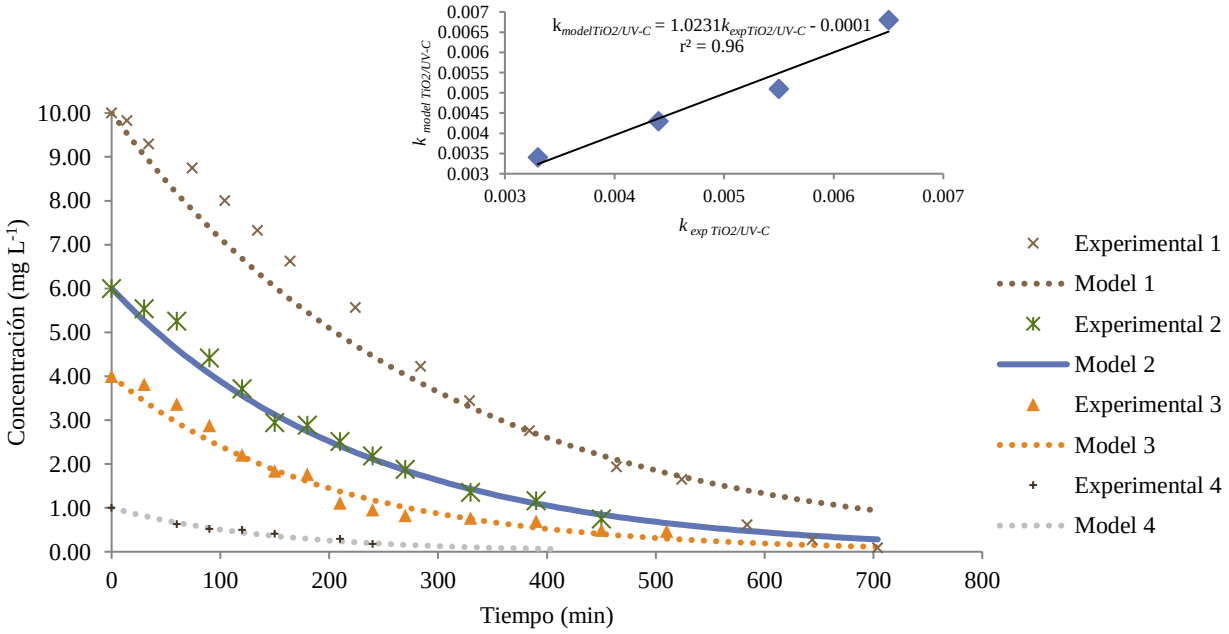


Figura 77. Modelo cinético de degradación de CBZ con TiO_2/UV-C

5.8.2. TMT

a) Efecto de la concentración inicial de TiO_2 $[TiO_2]_0$

La cinética de degradación siguió un modelo de pseudo- primer orden, la Figura 78 muestra el grafico de *ln* TMT/ TMT_0 en función del tiempo de reacción, de donde se obtiene el valor de la constante cinética aparente (k_{ap}) correspondiente a la pendiente de la recta del modelo de la Ecuación 5. Los valores de vida media ($t_{1/2}$) fueron evaluados con la Ecuación 6; estos resultados se indican en la Tabla 23. La concentración de 0.3 g L^{-1} es la condición propicia para la degradación encontrando que al elevar o reducir la concentración de TiO_2 con respecto a ese valor la k_{ap} no se ven favorecidos y los tiempos de vida media no se reducen.

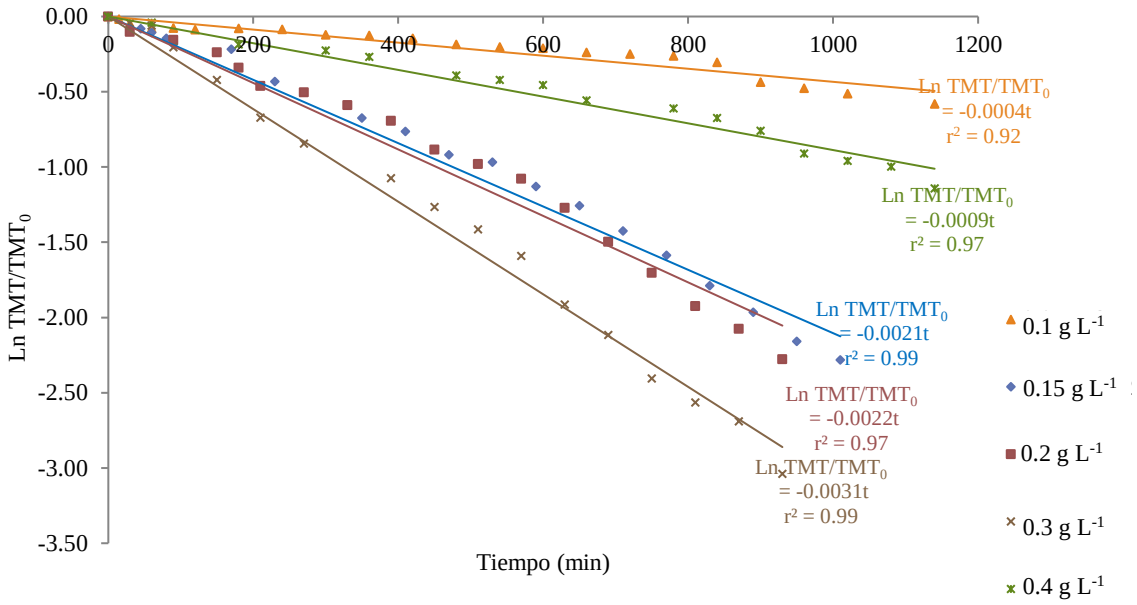


Figura 78. Cinética de degradación de TMT con TiO_2/ UV-C al variar $[TiO_2]_0$

Tabla 23. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ de TMT para TiO_2/ UV-C al variar $[TiO_2]_0$

Concentración TiO_2 (g L^{-1})	k_{ap} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	r^2
0.1	0.0004	1733	0.92
0.15	0.0021	330	0.99
0.2	0.0022	315	0.97
0.3	0.0031	224	0.99
0.4	0.0009	770	0.97

Dentro del intervalo de 0 a 0.3 el incremento de la k_{ap} se ve promovido por el aumento de los sitios activos debido al cambio gradual de la concentración de TiO_2 (Zouagbi *et al.*, 2007). Esta tendencia no se observa en 0.4 ya que el aumento de la densidad de la solución por la presencia de un exceso de partículas interfiere en la

adecuada adsorción de la radiación necesaria para la activación de los sitios activos y se refleja en un valor de k_{ap} menor a la tendencia esperada (Sauer *et al.*, 2002).

b) Efecto de la concentración inicial de TMT en la degradación con TiO_2/UV-C

El comportamiento de la cinética de degradación de al variar TMT_0 siguió una cinética de pseudo- primer orden, la Figura 79 muestra el grafico de *ln* TMT/ TMT_0 en función del tiempo de reacción. Los valores de k_{ap} y vida media ($t_{1/2}$) evaluados bajo estas condiciones se indican en la Tabla 24.

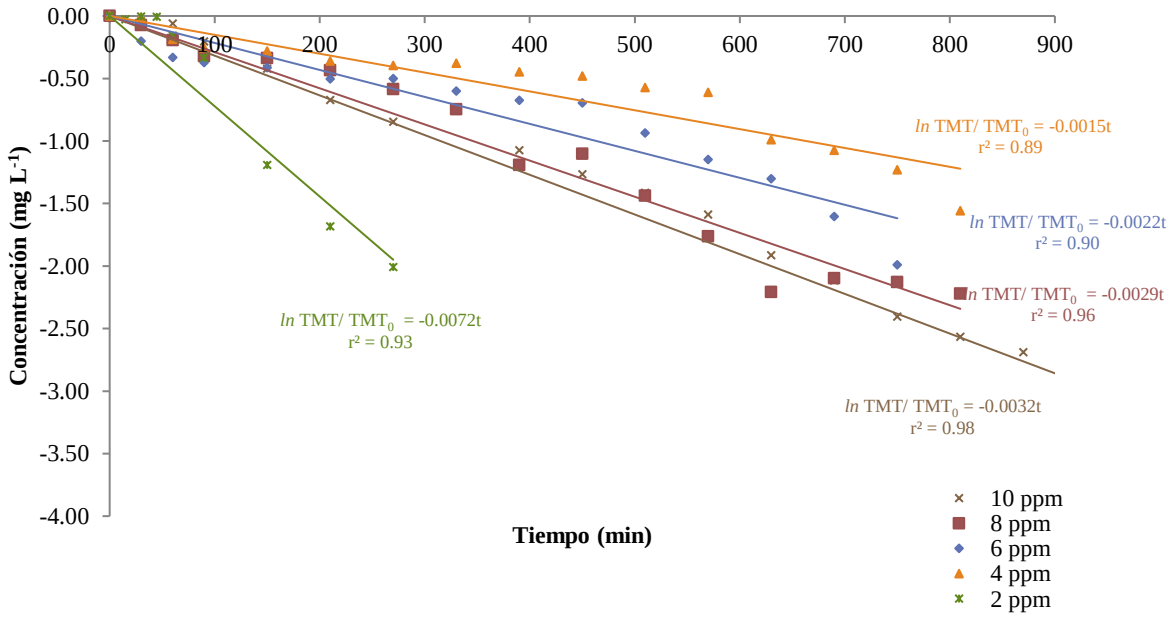


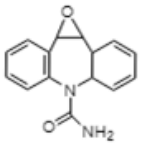
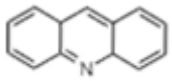
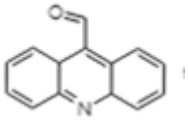
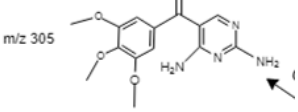
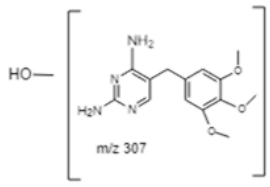
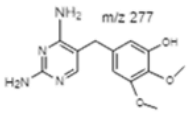
Figura 79. Cinética degradación de TMT con TiO_2/UV-C

Tabla 24. Valores k_{ap} y $t_{1/2}$ para TiO_2/ UV-C al variar $[TMT]_0$

TMT_0 (mg L^{-1})	k_{ap} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	r^2
10	0.0032	216.60	0.98
8	0.0029	239.01	0.96
6	0.0022	315.06	0.90
4	0.0015	462.09	0.89
2	0.0072	96.27	0.93

En resumen, la Tabla 25 muestra la comparación del comportamiento de la degradación de los fármacos con H_2O_2 y TiO_2. En ambos casos implica la formación de subproductos los cuales necesitan ser evaluados para determinar si estos tienen un impacto menor o mayor que la molécula original, y de este modo determinar cuál de las dos opciones es la más viable para la degradación.

Tabla 25. Comparación del comportamiento de la degradación de los fármacos con H_2O_2 y TiO_2.

Fármaco	AOPS	k_{ap} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	Productos de degradación detectados	Productos de degradación
CBZ	UV-C/ H_2O_2	0.036	19.3	1	 10,11- Epoxi carbamazepina
	UV-C/ TiO_2	0.0033	210	3	 Acridina  9-Formil acridina
TMT	UV-C/ H_2O_2	0.011	61	3	 m/z 305
	UV-C/ TiO_2	0.0031	224	4	 m/z 307  m/z 277

5.9. Evaluación de toxicidad de la solución remanente

Después de tener establecidas las condiciones de degradación para CBZ y TMT se procedió a evaluar la toxicidad de las soluciones de acuerdo con la guía estandarizada ASTM E1439-19 sobre ensayo de teratogénesis en embriones de rana *Xenopus Laevis* (FETAX).

5.9.1. Especímenes de prueba

Se utilizaron machos de rana africana (*Xenopus Laevis*) de 7,5 a 10 cm de largo y de al menos 2 años, y hembras de 10 a 12,5 cm de largo y de al menos 3 años. Mantenidos en acuario con agua a 20 ± 2 °C y a prueba de luz natural. Los animales fueron alimentados con alimento comercial Spirulina Boost (*Arthrospira máxima*) de un fabricante local.

5.9.2. Soluciones prueba

Las soluciones prueba fueron las resultantes de la exposición de una solución de 10 mg L^{-1} de los fármacos a un tratamiento efectivo de degradación con UV-C/ H_2O_2, UV-C/TiO_2 y UV-C, junto con soluciones control, descritas en las Tablas 26-28. Se utilizó medio de cultivo FETAX como testigo, con una composición de 625 mg NaCl, 96 mg $NaHCO_3$, 30 mg KCl, 15 mg $CaCl_2$, 60 mg $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, and 75 mg $MgSO_4$ por litro de agua destilada. Los reactivos usados fueron NaCl, $NaHCO_3$, KCl de la marca Fermont y $CaCl_2$, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ y $MgSO_4$ de la marca J. T. Baker. Previo a la exposición a la solución tratada con UV-C/ H_2O_2 se le adiciono catalasa para desactivar el H_2O_2 remanente del tratamiento y la solución tratada con UV-C/ TiO_2 se filtró con membrana de nylon de 0.5 micras para retirar al catalizador. El pH final de las soluciones fue ajustado a 7 con una solución de NaOH 1 N. Se sometieron un total de 60 embriones por cada solución.

Tabla 26. Soluciones control de la prueba FETAX

Solución	Composición
Testigo	Solución FETAX
Control 1	0.01 % Metanol en solución FETAX
Control 2	0.01 % catalasa en solución FETAX

Tabla 27. Soluciones prueba de CBZ de la prueba FETAX

Solución	Composición
CBZ	10 mg L^{-1} CBZ en solución FETAX
CBZ+UV/C	Solución de 10 ppm de CBZ tratada por fotolisis con radiación UV-C en solución FETAX
CBZ+UV/C+H_2O_2	Solución de 10 mg L^{-1} de CBZ tratada por UV-C /TiO_2 con solución FETAX
CBZ+UV/C+TiO_2	Solución de 10 mg L^{-1} de CBZ tratada por UV-C /H_2O_2 con solución FETAX

Tabla 28. Soluciones prueba de TMT de la prueba FETAX

Solución	Composición
TMT	10 mg L^{-1} TMT en solución FETAX
TMT+UV/C	10 mg L^{-1} TMT tratada por fotolisis con radiación UV-C en solución FETAX
TMT+UV/C+H_2O_2	Solución de 10 mg L^{-1} de TMT tratada por UV-C /H_2O_2 con solución FETAX
TMT+UV/C+TiO_2	Solución de 10 mg L^{-1} de TMT tratada por UV-C /H_2O_2 con solución FETAX

5.9.3. Fertilización

Para inducir la ovulación natural y la fertilización del ovocito, 12 horas previo a la iniciación del estudio se administraron a la hembra 800 IU y al macho 400 IU de gonadotrofina coriónica humana (HCG, Choriomon ®, IBSA) por inyección en el saco linfático dorsal, posteriormente la pareja fue aislada en una pecera de 20 L con agua a 20 ± 2 °C y a prueba de luz natural, donde la fertilización del ovocito ocurre de manera natural. Los ovocitos fueron examinados en un estereoscopio para seleccionar los especímenes fertilizados para el análisis.

5.9.4. Exposición

El ensayo fue realizado de acuerdo con la guía estandarizada American Society for Testing Materials (ASTM E1439-19) sobre ensayo de teratogénesis en embriones de rana *Xenopus Laevis* (FETAX).

De los embriones resultantes de la fertilización se seleccionaron aquellos con forma esférica, con división celular homogénea y que se encontraran en la etapa media blástula a gástrula temprana (etapa 8-11, Figura 80). Se colocaron 20 embriones en cajas Petri de 50 mm, previamente etiquetadas y con 10 ml de cada una de las soluciones de prueba y control, por triplicado (N=60 embriones por solución de prueba). Inmediatamente después de la preparación, los cultivos fueron colocados en una campana de flujo laminar para mantenerlos a una temperatura de 22 ± 2 °C hasta el final de la prueba

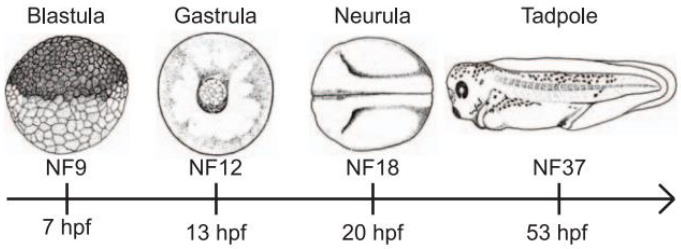


Figura 80. Cronología del desarrollo embrionario de *Xenopus Laevis* – NF etapas según Nieuwkoop y Faber y por horas después de la fertilización (hpf)

5.9.5. Monitoreo de cultivos

El medio fue reemplazado diariamente y los embriones muertos fueron removidos y cuantificados de cada caja Petri. La prueba concluye a las 96 horas de exposición, cuando los embriones alcanzan el desarrollo de la etapa 46.

5.9.6. Examinación de larvas

Al cumplirse las 96 horas de exposición las larvas sobrevivientes fueron fijadas en una solución de formaldehido al 3% para ser medir su longitud de cabeza a cola usando el software Zen Blue Zeiss. Cada uno de los embriones

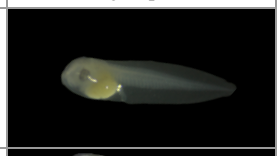
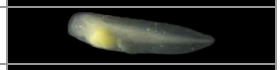
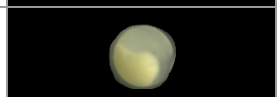
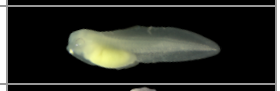
fueron examinados con ayuda de las imágenes obtenidas por la cámara Zeiss Axiocam 5s, para identificar las malformaciones usando el Atlas de Malformaciones (Bantle et al., 1991).

5.9.7. Resultados

a) Mortalidad

La Tabla 29 y las figuras 81-82 muestran el resultado de la exposición de los embriones a los diferentes tratamientos de CBZ y TMT durante 96 h.

Tabla 29. Mortalidad de embriones expuestos a las soluciones de tratamiento de CBZ y TMT

Solución	% acumulado de embriones muertos				% Mortalidad	Desarrollo
	24 h	48 h	72 h	96 h		ejemplo
Testigo	0%	22%	42%	43%	43%	
Control 1	0%	35%	68%	65%	65%	
Control 2	0%	22%	25%	100%	100%	
CBZ	100%	----	----	----	100%	
CBZ/UV-C	100%	----	----	----	100%	
CBZ UV-C/ H_2O_2	0%	26%	66%	95%	95%	
CBZ UV-C/TiO_2	0%	29%	69%	90%	90%	
TMT	100%	----	----	----	100%	
TMT UV-C	100%	----	----	----	100%	
TMT UV-C/ H_2O_2	0.00	164.00	284.00	300.00	100%	
TMT UV-C/TiO_2	0.00	177.00	227.00	235.00	78%	

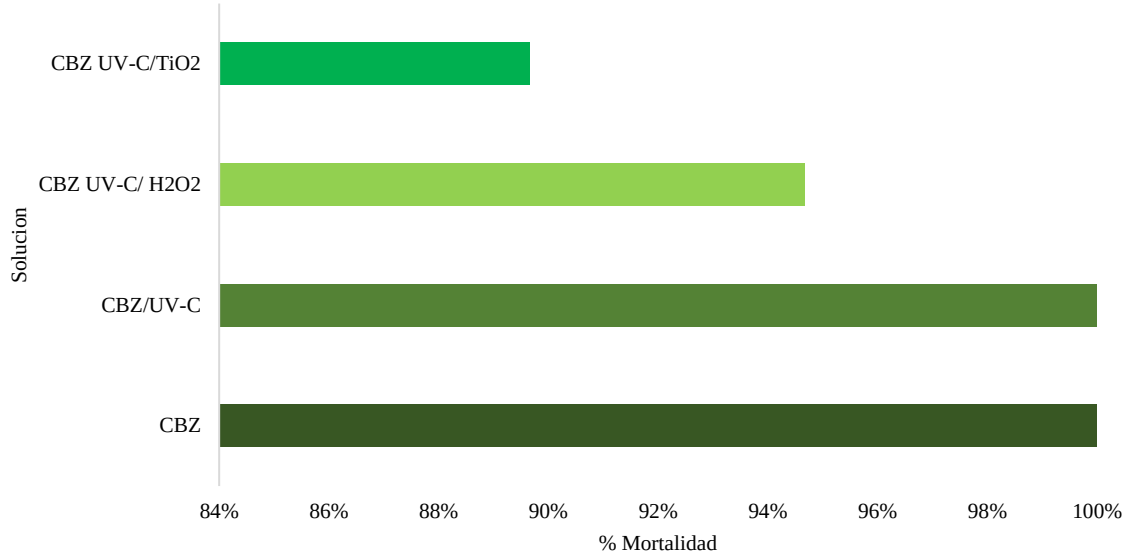


Figura 81. Mortalidad de embriones expuestos a las soluciones de tratamiento de CBZ después de 96 h de exposición

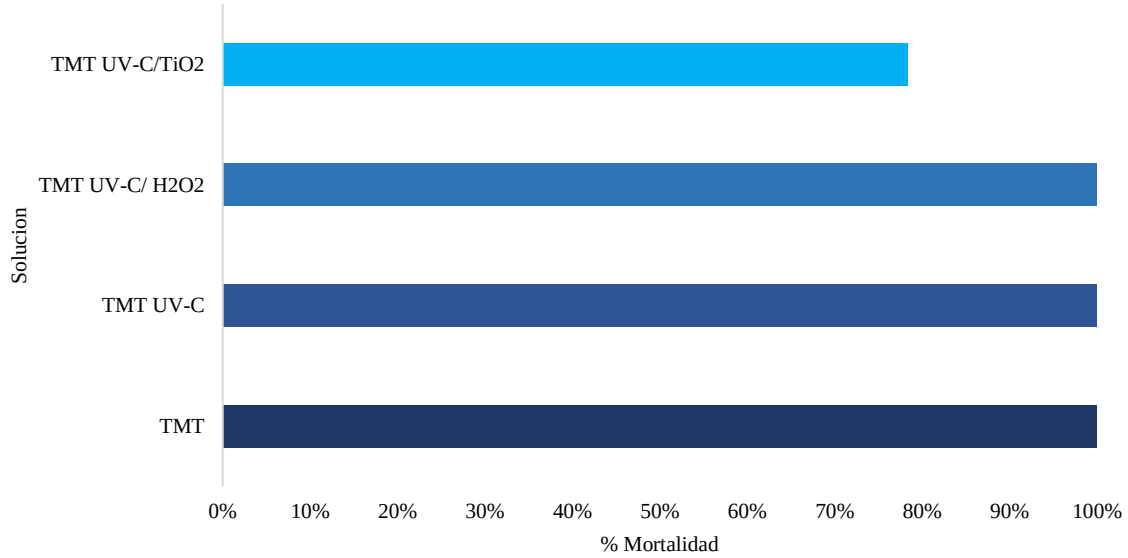


Figura 82. Mortalidad de embriones expuestos a las soluciones de tratamiento de TMT después de 96 h de exposición

b) Tamaño

La longitud promedio de cabeza a cola de los embriones sobrevivientes expuestos, se muestra en la Figura 83. Los datos se analizaron utilizando el software Stat Graphics Centurion XIX. La normalidad de los datos se verificó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov Test. Para determinar las diferencias de crecimiento de los embriones, cada larva se midió de la cabeza a la cola y los valores medios se compararon mediante análisis unidireccional (ANOVA) y comparaciones múltiples por el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. ($P < 0.05$) con respecto al grupo testigo y en el caso de CBZ se comparó la diferencia del

efecto entre los tratamientos de UV/C+H_2O_2 y UV-C/TiO_2. Los datos de análisis estadístico se reportan en el Anexo 7-8.

- **CBZ**

Los embriones expuestos a las soluciones remanentes de degradación no muestran una diferencia significativa con respecto al grupo testigo ($P<0.05$). Sin embargo; si existe una diferencia entre el crecimiento de las larvas que fueron expuestas al tratamiento de UV-C/ H_2O_2 con respecto a las larvas expuestas al tratamiento de UV-C /TiO_2 ($P<0.05$).

- **TMT**

Los embriones expuestos a las soluciones remanentes de degradación por UV-C/TiO_2, no muestran una diferencia significativa con respecto al grupo testigo ($P<0.05$). En este caso no se comparó la diferencia del efecto entre los tratamientos de UV/C+H_2O_2 y UV-C/TiO_2 debido a que en el tratamiento con H_2O_2 solo se alcanzó desarrollo de las larvas hasta las 72 horas.

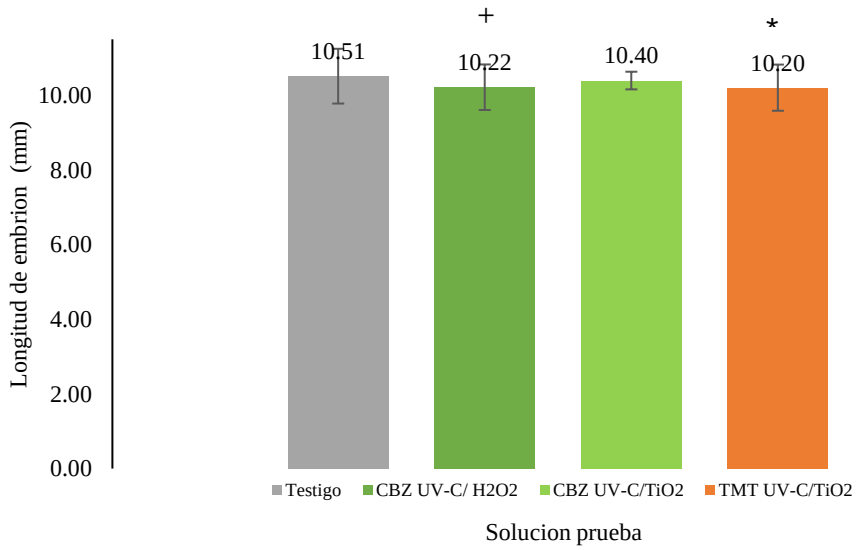


Figura 83. Longitud promedio de larvas *Xenopus Laevis* expuestos a las soluciones testigo y de tratamiento de CBZ y TMT después de 96 h de exposición, se indican las diferencias significativas relativas a la solución testigo (*) y la solución CBZ UV-C /H_2O_2 con respecto a la solución CBZ UV-C/TiO_2 (+), donde $p<0.05$.

.

c) Malformaciones

Las principales malformaciones observadas, son: enanismo, anomalías de formación en recto, tracto gastrointestinal, microcefalia, inhibición desarrollo embrionario y severas. La Figura 84 muestra su distribución y en la Figura 85 se ejemplifican.

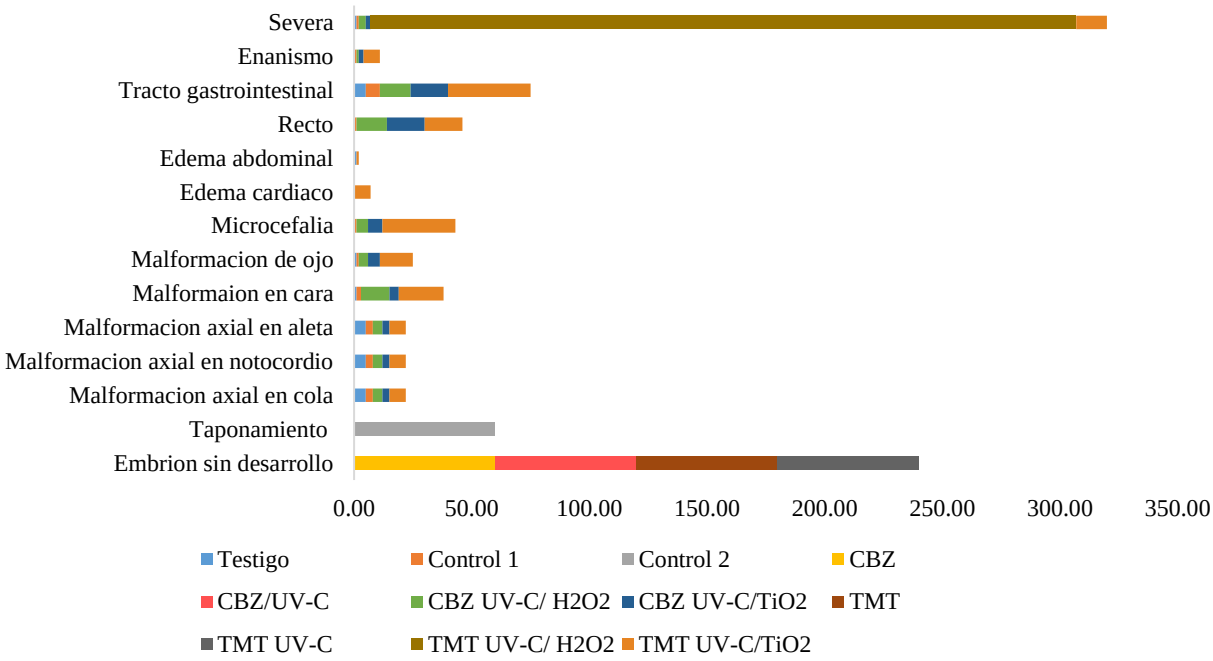
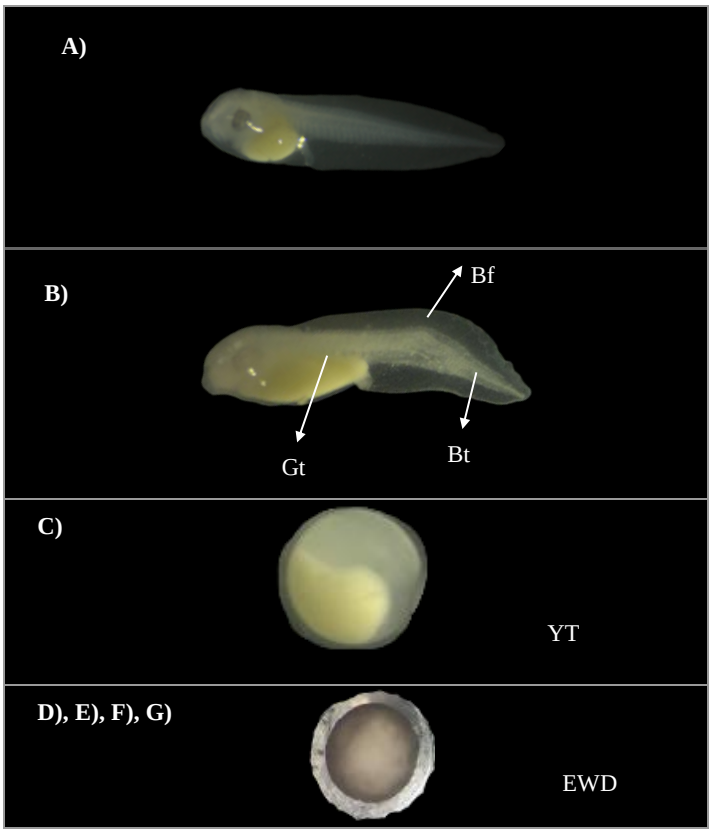


Figura 84. Histograma de frecuencia de malformaciones de los embriones *Xenopus Laevis* expuestos a las soluciones de tratamiento de CBZ y TMT con UV-C/H_2O_2 y UV-C/TiO_2.



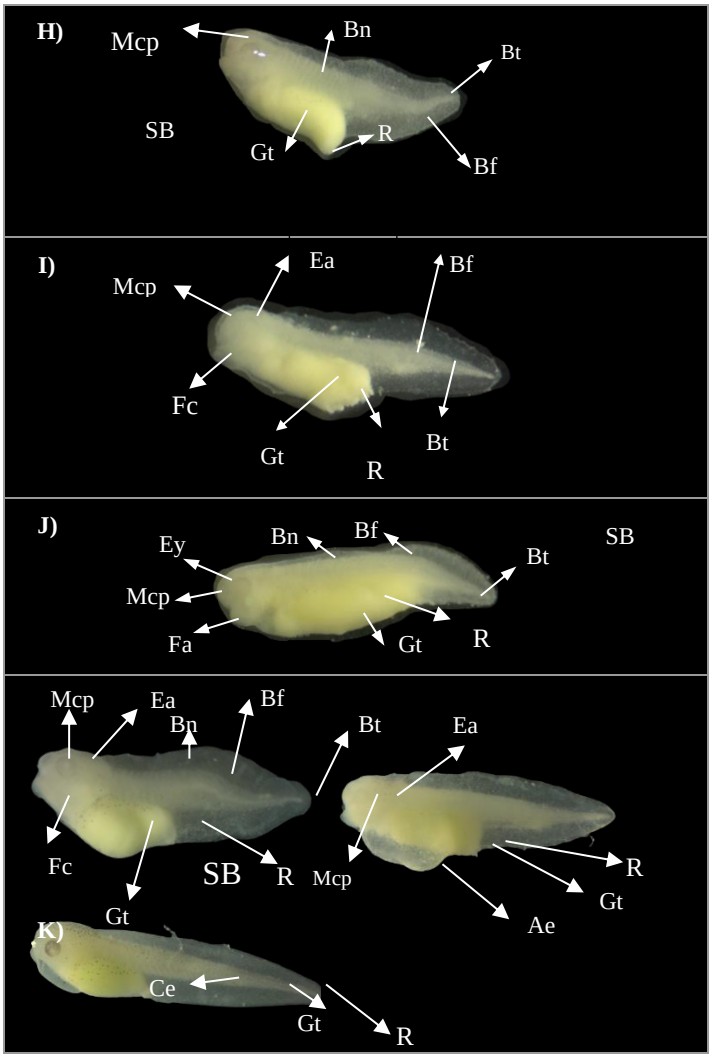


Figura 85. Representación de malformaciones de los embriones en *X. Laevis* expuestos a las soluciones: A) Testigo, 96 h; B) Control 1, 96 h; C) Control 2, 72 h; D) CBZ sin tratamiento de degradación, 24 h; E) CBZ expuesto a UV, 24 h; F) TMT sin tratamiento de degradación, 24 h; G) TMT expuesto a UV, 24 h; H) CBZ con tratamiento UV-C/H_2O_2, 96 h; I) CBZ con tratamiento UV-C/TiO_2, 96 h; J) TMT con tratamiento UV-C/H_2O_2, 96 h; K) TMT con tratamiento UV-C/TiO_2, 96 h. Donde Ae: Edema abdominal, Bf: Malformación axial en aleta, Bn: Malformación axial en notocordio, Bt: Malformación axial en cola; Ce: Edema cardiaco; Ea: Malformación en ojo; EWD: Embrión sin desarrollo; Fa: Malformación en cara; Gt: Malformación en tracto gastrointestinal; Mcp: microcefalia; R: Malformación en recto; SB: Enanismo, YT: Taponamiento de yema.

5.9.8. Análisis de resultados

La prueba FETAX fue aplicada para evaluar la toxicidad de las soluciones remanentes de los tratamientos UV-C/H_2O_2 y UV-C/TiO_2, propuestos para la degradación de los fármacos de CBZ y TMT. Siendo evaluados los parámetros de mortalidad, malformaciones físicas visuales e inhibición de crecimiento.

a) Mortalidad y malformaciones

- **Soluciones CBZ, TMT, CBZ/UV-C y TMT/UV-C**

Se obtuvo una mortalidad del 100% en el lapso de las primeras 24 horas y sin desarrollo del embrión en las soluciones de 10 mg L^{-1} de CBZ y TMT, debido a que las soluciones no recibieron tratamiento para degradación del fármaco, las soluciones conservan el nivel de toxicidad inherente a la concentración del fármaco. Lo mismo ocurre en las soluciones de 10 mg L^{-1} de CBZ/UV-C y TMT/UV-C debido a que este tratamiento no es eficiente para su degradación , por la alta estabilidad que poseen los dos compuestos frente a la radiación UV-C (Andreozzi *et al.*, 2002; Zuo, Zhang and Zhou, 2013), manteniéndose la misma concentración y condición de toxicidad de las dos soluciones anteriores.

La toxicidad de ambos fármacos ha sido reportada por diversos estudios donde se han indicado los potenciales riesgos de la exposición de estos en especies acuáticas; siendo evaluados sus niveles de toxicidad frente a organismos como bacterias, algas, microcrustáceos y peces. Tanto CBZ, como TMT se encuentran clasificados como "R52/53 Harmful to aquatic organisms and may cause long term adverse effects in the aquatic environment" dentro de la legislación europea actual sobre la clasificación y etiquetado de compuestos químicos (92/32/EEC) (Zhang, Yongjun; Geißen, Sven-Uwe ; Gal, 2008 ; Olga S. Arvaniti, 2020). Hai *et al.*, 2018 reporta para CBZ valores de LC_{50} de 111 mgL^{-1} en *Daphnia Magna* y Dassault et al, 2007 valores de LC_{50} y EC_{50} de un rango de 9.9 a 47.3 mg L^{-1} en mosquito *Chironomus dilutus* y el anfípodo *Hyalella azteca*. En TMT los valores de LC_{50} reportados por Jeong *et al.*, 2016 son 156 mg L^{-1} para larvas nauplio *T. Japonicus* y por Olga S. Arvaniti, 2020 de 58.8 mg L^{-1} en *Daphnia Magna* y 65.7 mg L^{-1} en *P. Promelas.*

- **Control 1**

Se consideró una solución de control metanol, debido a que se utilizó como disolvente en las soluciones stock para la preparación de las soluciones estándar de 10 mg L^{-1} de los fármacos. Las larvas expuestas a esta solución tuvieron una mortalidad del 65%, presentándose anormalidades en el desarrollo del notocordio, aleta y cola. Este valor es superior al grupo testigo, pero inferior a las soluciones donde los fármacos están presentes o en las soluciones donde se encuentran los productos de degradación. La concentración de metanol en la solución inicial previa a los procesos de degradación fue de 0.1%, Donner *et al.*, 2013 reporta que esta concentración no inhibe el efecto que puede causar el fármaco o los productos de degradación.

- **Control 2**

El grupo control de catalasa se consideró debido a que los resultados de la evaluación de los subproductos derivados de la degradación con UV-C y H_2O_2, indican que las soluciones remanentes conservan H_2O_2 residual, por lo que se adiciono como agente inhibidor para la conversión del H_2O_2 en H_2O y O_2 *(*Yang *et al,* 2016*).* Como resultado el grupo expuesto no se desarrolló de acuerdo con la cronología normal de vida de los embriones y a las 72 horas se alcanzó una mortalidad del 100%, observándose un efecto de taponamiento de embrión, lo cual no se observó en los grupos de las soluciones de UV-C y H_2O_2, indicando que la catalasa se consumió en casi su totalidad actuando de manera adecuada inhibiendo el efecto del H_2O_2 residual al convertirlo en H_2O.

- **Soluciones CBZ UV-C/H_2O_2 y UV-C/TiO_2**

Las larvas expuestas a las soluciones donde se usó el tratamiento de UV-C/ H_2O_2, se obtuvo una mortalidad del 95 %, mientras que con UV-C/TiO_2 se alcanzó 90%, con un desarrollo hasta las 96 horas. Presentándose principalmente malformaciones en el desarrollo del notocordio, aleta, cola, cara ojo y enanismo. A pesar de que los valores de mortalidad son altas se obtuvo un desarrollo mayor y un nivel de mortalidad menor que en las

soluciones donde no hay degradación del fármaco, indicio de que el efecto de la toxicidad es menor a estas soluciones.

A pesar de que el estudio cinético demostró que la degradación de ambos fármacos se realiza de manera exitosa con los tratamientos UV-C/H_2O_2 y UV-C/ TiO_2, los resultados arrojan que, aunque el fármaco ya no está presente en mayor proporción; las soluciones remanentes son mezclas de subproductos que están causando efectos negativos en el desarrollo de los organismos y posiblemente sean los responsables de las deformaciones y las tasas de mortalidad observadas.

Siendo, las soluciones remanentes de ambos tratamientos una mezcla de subproductos con la presencia de compuestos como 10,11-epoxicarbamazepine, acridina y acridona en diferente proporción. En tratamientos con H_2O_2 se ha observado que el compuesto principal es acridina (Vogna *et al.*, 2004; Leclercq *et al.*, 2009; Donner *et al.*, 2013b; Kudlek, 2018) se encuentra en mayor proporción y en TiO_2 la proporción de los compuestos es aleatoria (Im *et al.*, 2012; Georgaki, Vasilaki and Katsarakis, 2014; Ran *et al.*, 2020), debido a que aún no existe una caracterización e identificación completa de todos los subproductos que se pueden originar .

Estas moléculas han sido evaluadas toxicológicamente de manera aislada y en conjunto en especies como *Vibrio qinghaiensis sp.* (R. Zhang *et al.*, 2015), *Vibrio Fischer* (Olmez-Hanci, Arslan-Alaton and Dursun, 2014), *Daphnia magna* (Andreozzi *et al.*, 2002; Vogna *et al.*, 2004), *Chironomus riparius* (Leclercq *et al.*, 2009), *Pseudokirchneriella subcapitata* (Na *et al.*, 2019), entre otros. A pesar de que los estudios indican que de manera individual presentan una toxicidad significativamente menor a CBZ (Donner *et al.*, 2013a), la mezcla de los compuestos presenta una toxicidad mayor a CBZ (Q. Zhang *et al.*, 2015). Dando pauta a sugerir que en los tratamientos con H_2O_2 posiblemente se encuentren subproductos en mayor proporción que en TiO_2 o que los subproductos presentes en esta solución poseen un nivel de toxicidad mayor que los de la solución donde se utilizó TiO_2.

- **Soluciones TMT UV-C/H_2O_2 y UV-C/TiO_2**

Para TMT, las soluciones remanentes tratadas con UV-C/ H_2O_2, tuvieron una mortalidad del 100%, igual que en las soluciones donde no hubo tratamiento. Sin embargo, los embriones presentaron mayor desarrollo que en las soluciones donde no hay degradación; alcanzándose a desarrollar hasta las 72 horas, aunque las larvas manifestaron deformaciones físicas severas que ocasionaron su deceso. Por otro lado, la solución donde se usó TiO_2 tuvo una mortalidad menor, siendo del 78%; con un desarrollo de las larvas hasta las 96 horas. En estas larvas se observó anomalías principalmente en el desarrollo del tracto intestinal, recto, cara y microcefalia. Además, fue el único grupo de todo el estudio que presento larvas con edema cardiaco y/o abdominal. Al igual que en CBZ, a pesar de que los resultados del estudio cinético demuestran que la degradación de TMT por UV-C/H_2O_2 o UV-C/ TiO_2 es eficiente; las soluciones remanentes consisten en subproductos que posiblemente están interfiriendo en el desarrollo adecuado del embrión y sean los responsables de los decesos y deformaciones observados en este estudio. Siendo la variación de la mortalidad influenciada por la concentración y numero de subproductos derivados del tratamiento aplicado.

Las soluciones remanentes en este caso consisten en una mezcla de derivados de una serie de reacciones de oxidación y carbonilacion donde se han identificado frecuencuentemente la presencia de los compuestos $C_{14}H_{19}N_4O_4$ con m/z 307 y $C_{14}H_{19}N_4O_5$ con m/z 305 son los más abundantes y frecuentemente detectados cuando se degrada TMT con UV-C/ H_2O_2 (Alharbi *et al.*, 2017). Para el caso de TiO_2 los productos derivan de

reacciones de hidroxilación, desmetilación y ruptura de la molécula siendo los compuestos predominantes el α-hidroxi-trimetoprima (TMP-OH, monohidroxilado con m/z 307; $C_{14}H_{19}N_4O_4$) y el dihidroxilado (m/z 323; $C_{14}H_{19}N_4O_5$) (Jewell *et al.*, 2016). Estudios donde se han evaluados las soluciones de estos tratamientos donde se han identificado estos compuestos han mostrado que la toxicidad acuática disminuye con la degradación de TMP. Sin embargo, sus subproductos en conjunto aún mantienen niveles nocivos para organismos como *D. magna* con un EC_{50} <0.1 mgL^{-1}(Yang *et al.*, 2020), y valores de LC_{50} de un rango de 35.3 a 2345 mgL^{-1} a las 96 h para *P. promelas* y EC_{50} de un rango de 0.689 a 6.22 mg L-1 para *P. subcapita* (Arvaniti *et al.*, 2020).

b) Inhibición de crecimiento

Las similitudes de tamaño de las larvas expuestas a las soluciones remanentes con respecto al grupo testigo indican que los tratamientos aplicados para la degradación del fármaco están teniendo un impacto negativo menor que las soluciones donde no se aplicó un tratamiento efectivo, ya que en este caso los embriones no se desarrollaron debido a que el fármaco aún se encuentra presente.

- **CBZ**

Las larvas expuestas a las soluciones donde no hubo degradación de CBZ presentaron inhibición de crecimiento a las 24 horas, coincidiendo con lo reportado en estudios previos de especies como la alga *Pseudokirchneriella subcapitata, Daphnia magna y Vibrio fischeri* (Donner *et al.*, 2013a), esto podría atribuirse a un aumento de la duración del período de interfase del embrión inducido por este compuesto (Jos *et al.*, 2003).

Por otro lado, las larvas expuestas a las soluciones finales de los procesos de UV-C/ H_2O_2 y UV-C/TiO_2, alcanzaron un crecimiento similar al grupo testigo debido que poseen una concentración mucho menor a la concentración del fármaco de la solución inicial, se alcanza una eficiencia de degradación por arriba del 98%; por consecuente el efecto del fármaco es mucho menor permitiendo que los embriones se desarrollen hasta las 96 h.

Adicionalmente, hubo una reducción en la longitud de las larvas expuestas a los tratamientos de UV-C/ H_2O_2 con respecto a las tratadas por UV-C TiO_2; lo cual puede atribuirse al efecto de la presencia de los productos de degradación derivados de cada tratamiento, siendo que en reacciones con UV/H_2O_2 los principales subproductos son acridina y sus derivados (Vogna *et al.*, 2004; Kudlek, 2018). En estudios recientes se ha encontrado que la acridina posee un efecto más toxico que CBZ, y en especies como *Pseudokirchneriella subcapitata* ha ocasionado inhibición de crecimiento.

- TMT

Las larvas expuestas a las soluciones donde no hubo degradación de TMT presentaron inhibición de crecimiento a las 24 horas. Por otro lado, las larvas expuestas a las soluciones con UV-C/ H_2O_2 se desarrollaron hasta las 72 horas. El grupo expuesto a la solución de UV-C/TiO_2, alcanzo un crecimiento hasta las 96 horas con un tamaño similar al grupo testigo, esto debido a que posee una concentración de TMT mucho menor que la solución inicial sin tratamiento. Sin embargo, posee productos de degradación que ocasiona larvas con deformaciones físicas y en especies como *Vibrio qinghaiensis sp* (Sirtori *et al.*, 2010) y *V. fischeri*(Anquandah *et al.*, 2011) se ha observado inhibición de crecimiento.

6. Conclusiones

- Las soluciones finales de los tres fármacos después del tratamiento con UV-C/ H_2O_2 no son viables para el medio ambiente debido a la presencia del H_2O_2 residual, el cual es un agente nocivo. Por lo que es necesario aplicar un proceso secundario para su desactivación del, y de este modo contar con una solución remanente con menor impacto ecológico. Comúnmente se utiliza un agente inhibidor como la enzima catalasa o un reactivo como ácido ascórbico para la conversión del H_2 O_2 en H_2O y O_2.
- En el caso de EE2 los tratamientos usando radiación UV-C con H_2O_2 o con TiO_2 no son viables para degradar a esta molécula; por lo que es necesario buscar otras alternativas más eficientes para su degradación.
- En CBZ y TMT la degradación con UV-C/H_2O_2 fue en menor tiempo comparada con TiO_2; sin embargo las pruebas de toxicidad con el tratamiento con H_2O_2, indicaron que las soluciones remanentes tuvieron un mayor impacto negativo en comparación con los tratamientos con TiO_2; a pesar de que las soluciones derivadas de UV-C/H_2O_2 permitieron un mayor desarrollo de los organismos que en las soluciones donde no hubo una remoción del fármaco adecuada.
- La prueba FETAX indica que a pesar la presencia del fármaco disminuyo después del tratamiento de remoción; la mezcla de subproductos derivados de cada reacción está generando efectos negativos como malformaciones, mortalidad y disminución del crecimiento de los embriones expuestos; por lo que es necesario realizar más estudios que puedan brindar información sobre sus propiedades fisicoquímicas y ofrecer alternativas para su remoción.

Se recomienda:

- Hacer un estudio de caracterización de las soluciones remanentes para identificar y cuantificar a los subproductos derivados de la reacción y evaluar su toxicidad.
- Desarrollar un método analítico para la identificación y cuantificación de los subproductos derivados de la reacción.
- Desarrollar un método analítico para la cuantificación del H_2O_2 residual derivado del AOP, y proceder con la evaluación de la mejor alternativa de inhibición.
- Ampliar el estudio de toxicidad para determinar el índice de toxicidad de los productos de degradación más estables de modo individual y en mezcla.
- Proponer alternativas para la remoción o tratamientos de degradación para los subproductos que posean alta estabilidad y tengan un mayor índice de toxicidad.

Anexos

7. ANEXOS

Anexo 1. Fórmulas para realizar los cálculos de validación del método analítico

Media Aritmética de y ..... $\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$

Media Aritmética de x ..... $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$

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

Coeficiente de variación ..... $CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$

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

Ordenada al origen ..... $b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$

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

Intervalo de Confianza para la pendiente ..... $IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975,n-2} S_{b1}$

Desviación Estándar de la Pendiente ..... $S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$

Desviación Estándar de la Regresión ..... $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$

Desviación Estándar de la Ordenada al Origen ..... $S_{b0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$

Intervalo de Confianza para la Ordenada al Origen ..... $IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975,n-2} S_{b0}$

Diferencia Absoluta ..... $|d_i| = |\overline{y_1} - \overline{y_0}|$

Anexo 2. Tabla estadística de la distribución t de Student

Tabla 30. Distribución t de Student conforme a grados de libertad.

GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0.975}$	GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0.975}$	GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0.975}$
1	12.706	26	2.056	51	2.008
2	4.303	27	2.052	52	2.007
3	3.182	28	2.048	53	2.006
4	2.776	29	2.045	54	2.005
5	2.571	30	2.042	55	2.004
6	2.447	31	2.040	56	2.003
7	2.365	32	2.037	57	2.002
8	2.306	33	2.035	58	2.002
9	2.262	34	2.032	59	2.001
10	2.228	35	2.030	60	2.000
11	2.201	36	2.028	61	2.000
12	2.179	37	2.026	62	1.999
13	2.160	38	2.024	63	1.998
14	2.145	39	2.023	64	1.998
15	2.131	40	2.021	65	1.997
16	2.120	41	2.020	66	1.997
17	2.110	42	2.018	67	1.996
18	2.101	43	2.017	68	1.995
19	2.093	44	2.015	69	1.995
20	2.086	45	2.014	70	1.994
21	2.080	46	2.013	71	1.994
22	2.074	47	2.012	72	1.993
23	2.069	48	2.011	73	1.993
24	2.064	49	2.010	74	1.993
25	2.060	50	2.009	75	1.992

Anexo 3. Adecuabilidad del sistema

El análisis se realizó inyectando por quintuplicado el estándar de referencia al 100% para cada uno de los fármacos (10 mg L^{-1}), calculando el coeficiente de variación (CV); y para cada inyección se informó el factor de coleo (T), el factor de capacidad (K´) y el número de platos teóricos (N), cumpliendo con los criterios de aceptación: CV≤ 2, T< 2, K > 2 y N> 4000 para métodos cromatográficos. Las Tablas 31-33 muestran los resultados.

a) CBZ

Tabla 31. Resultados CBZ de adecuabilidad del sistema.

Muestra	Concentración mg L^{-1}	Área	Factor de capacidad (K')	Factor de coleo	Numero de Platos Teóricos	Tiempo de retención (min)
1	10	567342	3.371	1.18	9450	2.93
2	10	567116	3.366	1.17	9332	2.93
3	10	566447	3.373	1.17	9229	2.93
4	10	561572	3.490	1.17	8569	2.93
5	10	561425	3.377	1.12	9378	2.93
Promedio		564780	3.4	1.2	9191.6	2.9
D.E.		3014	K>2	T<2	N>4000	
C.V.		0.5				

b) TMT

Tabla 32. Resultados TMT de adecuabilidad del sistema.

Muestra	Concentración mg L^{-1}	Respuesta del analito Área	Factor de capacidad (K')	Factor de coleo	Numero de Platos Teóricos	Tiempo de retención (min)
1	10	290123	3.250	1.32	11258	1.92
2	10	287174	4.084	1.68	9240	1.92
3	10	287600	3.780	1.54	12210	1.93
4	10	283007	3.009	1.54	11100	1.92
5	10	293026	3.620	1.16	8900	1.92
Promedio		288186	3.5	1.4	8881	1.9
D.E.		3720	K>2	T<2	N>4000	
C.V.		1.3				

c) EE2

Tabla 33. Resultados EE2 de adecuabilidad del sistema.

Muestra	Concentración mg L^{-1}	Respuesta del analito Área	Factor de capacidad (K')	Factor de coleo	Numero de Platos Teóricos	Tiempo de retención (min)
1	10	52356	2.96	1.40	5726	3.92
2	0.01	52269	2.97	1.41	5624	3.93
3	0.01	53073	2.966	1.42	5621	3.93
4	0.01	52946	2.963	1.42	5762	3.93

5	0.01	52305	2.959	1.42	5674	3.92
Promedio		52590	3.0	1.4	5681	3.9
D.E.		387	K>2	T<2	N>4000	
C.V.		0.7				

Tabla 34. Adecuabilidad.

Fármaco	CBZ	TMT	EE2
Tiempo de retención	2.9 min	1.9 min	3.9 min
CV (%)	0.5	1.3	0.7
K´	2.7	3.0	3.0
T	1.5	1.4	1.4
N	8489	8881	5681

Anexo 4. Precisión del sistema

El análisis se realizó preparando un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que representa el 100% de la muestra (10 mg L^{-1}) para cada uno de los fármacos; calculando la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV), cumpliendo con los criterios de aceptación en donde la CV es menor al 1.5%. Los resultados se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35. Precisión del sistema.

Muestra	Señal analítica (UA)		
	CBZ	TMT	EE2
1	570135	290123	52356
2	557293	287174	52269
3	553968	287600	53073
4	561142	283007	52946
5	564507	293026	53269
6	560309	292769	52305
Promedio	561225.67	288949	52703
S	5641.46	3817.60	444.50

CV (%)	1.0	1.3	0.8

Anexo 5. Linealidad del sistema

En la Tabla 36-41 se muestran los resultados del análisis de la linealidad el cuál se realizó por triplicado para 6 concentraciones diferentes: 20, 40, 60, 80, 100, 120% para los tres fármacos; los cuales cumplen con los criterios de aceptación, la r^2 es mayor a 0.98. Los resultados se muestran en las figuras 86-88.

a) CBZ

Tabla 36. Análisis de la linealidad CBZ.

Pendiente	b_1=	4315.39
Ordenada al origen	b_0=	122738.64
Desv. estándar de la pendiente	Sb_1=	55.48
Desv. estándar de regresión	Sy/x=	8039.42
Numero de Datos	n	18

Tabla 37. Resultados Análisis de la linealidad CBZ.

Parámetro		Resultado	Criterio de aceptación
Coeficiente de determinación r^2	r^2	0.997	≥ 0.98
Intervalo de Confianza para la Pendiente	IC (β_1)	4433.00	No debe incluir el cero
Intervalo de Confianza para la Pendiente	IC (β_0)	4197.78	

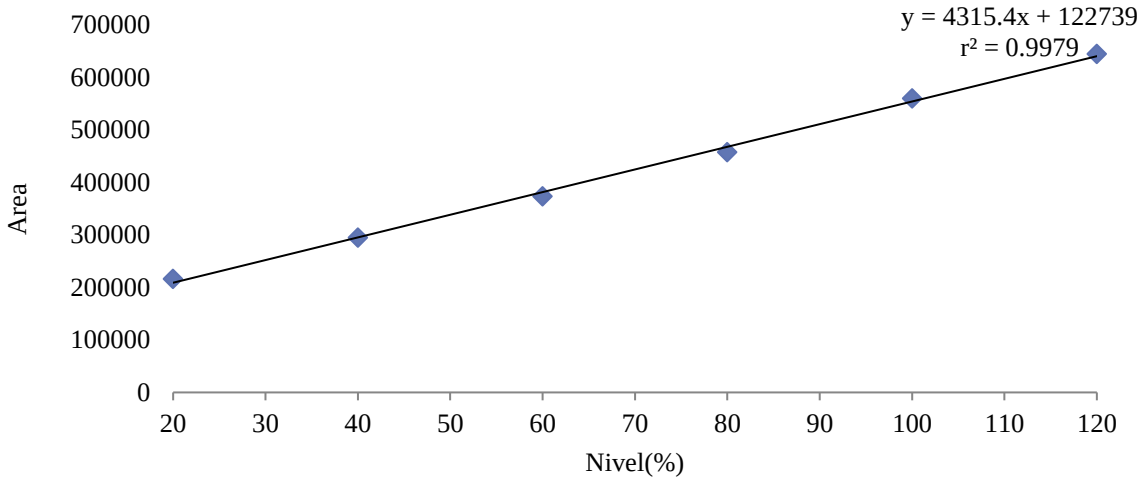


Figura 86. Linealidad CBZ

b) TMT

Tabla 38. Análisis de la linealidad TMT

.

Pendiente	b_1=	2351.7919
Ordenada al origen	b_0=	76819.733333
Desv. estándar de la pendiente	Sb_1=	51.6798
Desv. estándar de regresión	Sy/x=	7489.116
Numero de Datos	n	18

Tabla 39. Resultados Análisis de la linealidad TMT.

Parámetro		Resultado	Criterio de aceptación
Coeficiente de Determinación r^2	r^2	0.992	≥ 0.98
Intervalo de Confianza para la Pendiente	IC (β_1)	2461.3531	No debe incluir el cero
Intervalo de Confianza para la Pendiente	IC (β_0)	2242.2307	

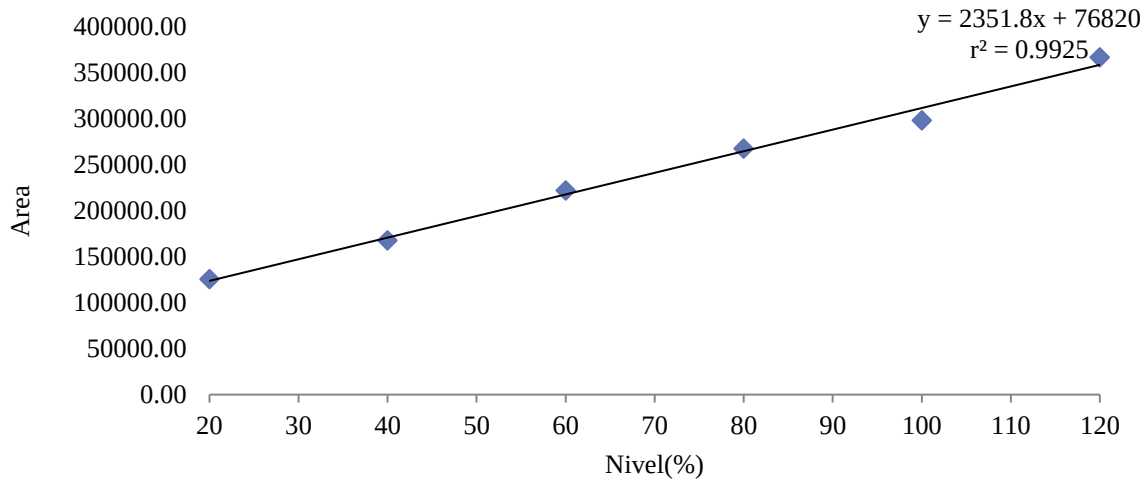


Figura 87. Linealidad TMT

c) EE2

Tabla 40. Análisis de la linealidad EE2

Pendiente	b_1=	711.2171
Ordenada al origen	b_0=	-12613.533333
Desv. estándar de la pendiente	Sb_1=	17.3222
Desv. Estándar de regresión	Sy/x=	2510.220
Numero de Datos	n	18

Tabla 41. Resultados Análisis de la linealidad EE2.

Parámetro		Resultado	Criterio de aceptación
Coeficiente de Determinación r^2	r^2	0.991	≥ 0.98
Intervalo de Confianza para la Pendiente	IC (β_1)	747.9401	No debe incluir el cero
Intervalo de Confianza para la Pendiente	IC (β_0)	674.4942	

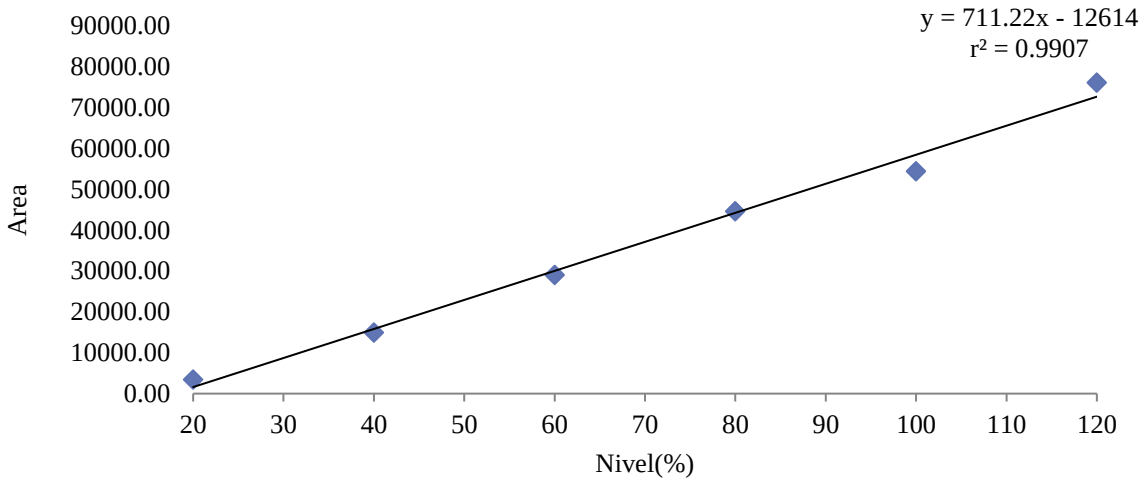


Figura 88. Linealidad EE2

Anexo 6. Límite de detección y cuantificación

Para obtener el límite de detección y cuantificación se usó el procedimiento señal-ruido, donde se observó la respuesta del analito en un intervalo de concentraciones en el cual se generó una respuesta. Para ello se prepararon soluciones concentraciones de 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 mg L^{-1}, observándose la señal-ruido de cada concentración, como se muestra en la figuras 89 -94

a) CBZ

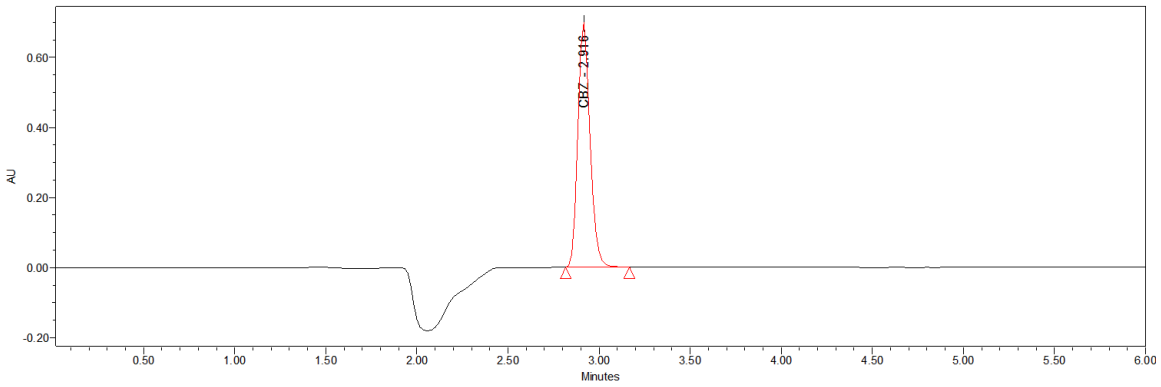


Figura 89. CBZ 100 mg L^{-1}

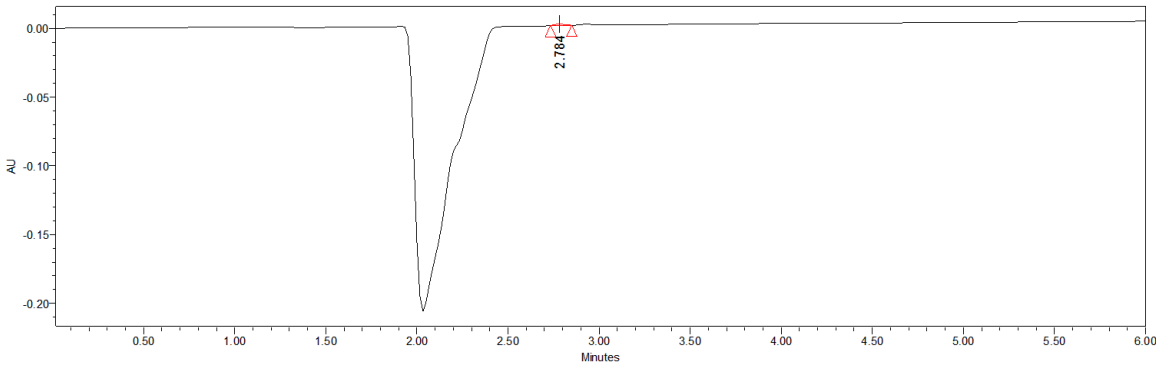


Figura 90. CBZ 0.01 mg L^{-1}

Los resultados del límite de detección y cuantificación se muestran en la Tabla 42.

Tabla 42. Resultados de límite de detección y cuantificación CBZ

concentración mg L^{-1}	Señal analítica (UA)
Blanco	1828
0.01	4562
0.10	18641
1.00	21029
10.00	577864
100.00	3226277

b) TMT

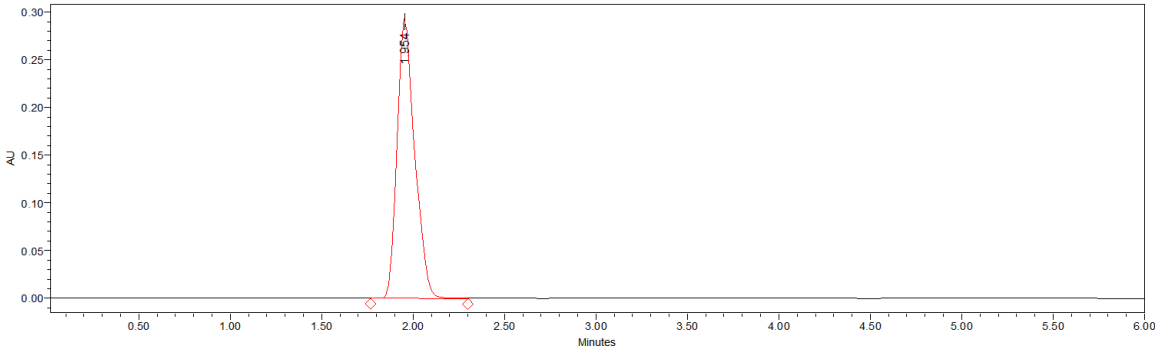


Figura 91. TMT 100 mg L^{-1}

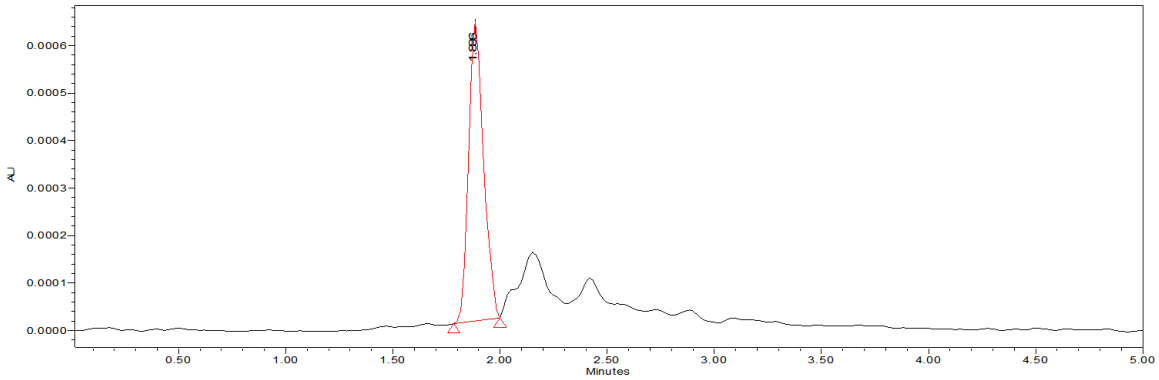


Figura 92. TMT 0.001 mg L^{-1}

Los resultados del límite de detección y cuantificación se muestran en la Tabla 43.

Tabla 43. Resultados de límite de detección y cuantificación TMT

Concentración mg L^{-1}	Señal analítica (UA)
Blanco	500
0.001	1308
0.01	2044
0.10	3835
1.00	5931
10.00	29256
100.00	292459

c) EE2

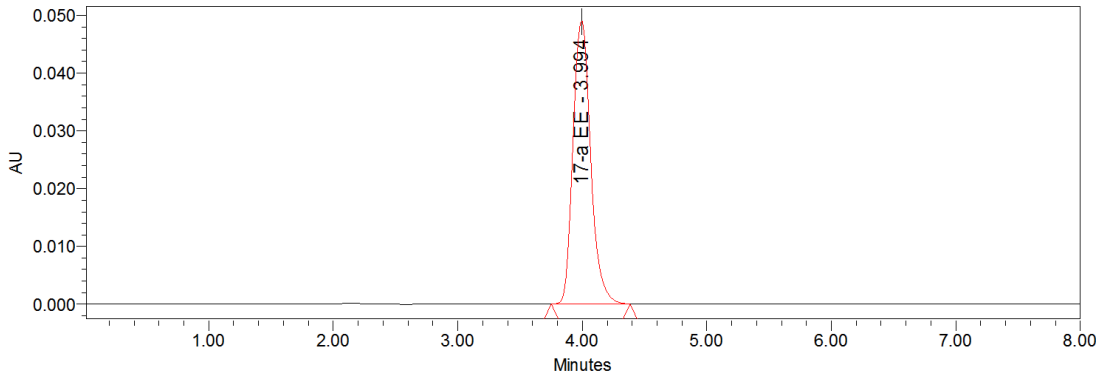


Figura 93. EE2 100 mg L^{-1}

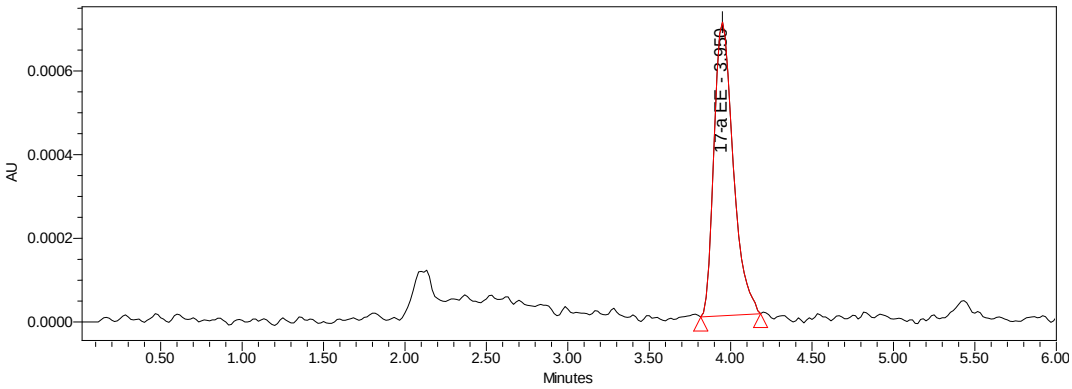


Figura 94. EE2 0.1 mg L^{-1}

Los resultados del límite de detección y cuantificación se muestran en la Tabla 44.

Tabla 44. Resultados de límite de detección y cuantificación EE2

Concentración mg L^{-1}	Señal analítica (UA)
Blanco	639
0.01	1329
0.1	2126
1	4473
10	52256
100	483178

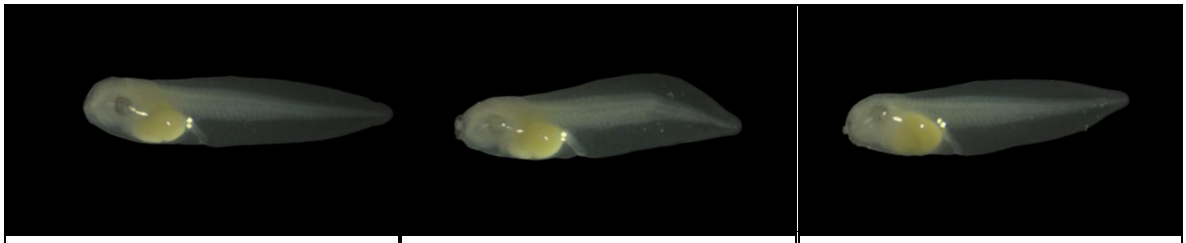
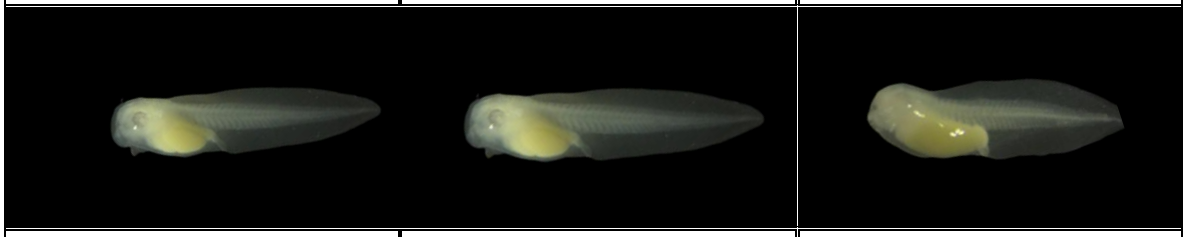
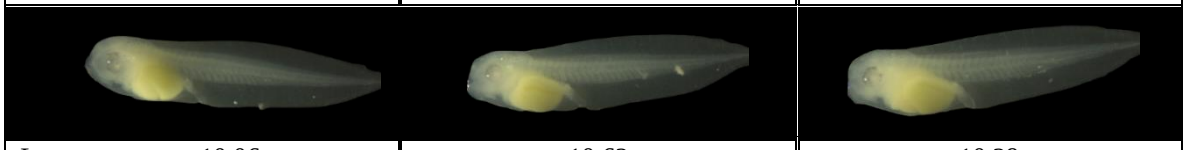
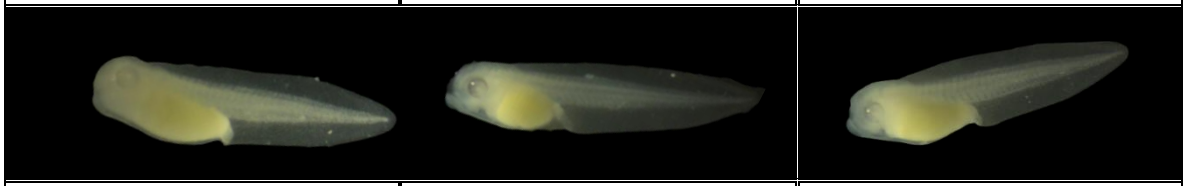
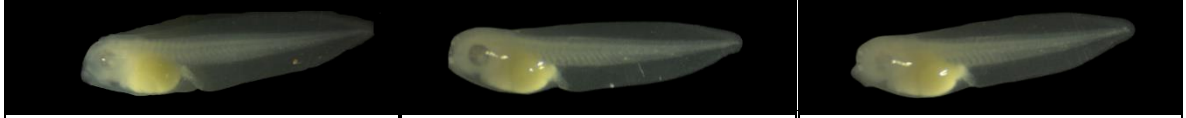
Con base a los resultados de los cromatogramas se determinó el límite de detección y cuantificación mediante el procedimiento señal-ruido, donde los valores se obtienen determinando aquella cantidad a la que el analito genere una respuesta con respecto a un blanco en una proporción de 3 a 1 para el límite de detección y una proporción 10 a 1 para el límite de cuantificación de acuerdo a la Guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México . Los resultados se indican en la Tabla 45.

Tabla 45. Resultados del límite de detección y cuantificación.

Parámetros	CBZ	TMT	EE2
Límite de detección (LD, mg L^{-1})	0.01	0.001	0.01
Límite de cuantificación (LC, mg L^{-1})	0.1	0.01	0.1

Anexo 7. Evidencia de larvas sobrevivientes a la prueba FETAX

Tabla 46**.** Longitud de embrión (L en mm) en muestras testigo

		
L:	11.83	10.61	10.93
		
L:	10.98	11.65	9.84
L:	9.84	10.72	9.44
L:	10.14	9.45	10.35
		
L:	10.06	10.62	10.29
		
L:	9.14	11.56	9.93
		
L:	10.96	9.00	9.24

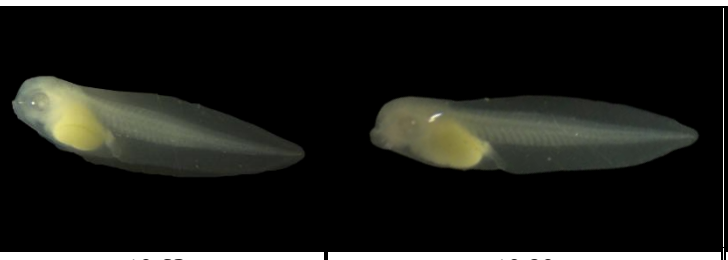
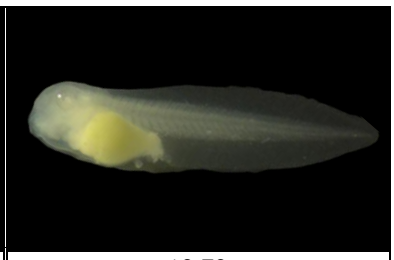
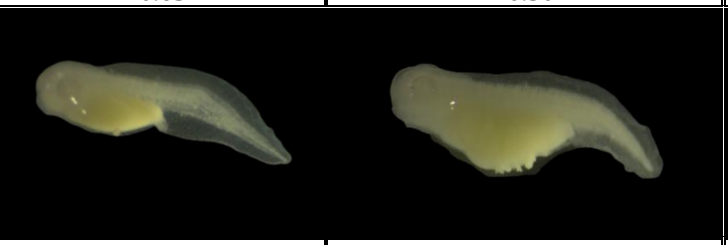
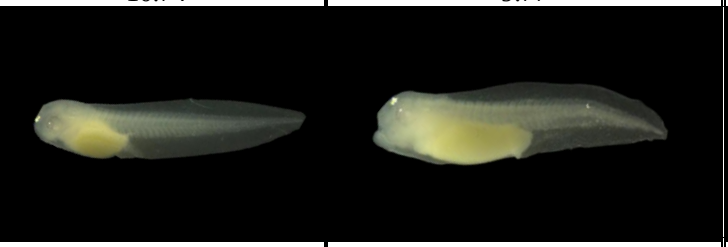
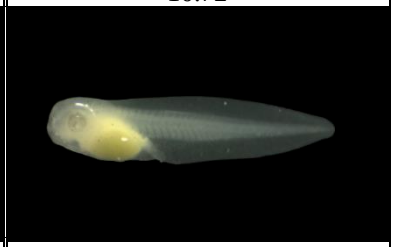
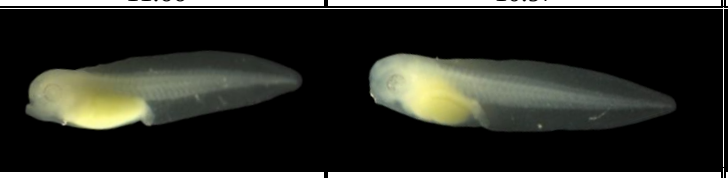
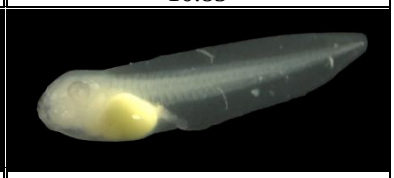
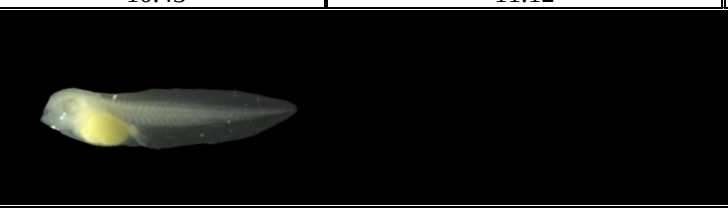
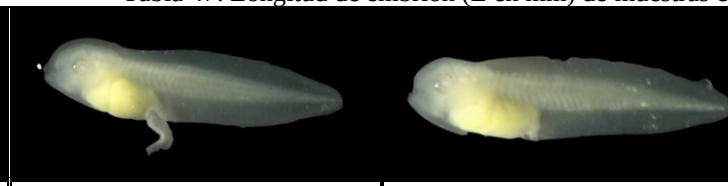
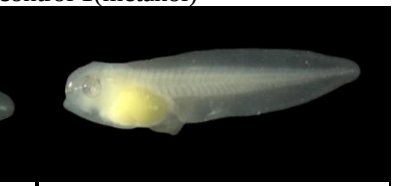
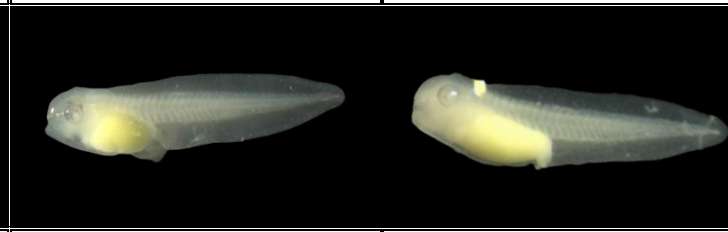
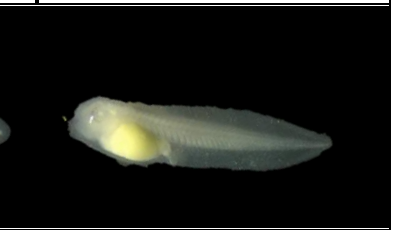
			
L:	10.63	10.90	10.70
			
L:	10.74	9.77	10.72
			
L:	11.66	10.97	10.85
			
L:	10.43	11.12	11.06
			

Tabla 47. Longitud de embrión (L en mm) de muestras control 1(metanol)

			
L:	8.85 mm	9.70 mm	9.08 mm
			
L :	8.90	9.77	10.03

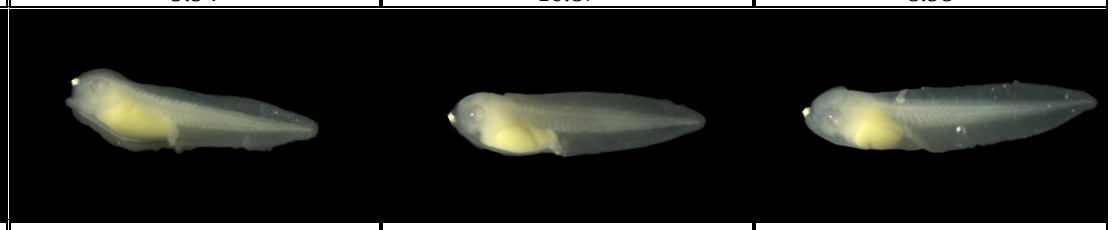
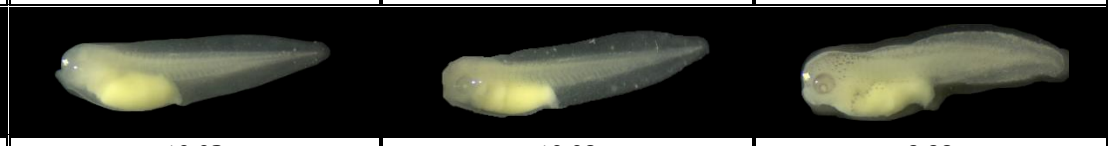
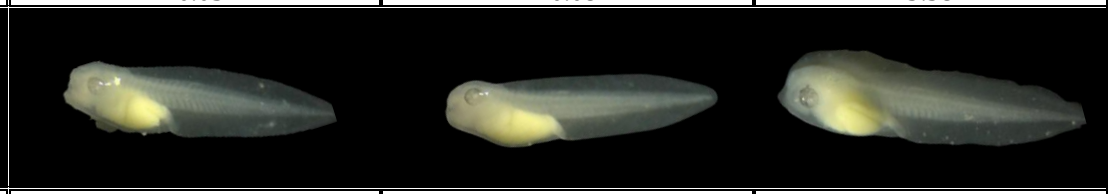
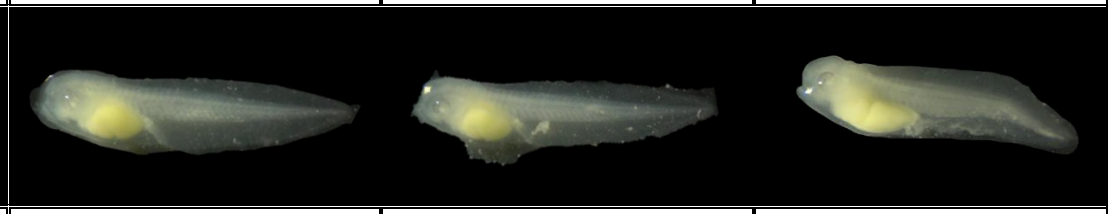
L :	9.94	10.87	8.98
			
L :	9.23	9.42	10.79
			
L :	10.03	10.08	9.98
			
L :	10.32	10.35	11.38
			
L :	11.75	11.21	10.31

Tabla 48. Longitud de embrión (L en mm) de muestras expuestas a tratamiento de CBZ+H_2O_2

L:	10.68	9.16	9.78
L:	10.60	9.76	10.83
L:	10.60	9.65	9.68

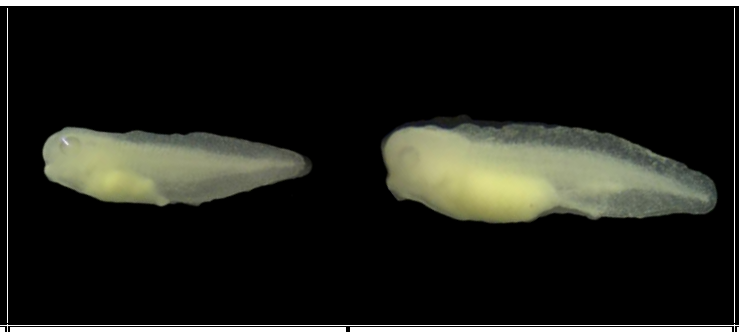
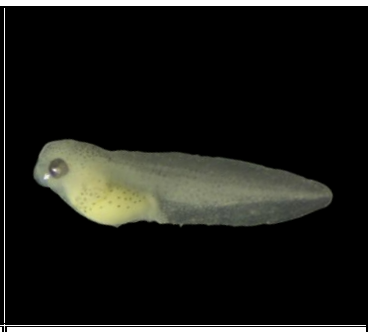
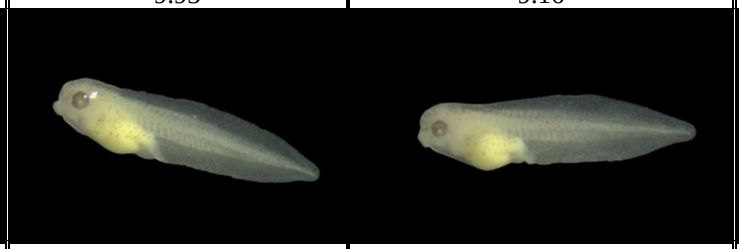
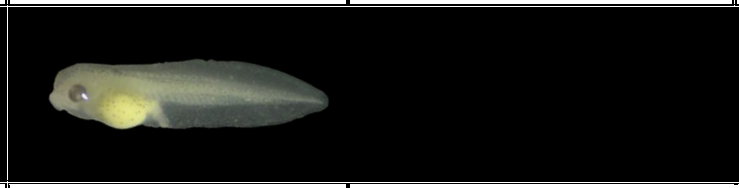
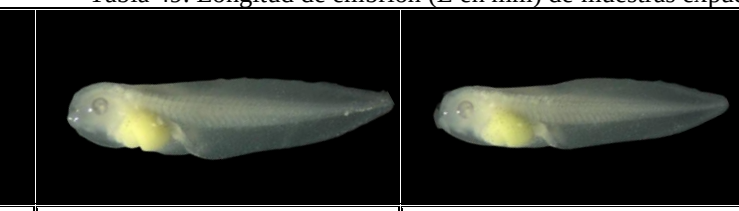
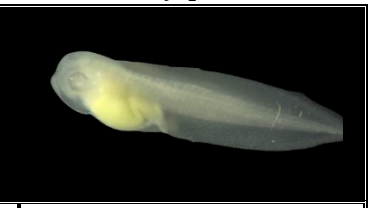
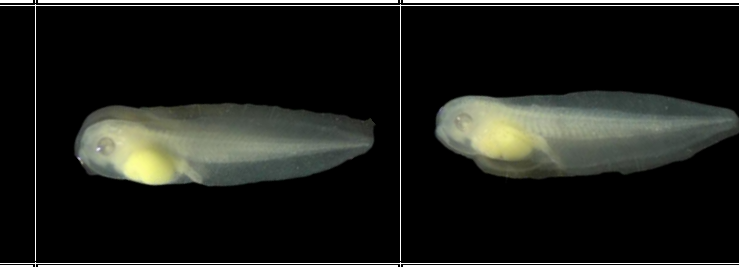
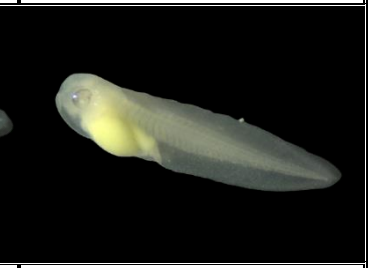
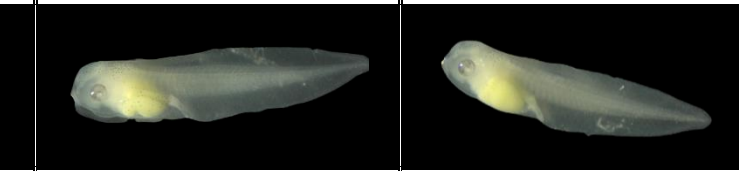
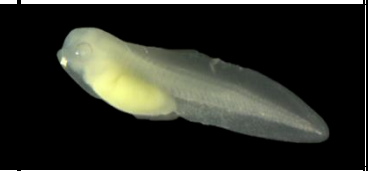
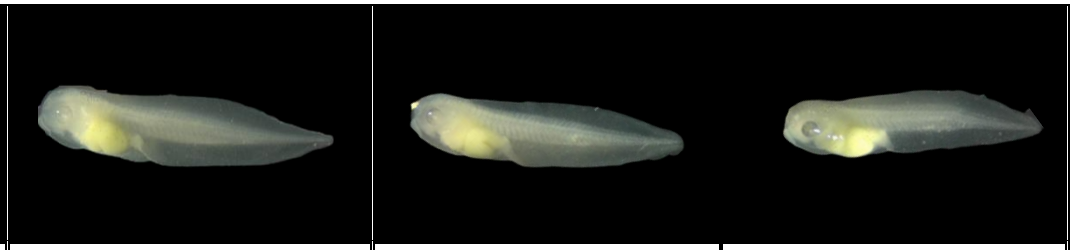
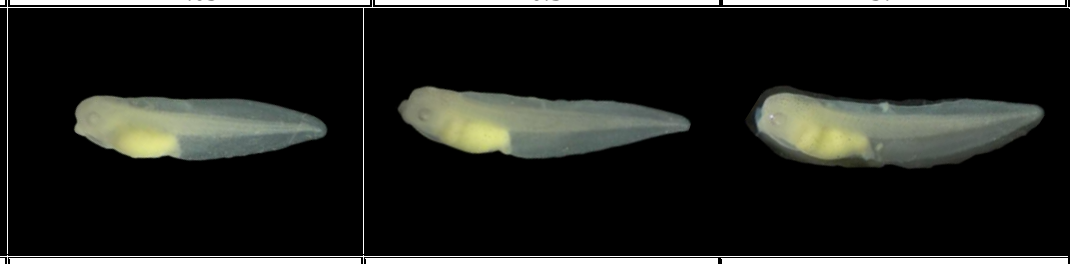
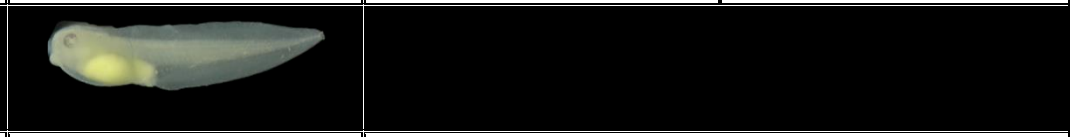
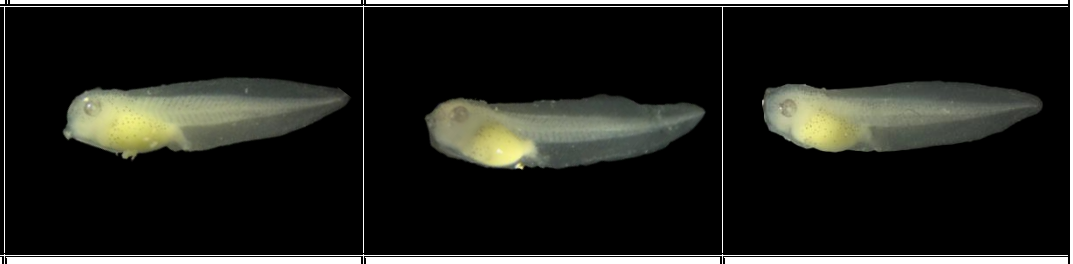
			
L:	9.93	9.16	11.30
			
L:	10.59	10.51	10.63
			
L:	10.63		

Tabla 49. Longitud de embrión (L en mm) de muestras expuestas a CBZ+T_iO_2

			
L:	12.31	10.95	10.49
			
L:	11.22	10.30	9.92
			
L:	11.22	10.29	10.61

			
L:	11.09	10.37	9.71
			
L:	9.55	10.88	10.66
			
L:	10.28		
			
L:	10.89	10.51	10.49
L:	9.87	9.62	11.23
L.	11.52	11.38	12.08

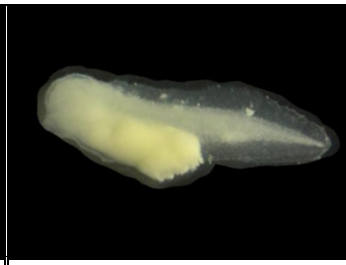
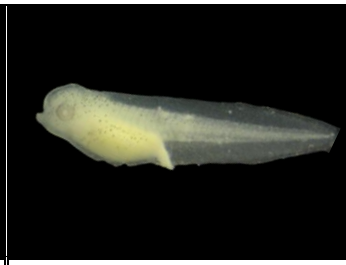
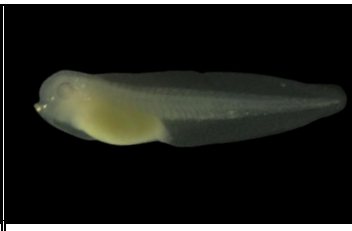
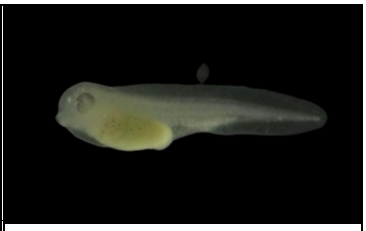
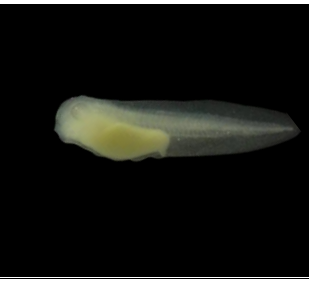
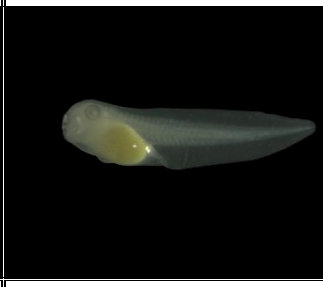
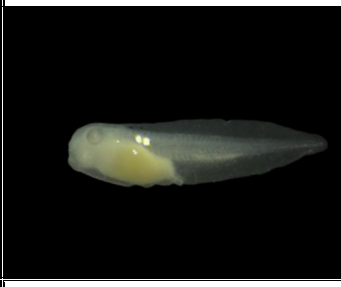
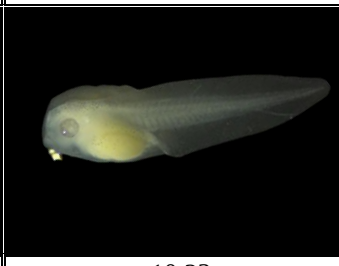
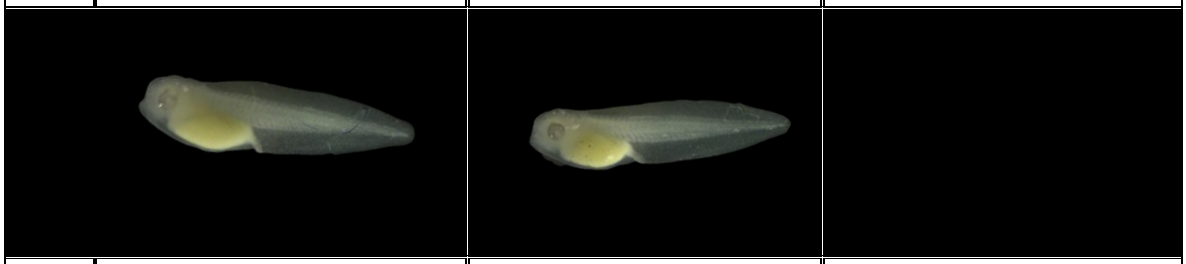
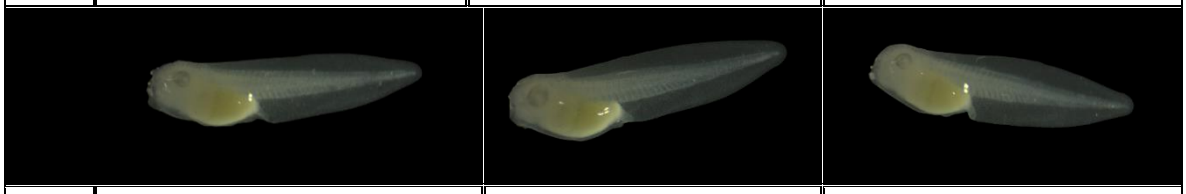
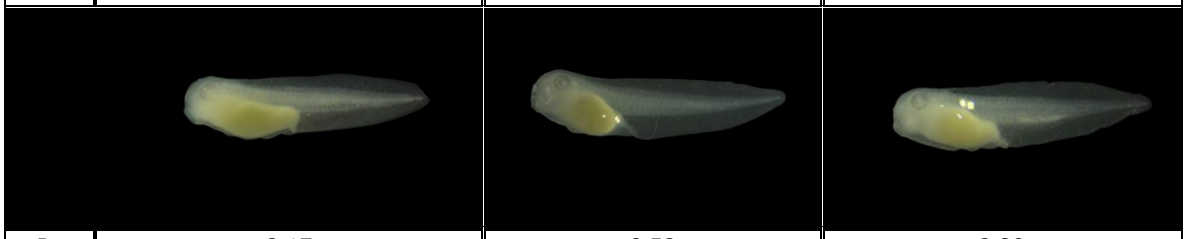
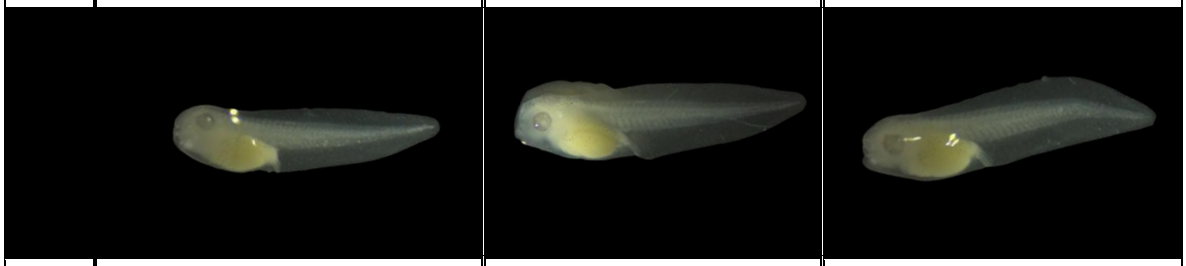
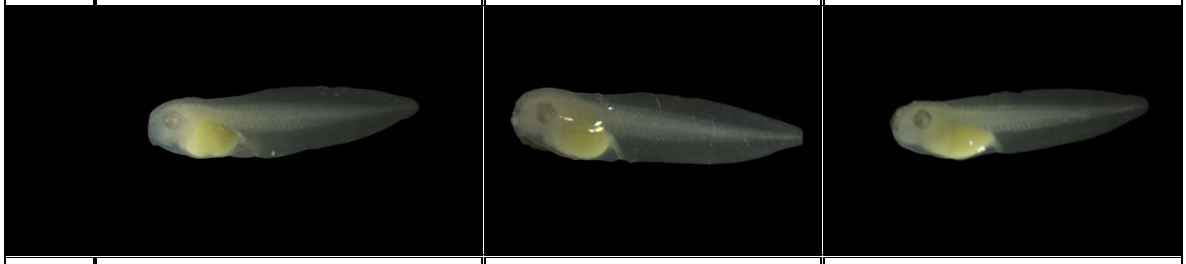
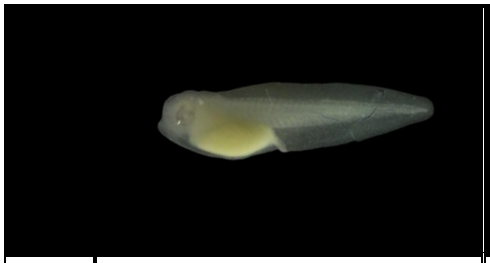
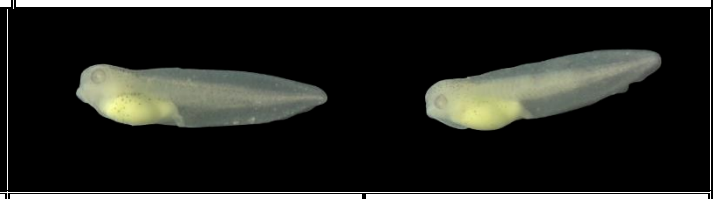
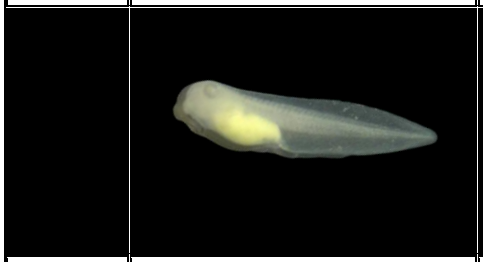
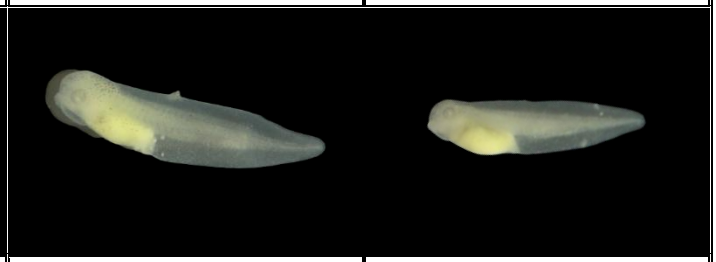
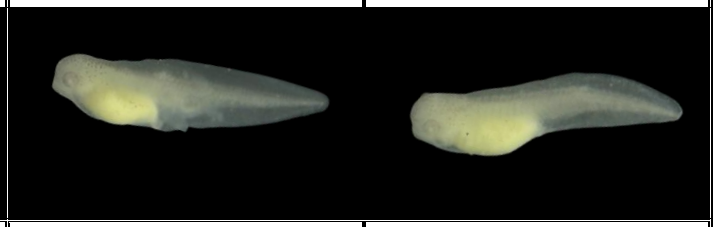
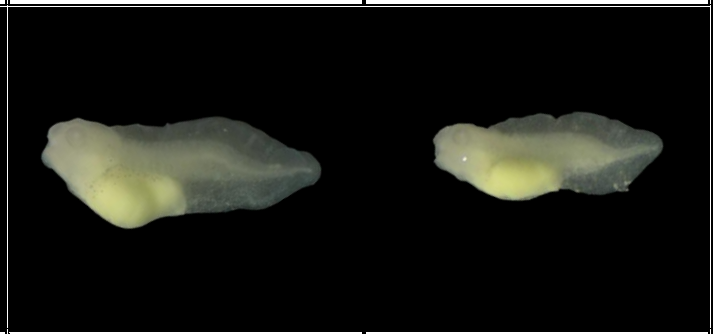
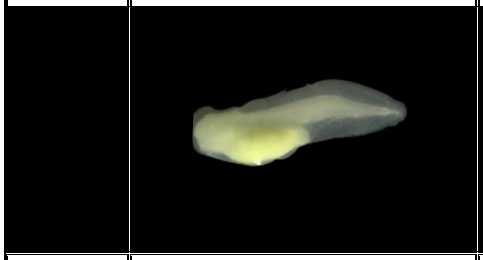
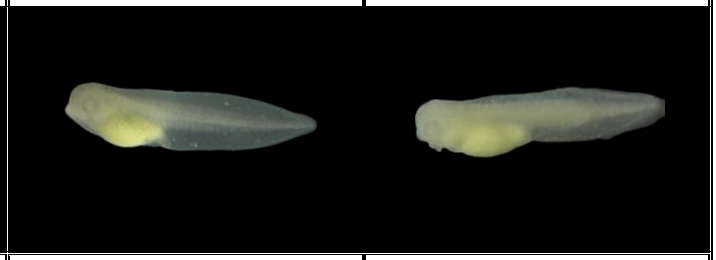
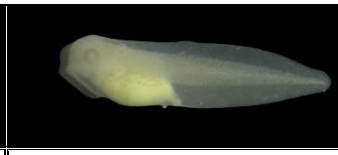
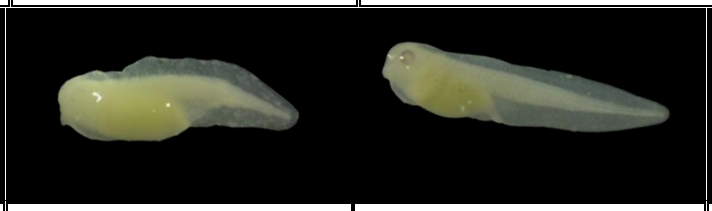
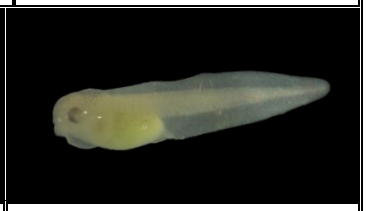
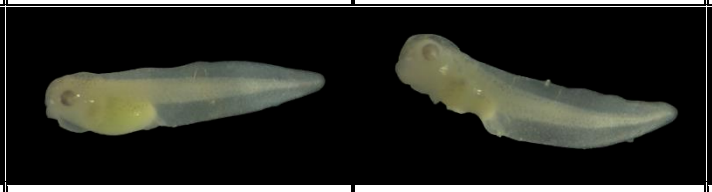
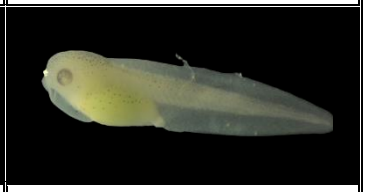
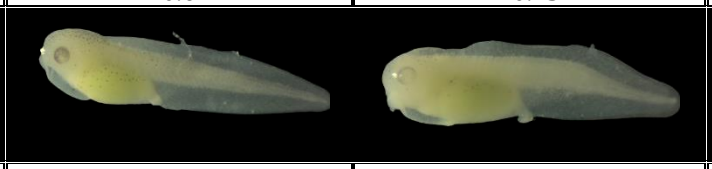
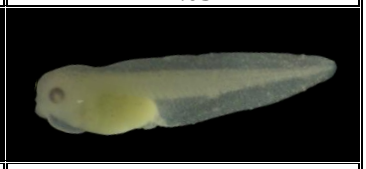
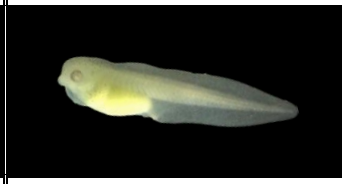
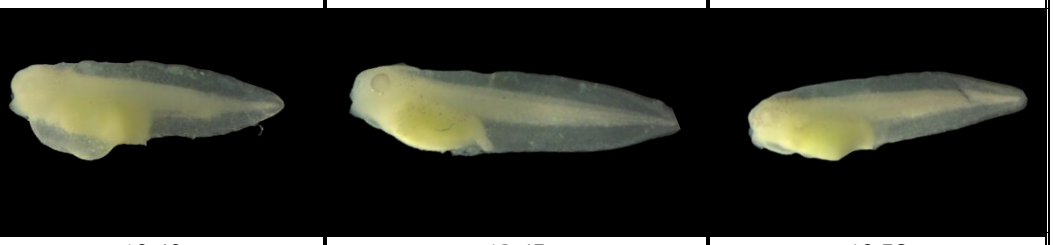
			
L:	8.67	7.98	10.36
L:	10.02	9.62	7.82

Tabla 50. Resultados muestras expuestas a tratamiento de TMT+T_iO_2

			
L:	9.56	9.16	10.72
			
L:	9.98	10.45	8.36
			
L:	10.58	10.23	10.48

L:	10.31	10.12	10.67
			
L:	10.20	11.66	
			
L:	10.23	10.70	9.90
			
L:	9.17	9.59	9.80
			
L:	10.12	11.01	11.05
			
L:	10.23	11.12	9.92
L:	11.75	10.97	10.75

			
L:	10.30	9.25	
			
L:	9.75	9.35	9.06
			
L:	9.70	8.46	8.21
			
L:	10.08	8.89	7.26
			
L:	9.46	10.39	8.67
			
L:	8.09	9.63	9.98

			
L:	7.93		
			
L:	9.20	10.97	10.63
			
	10.62	10.75	11.03
			
	11.08	11.14	11.43
			
	9.03		
L:	10.93	10.32	10.47
			
L.	10.40	12.45	10.58

Anexo 8. Análisis estadístico de crecimiento de larvas FETAX

Tabla 51. Análisis de distribución de muestra: Kolmogorov-Smirnov Test

	Normal
DPLUS	0.0427778
DMINUS	0.0636186
DN	0.0636186
P-Value	0.618035

Los resultados de las pruebas realizadas para determinar si el tamaño de la muestra indica que se puede modelar adecuadamente mediante una distribución normal.

Dado que el valor *p* entre las pruebas realizadas es mayor o igual a 0.05, no se puede rechazar la idea de que el tamaño proviene de una distribución normal con un 95% de confianza.

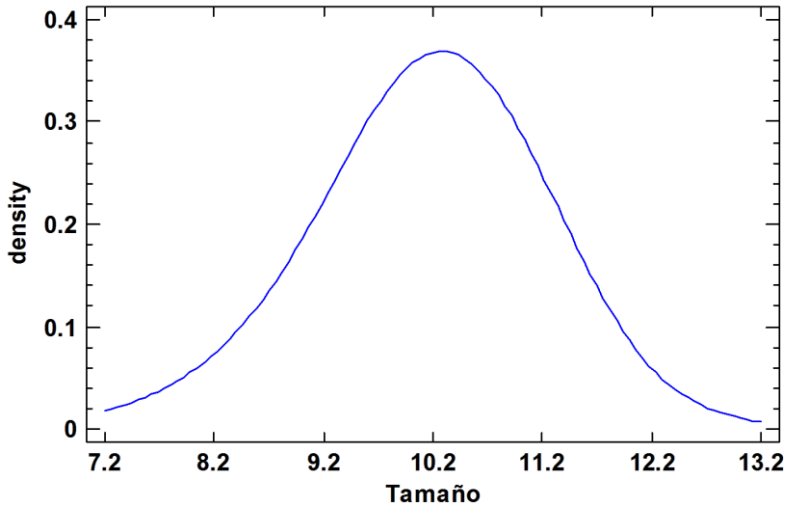


Figura 95. Distribución normal de la muestra

Tabla 52. Analisis ANOVA

Fuente de variacion	Suma de cuadrados	Df	Valor medio de los cuadrados	Razón- F	P-valor
Intergrupo	32.4452	10	3.24452	4.97	0.0000
Intragrupo	84.8578	130	0.652752		
Total (Corr.)	117.303	140			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Tamaño en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro del grupo. La razón F, que en este caso es igual a 4.97052, es una razón entre la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Dado que el valor P de la prueba F es inferior a 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre el Tamaño medio de un nivel de EXPOSICIÓN a otro al nivel de significación del 5 %.

Tabla 53. Test LSD (Least significant difference) de Fisher 95.0 %

Grupos de comparación	Sig.	Diferencia	+/- Limites
Control - MetOH	*	0.62	0.565119
Control - CBZ H_2O_2		0.15	0.565119
Control - CBZ TiO_2 10		-0.338542	0.610398
Control - CBZ TiO_2 20		0.025625	0.893531
Control - CBZ TiO_2 80		0.230792	0.57446
Control - TMT TiO_2 10		0.190982	0.584954
Control - TMT TiO_2 20		-0.045	0.565119
Control - TMT TiO_2 40	*	1.31125	0.565119
Control - TMT TiO_2 60		-0.219875	0.644335
Control - TMT TiO_2 80		-0.490208	0.765175
MetOH - CBZ H_2O_2		-0.47	0.565119
MetOH - CBZ TiO_2 10	*	-0.958542	0.610398
MetOH - CBZ TiO_2 20		-0.594375	0.893531
MetOH - CBZ TiO_2 80g		-0.389208	0.57446
MetOH - TMT TiO_2 10		-0.429018	0.584954
MetOH - TMT TiO_2 20	*	-0.665	0.565119
MetOH - TMT TiO_2 40	*	0.69125	0.565119
MetOH - TMT TiO_2 60	*	-0.839875	0.644335
MetOH - TMT TiO_2 80	*	-1.11021	0.765175
CBZ H_2O_2 - CBZ TiO_2 10		-0.488542	0.610398
CBZ H_2O_2 - CBZ TiO_2 20		-0.124375	0.893531
CBZ H_2O_2 - CBZ TiO_2 80		0.0807917	0.57446
CBZ H_2O_2 - TMT TiO_2 10		0.0409821	0.584954
CBZ H_2O_2 - TMT TiO_2 20		-0.195	0.565119
CBZ H_2O_2 - TMT TiO_2 40	*	1.16125	0.565119
CBZ H_2O_2 - TMT TiO_2 60		-0.369875	0.644335
CBZ H_2O_2 - TMT TiO_2 80		-0.640208	0.765175
CBZ TiO_2 10 - CBZ TiO_2 20		0.364167	0.922835
CBZ TiO_2 10 - CBZ TiO_2 80		0.569333	0.619057
CBZ TiO_2 10 - TMT TiO_2 10		0.529524	0.628806

Grupos de comparación	Sig.	Diferencia	+/- Limites
CBZ TiO_2 10 - TMT TiO_2 20		0.293542	0.610398
CBZ TiO_2 10 - TMT TiO_2 40	*	1.64979	0.610398
CBZ TiO_2 10 - TMT TiO_2 60		0.118667	0.684393
CBZ TiO_2 10 - TMT TiO_2 80		-0.151667	0.799199
CBZ TiO_2 20 - CBZ TiO_2 80		0.205167	0.899469
CBZ TiO_2 20 - TMT TiO_2 10		0.165357	0.906206
CBZ TiO_2 20 - TMT TiO_2 20		-0.070625	0.893531
CBZ TiO_2 20 - TMT TiO_2 40	*	1.28562	0.893531
CBZ TiO_2 20 - TMT TiO_2 60		-0.2455	0.945625
CBZ TiO_2 20 - TMT TiO_2 80		-0.515833	1.03176
CBZ TiO_2 80 - TMT TiO_2 10		-0.0398095	0.593983
CBZ TiO_2 80 - TMT TiO_2 20		-0.275792	0.57446
CBZ TiO_2 80 - TMT TiO_2 40	*	1.08046	0.57446
CBZ TiO_2 80 - TMT TiO_2 60		-0.450667	0.652543
CBZ TiO_2 80 - TMT TiO_2 80		-0.721	0.772099
TMT TiO_2 10 - TMT TiO_2 20		-0.235982	0.584954
TMT TiO_2 10 - TMT TiO_2 40	*	1.12027	0.584954
TMT TiO_2 10 - TMT TiO_2 60		-0.410857	0.661799
TMT TiO_2 10 - TMT TiO_2 80		-0.68119	0.779938
TMT TiO_2 20 - TMT TiO_2 40	*	1.35625	0.565119
TMT TiO_2 20 - TMT TiO_2 60		-0.174875	0.644335
TMT TiO_2 20 - TMT TiO_2 80		-0.445208	0.765175
TMT TiO_2 40 - TMT TiO_2 60	*	-1.53112	0.644335
TMT TiO_2 40 - TMT TiO_2 80	*	-1.80146	0.765175
TMT TiO_2 60 - TMT TiO_2 80		-0.270333	0.825409

* denota una diferencia estadística significativa

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 15 pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95.0 %. El método que se utiliza para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método, existe un riesgo del 5.0 % de llamar a cada par de medias significativamente diferente cuando la diferencia real es igual a 0.

8. Referencias

1. Alaani, H., Hashem, S. and Karabet, F. (no date) 'Photocatalytic (UV-A/TiO2) and photolytic (UV-A) degradation of steroid hormones: Ethinyl Estradiol, Levonorgestrel, and Progesterone'.
2. Albert, L. A. (1985) 'Curso básico de toxicología ambiental'.
3. Alharbi, S. K. *et al.* (2017) 'Photolysis and UV/H2O2of diclofenac, sulfamethoxazole, carbamazepine, and trimethoprim: Identification of their major degradation products by ESI–LC–MS and assessment of the toxicity of reaction mixtures', *Process Safety and Environmental Protection*, 112, pp. 222–234. doi: 10.1016/j.psep.2017.07.015.
4. Ali, F. *et al.* (2018) 'Carbamazepine degradation by UV and UV-assisted AOPs: Kinetics, mechanism and toxicity investigations', *Process Safety and Environmental Protection*, 117, pp. 307–314. doi: 10.1016/j.psep.2018.05.004.
5. Alrashood, S. T. (2016) 'Chapter Three – Carbamazepine', *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 41, pp. 133–321. doi: 10.1016/bs.podrm.2015.11.001.
6. Amor, C. *et al.* (2019) 'Application of advanced oxidation processes for the treatment of recalcitrant agro-industrial wastewater: A review', *Water (Switzerland)*, 11(2). doi: 10.3390/w11020205.
7. Andreozzi, R. *et al.* (2002) 'Carbamazepine in water: Persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity', *Water Research*, 36(11), pp. 2869–2877. doi: 10.1016/S0043-1354(01)00500-0.
8. Anquandah, G. A. K. *et al.* (2011) 'Oxidation of trimethoprim by ferrate(VI): Kinetics, products, and antibacterial activity', *Environmental Science and Technology*, 45(24), pp. 10575–10581. doi: 10.1021/es202237g.
9. Arvaniti, O. S. *et al.* (2020) 'Sonochemical degradation of trimethoprim in water matrices: Effect of operating conditions, identification of transformation products and toxicity assessment', *Ultrasonics Sonochemistry*, 67(March), p. 105139. doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105139.
10. Augugliaro, V. *et al.* (2012) 'Overview on oxidation mechanisms of organic compounds by TiO2 in heterogeneous photocatalysis', *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 13(3), pp. 224–245. doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2012.04.003.
11. aus der Beek, T. *et al.* (2016) 'Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), pp. 823–835. doi: 10.1002/etc.3339.
12. BIO Intelligence Service (2013) 'Study on the environmental risks of medicinal products, Final Report prepared for Executive Agency for Health and Consumers', (December), p. 310.
13. Boğa, A., Binokay, S. and Sertdemir, Y. (2009) 'Gibberellik asit'in (GA3) toksisite ve teratojenitesinin kurbağa embriyo teratogenezis testi (FETAX) kullanilarak değerlendirilmesi', *Turkish Journal of Biology*, 33(3), pp. 181–188. doi: 10.3906/biy-0807-30.
14. Center for Disease Dynamics Economics & Policy (2015) 'The State of the world's antibiotics 2015', *Centre for Disease Dynamics, Economics & Policy, CDDEP: Washington, D.C*, pp. 1–84. doi:

10.1016/S1473-3099(13)70318-9.

15. Dai, C. M. *et al.* (2012) 'Comparative study of the degradation of carbamazepine in water by advanced oxidation processes', *Environmental Technology (United Kingdom)*, 33(10), pp. 1101–1109. doi: 10.1080/09593330.2011.610359.
16. DELSAN ingenieros (2019) *No Title*.
17. Desrosiers, M. and Assessment, R. (2014) 'A review of what is an emerging contaminant', *Chemistry Central Journal*, 8(15), pp. 1–7. doi: 10.1186/1752-153X-8-15.
18. Donner, E. *et al.* (2013a) 'Ecotoxicity of carbamazepine and its UV photolysis transformation products', *Science of the Total Environment*, 443, pp. 870–876. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.059.
19. Donner, E. *et al.* (2013b) 'Ecotoxicity of carbamazepine and its UV photolysis transformation products', *Science of the Total Environment*, 443, pp. 870–876. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.059.
20. Drug Bank (2005) *drug Bnk*.
21. Drug Bank (no date) *Drug Bank*.
22. Ferguson R., Lynnete; Denny A., W. (1991) 'The genetic toxicology of acridines', *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 258(3), pp. 123–160. doi: 10.1016/0165-1110(94)90003-5.
23. Ferrari, B. *et al.* (2003) 'Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(3), pp. 359–370. doi: 10.1016/S0147-6513(02)00082-9.
24. Frank-Andreas Weber, A. *et al.* (2014) 'Fármacos en el medio ambiente – la perspectiva global'. Available at: www.umweltbundesamt.de.
25. Franz, S. *et al.* (2020) 'Degradation of carbamazepine by photo(Electro)catalysis on nanostructured TiO2 meshes: Transformation products and reaction pathways', *Catalysts*, 10(2). doi: 10.3390/catal10020169.
26. Gad, S. C. (2011) 'Drug Safety Evaluation', *Drug Safety Evaluation*, 1641. doi: 10.1002/9780470464151.
27. Georgaki, I., Vasilaki, E. and Katsarakis, N. (2014) 'A Study on the Degradation of Carbamazepine and Ibuprofen by TiO₂ & ZnO Photocatalysis upon UV/Visible-Light Irradiation', *American Journal of Analytical Chemistry*, 05(08), pp. 518–534. doi: 10.4236/ajac.2014.58060.
28. Griesbeck, A. *et al.* (2012) 'Photostability of Drugs and Drug Products', *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology, Third Edition - Two Volume Set*, 2016, pp. 1003–1028. doi: 10.1201/b12252-41.
29. Guo, Y., Qi, P. S. and Liu, Y. Z. (2017) 'A Review on Advanced Treatment of Pharmaceutical Wastewater', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 63(1). doi: 10.1088/1755-1315/63/1/012025.
30. Hai, F. I. *et al.* (2018) 'Carbamazepine as a Possible Anthropogenic Marker in Water: Occurrences, Toxicological Effects, Regulations and Removal by Wastewater Treatment Technologies', *Water (Switzerland)*, 10(2), pp. 1–32. doi: 10.3390/w10020107.
31. Hashim, N., Natarajan, P. and Ray, A. K. (2014) 'Intrinsic Kinetic Study for Photocatalytic Degradation of Diclofenac under UV and Visible Light', *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(49), pp. 18637–18646. doi: 10.1021/ie404355k.

32. Hernández, D. *et al.* (2018) 'Synthetic clay mineral as nanocarrier of sulfamethoxazole and trimethoprim', *Applied Clay Science*, 161(March), pp. 395–403. doi: 10.1016/j.clay.2018.03.016.
33. Hernández Enríquez, J. M. *et al.* (2011) 'Síntesis, caracterización y actividad fotocatalítica de óxido de titanio modificado con nitrógeno', *Boletin de la Sociedad Espanola de Ceramica y Vidrio*, 50(5), pp. 245–252. doi: 10.3989/cyv.322011.
34. Hu, L. *et al.* (2015) 'Use of the enhanced frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX) to determine chemically-induced phenotypic effects', *Science of the Total Environment*, 508, pp. 258–265. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.11.086.
35. Im, J.-K. *et al.* (2012) 'Carbamazepine Degradation by Photolysis and Titanium Dioxide Photocatalysis', *Water Environment Research*, 84(7), pp. 554–561. doi: 10.2175/106143012x13373550427273.
36. Jeong, Y. *et al.* (2016) 'Differential Effects of CBZ-Induced Catalysis and Cytochrome Gene Expression in Three Dimensional Zebrafish Liver Cell Culture', *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 6(5). doi: 10.4172/2161-0525.1000404.
37. Jewell, K. S. *et al.* (2016) 'New insights into the transformation of trimethoprim during biological wastewater treatment', *Water Research*, 88, pp. 550–557. doi: 10.1016/j.watres.2015.10.026.
38. Jiménez, C. (2011) 'Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: Productos farmacéuticos', *Revista Lasallista de Investigacion*, 8(2), pp. 143–153. doi: 10.1109/TGRS.2011.2120615.
39. Jos, A. *et al.* (2003) 'Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints', *Toxicology in Vitro*, 17(5–6), pp. 525–532. doi: 10.1016/S0887-2333(03)00119-X.
40. Jurgens, M. D. *et al.* (2002) 'The potential for estradiol and ethyinylestradiol degradation in English Rivers', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(3), pp. 480–488. doi: 10.1002/etc.5620210302.
41. Kent, J. and Tay, J. H. (2019) 'Treatment of 17α-ethinylestradiol, 4-nonylphenol, and carbamazepine in wastewater using an aerobic granular sludge sequencing batch reactor', *Science of the Total Environment*, 652, pp. 1270–1278. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.301.
42. Kim, H. Y., Kim, T. H. and Yu, S. (2015) 'Photolytic degradation of sulfamethoxazole and trimethoprim using UV-A, UV-C and vacuum-UV (VUV)', *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 50(3), pp. 292–300. doi: 10.1080/10934529.2015.981118.
43. Kosjek, T. and Heath, E. (2008) 'Applications of mass spectrometry to identifying pharmaceutical transformation products in water treatment', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(10), pp. 807–820. doi: 10.1016/j.trac.2008.08.014.
44. Krstić, M. *et al.* (2015) 'Influence of solid drug delivery system formulation on poorly water-soluble drug dissolution and permeability', *Molecules*, 20(8), pp. 14684–14698. doi: 10.3390/molecules200814684.
45. Kudlek, E. (2018) 'Decomposition of contaminants of emerging concern in advanced oxidation processes', *Water (Switzerland)*, 10(7). doi: 10.3390/w10070955.
46. Kumar, K. V., Porkodi, K. and Rocha, F. (2008) 'Langmuir-Hinshelwood kinetics - A theoretical study', *Catalysis Communications*, 9(1), pp. 82–84. doi: 10.1016/j.catcom.2007.05.019.
47. Leclercq, M. *et al.* (2009) 'Presence and fate of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites at wastewater treatment plants', *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*,

56(3), pp. 408–415. doi: 10.1007/s00244-008-9202-x.

48. Levenspiel, O. (1999) *Chemical reaction engineering*. Third. Edited by Wayne Anderson. New York: Wiley.
49. Liu, Q. *et al.* (2017) 'The removal of trimethoprim and sulfamethoxazole by a high infiltration rate artificial composite soil treatment system', *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 11(2), p. 12. doi: 10.1007/s11783-017-0920-z.
50. Loera, M. A. De *et al.* (2016) 'Ecofarmacovigilancia', 47(1), pp. 12–16.
51. Ma, X. *et al.* (2015) 'Simultaneous degradation of estrone, 17β-estradiol and 17α-ethinyl estradiol in an aqueous UV/H2o2system', *International Journal of Environmental Research and Public Health*. doi: 10.3390/ijerph121012016.
52. Magureanu, M. *et al.* (2015) 'Removal of the pharmaceutical diclofenac by pulsed corona discharge', pp. 1–4.
53. Manius, G. J. (1978) 'TRIMETHOPRIM'.
54. Maroneze, M. M. *et al.* (2014) 'A tecnologia de remoção de fósforo: Gerenciamento do elemento em resíduos industriais', *Revista Ambiente e Agua*, 9(3), pp. 445–458. doi: 10.4136/1980-993X.
55. Martínez, C. *et al.* (2011) 'Kinetics and mechanism of aqueous degradation of carbamazepine by heterogeneous photocatalysis using nanocrystalline TiO2, ZnO and multi-walled carbon nanotubes-anatase composites', *Applied Catalysis B: Environmental*, 102(3–4), pp. 563–571. doi: 10.1016/j.apcatb.2010.12.039.
56. Micevych, P. E. *et al.* (2007) 'Estradiol stimulates progesterone synthesis in hypothalamic astrocyte cultures', *Endocrinology*, 148(2), pp. 782–789. doi: 10.1210/en.2006-0774.
57. Moreira, J. *et al.* (2010) 'Evaluation of Photon Absorption in an Aqueous TiO_2 Slurry Reactor Using Monte Carlo Simulations and Macroscopic Balance', *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(21), pp. 10524–10534. doi: 10.1021/ie100374f.
58. Na, T. W. *et al.* (2019) 'Distribution and ecological risk of pharmaceuticals in surface water of the Yeongsan river, Republic of Korea', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 181(January), pp. 180–186. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.06.004.
59. Nasim, A. and Brychcy, T. (1979) 'Genetic effects of acridine compounds', *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 65(4), pp. 261–288. doi: 10.1016/0165-1110(79)90005-8.
60. Negrón-Encarnación, I. and Arce, R. (2007) 'Light-induced transformations of aza-aromatic pollutants adsorbed on models of atmospheric particulate matter: Acridine and 9(10-H) acridone', *Atmospheric Environment*, 41(32), pp. 6771–6783. doi: 10.1016/j.atmosenv.2007.04.062.
61. Oldenkamp, R., Beusen, A. H. W. and Huijbregts, M. A. J. (2019) 'Aquatic risks from human pharmaceuticals—modelling temporal trends of carbamazepine and ciprofloxacin at the global scale', *Environmental Research Letters*, 14(3), p. 034003. doi: 10.1088/1748-9326/ab0071.
62. Olmez-Hanci, T., Arslan-Alaton, I. and Dursun, D. (2014) 'Investigation of the toxicity of common oxidants used in advanced oxidation processes and their quenching agents', *Journal of Hazardous Materials*, 278, pp. 330–335. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.06.021.
63. Orepesa, A. L. (2008) 'Disruptores endocrinos en el medio ambiente: Caso del 17 - α - etinil-estradiol',

Observatorio Ambiental, 11, pp. 63–76. doi: 10.5209/REV_OBMD.2008.V11.22427.

64. Pereira, V. J. *et al.* (2007) 'UV degradation kinetics and modeling of pharmaceutical compounds in laboratory grade and surface water via direct and indirect photolysis at 254 nm', *Environmental Science and Technology*. doi: 10.1021/es061491b.
65. *PubChem Compound Database* (no date). Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/trimethoprim#section=Top (Accessed: 1 January 2017).
66. Ran, Z. *et al.* (2020) 'Photocatalytic Oxidative Degradation of', *Catalysts*, 10(540), p. 13. doi: 10.3390/catal1005054.
67. Rasool Hassan, B. A. (2012) 'HPLC Uses and Importance in the Pharmaceutical Analysis and Industrial Field', *Pharmaceutica Analytica Acta*, 03(09), p. 4172. doi: 10.4172/2153-2435.1000e133.
68. Samy, M. *et al.* (2020) 'Photocatalytic degradation of trimethoprim using S-TiO2 and Ru/WO3/ZrO2 immobilized on reusable fixed plates', *Journal of Water Process Engineering*, 33(September 2019), pp. 3–10. doi: 10.1016/j.jwpe.2019.101023.
69. Sauer, T. *et al.* (2002) 'Kinetics of photocatalytic degradation of reactive dyes in a TiO2 slurry reactor', *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 149(1–3), pp. 147–154. doi: 10.1016/S1010-6030(02)00015-1.
70. Scott Fogler, H. (2002) *Elements of chemical reaction engineering*. Third, *Chemical Engineering Science*. Third. New Jersey: Prentice Hall Inc. doi: 10.1016/0009-2509(87)80130-6.
71. Shinohara, R. *et al.* (1983) 'Determination of trace azaarenes in water by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry', *Journal of Chromatography A*, 256(C), pp. 81–91. doi: 10.1016/S0021-9673(01)88214-5.
72. Sirtori, C. *et al.* (2010) 'Effect of water-matrix composition on Trimethoprim solar photodegradation kinetics and pathways', *Water Research*, 44(9), pp. 2735–2744. doi: 10.1016/j.watres.2010.02.006.
73. Southworth, G. R., Parkhurst, B. R. and Beauchamp, J. J. (1979) 'Accumulation of acridine from water, food, and sediment by the fathead minnow, Pimephales promelas', *Water, Air, and Soil Pollution*, 12(3), pp. 331–341. doi: 10.1007/BF01047020.
74. Straub, J. (2013) 'An Environmental Risk Assessment for Human-Use Trimethoprim in European Surface Waters', *Antibiotics*, 2(1), pp. 115–162. doi: 10.3390/antibiotics2010115.
75. Synthesis, I. (no date) 'Homogeneous Reactions and Catalysis', 111, pp. 1–5.
76. Tejada, C., Quiñones, E. and Peña, M. (2014) 'Contaminantes Emergentes En Aguas: Metabolitos De Fármacos', *Universidad Militar Nueva Granada*, pp. 1–48. doi: 10.18359/rfcb.341.
77. Tønnesen, H. H. (2004) *Photostability of Drugs and Drug Formulations, Second Edition*, *Photostability of Drugs and Drug Formulations, Second Edition*. doi: 10.1201/9781420023596.
78. Transfer, M. (2014) 'Hererogeneous and Homogeneous Chemical reactions Overview : Chemical reactions', pp. 1–23.
79. Valavanidis, A. and Vlachogianni, T. (2015) 'Ecotoxicity Test Methods and Ecological Risk Assessment . Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology Tests under the Guidelines of International Organizations', *Science Advances on Environmental Chemistry, Toxicology and Ecotoxicology Issues*, (September), p. 28.
80. Vogna, D. *et al.* (2004) 'Kinetic and chemical assessment of the UV/H2O2 treatment of antiepileptic drug

carbamazepine', *Chemosphere*, 54(4), pp. 497–505. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00757-4.

81. Wang, J. and Hu, X. (2014) 'Ecopharmacovigilance: Current state, challenges, and opportunities in China', *Indian Journal of Pharmacology*, 46(1), p. 13. doi: 10.4103/0253-7613.125158.
82. Wang, Q. *et al.* (2019) 'Study of the degradation of trimethoprim using photo-Fenton oxidation technology', *Water (Switzerland)*, 11(2), pp. 1–14. doi: 10.3390/w11020207.
83. Woolhouse, M. *et al.* (2016) 'Global disease burden due to antibiotic resistance – state of the evidence', *Journal of Global Health*, 6(1), pp. 1–5. doi: 10.7189/jogh.06.010306.
84. Wu, Y., Chen, D. and Kookana, R. (2011) 'Aqueous Photodegradation of Selected Antibiotics under Different Conditions', *Energy Procedia*, 11, pp. 2098–2103. doi: 10.1016/j.egypro.2011.10.511.
85. Wu, Z. *et al.* (2016) 'Roles of reactive chlorine species in trimethoprim degradation in the UV/chlorine process: Kinetics and transformation pathways', *Water Research*, 104, pp. 272–282. doi: 10.1016/j.watres.2016.08.011.
86. Yan, Z. G. *et al.* (2019) 'A framework for ecotoxicity testing in the 21st century: Ecotox21', *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(3), pp. 9–12. doi: 10.3390/app9030428.
87. Yang, J. *et al.* (2020) 'Indirect photodegradation of sulfamethoxazole and trimethoprim by hydroxyl radicals in aquatic environment: Mechanisms, transformation products and eco-toxicity evaluation', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), pp. 1–14. doi: 10.3390/ijms21176276.
88. Yang, L., Yu, L. E. and Ray, M. B. (2008) 'Degradation of paracetamol in aqueous solutions by TiO2 photocatalysis', *Water Research*, 42(13), pp. 3480–3488. doi: 10.1016/j.watres.2008.04.023.
89. Zhang, Yongjun; Geißen, Sven-Uwe ; Gal, C. (2008) 'Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies', *Chemosphere*, pp. 1151–1161. Available at: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086.
90. Zhang, Q. *et al.* (2015) 'Degradation of carbamazepine and toxicity evaluation using the UV/persulfate process in aqueous solution', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(4), pp. 701–708. doi: 10.1002/jctb.4360.
91. Zhang, R. *et al.* (2015) 'Degradation of pharmaceuticals and metabolite in synthetic human urine by UV, UV/H2O2, and UV/PDS', *Environmental Science and Technology*, 49(5), pp. 3056–3066. doi: 10.1021/es504799n.
92. Zhang, R., Yang, Y., Huang, C.-H., *et al.* (2016) *Supporting Information UV/H 2 O 2 and UV/PDS Treatment of Trimethoprim and Sulfamethoxazole in Synthetic Human Urine: Transformation Products and Toxicity*.
93. Zhang, R., Yang, Y., Huang, C. H., *et al.* (2016) 'UV/H2O2 and UV/PDS Treatment of Trimethoprim and Sulfamethoxazole in Synthetic Human Urine: Transformation Products and Toxicity', *Environmental Science and Technology*, 50(5), pp. 2573–2583. doi: 10.1021/acs.est.5b05604.
94. Zhang, Y., Geißen, S. U. and Gal, C. (2008) 'Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies', *Chemosphere*, 73(8), pp. 1151–1161. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.07.086.
95. Zhang, Z. *et al.* (2010) 'Kinetic degradation model and estrogenicity changes of EE 2 (17␣-ethinylestradiol) in aqueous solution by UV and UV/H 2 O 2 technology', *Journal of Hazardous Materials*,

181, pp. 1127–1133. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.05.132.

96. Zhou, N., Liang, R. and Hu, A. (2014) *Chapter 2 'Development of TiO 2 Nanowires for Membrane Filtration Applications.' Nanotechnology for Water Treatment and Purification.* doi: 10.1007/978-3-319-06578-6.
97. Zouagbi, R. *et al.* (2007) 'Photocatalytic degradation of monolinuron and linuron in an aqueous suspension of titanium dioxide under simulated solar irradiation', *Revue des Sciences de l'Eau*, 20(2), pp. 163–172.
98. Zuo, Y., Zhang, K. and Zhou, S. (2013) 'Determination of estrogenic steroids and microbial and photochemical degradation of 17α-ethinylestradiol (EE2) in lake surface water, a case study', *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 15(8), pp. 1529–1535. doi: 10.1039/c3em00239j.