

República Bolivariana de Venezuela
Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Departamento de Geoquímica



**Estudio del Efecto del Microplástico de Poliestireno en la Fotodegradación de la
Hidroclorotiazida en Aguas Naturales**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela
por el **Br. Guenady Jesús
Gómez Martín** como requisito
para optar al título de Licenciado
en Geoquímica.

Caracas, Mayo de 2024

ACTA

Los abajo firmantes, asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo de Especial de Grado titulado: "Estudio del Efecto del Microplástico de Poliestireno en la Fotodegradación de la Hidroclorotiazida en Aguas Naturales". Presentado por el Br. Guenady Jesús Gómez Martín, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Geoquímica.



Katya Reategui (Tutor)



Belkis García (Jurado)



Gustavo Pérez (Jurado)

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar el efecto del microplástico de poliestireno sobre la fotodegradación de la hidroclorotiazida en agua proveniente de la zona Paseo Orinoco del Río Orinoco de la República Bolivariana de Venezuela, se realizó un estudio de este fenómeno en presencia y ausencia de este microplásticos (en su presentación no expandida). Este estudio consistió en una fase inicial de determinación de parámetros en la que se evaluó la influencia sobre el proceso de variables como la presencia de excipientes, la temperatura y las diferencias al utilizar una cámara de irradiación construida capaz de emitir luz UV artificial respecto al proceso dado ante luz natural proveniente del sol, y una fase final en la que se sometieron a distintas condiciones climáticas soluciones de hidroclorotiazida en agua de río a irradiación con luz solar durante 5 horas en condiciones de alta y baja energía cinética en el medio, tanto en ausencia como en presencia de microplásticos, mientras que otras soluciones similares fueron mantenidas a oscuras a modo de control. Todas estas soluciones fueron analizadas mediante HPLC utilizando una solución 20/80 acetonitrilo/agua como fase móvil para obtener los cromatogramas asociados a cada solución, de los cuales se compararon las áreas asociadas a las soluciones irradiadas respecto a las no irradiadas para evaluar así la influencia de los microplásticos sobre el proceso de fotodegradación.

Los resultados obtenidos indican que en condiciones de irradiancia solar intermedia, la presencia de microplásticos de poliestireno parece producir una disminución en la eficiencia del proceso de fotodegradación de la hidroclorotiazida, habiéndose obtenido una tasa de fotodegradación máxima de $72\% \pm 14\%$ a condiciones de baja energía cinética y ausencia de microplásticos en el medio acuoso, y una de $52\% \pm 13\%$ en condiciones de alta energía cinética y presencia de microplásticos en el medio acuoso. En condiciones de irradiancia elevada, la presencia de microplásticos y la energía del medio no parecieron influir sobre el proceso, obteniéndose tasas de fotodegradación superiores al 96% en todos los ensayos.

Palabras clave: Fotodegradación, Microplásticos, Hidroclorotiazida, HPLC, Río Orinoco

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo General.....	4
2.2 Objetivo Específicos.....	4
3. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1 Interacciones Luz – Materia.....	5
3.1.1 Fenómenos Fotofísicos.....	6
3.1.2 Fenómenos o Reacciones Fotoquímicas.....	6
3.1.2.1 Reacciones de Combinación.....	7
3.1.2.2 Fotoisomerización.....	7
3.1.2.3 Fotoionización.....	8
3.1.2.4 Fotodisociación.....	8
3.2 Rango de Longitudes de Onda en las Reacciones Fotoquímicas.....	10
3.3 Producto Cuántico.....	11
3.4 Tipos de Fotodegradación en Aguas Superficiales.....	12
3.5 Susceptibilidad de los Fármacos Ante las Reacciones Fotoquímicas.....	13
3.6 La Hidroclorotiazida.....	14
3.7 Factores que Influyen en los Procesos de Fotodegradación.....	16
3.7.1 Intensidad y Longitud de Onda de la Luz Incidente.....	17
3.7.2 Capacidad de Penetración de la Luz en el Medio.....	17
3.7.3 Latitud y Estación del Año.....	18
3.7.4 Especies Iónicas Disueltas.....	19
3.7.5 Sólidos Suspendidos.....	19
3.7.6 Concentración del Fármaco.....	20
3.7.7 Presencia de Materia Orgánica.....	20
3.7.8 El pH del medio.....	21
3.7.9 Efectos de los Microplásticos.....	21
3.7.9.1 El Poliestireno.....	24
4. ANTECEDENTES.....	27

4.1 Nacionales.....	27
4.1.1 Vargas et al. (1998):.....	27
4.1.2 Vargas et al, (2003):.....	28
4.2 Internacionales.....	29
4.2.1 Calisto et al. (2011):.....	29
4.2.2 Fernández-Perales et al. (2020).....	29
4.2.3 Uzelac et al. (2022):.....	30
4.2.4 Huang et al. (2022):.....	31
5. MARCO METODOLÓGICO.....	32
5.1 Instrumental Analítico y Condiciones.....	33
5.2 Primera Fase Experimental, Establecimiento de Parámetros.....	34
5.2.1 Pruebas de Disolución de la Hidroclorotiazida.....	34
5.2.2 Evaluación Inicial del Fenómeno de Fotodegradación de la Hidroclorotiazida	34
5.2.3 Restitución del Solvente.....	35
5.2.4 Siembra de Solución No Irradiada Para Identificar Pico Correspondiente a la Hidroclorotiazida en Cromatogramas.....	36
5.2.5 Estudio de la Influencia de la Temperatura.....	36
5.2.6 Selección Entre Luz Solar o Luz Artificial en Cámara de Irradiación.....	36
5.3 Segunda Fase Experimental: Estudio del Efecto de la Agitación y de la Presencia de Microplásticos.....	38
5.3.1 Caracterización del Agua Natural.....	38
5.3.2 Tamizado de los Microplásticos.....	39
5.3.3 Preparación de las Soluciones de Hidroclorotiazida.....	40
5.3.4 Irradiación de las Soluciones.....	41
5.3.5 Monitoreo de la Temperatura y la Irradiancia Durante el Proceso de Irradiación.....	41
5.3.6 Análisis de las Soluciones con HPLC.....	43
5.3.7 Evaluación del efecto de variabilidad climática.....	43
5.3.8 Cuantificación y Tratamiento de Datos.....	43
6. Resultados y Discusión.....	44

6.1 Determinación de Parámetros de Experimentación.....	44
6.1.1 Disolución de la Hidroclorotiazida.....	44
6.1.2 Primera Evaluación del Fotoproceso.....	47
6.1.3 Siembra de Solución No Irradiada Para Identificar el Pico Correspondiente a la Hidroclorotiazida.....	55
6.1.4 Influencia de la Temperatura.....	56
6.1.5 Diferencia entre la luz artificial y la natural.....	57
6.1.6 Evaluación del Efecto de los Excipientes.....	62
6.2 Análisis de las Soluciones Irradiadas Preparadas Con Agua del Río Orinoco	64
6.2.1 Control de Calidad en Mediciones.....	64
6.2.1.1 Incertidumbres Asociadas a las Áreas de los Cromatogramas.....	64
6.2.1.2 Blancos Preparados.....	66
6.2.2 Resultados de los Análisis con HPLC.....	68
6.2.3 Cambios en la Concentración de Hidroclorotiazida Tras Irradiar.....	74
6.2.4 Tasa de Fotodegradación de la Hidroclorotiazida.....	80
6.2.5 Efecto del Agua de Río.....	83
7. Conclusiones.....	85
8. Recomendaciones.....	86
Bibliografía.....	87
Anexos.....	95
Anexo 1. Masas de los Microplásticos Utilizados.....	95
Anexo 2. Soluciones Madre Preparadas.....	96
Anexo 3. Modelo de Cálculo Para la Determinación de las Tasas de Fotodegradación de la Hidroclorotiazida a Partir de las Áreas de los Cromatogramas.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo Propuesto por Gumieniczek et al. (2018) Para la Degradación por Fotólisis Directa de la Hidroclorotiazida.....	15
Figura 2. Cambios en la Cantidad de Horas de Luz Solar en Función de la Latitud y Día del Año (Chiang et al. 2019).....	19
Figura 3. Mecanismos de Fotodegradación del Pireno y del Antraceno en Presencia de Poliestireno Propuestos por Huang et al. (2022).....	24
Figura 4. Estructura Química del Estireno, Monómero del Poliestireno.....	26
Figura 5. Esquema Metodológico.....	32
Figura 6. Mecanismo de iluminación de la cámara de irradiación construida, apagado (izquierda) y encendido (derecha).....	37
Figura 7 (izquierda). Poliestireno no expandido utilizado en los experimentos.....	39
Figura 8 (derecha). Tamiz utilizado para escoger los microplásticos de poliestireno.....	39
Figura 9. Porción de 30 pellets de poliestireno pesados almacenados en un vial.	40
Figura 10. Vista de monitoreo de irradiancia de la página web windy.com.....	42
Figura 11. Cromatograma 1: solución p1 sin irradiar.....	45
Figura 12. Cromatograma 2: solución p2 sin irradiar.....	45
Figura 13. Cromatograma 3: solución p3 sin irradiar.....	46
Figura 14. Cromatograma 4: solución p1 irradiada.....	47
Figura 15. Cromatograma 5: solución p2 irradiada.....	47
Figura 16. Cromatograma 6: solución p3 irradiada.....	47
Figura 17. Cromatograma 7: solución p1 irradiada (re-análisis).....	49
Figura 18. Cromatograma 8: solución p2 irradiada (re-análisis).....	49
Figura 19. Cromatograma 9: solución p3 irradiada (re-análisis).....	50
Figura 20. Cromatograma 10: solución p4, ensayo no irradiado.....	52
Figura 21. Cromatograma 11: solución p4, ensayo 1 irradiado.....	52
Figura 22. Cromatograma 12: solución p4, ensayo 2 irradiado.....	52
Figura 23. Cromatograma 13: solución p4, ensayo 3 irradiado.....	53

Figura 24. Diferencia de color entre las soluciones antes y luego de ser sometidas a irradiación ante la luz solar.....	54
Figura 25. Cromatograma 14: siembra (solución p4, ensayo no irradiado + ensayo 1 irradiado).....	55
Figura 26. Cromatograma 15: solución p5, ensayo no irradiado.....	57
Figura 27. Cromatograma 16: solución p5, ensayo 1 irradiado.....	57
Figura 28. Cromatograma 17: solución p5, ensayo 2 irradiado.....	58
Figura 29. Cromatograma 18: solución p5, ensayo 3 irradiado.....	58
Figura 30. Esquema del montaje experimental en la cámara de irradiación.....	59
Figura 20. Cromatograma 10: solución p4, ensayo no irradiado.....	61
Figura 31, Cromatograma 19: ensayo tipo A del tercer día no irradiado.....	61
Figura 21. Cromatograma 11: solución p4, ensayo 1 irradiado.....	62
Figura 32, Cromatograma 20: ensayo de tipo A del tercer día irradiado.....	62
Figura 33. Cromatograma del blanco preparado para el día 1.....	65
Figura 34. Cromatograma del blanco preparado para el día 2.....	66
Figura 35. Cromatograma del blanco preparado para el día 3.....	66
Figura 36. Cromatogramas de ensayos tipo A del día 1, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha).....	68
Figura 37. Cromatogramas de ensayos tipo B del día 1, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha).....	68
Figura 38. Cromatogramas de ensayos tipo C del día 1, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha).....	68
Figura 39. Cromatogramas de ensayos tipo D del día 1, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha).....	69
Figura 40. Cromatogramas de ensayos tipo A del día 2, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha).....	69
Figura 41. Cromatogramas de ensayos tipo B del día 2, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha).....	69
Figura 42. Cromatogramas de ensayos tipo C del día 2, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha).....	70

Figura 43. Cromatogramas de ensayos tipo D del día 2, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha).....	70
Figura 44. Cromatogramas de ensayos tipo A del día 3, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha).....	70
Figura 45. Cromatogramas de ensayos tipo B del día 3, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha).....	71
Figura 46. Cromatogramas de ensayos tipo C del día 3, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha).....	71
Figura 47. Cromatogramas de ensayos tipo D del día 3, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha).....	71
Figura 48. Áreas iniciales y finales asociadas a la hidroclorotiazida.....	73
Figura 49. Área final alcanzada de los ensayos irradiados en función de la irradiancia a la que fueron sometidos.....	78
Figura 50. Posible línea asintótica en función de la irradiancia.....	78
Figura 51. Tasas de fotodegradación de la hidroclorotiazida.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros usados en equipo de HPLC.....	33
Tabla 2. Ensayos evaluados.....	41
Tabla 3. Medición con HPLC de para pruebas de disolución.....	46
Tabla 4. Resultados de análisis por HPLC de soluciones fotodegradadas preparadas a partir de pastillas del hidroclorotiazida.....	48
Tabla 5. Comparación de áreas para las soluciones irradiadas antes y luego de adquirir coloración amarilla.....	51
Tabla 6. Porcentajes de fotodegradación de los ensayos de la solución p4 irradiados ante el sol sin cubrir los laterales de sus recipientes.....	54
Tabla 7. Áreas bajo la curva en prueba de siembra.....	56
Tabla 8. Irradiación de ensayos de la solución p5 en cámara de irradiación.....	59
Tabla 9. Soluciones de prueba utilizadas en la primera fase experimental.....	61
Tabla 10. Características de los días de irradiación.....	64
Tabla 11. Incertidumbres asociadas al equipo de HPLC y al proceso de fotoirradiación.....	65
Tabla 12. Áreas asociadas a la hidroclorotiazida a distintas condiciones.....	75
Tabla 13. Disminución de concentración de los ensayos agitados respecto a los no agitados.....	77
Tabla 14. Parámetros fisicoquímicos del agua del Río Orinoco utilizada en los ensayos.....	84
Tabla 15. Comparación de la tasa de fotodegradación de las soluciones p4 y A1	85

1. INTRODUCCIÓN

Gracias a los grandes avances en los últimos tiempos en bioquímica y ciencias de la salud, el ser humano ha visto un incremento en su calidad de vida y en su longevidad sin precedentes, impulsado por el desarrollo de fármacos cada vez más efectivos cuyo uso ha permitido el tratamiento de enfermedades que en tiempos anteriores se consideraban incurables y/o mortales. Sin embargo, el uso de estos fármacos también trajo consigo una nueva serie de problemas los cuales afectan de forma directa o indirecta el presente y futuro de toda la vida en nuestro entorno.

Se conoce que muchos de estos fármacos al entrar en contacto con el medio ambiente, causan efectos adversos sobre los organismos que se ven expuestos a estos, efectos que varían en gravedad y naturaleza dependiendo del compuesto y del organismo afectado, teniendo como ejemplo (a pesar de que todavía no es del todo entendida la dimensión y el alcance de dicho efectos) la alteración del comportamiento defensivo de organismos marinos (Brodin et al., 2014), bioacumulación en los tejidos y órganos (Ramirez et al., 2009), así como alteración del crecimiento y desarrollo (Gunnarsson et al., 2019). Esto ha dado pie a investigaciones con el fin de evaluar el impacto de estos fármacos sobre el entorno natural, así como a la búsqueda de métodos para neutralizar sus efectos en estos ambientes. La fotodegradación es uno de estos procesos, de especial interés al darse de forma espontánea y natural sin la intervención del hombre cuando las especies contaminantes entran en contacto con la luz solar (Sanchez et al., 2010).

Entre estos fármacos está la hidroclorotiazida, la cual ha sido utilizada por más de medio siglo como diurético para tratar la hipertensión arterial de forma exitosa al ser administrada de forma aguda, pero sus efectos al ser usada de forma crónica no son

todavía bien entendidos (Herman et al., 2022). Este fármaco tiene cierta persistencia en el medio ambiente y la posibilidad de que este genere efectos adversos en estos entornos no puede ser excluida, debido a la ausencia de data referente al impacto ambiental del mismo (Health and Medical Care Administration, 2022).

La presencia de este compuesto es de 23 días en agua superficial y 48 días en sedimento según Hydrochlorothiazide: Aerobic transformation in aquatic sediment systems (2010), por lo que se ha detectado en distintos cuerpos de agua alrededor del mundo, desde aguas servidas, a agua de ríos y aguas subterráneas destinadas al consumo humano (Patel et al., 2019). El mismo presenta cierta susceptibilidad a ser degradado al entrar en contacto con la radiación ultravioleta proveniente del sol, y la eficiencia de este proceso de degradación puede verse afectada por factores como el pH e iones presentes en el medio y la concentración inicial del compuesto (Fernández-Perales et al., 2020). Sin embargo, no existen estudios que evalúen la forma en que este proceso se ve afectado cuando hay presencia de microplásticos, contaminantes presentes en cantidades cada vez mayores en los sistemas naturales los cuales pueden influir sobre los procesos de fotodegradación de diversos compuestos (Chen et al., 2020), y cuyo aumento de forma desproporcional es un problema que causa gran preocupación en la actualidad (Ricardo et al., 2021).

Debido a su presencia ampliamente distribuida en los cuerpos de agua superficiales de la corteza terrestre, la posible influencia de los microplásticos sobre la fotodegradación natural en el medio ambiente se torna en un factor de especial importancia a la hora de evaluar el impacto ambiental que pueden tener estos contaminantes. Si bien hay muchos tipos de plástico los cuales son degradados y convertidos en microplásticos, uno de los más abundantes a nivel mundial es el poliestireno (Orona-Návar et al., 2022), un polímero el cual contiene anillos aromáticos en su estructura, y que podría tener cierta influencia sobre la fotodegradación de la hidroclorotiazida.

¿Se ven afectados los procesos de fotodegradación naturales de la hidroclorotiazida al estar el mismo en contacto con partículas de poliestireno en ambientes acuáticos naturales? La respuesta a esta interrogante permitirá trazar planes de acción de prevención y remediación del impacto negativo de las actividades humanas sobre el medio ambiente, pues al tratarse de dos componentes que necesariamente entrarán en contacto en repetidas ocasiones en los sistemas naturales, el caracterizar parte de las interacciones que pueden ocurrir entre estos dos contaminantes permitirá hacer predicciones futuras respecto al impacto combinado que estos y especies similares pueden tener sobre el entorno. En un esfuerzo por arrojar indicios sobre esta interrogante, se plantean los siguientes objetivos:

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Evaluar el impacto del microplástico de poliestireno sobre la fotodegradación de la hidroclorotiazida en agua natural.

2.2 Objetivo Específicos

- Crear un montaje experimental que permita irradiar de forma controlada muestras del compuesto de interés con luz UV-A
- Cuantificar el avance del proceso de fotoalteración de la hidroclorotiazida en matriz en agua natural.
- Cuantificar el grado de fotoalteración agregando microplásticos de poliestireno a la matriz de agua natural.
- Evaluar el efecto de la intensidad de fotoirradiación y el grado de agitación en la fotoalteración del compuesto, tanto en presencia como en ausencia de poliestireno en la matriz de agua natural.

3. MARCO TEÓRICO

A continuación se desarrollarán una serie de conceptos e ideas generales las cuales sirven de sustento teórico para la realización de este proyecto, entre los puntos a tratar estarán primeramente las posibles interacciones entre la luz y la materia (incluyendo las interacciones fotofísicas, y las fotoquímica, concentrándonos en estas últimas debido a la naturaleza de la investigación), y se hablará posteriormente de dos parámetros de especial importancia a la hora de trabajar con estos procesos, la longitud de onda de la radiación incidente (λ) y el producto cuántico (Φ), el cual está estrechamente relacionado con la ley de Grotthuss-Draper. Con estos conceptos como base, se procede a hablar sobre la susceptibilidad de los fármacos ante las reacciones fotoquímicas y qué tipos de fotodegradación de estos compuestos farmacológicos son los que se observan normalmente en aguas superficiales. Tras esto, se le dedican unas palabras a la hidroclorotiazida, el compuesto sobre el cual se centra (junto con los microplásticos de poliestireno, tratados más adelante) esta investigación. Por último, debido a que se desea evaluar cómo sería este proceso de fotodegradación de la hidroclorotiazida en presencia de microplásticos en el entorno natural, se procede finalmente a hablar sobre los principales parámetros de estos ambientes naturales que pueden influir sobre este proceso, es aquí donde se observa la influencia de la geoquímica sobre la fotodegradación del compuesto.

3.1 Interacciones Luz – Materia

La interacción de la luz con la materia produce fenómenos de distinta naturaleza que pueden ser divididos en dos grandes grupos a nivel general, estos son los fenómenos fotofísicos y los fenómenos fotoquímicos. Según Suppan (1994), el factor que marca la diferencia entre estos es el que ocurra o no la generación de especies químicas estables o metaestables distintas a las iniciales tras culminar el proceso.

3.1.1 Fenómenos Fotofísicos

Según Suppan (1994), cualquier cambio en las especies involucradas el cual no conlleve a la formación de nuevas especies se considerará un fenómeno fotofísico, teniendo como ejemplos de estos aquellos fenómenos en los cuales los fotones incidentes no son absorbidos por las especies químicas, como por ejemplo los fenómenos clásicos refracción y reflexión, pero también otros que son de especial interés, donde los átomos o moléculas sí absorben estos fotones incidentes con la longitud de onda requerida para que esto suceda, resultando en procesos como la promoción de electrones a orbitales energéticos superiores para luego volver a caer a su estado basal, o un cambio en el espín de los mismos, los cuales si bien son procesos físicos, son de especial importancia pues son el proceso inicial que permite dar comienzo posteriormente a los procesos o reacciones fotoquímicas.

3.1.2 Fenómenos o Reacciones Fotoquímicas

Cuando hay generación de nuevas especies químicas, se está hablando de un fenómeno fotoquímico. Entre las reacciones asociadas a estos fenómenos se encuentra toda la gama clásica de reacciones químicas (combinación, intercambio, etc.), siendo la única característica imprescindible para que estas se consideren reacciones fotoquímicas el que la radiación electromagnética del rango del espectro visible esté involucrada en ellas como un reactante (Persico et al, 2018). Para que estas reacciones puedan tener lugar, es necesario que alguna de las especies involucradas en la reacción sea capaz de absorber parte de la luz incidente, tal y como estipula la Ley de Grothuss-Drapper, ya que de lo contrario solo podrán producirse cambios fotofísicos (Persico et al, 2018).

Al igual que cualquier otra reacción química, estas propician la formación de productos con características distintas a las de los reactantes que les dieron origen, y variando de caso a caso, según las necesidades y propósitos que se tengan, estos

procesos pueden considerarse beneficiosos o perjudiciales. Por ejemplo, es bien conocida la reacción que tiene lugar en las plantas gracias a la clorofila para sintetizar carbohidratos y oxígeno a partir de CO₂, agua y luz, conocida por el nombre de fotosíntesis (Olson, 2006). Esta reacción puede considerarse en la gran mayoría de los casos como algo positivo, y otro ejemplo sería la disociación de especies contaminantes (como pudieran ser los medicamentos o herbicidas liberados al medio ambiente tras su uso, los cuales han demostrado tener efectos perniciosos sobre el medio ambiente y la fotodegradación de los mismos puede servir como método de eliminación de los mismos (García et al., 2014), más sin embargo, también pudiera suceder que se formen especies con efectos aún más adversos que los reactantes iniciales tras la reacción de estos con la luz (Han et al., 2000), por lo que debe examinarse con sumo cuidado el comportamiento químico, físico y biológico de las especies generadas como resultado de estos procesos.

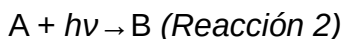
A modo general, las reacciones fotoquímicas pueden dividirse en 4 grandes grupos listados a continuación, para cada uno de los cuales se ofrece una representación esquemática, y sus explicaciones resumidas se basan en lo expuesto por Suppan (1994)

3.1.2.1 Reacciones de Combinación



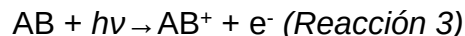
En este tipo de reacciones, la radiación lumínica incidente excita a alguna de las especies químicas involucradas en la reacción, y hace posible que tengan lugar reacciones de combinación que no ocurren normalmente. Se requiere de un tercer cuerpo (representado por M en la reacción 1) capaz de absorber el exceso de energía de la especie generada para estabilizar a la misma y hacer posible su formación.

3.1.2.2 Fotoisomerización



Ciertas especies pueden sufrir una conversión isomérica momentánea cuando incide radiación luminosa de la longitud de onda apropiada sobre ellas, para luego liberar esta energía de nuevo al medio y volver a su estado original. En la reacción 2 se puede ver representado este proceso, al absorber el reactivo A un fotón (representado por $h\nu$), se forma el isómero B al tener lugar un rearrreglo de los enlaces de la especie A. Luego de cierto tiempo, la especie B libera energía y sufre un nuevo rearrreglo en sus enlaces químicos, formando de nuevo la especie A.

3.1.2.3 Fotoionización



Cuando la energía de la radiación lumínica incidente es lo suficientemente alta, esta provoca que las especies que sufren este proceso pierdan uno o más electrones, parte de la energía es empleada para vencer la atracción del núcleo, y el exceso de energía restante se convierte en energía cinética del electrón o electrones emitidos por la especie original, quedando con carga positiva la especie irradiada como puede observarse en la reacción 3.

3.1.2.4 Fotodisociación



De entre todos los tipos de fotoreacciones ya descritos, posiblemente sea este el de mayor interés para la presente investigación, pues en este se basan los procesos que se desean estudiar sobre el compuesto hidrocortiazida. En este tipo de reacciones, parte de la energía radiante incidente (representada por $h\nu$ en la reacción 4) sobre la especie química es absorbida por la misma, resultando en el rompimiento de enlaces químicos, disociando a la molécula original y formando dos (o más) nuevas especies. La fotólisis directa pertenece a este tipo de reacción.

Cuando los fotones incidentes sobre la especie química tienen la longitud de onda apropiada para ser absorbidos por los enlaces químicos de esta, si la energía de dichos fotones es mayor a la energía de disociación de enlaces, se genera la ruptura de los mismos, trayendo como consecuencia la separación de la especie original en especies químicas de menor peso molecular.

Según Wypych (2003), esta ruptura fotolítica puede darse de dos maneras distintas en base a la similitud de las electronegatividades de las especies resultantes. Si la diferencia de electronegatividades es grande, tiene lugar normalmente una ruptura heterolítica, en la que los electrones del enlace son retenidos por una sola especie dando como resultado la formación de un par anión – catión. Si las electronegatividades son lo suficientemente similares en magnitud, sin embargo, tiene lugar una ruptura homolítica, en la que ambas especies retienen por igual parte de los electrones del enlace, resultando en la formación de pares de radicales libres (especies químicas que poseen uno o más electrones de valencia desapareados). Gracias a que el momento magnético de estos radicales libres es distinto a cero (consecuencia del Principio de Exclusión de Pauli), esto permite que los mismos sean detectados mediante técnicas basadas en el uso de las leyes del magnetismo como la Resonancia de Espín de Electrones.

En este tipo de reacciones pueden generarse directa o indirectamente especies las cuales pueden a su vez incrementar la degradación del resto de especies remanentes en el proceso, debido a la gran reactividad química de las mismas. Una de estas especies de gran importancia es el **oxígeno singlete**, el cual ha sido identificado en ciertos procesos de fotodegradación (Vargas et al, 1998) como uno de los principales agentes en la cadena de mecanismos iniciados por estos procesos fotoquímicos, mas sin embargo, no resulta indispensable la presencia del mismo, pues estos procesos también pueden tener lugar sin la acción de este radical (Vargas et al, 2003). Esta especie consiste en una molécula diatómica de oxígeno en la que, a

consecuencia de la excitación fotolumínica de sus electrones, no presenta ningún electrón con espín desapareado, al contrario que su contraparte en estado basal (Wayne, 1969), **oxígeno triplete**, con 2 electrones desapareados.

3.2 Rango de Longitudes de Onda en las Reacciones Fotoquímicas

La radiación electromagnética que actúa en este tipo de reacciones posee longitudes de onda que caen normalmente dentro de la región visible (400-750nm), la zona ultravioleta (10-400nm) o la zona del infrarrojo cercano del espectro electromagnético (750 - 1500nm), es decir, longitudes que van desde los 1200nm a los 120nm. No abarcan todo el ultravioleta ni todo el infrarrojo, ya que según Suppan (1994), la radiación en el infrarrojo inferior no se considera dentro de este rango debido a que las otras anteriormente mencionadas producen saltos electrónicos en las especies involucradas como mecanismo principal de acción, mientras que las ondas en el infrarrojo además de hacer esto, producen fenómenos adicionales sobre las moléculas, como por ejemplo alteraciones sobre los estados de rotación, traslación y vibración de las mismas (efectos comúnmente asociados a incrementos o descensos en la temperatura), lo cual hace a esta especie reaccionar en formas distintas a las que lo hacen cuando el único cambio que han sufrido es la excitación y promoción de sus electrones de un orbital a otro. Radiaciones de longitud de onda más corta que las de la región del ultravioleta, por su parte, producen otra gama de efectos totalmente distintos, pudiendo incluso llegar a interactuar con los núcleos atómicos en el caso de las ondas gamma (Chadwick & Goldhaber, 1934). La excitación y promoción de electrones entre orbitales es el factor característico de todas las reacciones químicas que se considera forman parte de la fotoquímica.

3.3 Producto Cuántico

Un parámetro experimental que establece la relación causa-efecto entre la acción de los fotones y la ocurrencia de una reacción fotoquímica es el que se conoce como producto cuántico. Este está definido como la razón entre el número de eventos observados (pudiendo en este caso un evento consistir en la formación de una especie química particular) sobre la cantidad de fotones absorbidos por las moléculas (Suppan, 1994) como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\Phi_x = \frac{\text{Número de moléculas afectadas o de eventos observados}}{\text{Número de fotones absorbidos}}$$

Ecuación 1

A modo de ejemplo para entender mejor la ecuación 1, para una especie química dada, si por cada fotón absorbido ocurre un evento químico (por ejemplo, la disociación de una molécula de reactante), el producto cuántico para la misma tendría un valor de 1, si ocurren dos eventos químicos por cada fotón absorbido el producto cuántico será de 2, etc. Normalmente las cantidades se expresan en moles (moles de cantidad de eventos químicos ocurridos sobre moles de fotones absorbidos, o Einsteins de fotones), y el valor del producto cuántico es usualmente menor a 0, aunque existen instancias de reacciones con productos cuánticos mayores a 1, como en el caso de las reacciones en cadena, en las cuales cada fotón absorbido ocasiona que ocurra más de un evento químico. Un ejemplo es el proceso de producción del plástico CPVC, el cual se forma al hacer incidir luz ultravioleta sobre gas cloro en presencia de gas PVC para propiciar su cloración, dando como resultado el reemplazo de átomos de hidrógeno por átomo de cloro en su estructura.

Chowdhury et al. (2019) indican que se han logrado determinar experimentalmente valores de producto cuántico de $0,0216 \pm 0,0043$ (a pH 5), $0,0166 \pm 0,0009$ (a pH 7) y $0,0226 \pm 0,0018$ (a pH 8) (mol/einstein) para la hidrocortiazida. Estos valores están dados en moles de moléculas fotodegradadas / moles de fotones

absorbido (einsteins), es decir, la cantidad de moles de moléculas del compuesto que son degradadas por cada mol de fotones que es absorbido por el sistema, lo cual muestra que la hidroclorotiazida es más susceptible a ser degradada a pH ácidos y alcalinos que neutros. A pesar de que no se determinará el producto cuántico de la hidroclorotiazida bajo las condiciones de experimentación del proyecto presente, es importante tener en cuenta el principio que establece este concepto, es decir, la relación directa e inequívoca entre la cantidad de fotones que absorbe un sistema químico, y la cantidad de eventos químicos que se generan como consecuencia. Para que tenga lugar una reacción fotoquímica, debe haber absorción de fotones, tal y como lo estipula la Ley de Grotthuss-Draper, y a mayor cantidad de fotones absorbidos, mayor la cantidad de eventos fotoquímicos que tendrán lugar, y viceversa, lo cual puede verse reflejado en la ecuación del producto cuántico (ecuación 1) de las reacciones fotoquímicas.

Adicionalmente, es apropiado mencionar a la Ley de Stark-Einstein, la cual dicta que, por cada fotón absorbido por el sistema, solamente una molécula es activada para una reacción fotoquímica, es decir, un mismo fotón no podrá activar químicamente a un número arbitrario de moléculas, solamente podrá activar a una molécula a la vez, o a ninguna, en el caso de que la absorción de este no resulte en el comienzo de una reacción química.

3.4 Tipos de Fotodegradación en Aguas Superficiales

Según los autores Matamoros et al. (2009) y Werner et al. (2005), existen dos vías principales por las que ocurre las reacciones fotoquímicas en ambientes de aguas superficiales, estas son la fotólisis directa, en la que los compuestos químicos absorben luz directamente y terminan siendo fotodegradados como consecuencia, y la fotólisis catalizada por fotosensibilizantes, en la cual ciertos catalizadores (por ejemplo el TiO_2) interactúan con la luz para formar radicales libres (como puede ser el radical $\cdot\text{OH}$) o

especies como el oxígeno singlete, las cuales a su vez reaccionan con los compuestos con los que entran en contacto ocasionando la degradación de los mismos, pudiendo así remineralizar muchos compuesto orgánicos contaminantes presentes en las aguas. Este último proceso también es conocido por el nombre de **Procesos de Oxidación Avanzada**, y los mismos han recibido gran atención en los últimos tiempos, pues se ha determinado que pueden ser empleados de forma eficiente para degradar contaminantes en aguas (Deng & Zhao, 2006). En el punto 3.6 de este marco teórico se desarrolla el mecanismo de fotólisis directa de la hidroclorotiazida (figura 1), mientras que en el punto 3.7.8 (figura 3) puede observarse un ejemplo de procesos de oxidación avanzada del compuesto antraceno, proceso fotocatalizado por la presencia de microplásticos de poliestireno.

3.5 Susceptibilidad de los Fármacos Ante las Reacciones Fotoquímicas

Según Kavitha (2022), la estabilidad de un fármaco se define como “el período temporal durante el cual un fármaco conserva las mismas propiedades y características que poseía al momento de su manufactura”. Entre otros factores, uno de los que se tienen en cuenta al evaluar la estabilidad de los compuestos farmacológicos es la resistencia que estos poseen frente a la degradación por acción de la incidencia de luz visible sobre lo mismos. En particular, la fotoestabilidad se refiere al “efecto que tiene la luz obre la estabilidad de los fármacos” (Kavitha, 2022), y debido a la susceptibilidad que presentan algunos fármacos frente a la fotodegradación, se han creado lineamientos en distintos países con el objetivo de evaluar dicha fotoestabilidad, teniendo como ejemplo a la norma *Guidance for Industry: Photostability testing of new drug substances and products* de la FDA en estados unidos, la cual estipula que “las características intrínsecas de fotoestabilidad cualquier droga nueva deberá ser evaluada para demostrar que, según sea apropiado, la exposición a la luz no resulte en cambios inaceptables de la misma”.

3.6 La Hidroclorotiazida

La hidroclorotiazida en particular ha demostrado tener cierta susceptibilidad a estos procesos de fotodegradación, y de la misma forma se ve influenciada por los factores anteriormente mencionados. La susceptibilidad de este compuesto frente a la fotodegradación parece incrementar a pH bajos y temperaturas elevadas, se favorece además al ser sometida a irradiación lumínica en el rango ultravioleta del espectro electromagnético, y sufre cierta inhibición ante la presencia de ácidos húmicos en el entorno acuoso (Fernández-Perales et al., 2020; Uzelac et al, 2022), sin embargo, no se han realizado estudios que evalúen la posible influencia de la presencia de microplásticos sobre la fotodegradación de este compuesto. Han sido propuestos mecanismos de fotodegradación directa para este compuesto por los autores Gumieniczek et al. (2018) y Tamat & Moore (1983), ambos estudios coinciden en que la descloración de este compuesto es un paso esencial para dar pie a la degradación ante la acción de la luz solar. Se muestra un esquema propuesto por Gumieniczek et al. (2018) de este mecanismo en la figura 1.

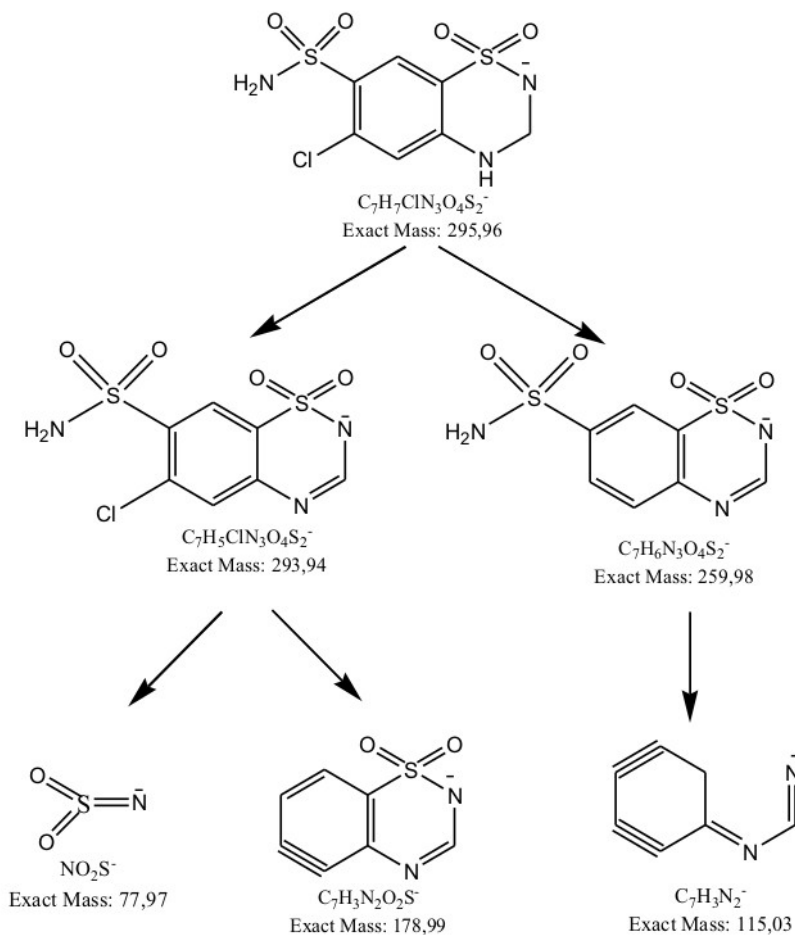


Figura 1. Mecanismo Propuesto por Gumieniczek et al. (2018) Para la Degradación por Fotólisis Directa de la Hidroclorotiazida

En la primera rama (a la izquierda en la figura 1) la pérdida de un protón genera la formación de clorotiazida, la cual se degrada nuevamente perdiendo el grupo sulfoamida y HCl dando como resultado la molécula $C_7H_3N_2O_2S^-$, mientras que en la rama de la derecha se inicia con la pérdida del ion cloruro del anillo aromático gracias a la acción de la luz incidente, así como del protón enlazado al átomo de nitrógeno, Para posteriormente perder un grupo sulfoamida y SO_2 dando como resultado la molécula $C_7H_3N_2^-$ según exponen Gumieniczek et al. (2018).

Respecto a los productos de degradación formados por estas reacciones de fotólisis, debe decirse que la naturaleza y efectos de los mismos variarán de compuesto a compuesto. Así, Kavitha (2022) reporta por ejemplo la formación de productos de degradación con efectos menos perniciosos para los ecosistemas al experimentar estos procesos de fotólisis compuestos como el ibuprofeno o el acetaminofén, y en el caso particular de la hidroclorotiazida, Fernández-Perales et al. (2020) y Uzelac et al. (2022) reportan que los productos de fotodegradación del compuesto son menos tóxicos para los ecosistemas que el compuesto original sin degradar, más sin embargo, Han et al. (2000) indican que ciertos productos de fotodegradación de la hidroclorotiazida parecen tener efectos menos deseables sobre los organismos de los ecosistemas que el compuesto original antes de ser fotodegradado. En principio hay una mayor cantidad de estudios que indican que los productos de fotodegradación de la hidroclorotiazida son menos tóxicos que el compuesto sin degradar, sin embargo, se deberá tener cierta cautela a la hora de aseverar esto en vista de la existencia de estudios que reportan lo contrario.

3.7 Factores que Influyen los Procesos de Fotodegradación

Al ser liberado a los entornos naturales, los fármacos y sus productos de metabolización son sometidos a estos procesos de fotodegradación ante la luz natural, y el grado en que los mismos serán degradados dependerá, además de la naturaleza del fármaco en sí, a ciertos factores (Kavitha, 2022), de entre los cuales se nombran los de mayor influencia sobre el proceso a continuación. Es aquí donde adquiere importancia la geoquímica, pues para algunos de estos parámetros, la composición química de las aguas en función de la materia orgánica que va a parar a ellas y en función de la geología del medio será determinante para con la eficiencia del proceso de fotodegradación de la hidroclorotiazida y de cualquier otro fármaco en general en el entorno libre. (Cabe recalcar que la influencia de algunos de los factores indicados a

continuación no será evaluada en el presente estudio, sin embargo, es importante tener estos factores presentes a la hora de hacer interpretaciones, por lo cual se dará una breve explicación de los mismos a pesar de que no sean considerados en la metodología).

3.7.1 Intensidad y Longitud de Onda de la Luz Incidente

La longitud de onda de la luz incidente sobre las moléculas es un factor clave, pues incluso si una especie química es fotodegradable, debido a la cuantización de los fotones, solo aquellos que tengan la longitud de onda adecuada podrán interactuar con estas (y potencialmente ser absorbidos). Como ejemplo de este fenómeno tenemos el estudio de Lund-Høie & Friestad (1986), el cual determinó que un herbicida llamado glifosato sufría fotodegradación al ser irradiado con luz ultravioleta, mientras que lo mismo no ocurría al ser irradiado con luz de otras regiones del espectro. Mientras que la longitud de onda de la luz se relaciona con la energía de los fotones, la intensidad de la radiación se relaciona con la cantidad de los mismos y como se muestra en la ecuación del producto cuántico (ecuación 1), para que ocurra cierta cantidad de fotoeventos, se necesita una cantidad apropiada incidente de fotones, lo que quiere decir que, a menor cantidad de fotones incidentes, menor cantidad de eventos de fotodegradación tendrán lugar, y viceversa. Según Fernández-Perales et al. (2020), la hidroclorotiazida presenta mayor susceptibilidad a la luz del rango ultravioleta, en concreto, a 224 nm, y 272 nm de longitud de onda. Hanz et al (2000) reportan, además, otro pico de absorción para el compuesto a 320 nm.

3.7.2 Capacidad de Penetración de la Luz en el Medio

Radiaciones electromagnéticas de distintas longitudes de onda tienen distintas capacidades de penetración en el agua, debido a que los distintos componentes presentes en esta pueden absorber radiaciones de ondas particulares en mayor o menor medida (Pope & Fry, 1997), así que distintas longitudes de onda tendrán un poder de penetración determinado para tipos distintos de agua (Gordon & McCluney,

1975) Chiang et al. (2011) abordan este tema, dejando ver que en medio acuático, las radiaciones de longitud de onda menor (es decir la de mayor energía) tienen mayor capacidad de penetración en el agua marina por ejemplo. Debido a que se necesita la acción de la luz para que ocurran los procesos de fotodegradación, en concreto, que dicha radiación entre en contacto con las especies químicas de interés, y que además sea absorbida por esta, el alcance y penetración de dicha luz en el agua influirá directamente sobre la fotodegradación de los compuestos químicos en el entorno natural al ser un factor que regula la cantidad de luz que entrará en contacto con los mismos.

3.7.3 Latitud y Estación del Año

La intensidad de luz solar que llega a la superficie del planeta varía de zona a zona dependiendo de la latitud (Chiang et al., 2019). Debido a que la cantidad de veces que ocurre un fotoproceso va de la mano con la cantidad de fotones que inciden sobre las especies químicas que los experimentarán según muestra la ecuación del producto cuántico (ecuación 1), si la cantidad de fotones en el medio varía con la latitud, también lo hará la cantidad de veces que ocurren estos procesos. En conjunto con la latitud, la cantidad de luz solar varía con cada estación del año (Chiang et al., 2019), sobre todo en las zonas alejadas de los trópicos, las cuales reciben una menor cantidad de luz en invierno y mayor en verano, pudiendo aumentar o disminuir en función de esto la prominencia con la que ocurren estos procesos al haber como consecuencia menor cantidad de fotones en el medio que pueda iniciar estos procesos. En la Figura 2. puede observarse la variación en la cantidad de horas al día de luz solar en función de la latitud y del día del año, según exponen Chiang et al (2019).

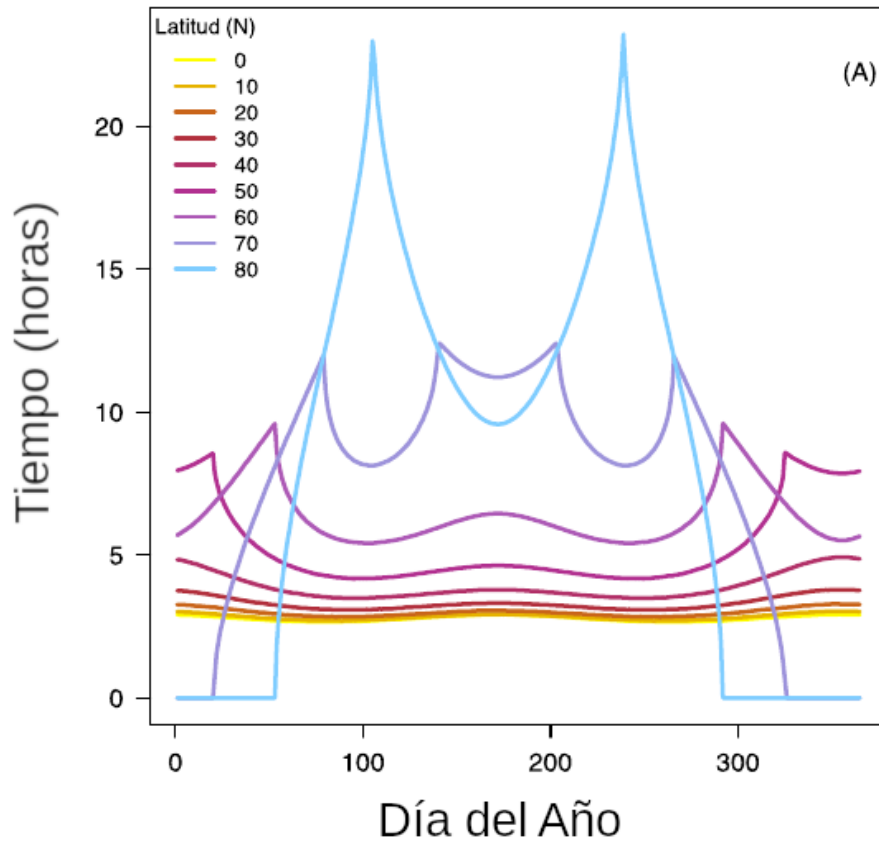


Figura 2. Cambios en la Cantidad de Horas de Luz Solar en Función de la Latitud y Día del Año (Chiang et al. 2019)

3.7.4 Especies Iónicas Disueltas

Uzelac et al. (2022) indican que la eficiencia de la fotodegradación de la hidroclorotiazida se ve disminuida por la presencia de iones cloruro, carbonato, calcio y magnesio, por lo que este proceso puede verse inhibido en cierta medida al tener lugar en aguas naturales en la que estén presente estas especies.

3.7.5 Sólidos Suspendidos

Los sólidos suspendidos en un cuerpo acuático son capaces de actuar como pantalla, reduciendo la cantidad de fotones que llegan a las especie químicas fotodegradables e impidiendo así que ocurra el proceso. Furman et al., (2013)

estudiaron la influencia de estos sólidos, y determinaron que la tasa de fotodegradación disminuía al aumentar la concentración de estos en el medio acuoso.

3.7.6 Concentración del Fármaco

Según Fernández-Perales et al. (2020), la eficiencia de la fotodegradación de la hidroclorotiazida puede verse influenciada por la concentración inicial de la misma en el medio. Los autores de este estudio exponen que, si se mantiene constante la cantidad de fotones que inciden sobre la muestra, pero se aumenta la cantidad de molécula sobre las que pueden incidir, entonces cada molécula presente en el medio recibirá una cantidad menor de fotones debido a que la misma cantidad de radiación lumínica incidente se distribuirá sobre un mayor número de moléculas, reduciéndose por lo tanto la eficiencia con la que ocurre el proceso.

3.7.7 Presencia de Materia Orgánica

Como un ejemplo interesante de la influencia de estos factores tenemos el trabajo de Calisto et al. (2011), donde se muestra que ciertos fármacos pueden volverse más susceptibles a ser fotodegradados en presencia de ácidos fúlvicos, mientras que la tasa de fotodegradación disminuye para esos mismos compuestos cuando son expuestos a ácidos húmicos en la matriz acuosa en la que se encuentran al recibir esta luz incidente. Entre las posibles causas, estos investigadores exponen que además del posible efecto de atenuación por apantallamiento y de la absorción de la luz incidente sobre los grupo aromáticos de estas sustancias húmicas (esto para ambas sustancias húmicas), se tiene como posible factor predominante la generación o captura de especie químicas intermediarias involucradas en los procesos de fotodegradación, las cuales son afectadas en diferente medida y de distinta forma por cada una de las fracciones húmicas. Respecto a la posible causa de la diferencia entre las influencias que ejercen los ácidos fúlvicos y los ácidos húmicos, Calisto et al (2011) se limitaron a indicar como de posible relevancia un mayor grado de aromaticidad en

los ácidos húmicos que utilizaron, así como una mayor presencia de grupos carboxílicos y ésteres en la fracción de ácidos fúlvicos que utilizaron, sin embargo no se arriesgaron a designar a estas diferencias como las responsables, e indicaron que deberán hacerse más estudios para determinar a ciencia cierta la raíz de la causa. Debido a la gran complejidad de estas sustancias, las cuales no pueden definirse estructural ni funcionalmente sino operacionalmente en base a su solubilidad a determinado pH debido a la gran variedad de posibles componentes que puede poseer (Aiken et al, 1985), podría esperarse que la misma fracción húmica (ej. Ácidos fúlvicos) afecte de forma distinta al proceso de lo que lo haría esta misma fracción en otra localidad, sin embargo el determinar esto va más allá del alcance del presente proyecto de investigación, pero queda como una interrogante a contestar en estudios posteriores.

3.7.8 El pH del medio

Chowdhury et al. (2019) determinaron que el pH del medio influía sobre la eficiencia de la fotodegradación de muchos fármacos, y en el caso concreto de la hidroclorotiazida, Fernández-Perales et al. (2020) determinaron que la fotodegradación del compuesto se veía favorecida a pH ácido, y proponen que esto se debe a la mayor reactividad con la luz que posee este compuesto en su forma protonada, la cual está presente en mayores concentraciones en pH bajo que en pH alto. En comparación con su forma protonada, su forma desprotonada necesita de mayores energías de irradiación para lograr ser fotoexcitada, dificultando que se dé la fotodegradación del compuesto.

3.7.9 Efectos de los Microplásticos

Entre los factores que pueden influir sobre la eficiencia de estos procesos fotoquímicos de degradación se encuentran las interacciones cruzadas con otros contaminantes. Entre estos, debido a su gran abundancia en los ecosistemas

adquieren especial importancia los microplásticos, definidos operacionalmente como cualquier partícula plástica con un diámetro menor a 5mm (Dong et al, 2018). Entre los más abundantes de estos microplásticos se encuentran el polietileno, el polipropileno y el poliestireno, este último ha demostrado tener una influencia directa sobre los procesos de fotólisis, pudiendo inhibirlos (como en el caso del pireno, consecuencia de disminuir la cantidad de electrones que las moléculas fotoexcitadas pueden transferir a molécula de oxígeno en el entorno) o incrementarlos (como en el caso del antraceno, gracias a que en este caso promueve la formación de oxígeno singlete), así como de modificar los mecanismos de fotodegradación, indistintamente de si la eficiencia de la misma se ve incrementada o disminuida (Huang et al., 2022). Queda claro en base a esto que la influencia de este microplástico sobre la eficiencia de la fotodegradación de compuestos químicos dados dependerá de la naturaleza, características y mecanismos de reacción de cada compuesto en particular, esto aunado a la falta de estudios de la influencia de este u otro microplástico similar sobre la fotodegradación de la hidroclorotiazida deja en evidencia la necesidad de realizar estudios de su influencia sobre dicho proceso.

En la Figura 3. se muestra el mecanismo propuesto por Huang et al. (2022) para explicar la influencia del poliestireno sobre la fotodegradación del pireno y el antraceno. En el caso del antraceno (a la izquierda en la figura 3), los autores proponen que el antraceno y los microplásticos de poliestireno son activados por la luz incidente para formar antraceno triplete y polietileno triplete (un triplete es una molécula que posee 2 electrones desapareados en su estructura), los cuales vuelven a su estado basal transfiriendo su exceso de energía al oxígeno del entorno, haciendo que este pase de un estado triplete a singlete (un singlete no posee ningún electrón desapareado), el cual ataca químicamente al antraceno. El poliestireno lumínicamente excitado también propicia la formación del radical $\cdot\text{OH}$, el cual ataca a su vez a los productos de fotodegradación generados en el paso anterior, incrementando así la eficiencia del proceso. En el caso del pireno (a la derecha en la figura 3), la fotoionización (proceso el

cual influye de forma positiva en la fotodegradación al propiciar normalmente la formación de oxígeno singlete) del pireno se ve disminuida por la presencia del poliestireno debido a la competición que este propicia para con los electrones liberados por el pireno que son absorbidos por el plástico en lugar de ser utilizados en la formación de oxígeno singlete, reduciendo la eficiencia del proceso, aunque no lo detiene por completo gracias a que al igual que en el caso anterior, el poliestireno fotoexcitado propicia la formación del radical $\cdot\text{OH}$ el cual actúa sobre la molécula de pireno degradándola. Si el poliestireno compite con otros procesos generadores de radicales libres, entonces la tasa de degradación por procesos de oxidación avanzada se verá disminuida, mientras que, si el proceso se ve acentuado por la presencia del poliestireno como en el caso del antraceno, la eficiencia del proceso mejorará (ayudado además por los radicales $\cdot\text{OH}$ que estos microplásticos parecen ser capaces de generar).

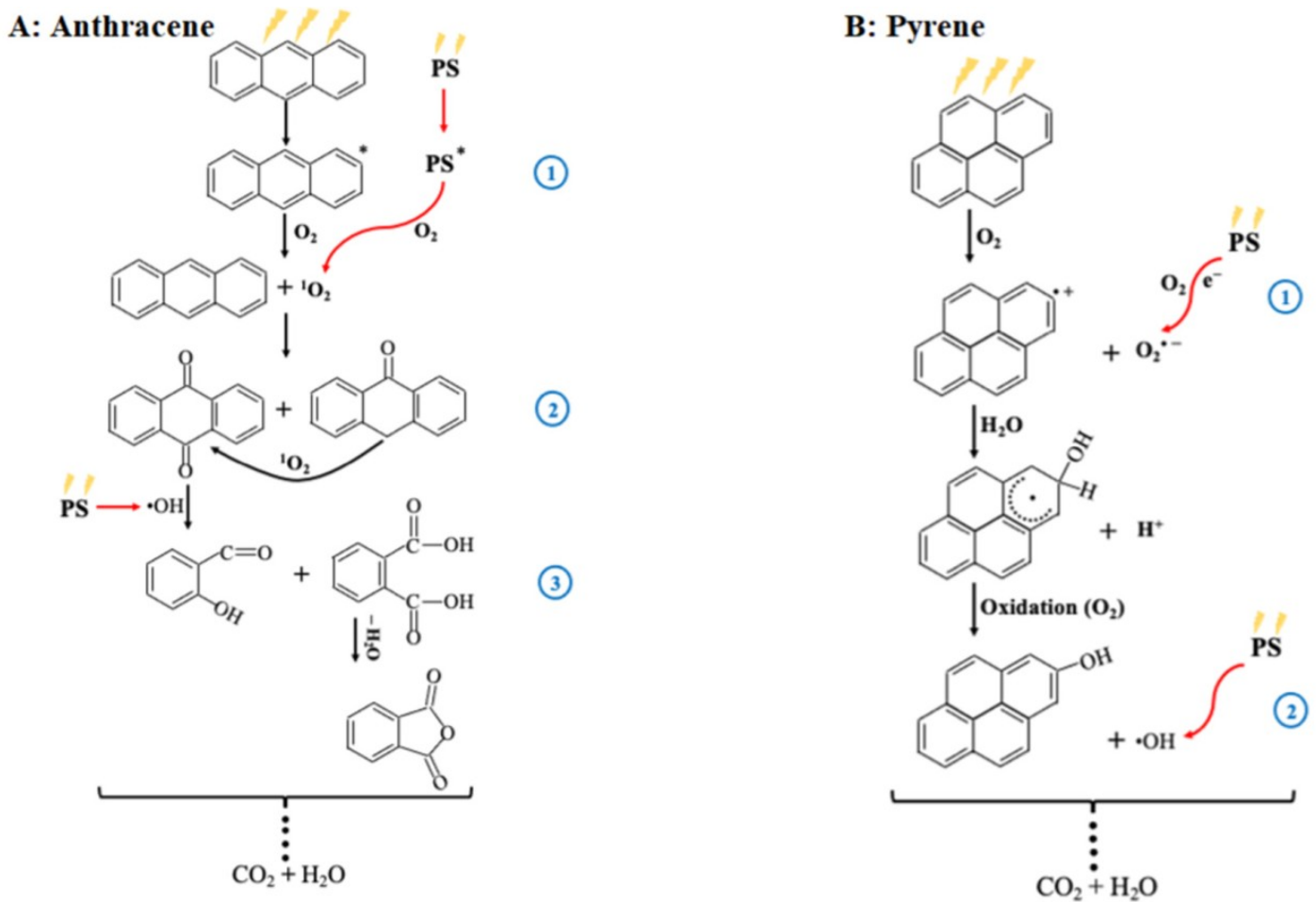


Figura 3. Mecanismos de Fotodegradación del Pireno y del Antraceno en Presencia de Poliestireno Propuestos por Huang et al. (2022).

3.7.9.1 El Poliestireno

El poliestireno es un polímero orgánico producido a nivel mundial y utilizado ampliamente en diversidad de industrias con usos múltiples que van desde servir como material aislante a equipos electrónicos, juguetes, productos del hogar y empaques por mencionar algunos. Es blanco o transparente, posee una densidad de 1,04 a 1,06 g/cm³ por lo que se sumerge en el agua, sin embargo, si se encuentra como espuma de poliestireno o poliestireno expandido (anime), flota, debido a que este material es el mismo poliestireno pero con aire inyectado para hacerlo más liviano, factor que tiene

consecuencia una mayor capacidad de dispersión en los cuerpos acuático superficiales, y factor que también lo ha llevado a estar entre los 3 microplásticos más comúnmente encontrados a nivel mundial como contaminante en cuerpos acuáticos de la superficie terrestre (Orona-Návar et al., 2022).

Este polímero fue descubierto a inicios del siglo 20, y desde dicho siglo ha sido producido en masa, generando grandes acumulaciones a nivel global las cuales tienen un gran tiempo de permanencia en los ambientes naturales debido a la gran dificultad con la que este y otros plásticos se degradan, por lo que su interacción con otros contaminantes en el entorno será inevitable y prolongada en el tiempo hasta que se encuentre alguna solución económicamente viable a esta problemática, razón por la cual algunos autores han estudiado la influencia combinada de este compuesto con otros contaminantes, teniendo como ejemplo el estudio de Dong et al. (2018), el cual investigó la influencia combinada del nanopoliestireno y nanopartículas de dióxido de titanio presentes en el medio ambiente como contaminantes sobre los nematodos, pero no existen estudios que evalúen su influencia sobre la fotodegradación de la hidroclorotiazida.

Este plástico se sintetiza mediante polimerización por radicales libres de peróxido en presencia de etilbenceno a una temperatura de polimerización entre los 100 y 180°C (Wypych, 2022), y el mismo posee anillos aromáticos en su estructura, (figura 4) lo cual lo hace capaz de interactuar con la luz visible debido a las características fotosensibles de los anillos aromáticos (Herzfeld, 1940), volviéndolo un prospecto interesante a la hora de evaluar interacciones fotoquímicas de otros contaminantes en presencia de microplásticos.

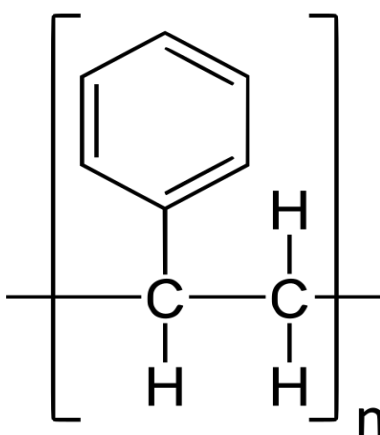


Figura 4. Estructura Química del Estireno, Monómero del Poliestireno.

4. ANTECEDENTES

A continuación, se da un breve resumen de algunos estudios previos realizados tanto a nivel nacional como internacional, los cuales sirvieron de base para la presente investigación

4.1 Nacionales

4.1.1 Vargas et al. (1998):

Hicieron un estudio de la fotólisis y la degradación fotosensibilizada de la droga diurética y fototóxica, acetazolamida, la cual es fotolábil al ser irradiada con radiación luz UV de 300nm de longitud de onda en ambientes aeróbicos. Para ello irradiaron al compuesto acetazolamida a temperatura ambiente durante 72 horas en matriz de metanol con un reactor químico Rayonet equipado con 16 lámparas de fósforo con un máximo de emisión a 300nm, a 23 mW/cm³ de irradiancia (dichos parámetros controlados con un radiómetro digital UVX luego de 1h de iluminación continua) en atmósfera de oxígeno y de argón. También repitieron la irradiación con un láser de nitrógeno de 337 nm de longitud de onda, logrando que tuviera lugar el mismo proceso de fotodegradación en ambos casos. El desarrollo de la reacción se monitoreó con espectrometría UV/Vis y cromatografía de gases, así como HPLC. Posterior a la irradiación una vez consumido el compuesto, evaporaron el solvente a baja presión y purificaron el residuo con cromatografía de capa fina usando una mezcla de cloruro de metileno y metanol (4:2). Analizaron finalmente los productos de degradación mediante resonancia magnética nuclear y espectroscopía IR. Lograron aislar e identificar dos productos de fotodegradación los cuales estuvieron presentes en ambos casos, además de determinar que la fotodegradación con el oxígeno singlete era el proceso principal que tenía lugar en esta reacciones. Lograron proponer también un mecanismo de reacción de la fotodegradación de este fármaco. Este estudio es uno de los ejemplos que establecen un vínculo importante entre la acción del oxígeno singlete y la

fotodegradación de algunos compuestos químicos en respuesta a la irradiación con ondas de ciertas longitudes bajo condiciones determinadas.

4.1.2 Vargas et al, (2003):

También estudiaron las vías de fotodegradación y la fototoxicidad in-vitro de la droga antitubercular pirazinamida. Para ello irradiaron al compuesto pirazinamida a temperatura ambiente durante 72 horas en matriz de metanol y en medio acuoso con un reactor químico Rayonet equipado con 16 lámparas de fósforo con un máximo de emisión a 300nm, a 23 mW/cm³ de irradiancia (dichos parámetros controlados con un radiómetro digital UVX luego de 1h de iluminación continua) en atmósfera de oxígeno y de argón. El desarrollo de la reacción se monitoreó con espectrometría UV/Vis y cromatografía de gases, así como HPLC y analizaron finalmente los productos de degradación mediante resonancia magnética nuclear y espectroscopía IR. A pesar de haber logrado identificar la acción de radicales libres intermediarios en estos procesos, en este caso se evidenció que el oxígeno singlete no participaba en este proceso, siendo uno de los ejemplos de procesos de fotodegradación que no involucran la participación de esta especie química.

4.2 Internacionales

4.2.1 Calisto et al. (2011):

Hicieron investigaciones referentes a la benzodiazepinas, productos de uso psiquiátrico los cuales son detectados frecuentemente en las aguas superficiales. Estos irradiaron a cuatro benzodiazepinas distintas (cuya concentración inicial fue de 10 mg/L, y se usó acetonitrilo para mejorar la solubilidad de estas) con luz solar simulada (longitudes de onda comprendidas entre 290nm-400nm e irradiancia de 55w/m²) en matrices acuáticas de distinta naturaleza para determinar la tasa de fotodegradación y vida media de estos fármacos. Tomaron alícuotas de las soluciones irradiadas a intervalos regulares las cuales almacenaron a 4°C para ser posteriormente analizadas mediante cromatografía micelar dos días después, e identificaron los productos de degradación mediante espectrometría de masas. Lograron establecer que la presencia de sustancias húmicas en la matriz acuosa ejercía una gran influencia sobre la eficiencia de estos procesos de fotodegradación, viéndose esta incrementada ante la presencia de ácido fúlvicos, pero disminuida ante la presencia de ácidos húmicos en la matriz. Este estudio muestra la gran importancia de tener en cuenta las características químicas de la matriz donde se hace la experimentación, pues dependiendo de la características y naturaleza química de los componentes secundarios de la misma, los procesos de fotodegradación de los componentes de interés pueden verse afectados para beneficio o detrimento de los objetivos de investigación en un momento dado.

4.2.2 Fernández-Perales et al. (2020)

Irradiaron el compuesto hidroclorotiazida con la luz proveniente de una lámpara de mercurio de 254 nm de longitud de onda y luz solar simulada, calculando la irradiancia mediante actinometría. Estudiaron la influencia de parámetros como el pH, concentraciones iniciales de hidroclorotiazida y la influencia de distintas matrices sobre el proceso de fotodegradación, calcularon también el producto cuántico de este

compuesto al ser sometido a fotólisis directa. Además de la fotólisis directa, abordaron la fotodegradación del compuesto mediante procesos de oxidación avanzada en presencia de algunas especies químicas, entre ellas el peróxido de hidrógeno y $K_2S_2O_8$, para contrastar la eficiencia de este proceso en contraposición a la fotólisis directa. Utilizaron espectrometría de masas para proponer un mecanismo de reacción de la fotodegradación del compuesto. Evaluaron además la fototoxicidad del compuesto en células vivas e indicaron que los productos de formación de este compuesto son menos tóxicos que el compuesto sin degradar, la importancia de lo cual radica en que establece a la fotodegradación de la hidroclorotiazida como un proceso deseable el cual reduce el impacto medioambiental de dicho compuesto.

4.2.3 Uzelac et al. (2022):

Investigaron la estabilidad de la hidroclorotiazida en agua destilada, agua de grifo y dos aguas naturales distintas, en concreto, la hidrólisis, fotólisis directa y fotólisis indirecta de este compuesto en estas matrices al ser irradiadas por luz solar simulada y por luz ultravioleta. Además, condujeron estos experimentos a 5 y 25 °C en la oscuridad, en análisis computacionales y experimentales para examinar la estabilidad y reactividad del compuesto. Los resultados de este estudio establecieron que la hidroclorotiazida es susceptible a la fotólisis directa e indirecta al ser irradiada con luz ultravioleta, dando como resultado que el fármaco fue completamente degradado tras 180 minutos de irradiación en agua destilada, pero estos procesos fueron inhibidos en aguas naturales debido a la presencia de iones cloruro, magnesio, calcio y carbonato. En el proceso de fotodegradación que tuvo lugar en la matriz de agua destilada, lograron determinar que los radicales $\cdot OH$ jugaban un papel importante en este proceso. Este estudio posee gran importancia, pues establece no solo la capacidad de la hidroclorotiazida de ser fotodegradada, sino también la gran influencia de los componentes de la matriz en la que se encuentra el compuesto sobre este proceso.

4.2.4 Huang et al. (2022):

Investigaron la influencia de las micropartículas de poliestireno sobre los fotoprocesos asociados al pireno y al antraceno en muestras de agua de distintas características. Para ello irradiaron muestras de pireno y antraceno tanto en presencia como en ausencia de microplásticos de poliestireno en contenedores de cuarzo con luz solar simulada con longitudes de onda comprendidas entre los 200 nm y 800 nm, y se colocaron muestras de estos compuestos en recipientes similares pero cubiertos de papel aluminio para evaluar si había degradación de estos en ausencia de irradiación. Repitieron la irradiación con luz ultravioleta de 314 nm de longitud de onda, cuya irradiancia fue de 1580 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ según el radiómetro UVX utilizado como control. Se tomó 1 ml de la solución irradiada y se separaron los microplásticos mediante filtración para posteriormente analizar la cantidad residual de antraceno y pireno mediante HPLC. Los productos de degradación fueron detectados con UPLC acoplado a espectrómetro de masas. Lograron determinar que la presencia de microplásticos de poliestireno aumentaban la magnitud de la fotodegradación del antraceno, mientras que disminuían la del pireno. Este estudio es de importancia pues demuestra que la presencia de microplásticos no afectará de la misma forma y en la misma magnitud a los fotoprocesos de todos los contaminantes químicos, indicando la necesidad de evaluar la manera en que tienen lugar lo mimos caso por caso.

5. MARCO METODOLÓGICO

El desarrollo experimental se dividió en dos fases, una fase inicial de determinación de parámetros, en la cual se realizaron ensayos de prueba con agua destilada y pastillas de hidroclorotiazida, y una fase de experimentación en condiciones finales, en la que se realizaron ensayos con el compuesto puro en agua del Río Orinoco en base a los parámetros establecidos en la fase inicial. La secuencia de ambas se muestra en la figura 5.

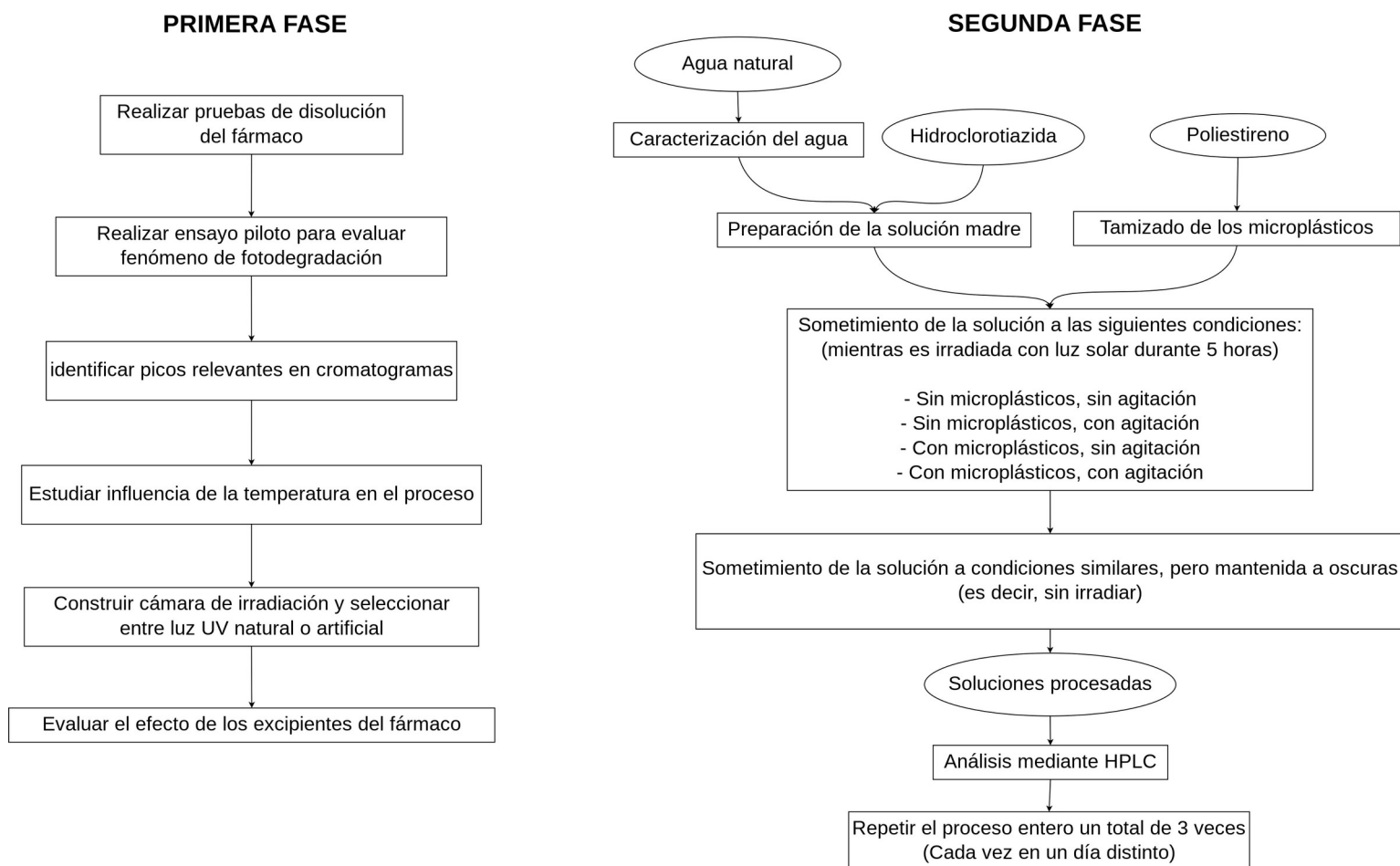


Figura 5. Esquema Metodológico

5.1 Instrumental Analítico y Condiciones

El método analítico instrumental utilizado para medir las concentraciones de la hidroclorotiazida en los distintos ensayos fue cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), utilizando un equipo HPLC marca Agilent Technologies serie 1200 con detector de luz UV de longitud de onda variable, una columna de fase reversa Zorbax C18 (5µm, 4.6 x 150 mm) y volumen de inyección de 20 µL, todo esto a condiciones de temperatura ambiente. En la tabla 1 a continuación se muestran los distintos parámetros utilizados con este instrumento durante la fase experimental.

Tabla 1. Parámetros usados en equipo de HPLC

Set	Fase móvil	Proporción fase móvil (%v/v)	Tiempo de corrida	Flujo	Lambda (nm)
1	acetonitrilo/agua	50/50	5 minutos	1 ml/minuto	272
2	acetonitrilo/agua	20/80	5 minutos	1 ml/minuto	272

Para determinar los parámetros de pH, sólidos disueltos y conductividad de las muestras de agua del Río Orinoco utilizadas en la segunda fase experimental, se empleó un dispositivo multitester marca HANNA Instruments, modelo HI98129.

Para someter a agitación a las soluciones de la segunda fase experimental, se utilizó una placha de calentamiento con agitador magnético incorporado de la marca Fisatom, modelo 7534, en el mayor nivel de agitación posible de la misma, el cual produce una agitación de 1180 rpm según las especificaciones del equipo.

5.2 Primera Fase Experimental, Establecimiento de Parámetros

5.2.1 Pruebas de Disolución de la Hidroclorotiazida

Inicialmente se tuvo como opción el utilizar hidroclorotiazida en su presentación comercial de pastillas (concentración nominal de 12,5 mg del principio activo por pastilla), por lo que se realizaron pruebas para evaluar la repetibilidad del proceso de disolución de las mismas. Para ello, se prepararon 3 soluciones disolviendo una pastilla del compuesto en 100 ml de una mezcla de acetonitrilo/agua destilada 20/80 v/v para cada una de ellas, siendo posteriormente sometidas a 45 minutos en ultrasonido. Una vez preparadas, estas soluciones fueron analizadas por HPLC utilizando el set de parámetros 1 en la tabla 1 y se compararon las áreas en los cromatogramas obtenidos.

Se eligió usar una mezcla 20/80 acetonitrilo/agua como solvente siguiendo lo indicado por Reategui et al (2021) y Amaro et al (2024) con el objetivo de estabilizar las soluciones, y también debido a factores como la solubilidad reducida de la hidroclorotiazida en agua destilada, la posibilidad de que los excipientes presentes en las pastillas afectasen la solubilidad del principio activo, y la necesidad de incluir un compuesto el cual inhibiese cualquier actividad microbiana potencialmente capaz de biodegradar el compuesto.

5.2.2 Evaluación Inicial del Fenómeno de Fotodegradación de la Hidroclorotiazida

Se realizaron ensayos iniciales de fotodegradación de la hidroclorotiazida ante luz solar para obtener una primera evaluación del fotoproceso, esta etapa consistió en 2 sesiones de irradiación.

En la primera sesión, se colocaron las soluciones preparadas en el apartado 5.2.1 en vasos de precipitado de borosilicato transparentes de 30 ml de capacidad hasta alcanzar la marca de aforo superior de los mismos (25 ml), los laterales de estos recipientes fueron cubiertos con cartulina negra para impedir la entrada de luz solar a través sus costados y limitar la zona de entrada de luz únicamente al tope de estos, y los topes fueron cubiertos con papel film (conocido coloquialmente como envoplast) para evitar el ingreso de partículas contaminantes a la solución sin impedir la entrada de luz solar. Una vez hecho esto, las soluciones fueron irradiadas durante 5 horas ante luz solar (de 10 am a 3 pm), almacenadas a oscuras y finalmente analizadas por HPLC tras transcurrir un día siguiendo el set de parámetros 1 en la tabla 1.

En la segunda sesión se realizaron nuevos ensayos de irradiación en condiciones distintas. Esta vez se preparó una solución madre de hidroclorotiazida de 75 mg/L de concentración, disolviendo para ello pastillas enteras de este fármaco en una solución acetonitrilo/agua 20/80 v/v y sometiénola a 45 minutos de ultrasonido, y se prepararon 4 ensayos a partir de esta, de los cuales uno se mantuvo a oscuras y tres fueron irradiados con luz solar durante 5 horas (de 10 am a 3 pm). No se cubrieron en esta oportunidad los laterales de los recipientes, esto para aumentar la cantidad de luz solar que entraba en contacto con la solución e incrementar la velocidad del proceso de fotodegradación. Una vez finalizada la irradiación, los ensayos fueron almacenados a oscuras y analizados por HPLC tras transcurrir un día, esta vez utilizando el set de parámetros 2 en la tabla 1 con el objetivo de obtener una mejor separación entre los picos de los cromatogramas generados al utilizar un eluyente de mayor polaridad.

5.2.3 Restitución del Solvente

Debido a que durante cada sesión de irradiación se perdía parte del solvente por evaporación, tras finalizar cada sesión se agregó a cada ensayo irradiado el mismo solvente utilizado para volver a llenar cada recipiente hasta la misma marca de aforo a

la que habían sido llenados previo a la irradiación, y evitar así variaciones significativas en la concentración ocasionadas por diferencias en la cantidad de solvente.

5.2.4 Siembra de Solución No Irradiada Para Identificar Pico Correspondiente a la Hidroclorotiazida en Cromatogramas

La interpretación de los datos se haría en base a las disminuciones de área del pico representativo de la hidroclorotiazida en los distintos cromatogramas, y debido a que tras la irradiación era posible la aparición de nuevos picos en estos, surgió la necesidad de confirmar cual de todos los picos presentes en los cromatogramas de los ensayos irradiados correspondían al compuesto original. Para ello, se realizó una siembra de la solución no irradiada en uno de los ensayos irradiados de la solución de prueba preparada en el apartado 5.2.2 en proporción 50% v/v, y se analizó esta mezcla por HPLC para observar cual de los picos aumentaba en área en el cromatograma de la mezcla respecto a los picos de los cromatogramas de las soluciones irradiadas.

5.2.5 Estudio de la Influencia de la Temperatura

Para corroborar que los cambios vistos en las soluciones irradiadas estaban siendo causados por los fotones incidentes sobre la hidroclorotiazida y no por el aumento de temperatura que tenía lugar durante la irradiación, se preparó un nuevo ensayo a partir de la solución de prueba preparada en el apartado 5.2.2, el cual se colocó a oscuras en una plancha de calentamiento a 50 °C durante 5 horas, tras lo cual se retiró y se observó en búsqueda de cambios de coloración que indicaran si había ocurrido en ausencia de luz solar el mismo proceso que había tenido lugar en los ensayos irradiados.

5.2.6 Selección Entre Luz Solar o Luz Artificial en Cámara de Irradiación

Se construyó una cámara de irradiación con el objetivo de poder irradiar las soluciones en condiciones controladas, reproducibles y constantes.

La función principal de la cámara de irradiación sería el permitir someter a irradiación a las muestras con el tipo de luz seleccionado mientras se evitaba el contacto entre estas y la luz del exterior, para lo cual se construyó la misma tomando como guía la cámara de irradiación utilizada por Zeng et al (2009) con modificaciones. Se utilizó una sola longitud de onda durante la irradiación en la cámara, teniendo como fuente de emisión una una bombilla cilíndrica de luz UV-A acoplada al cuerpo de la cámara (figura 6) la cual era encendida utilizando corriente alterna mediante un mecanismo de balastro. Para construir el cuerpo de la cámara se utilizó un recipiente cúbico de anime cubierto en su superficie interna por pintura mate de color negro, esto con el propósito de minimizar cualquier efecto de reflexión lumínica que pudiera darse en el interior de la misma. Para mayor seguridad, se trabajó en una habitación cerrada con luz tenue. La distancia de las muestras a la fuente lumínica fue siempre constante.

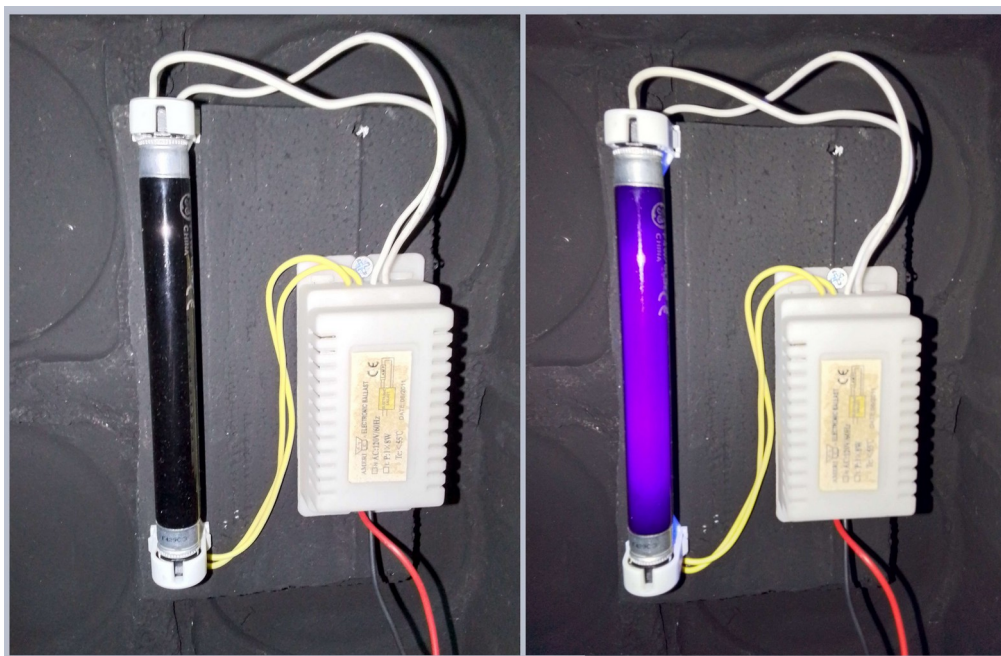


Figura 6. Mecanismo de iluminación de la cámara de irradiación construida, apagado (izquierda) y encendido (derecha)

Una vez construida esta cámara, para evaluar el proceso de fotodegradación dentro de la misma se preparó una nueva solución madre de hidroclorotiazida de concentración 75 mg/L a partir de pastillas del compuesto, disolviéndolas en mezclas de acetonitrilo/agua destilada 20/80 v/v, y se llenaron vasos de precipitado de 30 ml con esta solución madre hasta el aforo de 25 ml para preparar 4 ensayos, 3 de los cuales fueron irradiados dentro de la cámara durante 48 horas, mientras que el cuarto ensayo se mantuvo a oscuras a modo de control para poder evaluar los cambios producidos por la irradiación. Estos 4 ensayos fueron analizados por HPLC con el set de parámetros 2 en la tabla 1 y se compararon los resultados obtenidos con los de los ensayos previos realizados con luz solar.

5.3 Segunda Fase Experimental: Estudio del Efecto de la Agitación y de la Presencia de Microplásticos

Una vez concluida la primera fase de determinación de parámetros se procedió con la fase final de experimentación, en la cual se utilizaron soluciones preparadas con agua del Río Orinoco y el compuesto hidroclorotiazida puro en lugar de agua destilada y pastillas del compuesto.

5.3.1 Caracterización del Agua Natural

Se caracterizó el agua de una muestra de Río Orinoco donada por la profesora Beatriz Angulo de INTEVEP, la cual se indicó fue tomada de la zona Paseo Orinoco. Se determinó la concentración de iones Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} y CO_3^{2-} de la misma, ya que estos factores pueden influir sobre el desarrollo de la fotólisis (Fernández-Perales et al., 2020; Uzelac et al, 2022). Para ello, se emplearon las siguientes técnicas:

Cl⁻ : Titulación con nitrato de plata e indicador de cromato de potasio (método Mohr, metodología basada en ISO-9297).

Mg²⁺ y Ca²⁺ : Determinación de dureza por titulación con EDTA, usando negro de eriocromo T y azul de hidroxinaftol como indicadores (metodología basada en ISO-6059).

CO₃²⁻ : Determinación de alcalinidad total mediante titulación con H₂SO₄, usando fenolftaleina y naranja de metilo como indicadores (metodología basada en ISO-9963).

pH, sólidos disueltos totales y conductividad : Se utilizó el multítester electrónico descrito en el apartado 5.1.

5.3.2 Tamizado de los Microplásticos

Se utilizaron pellets de poliestireno no expandido nuevos (sin desgaste ni uso previo) en las experiencias, los mismos fueron tamizados utilizando un tamíz N^o4 (malla de 4,75 mm) para asegurar que tuvieran un diámetro menor a 5 mm y cumplieran con la definición de microplástico.



Figura 7 (izquierda). Poliestireno no expandido utilizado en los experimentos.

Figura 8 (derecha). Tamiz utilizado para escoger los microplásticos de poliestireno.

Se pesaron y agregaron a cada una de las soluciones destinadas a contener microplásticos un total de 30 pellets de poliestireno traslúcido no expandido, los cuales fueron suficientes para cubrir el fondo de los recipientes donde estaban contenidas las soluciones.

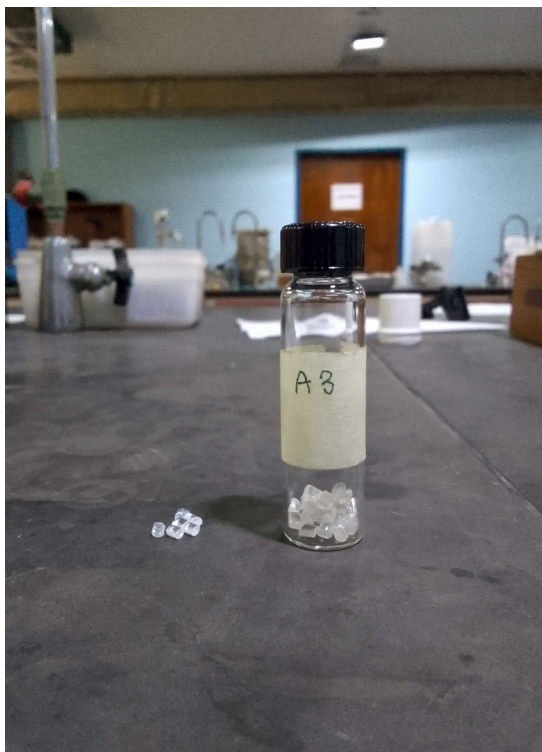


Figura 9. Porción de 30 pellets de poliestireno pesados almacenados en un vial

5.3.3 Preparación de las Soluciones de Hidroclorotiazida

Se preparó una solución madre de hidroclorotiazida pesando para ello 16 mg del compuesto puro y disolviéndolos en una mezcla de acetonitrilo/agua natural del Río Orinoco 20/80 v/v (el propósito principal del acetonitrilo es tanto promover la solubilidad de la hidroclorotiazida, como inhibir cualquier posible acción microbiana en la solución capaz de alterar la concentración del compuesto al biodegradarlo).

Se prepararon 8 ensayos a partir de esta solución madre (cada uno de 25 ml de dicha solución) para ser expuestos ante distintas condiciones durante el resto de la segunda fase experimental. 4 de estos ensayos se prepararon según las especificaciones de la tabla 2 y fueron destinados a ser sometidos a irradiación. Y otros 4 se prepararon de nuevo según lo indicado en esta tabla y fueron destinados a permanecer a oscuras mientras los anteriores eran irradiados, esto con el propósito de servir como controles no irradiados que permitieran evaluar los efectos de la luz sobre la hidroclorotiazida para cada uno de los tipos de ensayo.

Tabla 2. Ensayos evaluados

	Sin agitación	Con agitación
Sin microplásticos	Ensayo tipo A	Ensayo tipo B
Con microplásticos	Ensayo tipo C	Ensayo tipo D

5.3.4 Irradiación de las Soluciones

Cada uno de los ensayos preparados fueron contenidos en vasos de precipitado traslúcidos de borosilicato con capacidad volumétrica de 30 ml, y la boca de estos fue cubierta por una capa de envoplast. Aquellos ensayos destinados a ser irradiados fueron expuestos durante 5 horas ante la luz solar (de 10 am a 3 pm), mientras que el resto permanecieron a oscuras en ausencia de luz solar en condiciones similares a las especificadas en la tabla 2. Una vez concluido el tiempo de irradiación, todos los ensayos (tanto los irradiados como los no irradiados) fueron almacenados a oscuras durante la noche para poder ser analizados mediante HPLC al siguiente día.

5.3.5 Monitoreo de la Temperatura y la Irradiancia Durante el Proceso de Irradiación

Se colocó agua destilada dentro de un vaso de precipitado en la misma zona donde fueron irradiados los ensayos, y se tomó la temperatura de esta cada 30 minutos

mientras transcurría el proceso de irradiación. La irradiancia de la zona donde se hizo la irradiación (el tejado del edificio del Instituto de Ciencias de la Tierra de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela) se anotó durante el proceso de irradiación (realizado entre los meses de septiembre y octubre del año 2023) cada media hora a partir de los datos de monitoreo mostrados en la página web <https://www.windy.com/> para esta zona, (se puede ver un ejemplo de esto en la figura 10), y una vez finalizado el proceso, se promediaron los datos de temperatura e irradiancia para ser reportados.

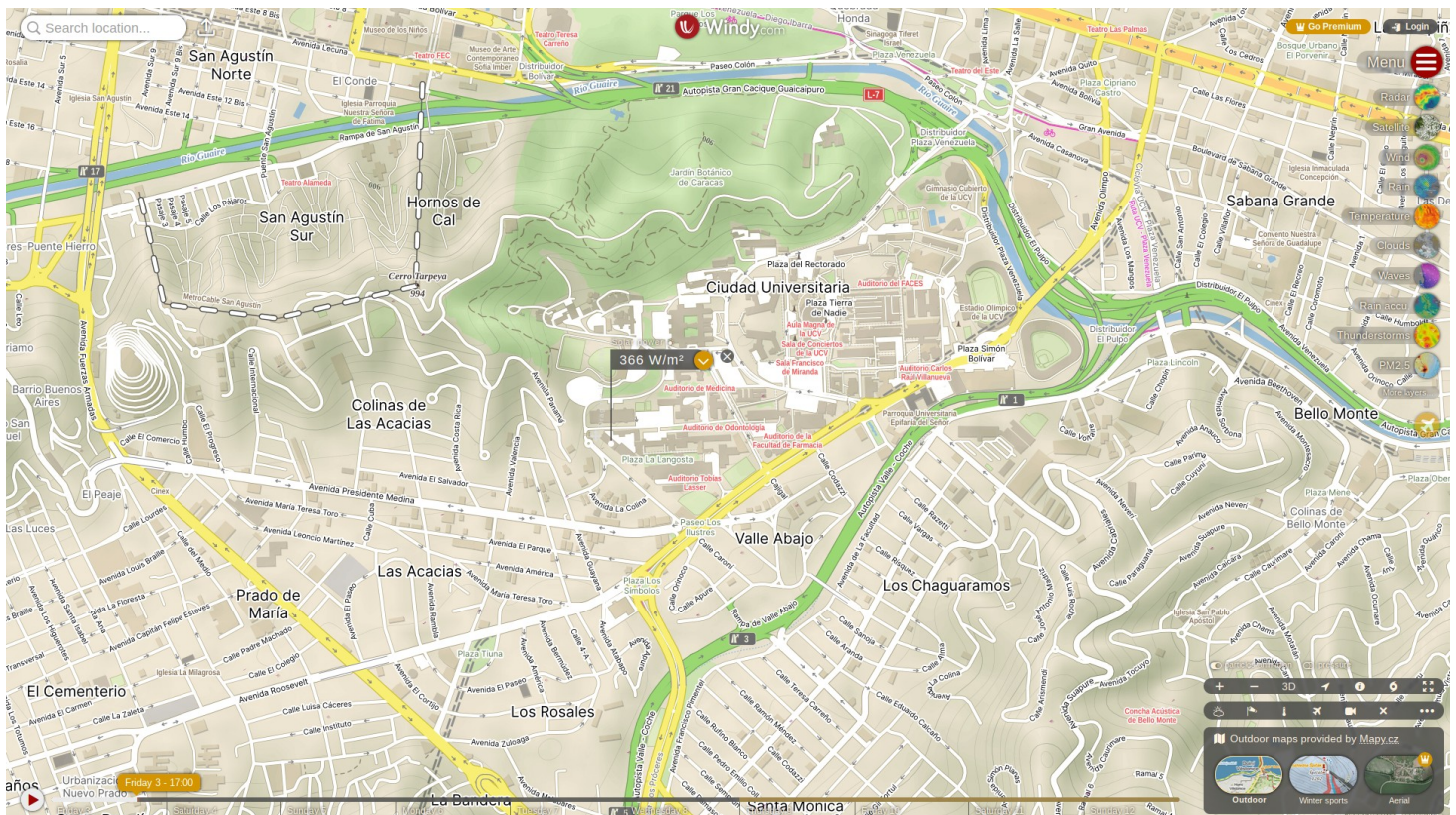


Figura 10. Vista de monitoreo de irradiancia de la página web windy.com

5.3.6 Análisis de las Soluciones con HPLC

Cada uno de los 8 ensayos procesados fueron filtrados con filtros de nylon de 0,22 micrómetros para HPLC y analizados por HPLC siguiendo el set 2 de parámetros en la tabla 1.

5.3.7 Evaluación del efecto de variabilidad climática

Para estudiar el fenómeno a distintas condiciones climáticas, todo el proceso descrito anteriormente para esta segunda fase experimental fue realizado 3 veces, cada una en un día distinto con condiciones climáticas diferentes, preparando cada vez una solución madre nueva y sus 8 ensayos correspondientes según lo especificado en la tabla 2 (4 irradiados y 4 conservados a oscuras).

5.3.8 Cuantificación y Tratamiento de Datos

Una vez obtenidos los cromatogramas de cada uno de los ensayos analizados, se calcularon las áreas bajo la curva del pico asociado a la hidroclorotiazida de cada uno de ellos, utilizando para esto la funcionalidad de integración de áreas del software del equipo de HPLC (delimitando manualmente la zona de la curva a ser integrada), y posteriormente se calcularon las tasas de fotodegradación del compuesto a partir de estas áreas siguiendo el procedimiento mostrado en el anexo 3.

Debido a que las áreas bajo la curva en los cromatogramas son proporcionales a la concentración del compuesto, y a que los cambios relativos en la concentración de este se podían evaluar a partir de los cambios de estas áreas directamente, se optó por hacer esto en lugar de determinar los valores concretos de concentración a partir de las áreas con la ayuda de curvas de calibración.

Para determinar la incertidumbre asociada a las áreas, se calculó la desviación estandar del área del pico asociado a la hidroclorotiazida en el cromatograma de un triplicado de ensayos de tipo A (los cuales consistían únicamente el compuesto en agua de río) irradiados, y de un triplicado de ensayos no irradiados de ese mismo tipo en cada uno de los días de experimentación, y se utilizaron estas desviaciones estándar como el estimado de la incertidumbre para resto de los ensayos del mismo día.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación de Parámetros de Experimentación

6.1.1 Disolución de la Hidroclorotiazida

Al intentar disolver las pastillas de hidroclorotiazida en agua destilada, estas se disgregaban en su totalidad, pero invariablemente luego del proceso permanecía en el fondo de los recipientes un polvo blanco el cual no lograba disolverse. Se contempló la posibilidad de que el residuo blanco no fuera en sí el principio activo, sino algún material poco soluble de los excipientes de la pastilla, como por ejemplo la celulosa, la cual es una de las sustancias más utilizadas con este propósito (Thoorens et al. 2014), por ello, se decidieron realizar pruebas de solubilidad utilizando como solvente una mezcla de acetonitrilo/agua 20/80 v/v para intentar determinar por HPLC si se había logrado disolver el principio activo en el medio acuoso a pesar de la presencia del polvo blanco.

Se decidió utilizar la mezcla de acetonitrilo/agua como solvente ya que, según lo indicado por Reategui et al (2021), el acetonitrilo simula la presencia de materia orgánica disuelta y favorece la solubilidad de sustancias orgánicas en el medio acuoso (aumentando así la estabilidad de la solución), a la vez que previene la biodegradación del fármaco por la acción de microorganismos potencialmente presentes en el medio (se reporta comúnmente además que la hidroclorotiazida específicamente tiene una solubilidad mejorada en acetonitrilo). Se decidió utilizar una concentración de 20/80 v/v basado en el trabajo de Amaro et al (2024), donde se utilizaron concentraciones similares para mejorar la estabilidad de las soluciones que utilizaron.

A partir de dicha mezcla, se prepararon 3 soluciones de prueba de hidroclorotiazida (denominadas a partir de ahora p1, p2 y p3) de 125 mg/L de concentración cada una, usando pastillas enteras del compuesto en su presentación comercial de 12,5 mg por pastilla, destinadas a ser analizadas mediante HPLC para

determinar la presencia del principio activo de las pastillas en el medio acuoso tras el proceso de disolución, y para obtener así mismo una medida de la repetibilidad de este (esta concentración de 125 mg/L de las soluciones se eligió sin ninguna razón particular más que de tener una concentración relativamente baja la cual fuera un múltiplo entero de la concentración nominal del principio activo de las pastillas en su presentación comercial, para así poder utilizar pastillas enteras sin tener que triturarlas y pesarlas). Los resultados de estos análisis se muestran en los cromatogramas 1, 2 y 3 (figuras 11, 12 y 13 respectivamente) para cada una de estas soluciones. El polvo blanco el cual se asumió era celulosa no logró disolverse con la mezcla de solventes utilizados, mas sin embargo, según lo mostrado en los cromatogramas esto no parece haber impedido la disolución del principio activo en el medio acuoso.

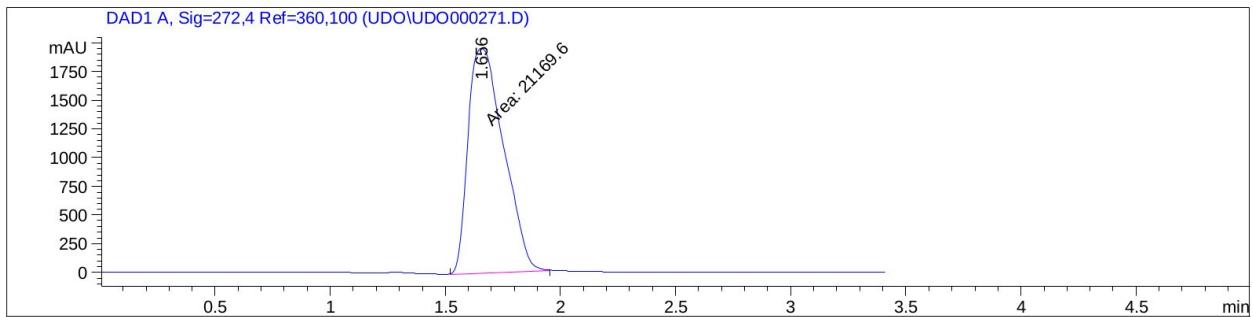


Figura 11. Cromatograma 1: solución p1 sin irradiar

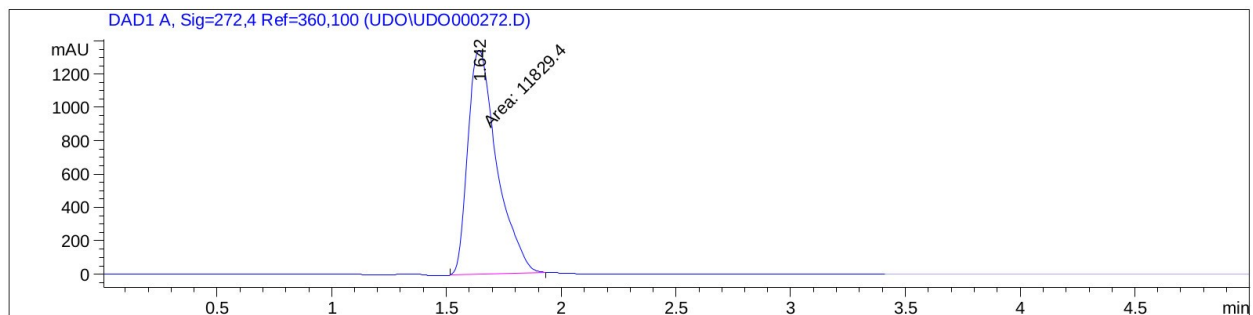


Figura 12. Cromatograma 2: solución p2 sin irradiar

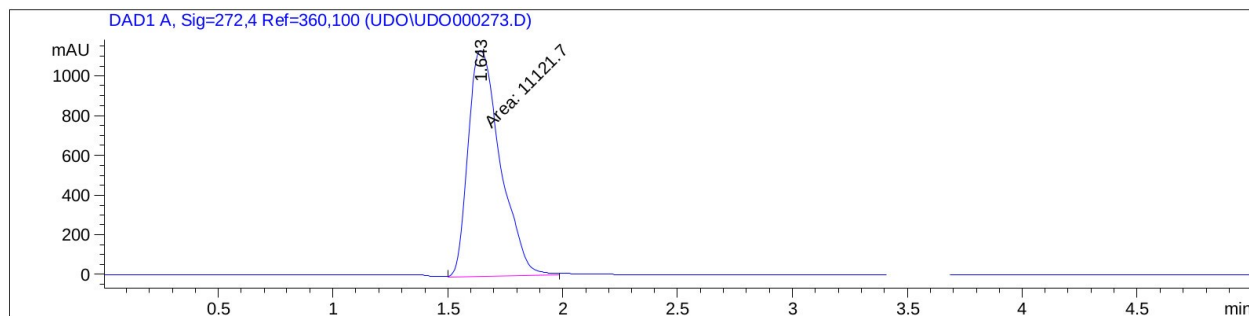


Figura 13. Cromatograma 3: solución p3 sin irradiar

En las figuras 11, 12 y 13 se logró observar la presencia de picos, se calculó el área bajo la curva de cada uno de estos con el software del equipo de HPLC y sus valores se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Medición con HPLC de para pruebas de disolución

Solución	Área (mAU*s)	Mediana	Rango de valores
p1	21170	11829	(11122 - 21170)
p2	11829		
p3	11122		

Las cifras de la tabla 3 indicaron una gran variabilidad en el proceso de disolución de las pastillas, lo cual hizo que se prefiriera la utilización del principio activo puro para los ensayos finales en agua de río. Sin embargo, se siguieron utilizando soluciones preparadas a partir de pastillas del compuesto durante esta fase inicial de determinación de parámetros debido a su mayor facilidad de adquisición en comparación al compuesto puro. Las posibles razones de esta variabilidad en el proceso de disolución de las pastillas pudieran tener que ver con la sorción del principio activo en el residuo blanco proveniente de los excipientes, y con el proceso mismo de fabricación del producto.

6.1.2 Primera Evaluación del Fotoproceso

Las soluciones p1, p2 y p3 fueron irradiadas con luz solar durante 5 horas para observar qué cambios experimentaba la hidroclorotiazida en el medio acuoso tras el proceso. Estas soluciones se almacenaron a oscuras luego de la irradiación y al transcurrir un día se analizaron mediante HPLC, obteniendo los cromatogramas presentados en las figuras 14, 15 y 16:

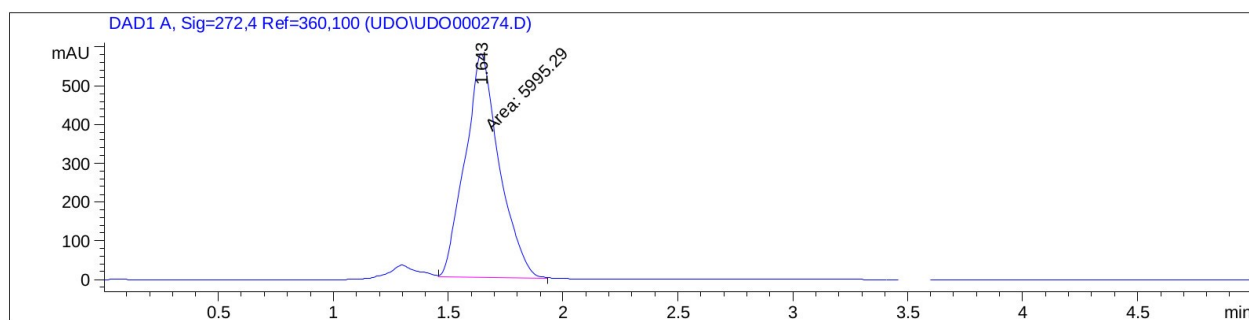


Figura 14. Cromatograma 4: solución p1 irradiada

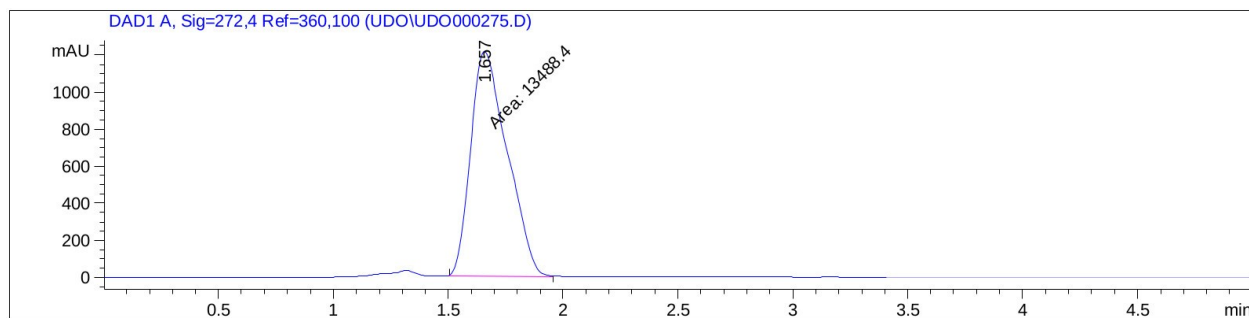


Figura 15. Cromatograma 5: solución p2 irradiada

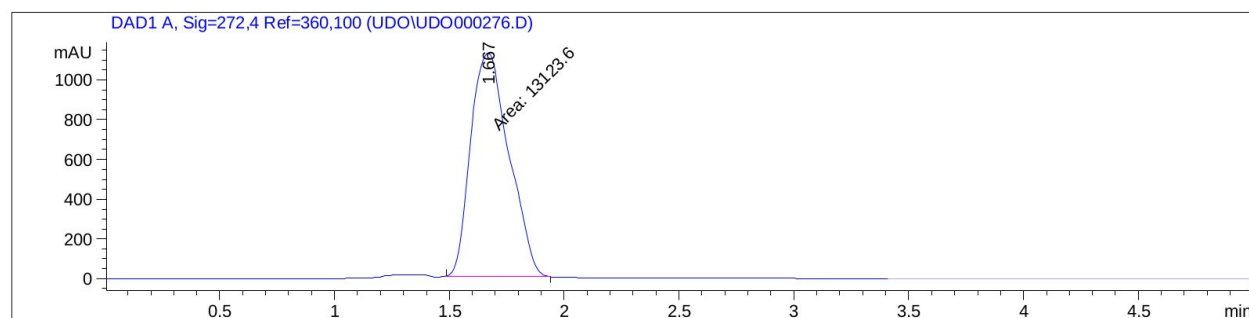


Figura 16. Cromatograma 6: solución p3 irradiada

En la tabla 4 se muestran los cambios en el área bajo la curva para estos cromatogramas al ser comparados con los de las soluciones sin irradiar.

Tabla 4. Resultados de análisis por HPLC de soluciones fotodegradadas preparadas a partir de pastillas del hidrocortiazida

Solución	tr solución no irradiada (min)	tr solución irradiada (min)	Área solución no irradiada (mAU*s)	Área solución irradiada (mAU*s)	% de fotodegradación
p1	1,656	1,643	22015	6175	71,95
p2	1,642	1,657	12497	13600	-8,83
p3	1,643	1,667	11290	13412	-18,80

En estos cromatogramas se observa la aparición de un nuevo pico de poco tamaño (mucho más evidente en la figura 14) el cual posiblemente corresponda a algún producto de fotodegradación generado durante el proceso de irradiación, y adicionalmente, puede observarse una abrupta disminución del pico de mayor tamaño en la solución p1 (figura 14 respecto a figura 11), indicando lo que pareciera ser una gran tasa de fotodegradación para esta solución. Por otro lado, en las demás soluciones (figura 15 respecto a figura 12, y figura 16 respecto a figura 13) el área del pico mayor aumentó en lugar de disminuir, lo que pareció indicar que se habían formado productos de fotodegradación los cuales debido a no poder separarse correctamente en el cromatograma a las condiciones en las que fue realizado el análisis, estaban ocasionando un solape de picos, y, debido a esto tenía lugar el aparente incremento observado en las áreas.

Los resultados obtenidos indicaron que el proceso de irradiación debía modificarse, pues no estaba afectando de manera uniforme a las soluciones. También debían modificarse los parámetros de análisis con el equipo de HPLC, ya que muy

posiblemente no estaban logrando separarse bien los picos asociados a los productos de fotodegradación generados durante el proceso de irradiación de las soluciones. Las soluciones utilizadas se apartaron y se almacenaron a oscuras mientras se seguía con la experimentación, sin embargo, tras un mes y seis días al volver a revisarlas, se observó que las soluciones que habían sido irradiadas habían adquirido una coloración amarilla, mientras que las que no habían sido irradiadas habían permanecido incoloras. Esto fue indicativo de que posiblemente al irradiar las soluciones se inició en ellas un proceso de degradación autocatalítico de la hidroclorotiazida el cual continuó avanzando aun a oscuras, y este proceso ocurrió solamente en las soluciones que fueron irradiadas, por lo que se decidió analizarlas de nuevo dando como resultado los cromatogramas presentes en las figuras 17, 18 y 19:

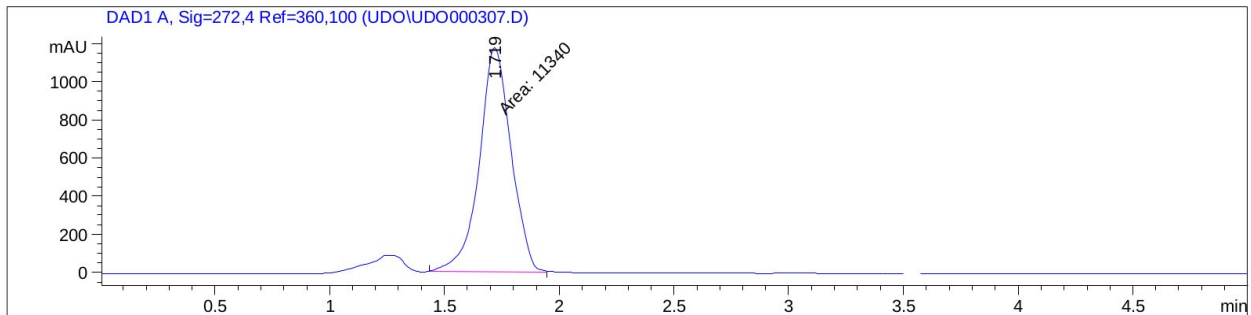


Figura 17. Cromatograma 7: solución p1 irradiada (re-análisis)

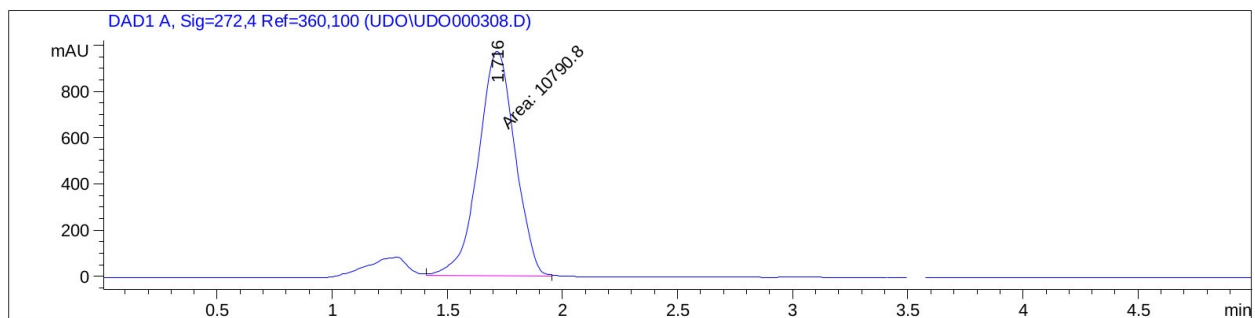


Figura 18. Cromatograma 8: solución p2 irradiada (re-análisis)

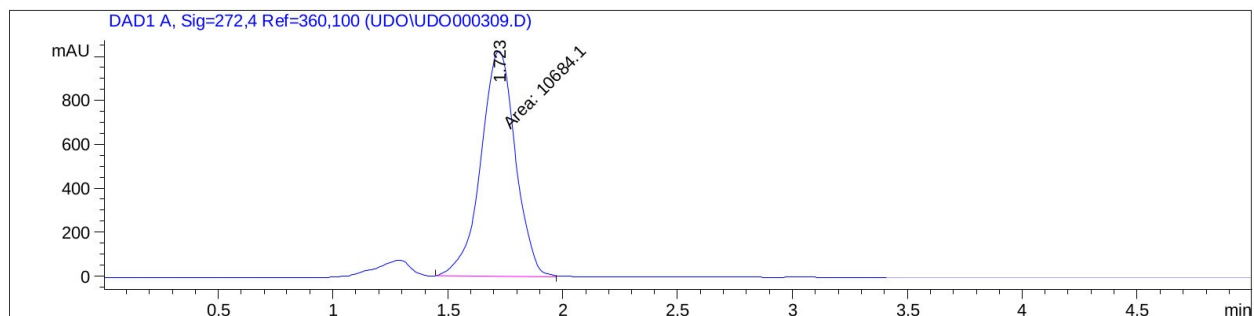


Figura 19. Cromatograma 9: solución p3 irradiada (re-análisis)

En la Tabla 5 se puede apreciar la comparación entre las áreas de estos cromatogramas y los obtenidos previo al mes de almacenamiento.

Tabla 5. Comparación de áreas para las soluciones irradiadas antes y luego de adquirir coloración amarilla

Solución	tr solución sin color (min)	tr solución coloreada (min)	Área sin color (mAU*s)	Área tras adquirir color (mAU*s)	% de degradación sin color	% de degradación tras color
p1	1,643	1,719	6175	11340	71,95	48,49
p2	1,657	1,716	13600	10791	-8,83	13,65
p3	1,667	1,723	13412	10684	-18,80	5,37

Se puede observar que el área bajo la curva disminuyó para las soluciones 2 y 3 coloreadas respecto a los cromatogramas anteriores obtenidos cuando estas soluciones aún no habían adquirido la coloración (figura 19 respecto a figura 16, y figura 18 respecto a figura 15), mientras que para la solución 1, esta pareció aumentar (figura 17 respecto a figura 14), además de un ligero aumento en el tiempo de retención, indicando que posiblemente se habían generado durante el tiempo a oscuras

nuevos productos de fotodegradación los cuales estaban siendo detectados ahora en el cromatograma y ocasionaban el aumento observado en el área del pico.

Debido al tiempo transcurrido entre los análisis sin coloración y los análisis luego de que las soluciones irradiadas adquirieran la coloración, en principio no pueden compararse estos resultados directamente, sin embargo, es interesante notar que luego de haber adquirido la coloración, las áreas del pico principal en las 3 soluciones parecieron estabilizarse mejor alrededor de un valor promedio respecto a las soluciones irradiadas previo a que adquirieran la coloración.

Se quiso intentar replicar estos cambios para poder discernir si los mismos se debían en efecto al proceso de fotodegradación o no, por lo que se preparó una solución madre de prueba (denominada a partir de ahora solución p4), utilizando la misma mezcla acetonitrilo/agua como solvente, pero esta vez con una concentración de 75 mg/L de hidrocortiazida, siendo esta menor respecto a las soluciones p1, p2 y p3 con el propósito de intentar producir el cambio de coloración en un menor tiempo, ya que se ha reportado que el proceso de fotodegradación ocurre con mayor rapidez al disminuir la concentración del compuesto. A partir de esta solución madre, se tomó un triplicado destinado a ser expuesto a irradiación solar durante el mismo tiempo que fueron expuestas las soluciones p1 p2 y p3, pero para intentar acelerar el proceso de fotodegradación, no se cubrieron los laterales de los recipientes de irradiación en esta oportunidad, permitiendo así que entrara en contacto una mayor cantidad de luz solar con la solución. Tras las 5 horas de irradiación ante luz solar, se pudo observar que en esta ocasión los triplicados irradiados adquirieron tras solo 5 horas misma tonalidad amarilla que habían adquirido las soluciones p1 p2 y p3 luego del mes de espera, indicando que las medidas tomadas para que el proceso se diera con mayor rapidez fueron efectivas.

Los triplicados irradiados de la solución p4 se almacenaron a oscuras y al transcurrir un día fueron analizados mediante HPLC, usando esta vez para ello como eluyente una solución 20/80 acetonitrilo/agua v/v (tratando de aumentar el carácter

polar de la misma en comparación a la usada previamente), obteniendo los cromatogramas mostrados en las figuras 21, 22 y 23, así como el cromatograma mostrado en la figura 20 correspondiente a la solución p4 sin irradiar:

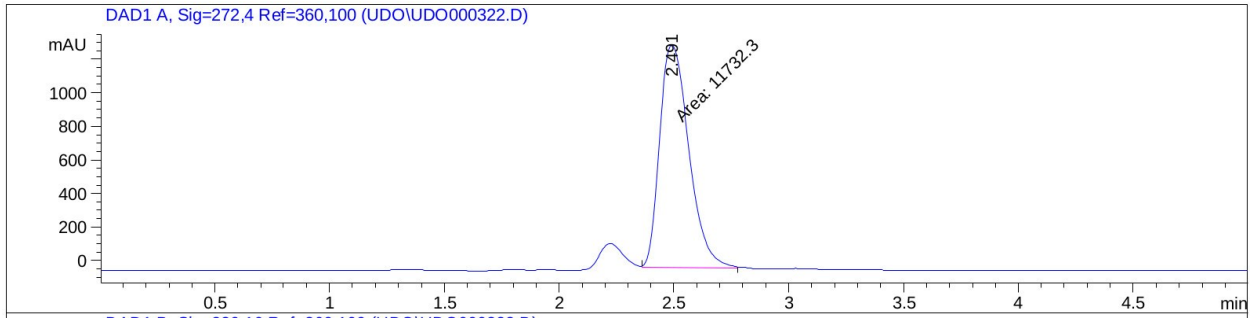


Figura 20. Cromatograma 10: solución p4, ensayo no irradiado

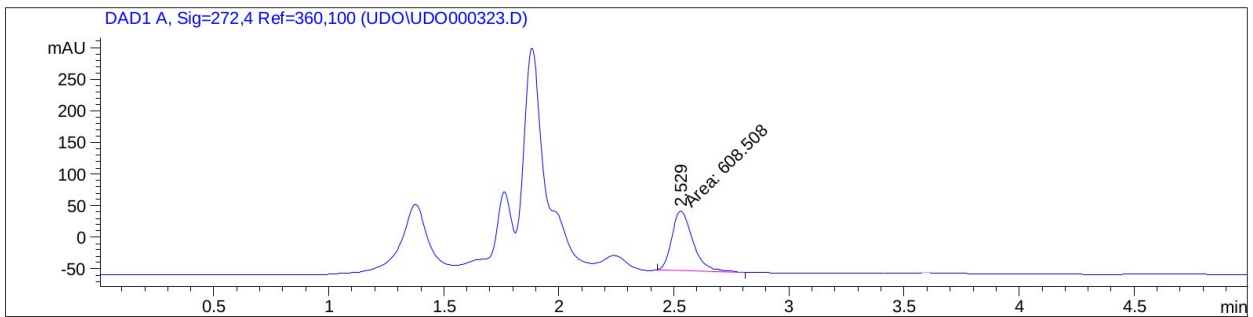


Figura 21. Cromatograma 11: solución p4, ensayo 1 irradiado

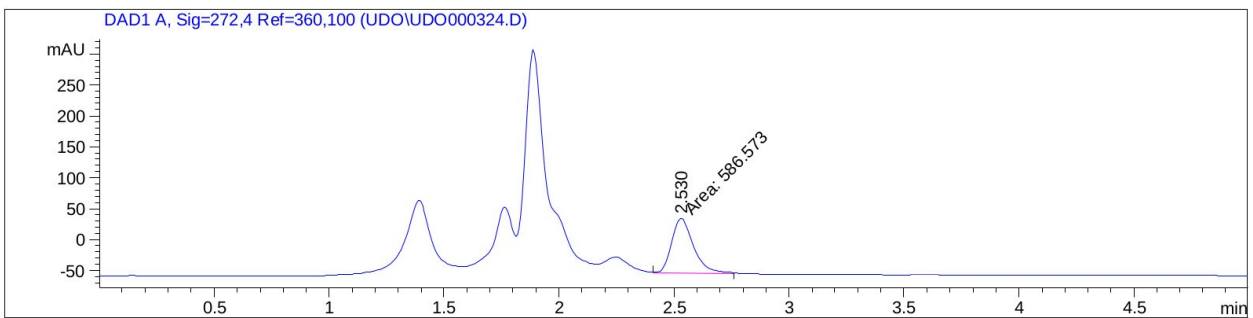


Figura 22. Cromatograma 12: solución p4, ensayo 2 irradiado

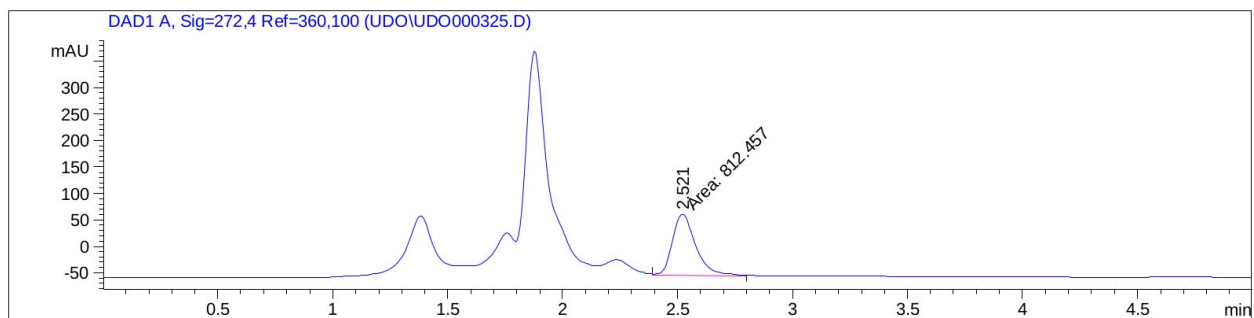


Figura 23. Cromatograma 13: solución p4, ensayo 3 irradiado

Se puede observar que en estos cromatogramas se lograron separar de forma más apropiada los picos correspondientes a las soluciones irradiadas y también a la solución original no irradiada (figura 20), en la que se observa un nuevo pico de menor tamaño el cual no estaba presente en los cromatogramas correspondientes a las soluciones p1 p2 y p3 sin irradiar (figuras 11, 12 y 13), indicando que en esta oportunidad las condiciones de elución fueron más acertadas, pues se logró separar del pico original de lo que pudiera ser un pico asociado a algún excipiente presente en las pastillas, o a algún producto de alteración del fármaco ya presente. En la tabla 6 se encuentran resumidos los valores mostrados en estos cromatogramas.

Tabla 6. Porcentajes de fotodegradación de los ensayos de la solución p4 irradiados ante el sol sin cubrir los laterales de sus recipientes

Ensayo	tr solución no irradiada (min)	tr solución irradiada (min)	Área solución no irradiada (mAU*s)	Área solución irradiada (mAU*s)	% de degradación	% promedio \pm s
1	2,491	2,529	11977	579	95,16	94,7% \pm 0,7%
2		2,530		580	95,16	
3		2,521		729	93,91	

El resultado promedio fue una fotodegradación del $94,7\% \pm 0,7\%$, indicando un alto grado de repetibilidad en los resultados obtenidos. En general, estos resultados sugieren que la presencia de la coloración amarilla en las soluciones tras el proceso de irradiación puede tomarse como indicio de que el proceso de fotodegradación de la hidroclorotiazida ha transcurrido de forma considerable, llegando a fotodegradar casi por completo al compuesto.

En la figura 24 se puede observar una comparación del color de estas soluciones antes y después de ser irradiadas en estas condiciones:



Figura 24. Diferencia de color entre las soluciones antes y luego de ser sometidas a irradiación ante la luz solar.

6.1.3 Siembra de Solución No Irradiada Para Identificar el Pico Correspondiente a la Hidroclorotiazida

En el primer cromatograma (figura 20) de la solución p4 se observa el pico principal asociado a la hidroclorotiazida eluído en un tiempo de 2,491 minutos. Para confirmar que en los cromatogramas de la solución irradiada (figuras 21, 22 y 23) el

pico de menor área que se encontraba cercano a este mismo tiempo de elución correspondía aun al compuesto sin fotodegradar, se realizó una siembra la cual consistió en agregar una cantidad de la solución sin irradiar a la solución irradiada, dando como resultado el siguiente cromatograma de la figura 25:

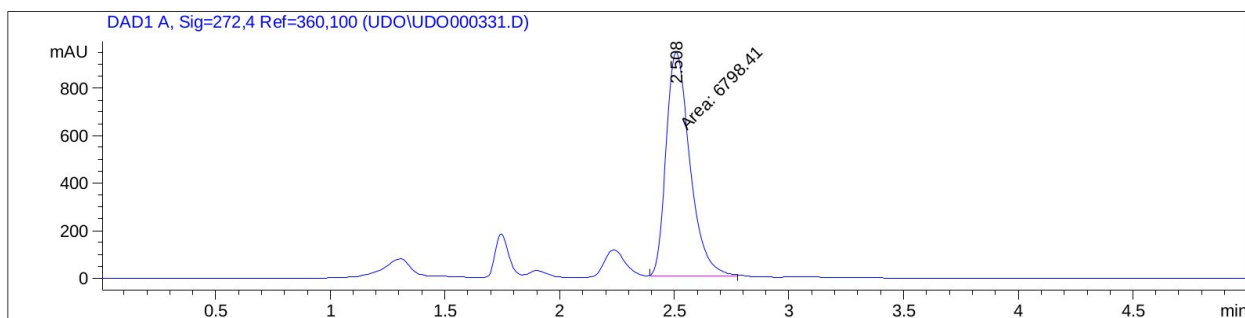


Figura 25. Cromatograma 14: siembra (solución p4, ensayo no irradiado + ensayo 1 irradiado)

En el mismo se puede observar que, al mezclar ambas soluciones, el pico eluido a 2,508 minutos alcanzó un área mayor a la solución irradiada, pero menor a la no irradiada, es decir un área intermedia entre ambos, confirmando así este corresponde a la hidroclorotiazida no fotodegradada en ambos casos. Los valores asociados a esta siembra se ven reflejados en la tabla 7:

Tabla 7. Áreas bajo la curva en prueba de siembra

Condición del ensayo	tr (min)	Área bajo la curva (mAU*s)
no irradiado	2,491	11732
irradiado	2,529	609
siembra	2,508	6798

6.1.4 Influencia de la Temperatura

Cada vez que las soluciones del compuesto eran sometidas a irradiación ante luz solar, estas alcanzaban temperaturas superiores a los 30 °C, por lo que se debía

descartar la posibilidad de que los cambios observados estuviesen siendo ocasionados por los aumentos de temperatura en lugar de por la acción de la luz solar, pues de ser este el caso, no sería una fotoreacción lo que se estaba evidenciando.

Para hacer esto, se realizó otro ensayo preparado a partir de la solución p4, el cual fue sometido a calentamiento a 50 °C a oscuras durante 5 horas. Una vez finalizadas las 5 horas, se pudo observar que esta solución había permanecido completamente transparente y sin ningún rastro de coloración amarilla, a pesar de haber sido expuesta durante el mismo tiempo que los ensayos irradiados previos a temperaturas incluso superiores a las que fueron expuestas estos. En base a esta observación, se descartaron a los aumentos de temperatura que tenían lugar durante el proceso de irradiación ante la luz solar como los responsables de los cambios observados en las soluciones al finalizar el proceso, confirmando que estos eran consecuencia del contacto entre la hidrocortiazida y la luz del sol y que era efectivamente una fotoreacción lo que se estaba evidenciando cuando tenía lugar el cambio de color, pues el proceso no ocurría en ausencia de esta luz.

6.1.5 Diferencia entre la luz artificial y la natural

Una vez se tuvo listo el montaje de la cámara de irradiación acondicionada según lo descrito en la metodología, se preparó una nueva solución madre de prueba de hidrocortiazida (denominada a partir de ahora p5) exactamente igual a la solución p4 (75 mg/L de concentración del compuesto, preparada disolviendo pastillas del compuesto en una solución 20/80 v/v acetonitrilo/agua destilada), a partir de la cual se tomó un triplicado para realizar ensayos en la cámara. Según lo reportado por algunos autores (Brigante et al., 2005), el proceso de fotodegradación se da con mucha mayor rapidéz ante la luz solar que ante luz UV artificial, por lo que se decidió someter a los ensayos preparados a un tiempo de irradiación mayor en la cámara, el cual a modo tentativo se decidió que fueran inicialmente 48 horas con la posibilidad de ser ajustado en pruebas posteriores, mas sin embargo, debido a que transcurrido este tiempo se lograron obtener tasas de fotodegradación relativamente cercanas a las obtenidas tras

las sesiones de irradiación ante la luz solar en las pruebas anteriores, este ajuste no fue necesario.

Al momento de retirar los ensayos irradiados, se evidenció nuevamente en estos la coloración amarilla observada previamente en las soluciones irradiadas con luz solar, indicando que el proceso de fotodegradación había ocurrido exitosamente dentro de la cámara de irradiación. Estos ensayos fueron analizados por HPLC con el set 2 de parámetros especificados en la tabla 1, teniendo como resultado los cromatogramas mostrados en las figuras 26, 27, 28 y 29:

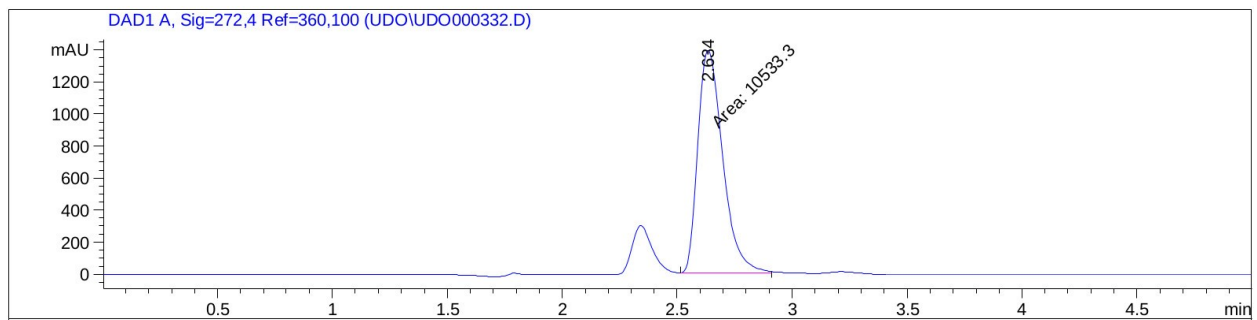


Figura 26. Cromatograma 15: solución p5, ensayo no irradiado

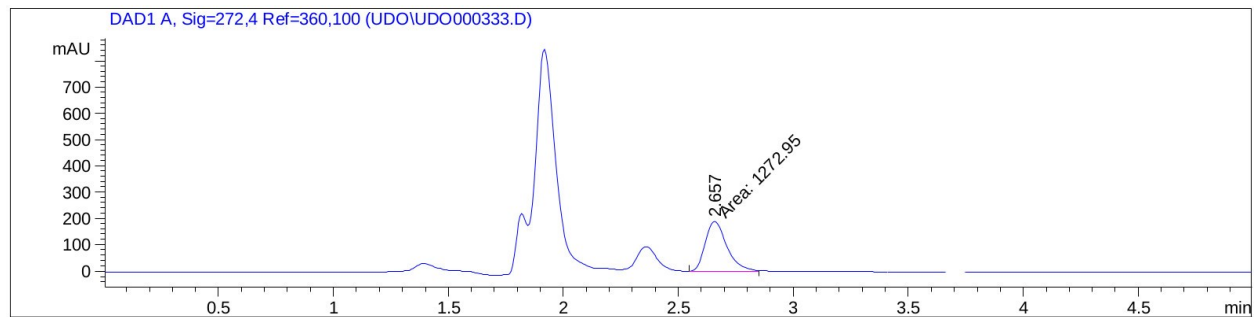


Figura 27. Cromatograma 16: solución p5, ensayo 1 irradiado

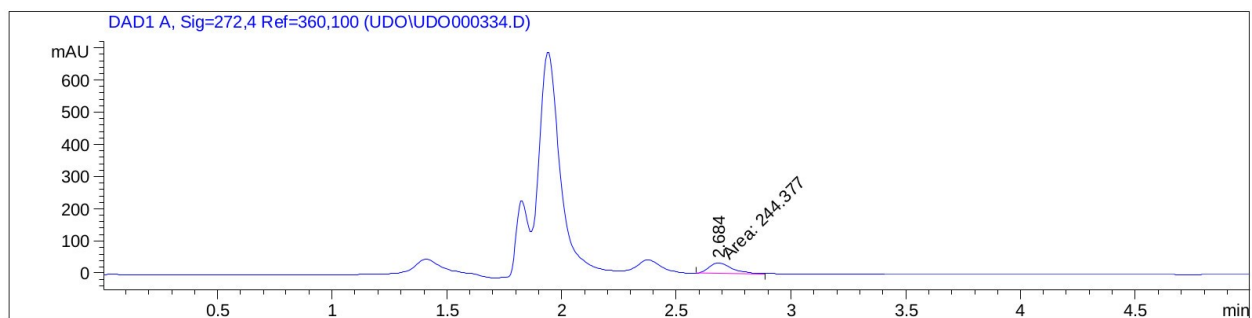


Figura 28. Cromatograma 17: solución p5, ensayo 2 irradiado

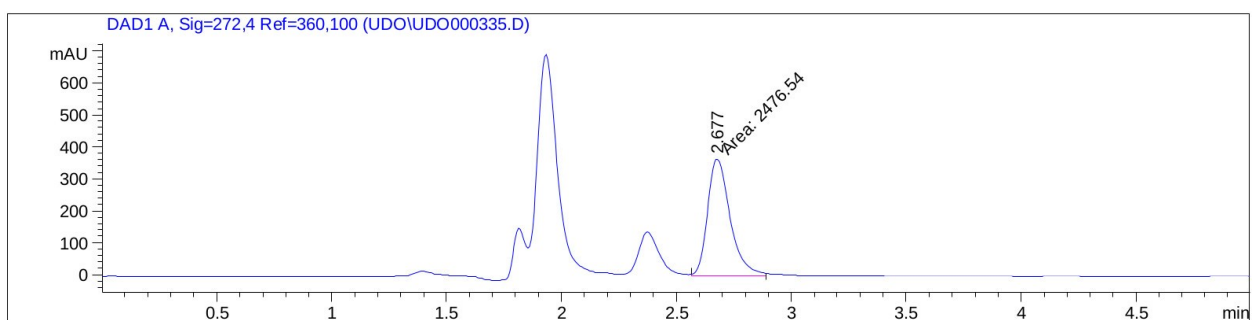


Figura 29. Cromatograma 18: solución p5, ensayo 3 irradiado

En estos cromatogramas se pudo observar un descenso significativo en el área del pico mayor correspondiente a la hidroclorotiazida no fotodegradada, los porcentajes de fotodegradación se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Irradiación de ensayos de la solución p5 en cámara de irradiación

Ensayo	tr1 (min)	tr2 (min)	Área solución no irradiada (mAU*s)	Área solución irradiada (mAU*s)	% de fotodegradación	Fotodegradación promedio \pm s
1	2,634	2,657	10559	1211	88,53	86% \pm 11%
2		2,684		401	96,21	
3		2,677		2624	75,14	

La fotodegradación promedio fue del $86\% \pm 11\%$, y a pesar de que se logró observar el fenómeno de fotodegradación de forma satisfactoria, la tasa de fotodegradación tuvo una mayor variabilidad en estos ensayos en comparación a los ensayos previos realizados con luz solar. Los factores que pudieron haber influido en mayor medida fueron posiblemente el posicionamiento de las soluciones respecto a la lámpara dentro de la cámara de irradiación, así como el grado de uniformidad de la emisión lumínica de la lámpara (es decir, que la misma no emitiera luz UV con la misma intensidad a lo largo de toda su extensión). En la figura 30 se muestra un esquema del montaje.

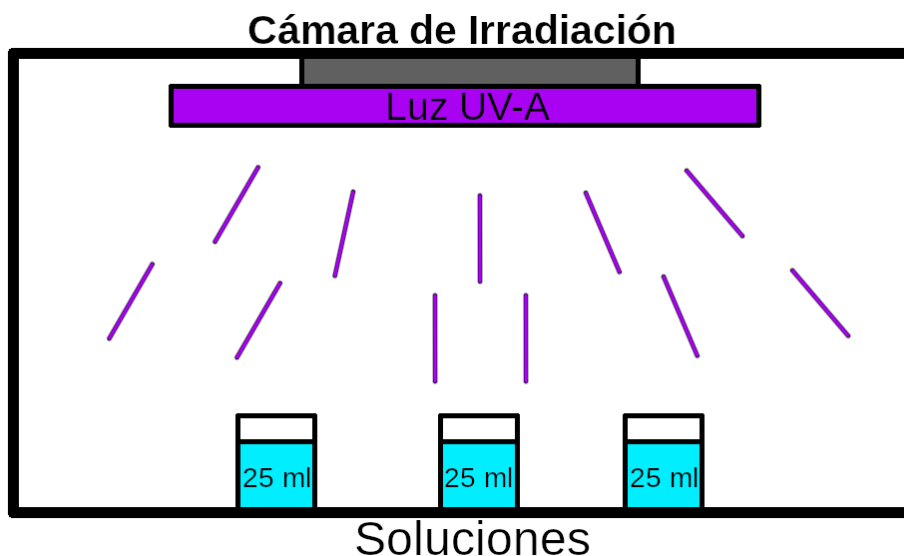


Figura 30. Esquema del montaje experimental en la cámara de irradiación.

En general, la geometría de la cámara y la disposición de las soluciones dentro de la misma parecen ejercer una influencia significativa sobre la intensidad del proceso de fotodegradación. Como recomendación, en ensayos que utilicen diseños similares convendría procesar un ensayo a la vez siendo este colocado siempre en la misma zona de la cámara.

Debido a lo expuesto anteriormente, se prefirió utilizar la luz solar natural como fuente lumínica en las pruebas finales de la segunda fase experimental, ya que los

resultados observados en la tabla 6 de la solución p4 (la cual se sometió a irradiación ante la luz solar) mostraron rangos de intensidad de fotodegradación menos amplios para los ensayos irradiados, con un valor de desviación estándar bastante bajo, lo que indica que se tuvo un mayor nivel de repetibilidad al utilizar este tipo de luz.

En la tabla 9 se coloca un resumen de las soluciones de prueba utilizadas en esta fase de experimentación inicial.

Tabla 9. Soluciones de prueba utilizadas en la primera fase experimental

Solución	Solvente	Presentación HCTZ usada (mg/pastilla)	Concentración HCTZ (mg/L)
p1	acetonitrilo/agua destilada 20/80 v/v	12,5	125
p2	acetonitrilo/agua destilada 20/80 v/v	12,5	125
p3	acetonitrilo/agua destilada 20/80 v/v	12,5	125
p4	acetonitrilo/agua destilada 20/80 v/v	12,5	75
p5	acetonitrilo/agua destilada 20/80 v/v	12,5	75

6.1.6 Evaluación del Efecto de los Excipientes

Mientras que todas las soluciones de la fase inicial habían sido preparadas a partir de pastillas de hidroclorotiazida, para los ensayos de la segunda fase se utilizaron soluciones preparadas a partir del compuesto puro. Una diferencia importante entre las soluciones preparadas a partir de estas dos presentaciones distintas del compuesto es la presencia de excipientes en las pastillas del mismo, por lo que se evaluó el posible efecto de estos comparando para ello los cromatogramas de dos soluciones distintas, una preparada a partir de pastillas del compuesto, y la otra preparada a partir del compuesto puro. Se colocan a continuación los cromatogramas de la solución p4 (sin irradiar en la figura 20 e irradiada en la figura 21), la cual fue preparada a partir de pastillas del compuesto, y los de una de las soluciones procesadas en la fase final de experimentación (en concreto, los del ensayo de tipo A del tercer día de experimentación), la cual fue preparada a partir del compuesto puro (sin irradiar en la figura 31 e irradiada en la figura 32).

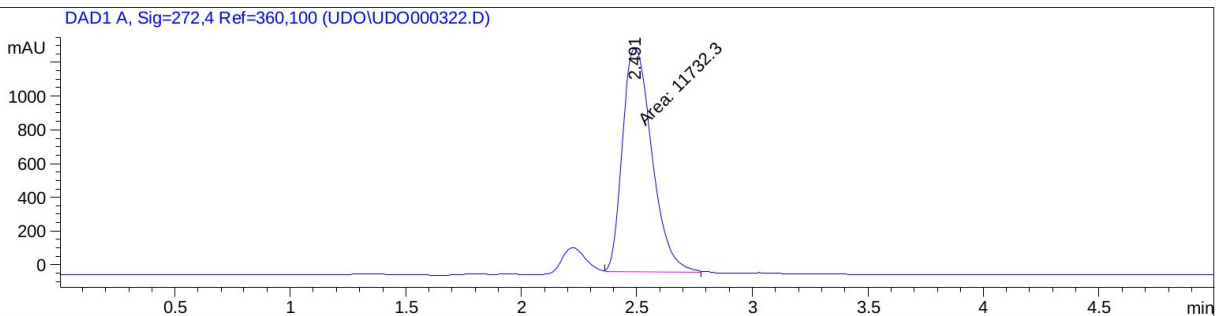


Figura 20. Cromatograma 10: solución p4, ensayo no irradiado

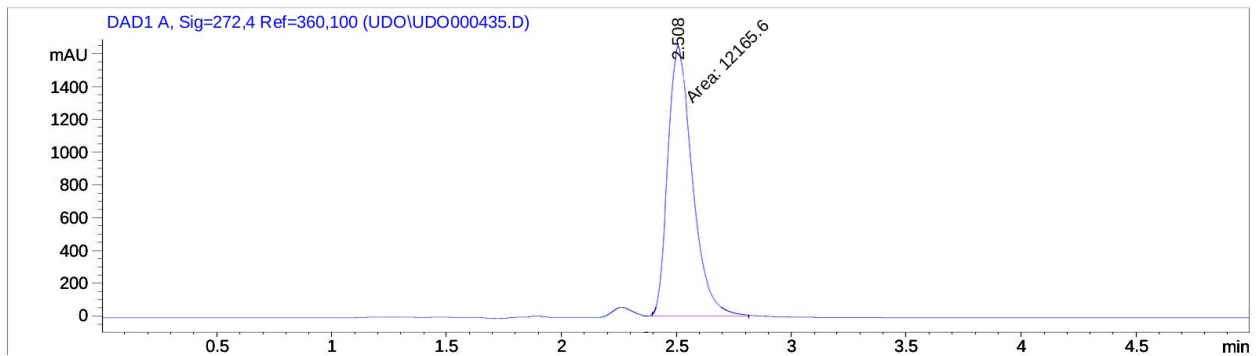


Figura 31, Cromatograma 19: ensayo tipo A del tercer día no irradiado

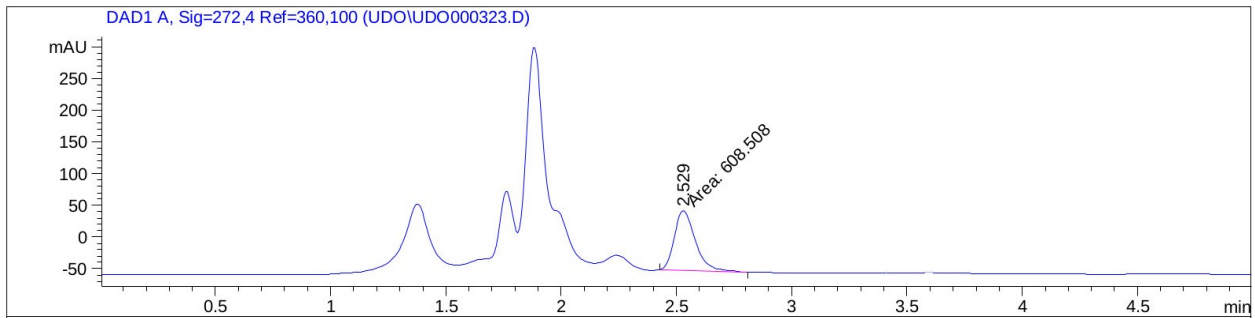


Figura 21. Cromatograma 11: solución p4, ensayo 1 irradiado

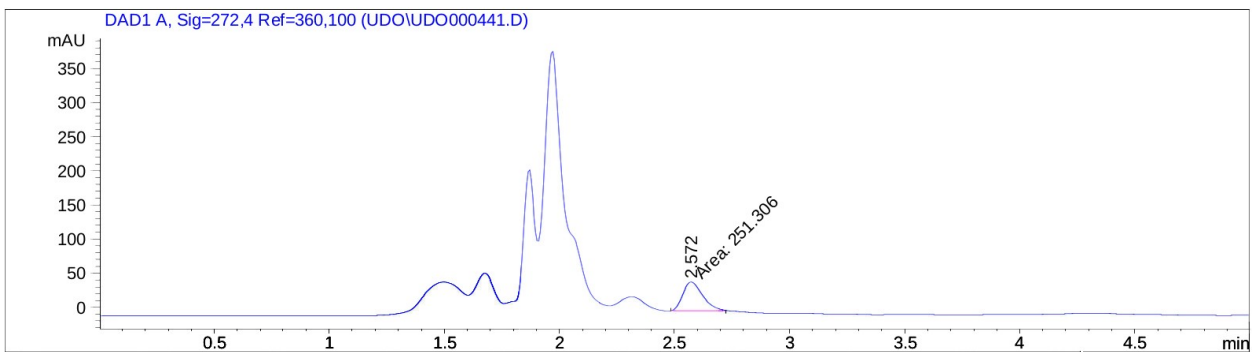


Figura 32, Cromatograma 20: ensayo de tipo A del tercer día irradiado

En general, se observa que todos los cromatogramas correspondientes a los ensayos no irradiados muestran un pequeño pico eluído antes del pico mayor, tanto para la solución preparada a partir de pastillas como para la preparada a partir del compuesto puro. Adicionalmente, las formas de los picos son bastante cercanas entre ambos cromatogramas de los ensayos irradiados, por lo que puede decirse que la presencia de excipientes en el medio acuoso no parece causar un efecto excesivamente marcado sobre los picos de los productos de fotodegradación del compuesto, salvando pequeñas diferencias como por ejemplo la ausencia en el cromatograma de la figura 21 del segundo pico que aparece de izquierda a derecha en el cromatograma de la figura 32.

6.2 Análisis de las Soluciones Irradiadas Preparadas Con Agua del Río Orinoco

Tras haber determinado en la fase inicial los parámetros de experimentación a ser utilizados en los ensayos finales, se procedió a realizar el proceso descrito en la fase 2 de la metodología. Para cada uno de los 3 días finales de experimentación se prepararon 8 ensayos (cada uno de estos preparados según lo indicado en la tabla 2) para ser procesados. Las características de irradiación y de temperatura los tres días de experimentación se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Características de los días de irradiación

Día	Fecha	Irradiancia promedio (w/m ²)	Temperatura promedio (C°)	Descripción
1	2023/08/23	802,6	38,7 ± 0,1	nublado
2	2023/08/29	735,3	29,7 ± 0,1	lluvioso
3	2023/09/05	781,4	35,7 ± 0,1	soleado

A continuación se discuten las medidas tomadas para estimar la incertidumbre asociada a los valores obtenidos del análisis de las soluciones, y posteriormente se discuten los resultados obtenidos.

6.2.1 Control de Calidad en Mediciones

6.2.1.1 Incertidumbres Asociadas a las Áreas de los Cromatogramas

Para los ensayos procesados, las áreas del pico asociado a la hidroclorotiazida en los cromatogramas (mostradas en la tabla 12) estuvieron influenciadas por una incertidumbre compuesta por dos fuentes principales de error: el error asociado al equipo de HPLC el cual denominaremos α , y el error asociado al proceso de fotodegradación el cual denominaremos β . Debido a la imposibilidad de realizar por triplicado cada uno de los ensayos para estimar las incertidumbres asociadas a los

resultados del análisis de estos (ya que esto hubiera implicado la realización de un número de ensayos superior a 70, y no se contaba con la cantidad de reactivos ni de agua de río necesarios para esto), se optó por procesar un triplicado de ensayos de tipo A (el cual consistía hidroclorotiazida disuelta en agua de río sin agitar y sin microplásticos) irradiados y un triplicado no irradiado de este mismo tipo en cada uno de los tres días de experimentación, y se utilizaron las desviaciones estandar calculadas para estos triplicados como un aproximado de las incertidumbres asociadas a las áreas obtenidas de los demás ensayos irradiados y no irradiados de cada día respectivamente. En la tabla 11 a continuación se muestran estos valores.

Tabla 11. Incertidumbres asociadas al equipo de HPLC y al proceso de fotoirradiación.

Día	Tipo ensayo	Irradiado	Desviación estandar de las áreas	Coefficiente de variación (%)
1	A	Sí	74	15
1	A	No	1306	6
2	A	Sí	513	11
2	A	No	334	1
3	A	Sí	66	22
3	A	No	513	3

En esta tabla, la desviación estandar calculada para los ensayos irradiados engloba a ambos errores α y β mencionados anteriormente, mientras que en el caso de los ensayos no irradiados, la desviación estandar unicamente contempla al error α asociado al equipo de medición, ya que estos se mantuvieron a oscuras durante el desarrollo de las experiencias y no fueron influenciados por el error asociado al fotoproceso.

6.2.1.2 Blancos Preparados

A continuación, se muestran los cromatogramas de los blancos preparados en cada uno de los días de experimentación. Estos fueron preparados utilizando el mismo solvente acetonitrilo/agua del río orinoco 20/80 v/v en ausencia de hidrocortiazida, y fueron analizados inmediatamente luego de ser preparados sin ser sometidos a irradiación.

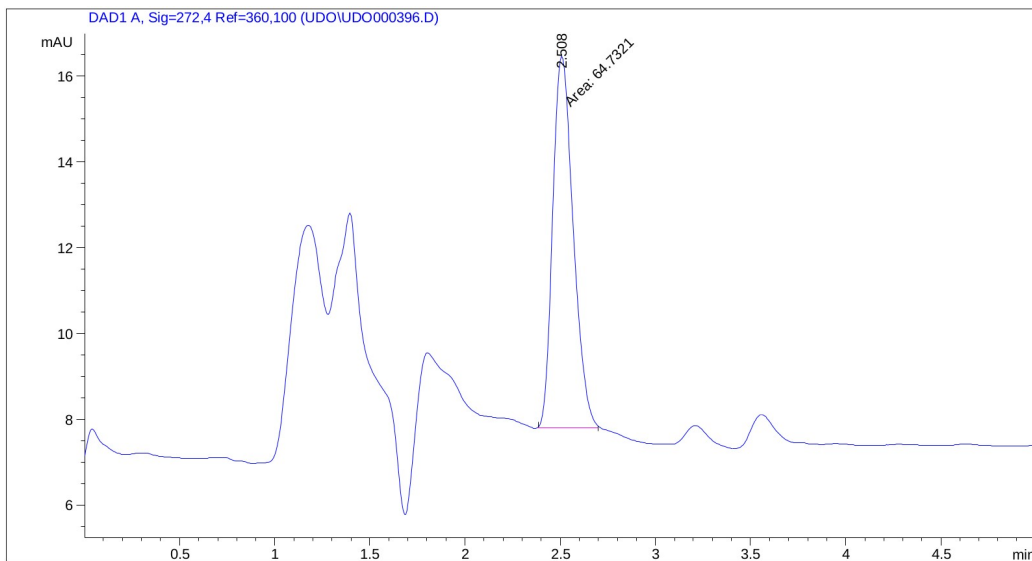


Figura 33. Cromatograma del blanco preparado para el día 1

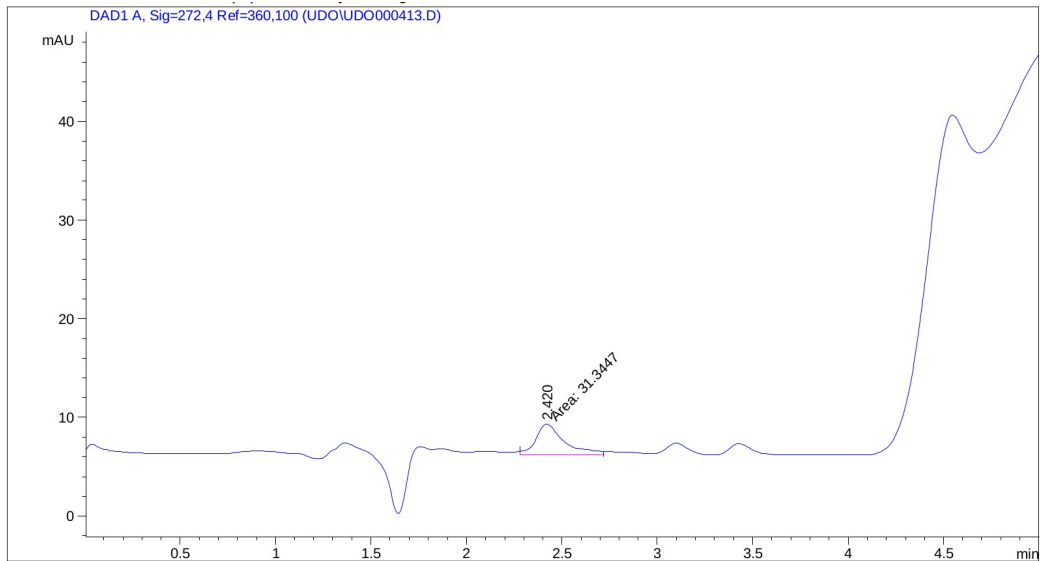


Figura 34. Cromatograma del blanco preparado para el día 2

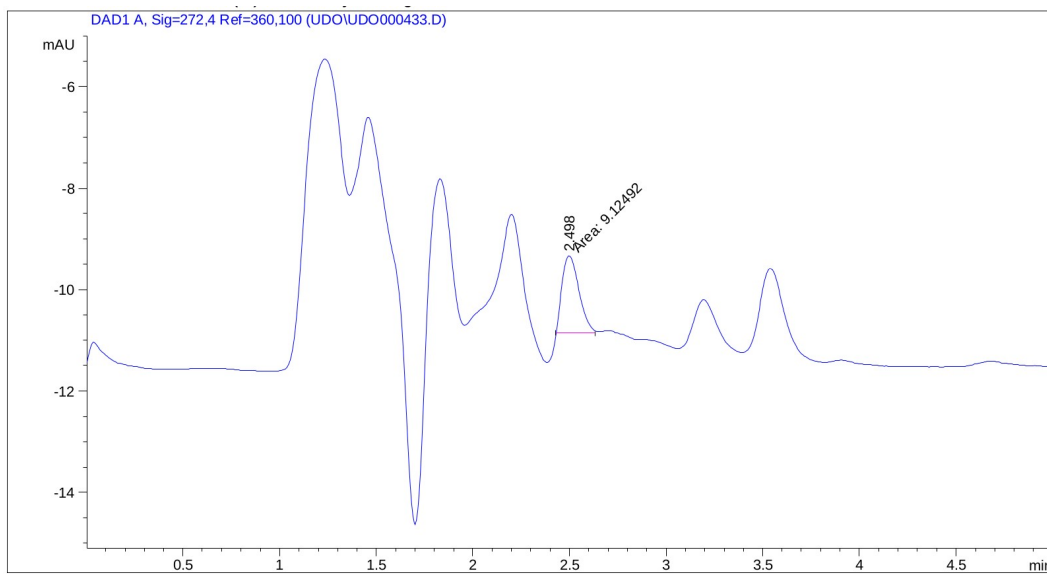


Figura 35. Cromatograma del blanco preparado para el día 3

6.2.2 Resultados de los Análisis con HPLC

En las figuras 36 a 47 se muestran los cromatogramas obtenidos en esta fase para cada uno de los tres días de experimentación. Las letras “A”, “B”, “C” y “D” hacen referencia a la tipología de los ensayos según lo descrito en la tabla 2, recordando que estas son:

- A:** Hidroclorotiazida disuelta en agua de río
- B:** Hidroclorotiazida disuelta en agua de río y sometida a agitación
- C:** Hidroclorotiazida disuelta en agua de río con microplásticos agregados
- D:** Hidroclorotiazida disuelta en agua de río con microplásticos y sometida a agitación

Las figuras 36, 37, 38 y 39 corresponden a los cromatogramas de los ensayos procesados el primer día de experimentación, las figuras 40, 41, 42 y 43 a los procesados durante el segundo día, y finalmente las figuras 44, 45, 46 y 47) a los del tercer y último día de esta fase experimental.

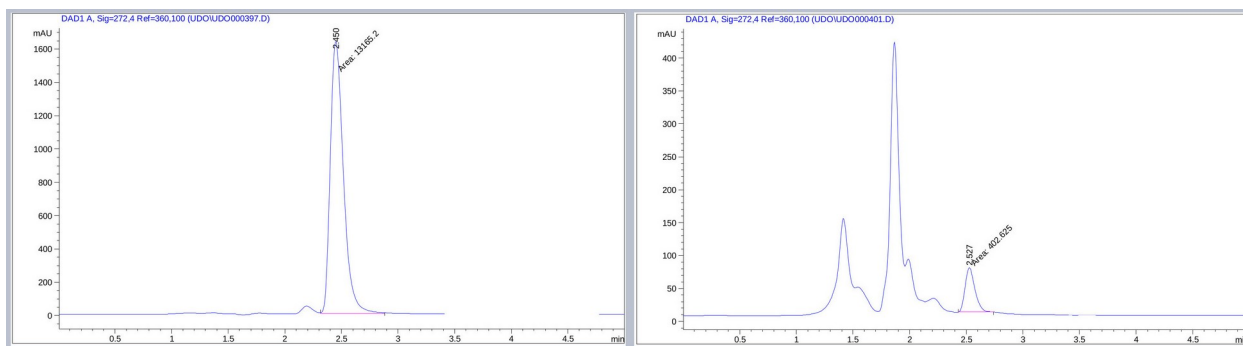


Figura 36. Cromatogramas de ensayos tipo A del día 1, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha)

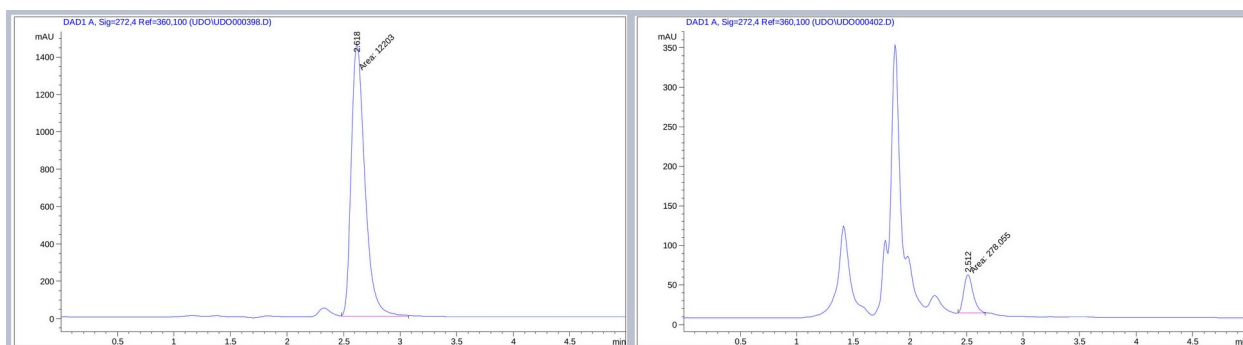


Figura 37. Cromatogramas de ensayos tipo B del día 1, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha)

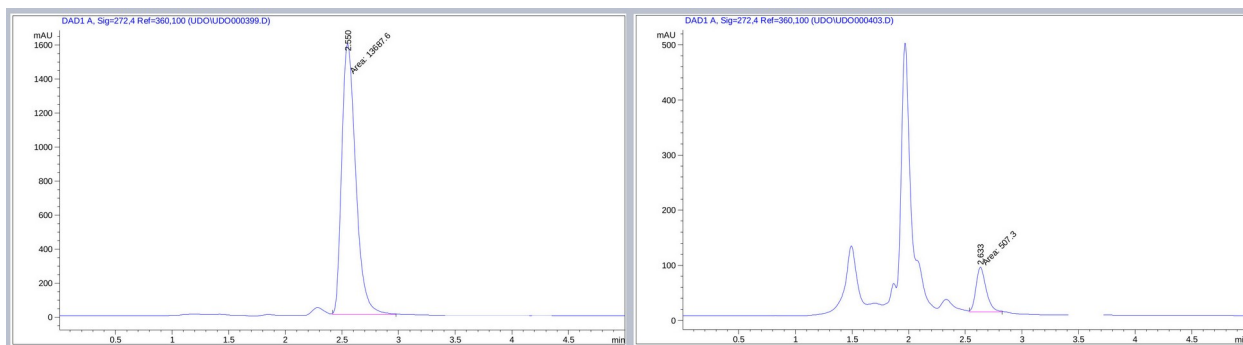


Figura 38. Cromatogramas de ensayos tipo C del día 1, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha)

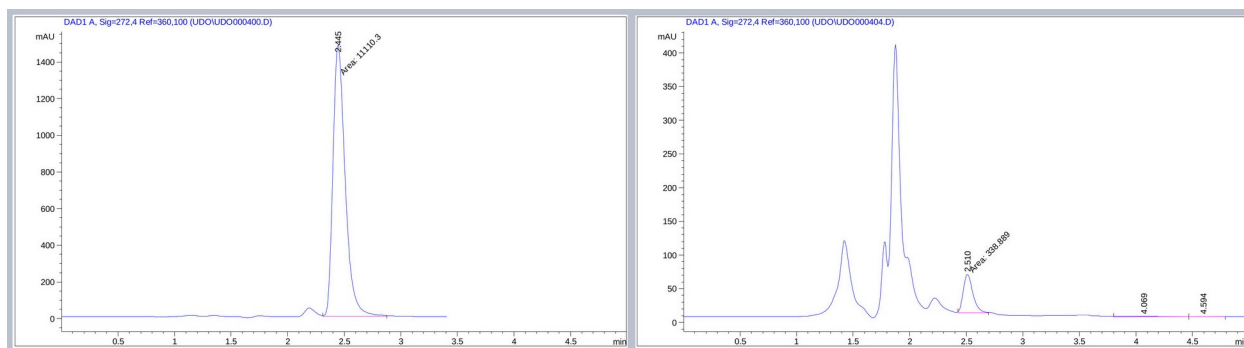


Figura 39. Cromatogramas de ensayos tipo D del día 1, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha)

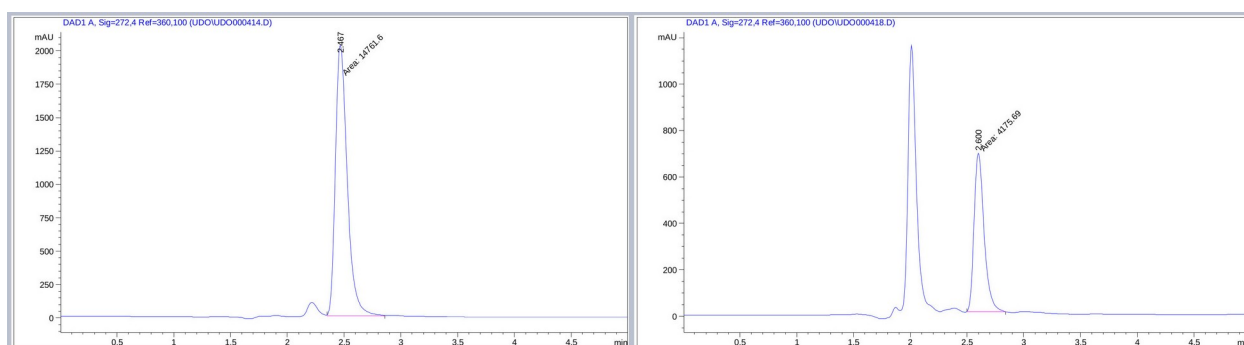


Figura 40. Cromatogramas de ensayos tipo A del día 2, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha)

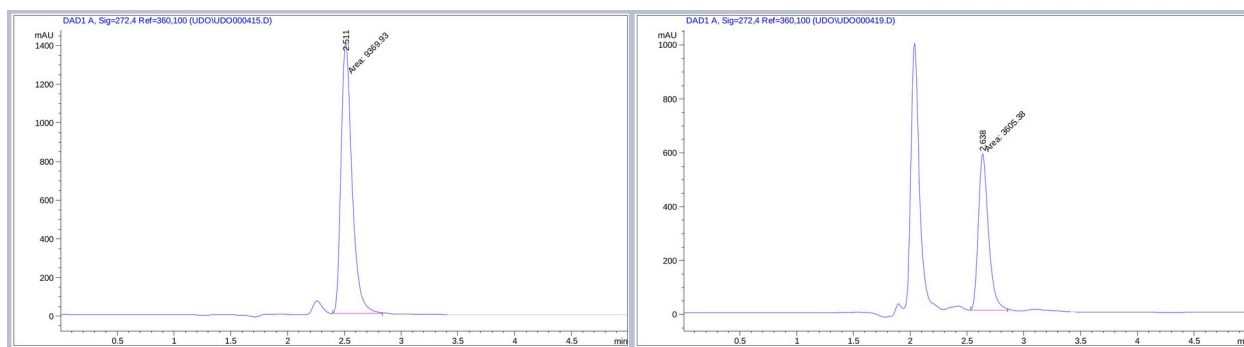


Figura 41. Cromatogramas de ensayos tipo B del día 2, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha)

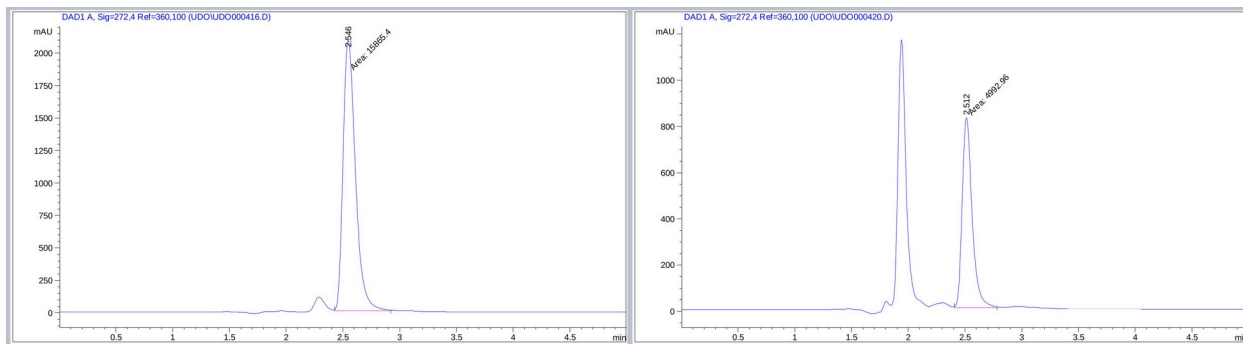


Figura 42. Cromatogramas de ensayos tipo C del día 2, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha)

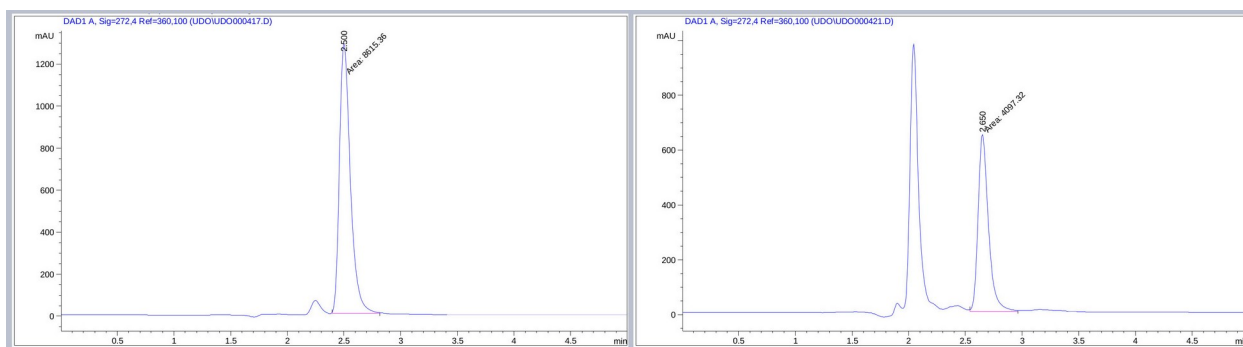


Figura 43. Cromatogramas de ensayos tipo D del día 2, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha)

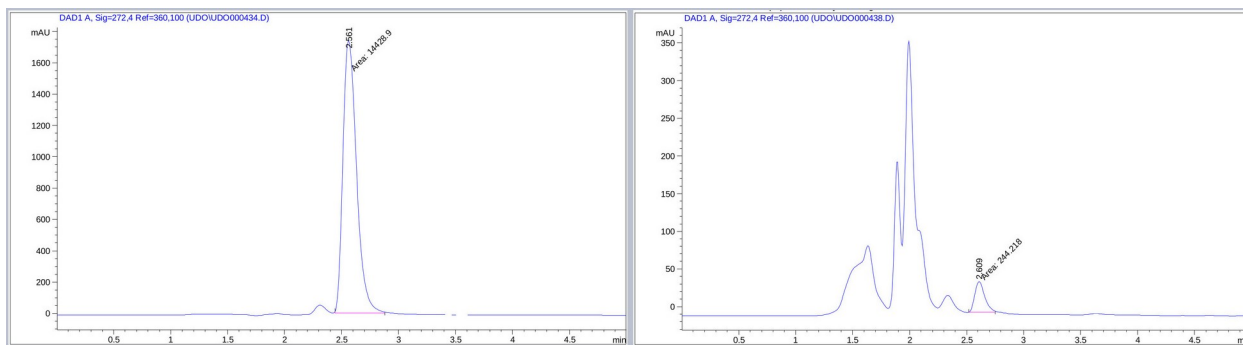


Figura 44. Cromatogramas de ensayos tipo A del día 3, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha)

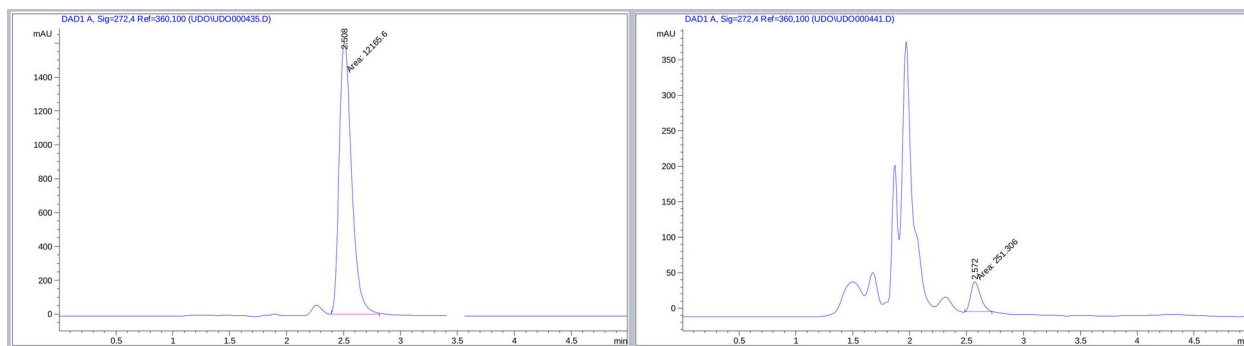


Figura 45. Cromatogramas de ensayos tipo B del día 3, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha)

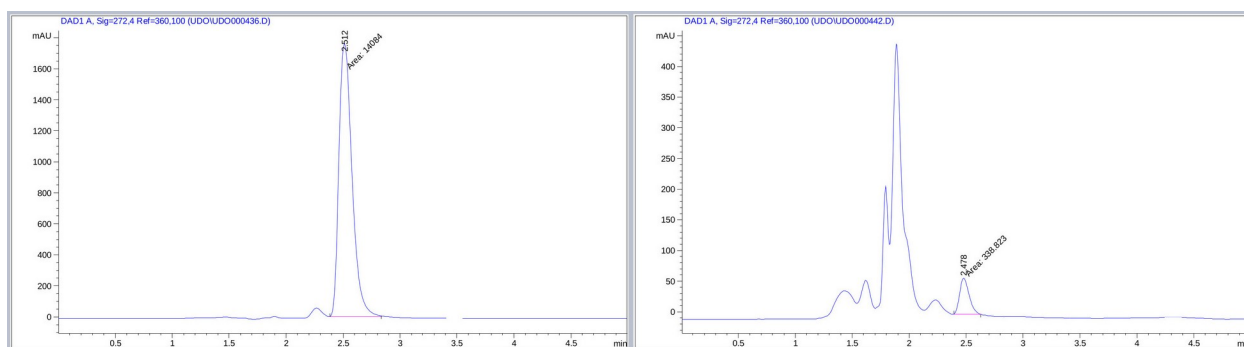


Figura 46. Cromatogramas de ensayos tipo C del día 3, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha)

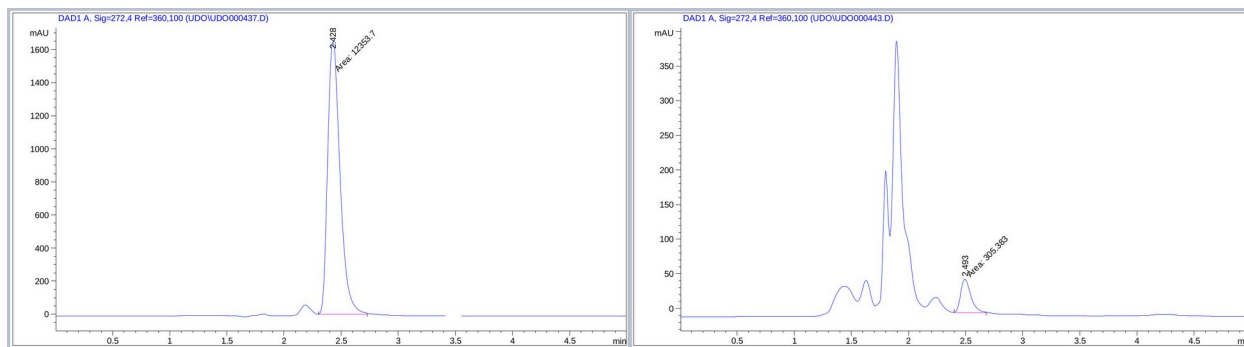


Figura 47. Cromatogramas de ensayos tipo D del día 3, no irradiado (izquierda) e irradiado (derecha)

En general, se observa que los cromatogramas de los ensayos irradiados el día 1 (figuras 36, 37, 38 y 39) y los del día 3 (figuras 44, 45, 46 y 47) poseen formas más parecidas entre sí que los del día 2 (figuras 40, 41, 42 y 43), lo cual muy probablemente se deba a que en el día 1 y 3 los valores de irradiancia fueron más cercanos entre sí que con el del día 2 (tabla 10). Si se comparan los cromatogramas de los ensayos

irradiados en esta fase con los de los ensayos irradiados de la fase inicial de determinación de parámetros, se puede observar que los cromatogramas del día 1 y 3 muestran cierto parecido con los cromatogramas de los ensayos irradiados de las soluciones preparadas a partir de pastillas de hidroclorotiazida, tal y como fue mencionado en el apartado 6.1.6. Los cromatogramas de los ensayos irradiados el día 2 sin embargo (figuras 40, 41, 42 y 43), muestran un comportamiento distinto. Debido a que se observan en los cromatogramas del día 1 y 3 irradiados picos similares a los de las soluciones de prueba irradiadas en la fase inicial, se puede inferir que estos picos secundarios no se generan (al menos no todos) a partir de excipientes presentes en las pastillas, sino a partir del principio activo (la hidroclorotiazida) en sí, y que la ausencia de la mayoría de picos secundarios en los cromatogramas de los ensayos irradiados durante el segundo día se debió principalmente a la intensidad de la irradiancia para ese día, la cual fue menor respecto a los otros dos. En el caso de los ensayos no irradiados, la forma del cromatograma es similar para todos los ensayos en cada uno de los tres días (figuras 36 a 47), y también es similar a la de los cromatogramas de los ensayos no irradiados de la fase inicial de determinación de parámetros.

Una vez obtenidas por HPLC las áreas de los cromatogramas de estas experiencias, se compararon las de los ensayos irradiados con las de los ensayos no irradiados de cada uno de los 4 tipos de ensayo procesados para los tres días de experimentación, determinando así los valores de disminución tanto absoluta como relativa de dichas áreas (disminución la cual es indicativa de grado de fotodegradación alcanzado por el compuesto). Inicialmente se discuten las disminuciones absolutas de concentración de hidroclorotiazida para cada tipo de ensayo en base a los cambios en las áreas, y posteriormente las tasas relativas de fotodegradación del compuesto.

6.2.3 Cambios en la Concentración de Hidroclorotiazida Tras Irradiar

En la figura 48 se observan los cambios en las áreas del pico asociado a la hidroclorotiazida en los cromatogramas de los distintos ensayos realizados. El error mostrado en las barras corresponde al error $\alpha + \beta$ para los ensayos irradiados, y únicamente al error α en el caso de los ensayos no irradiados. Los colores de las barras representan el tipo de ensayo (indicado en la leyenda de la figura), y para cada día se observan dos barras conjuntas del mismo color por cada uno de los tipos de ensayo, correspondiendo la barra de la izquierda de cada par al ensayo no irradiado de ese tipo, y la de la derecha al ensayo irradiado.

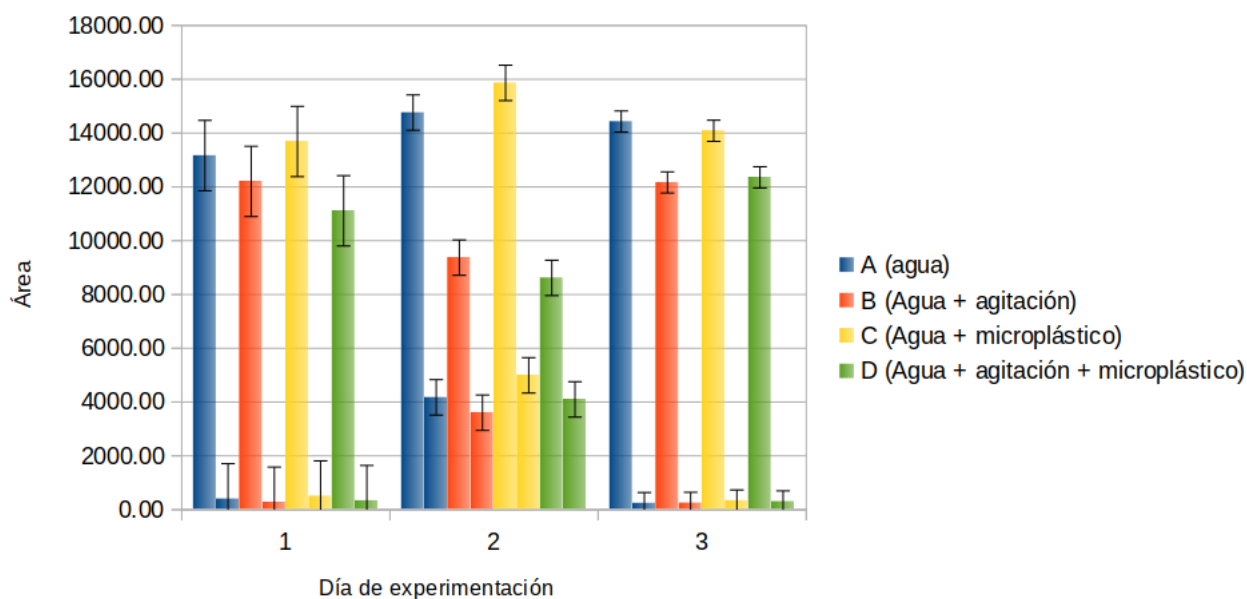


Figura 48. Áreas iniciales y finales asociadas a la hidroclorotiazida

En la tabla 12 se muestran los valores de las áreas para los cromatogramas de cada uno de los ensayos procesados en los tres días de experimentación. La columna “tipo de ensayo” hace referencia a las condiciones del ensayo según la tipología especificada en la tabla 2.

Tabla 12. Áreas asociadas a la hidroclorotiazida a distintas condiciones

Día	Tipo de ensayo	Área ensayo no irradiado (mAU*s)	Área ensayo irradiado (mAU*s)	Tasa de fotodegradación (%)
1	A (Agua)	13165 ± 1306	403 ± 74	97 ± 21
1	B (Agua + agitación)	12203 ± 1306	278 ± 74	98 ± 21
1	C (Agua + microplástico)	13688 ± 1306	507 ± 74	96 ± 21
1	D (Agua + agitación + microplástico)	11110 ± 1306	339 ± 74	97 ± 21
2	A (Agua)	14762 ± 334	4176 ± 513	72 ± 14
2	B (Agua + agitación)	9370 ± 334	3605 ± 513	62 ± 13
2	C (Agua + microplástico)	15865 ± 334	4993 ± 513	69 ± 14
2	D (Agua + agitación + microplástico)	8615 ± 334	4097 ± 513	52 ± 13
3	A (Agua)	14429 ± 513	244 ± 66	98 ± 31
3	B (Agua + agitación)	12166 ± 513	251 ± 66	98 ± 31
3	C (Agua + microplástico)	14084 ± 513	339 ± 66	98 ± 31
3	D (Agua + agitación + microplástico)	12354 ± 513	305 ± 66	98 ± 31

Tanto para el primer como el tercer día se observa la disminución casi total en el área del pico asociado a la hidroclorotiazida en los cromatogramas, y debido a que las áreas en los cromatogramas son proporcionales a las concentraciones del compuesto, esto indica a su vez una disminución casi total en la concentración de este para todos los tipos de ensayo, lo cual parece ocurrir sin importar las condiciones en las que ocurre el proceso (siendo estas condiciones la energía cinética del medio acuoso y la presencia o ausencia de microplásticos). Según indican estos resultados, el compuesto se fotodegrada casi por completo al ser sometido ante luz solar con irradiancia suficiente durante un tiempo relativamente corto. Teniendo en cuenta que en cada uno de los tres días de experimentación todos los ensayos del día fueron preparados a partir de la misma solución madre de ese día (ver anexo 2), todos los ensayos

realizados en un mismo día necesariamente partieron de la misma concentración base, así pues, cualquier discrepancia observada entre las áreas de los ensayos no irradiados (y por lo tanto entre sus concentraciones) dentro de un mismo día se debe necesariamente o bien a la incertidumbre asociada a sus valores (en los casos en los que hay intersección entre los intervalos demarcados por el error asociado a cada valor), o a la influencia de algún efecto ajeno a la fotodegradación el cual no fue contemplado inicialmente (esto en los casos en los que los valores de las áreas distan de forma significativa, y en especial si dicha intersección de intervalos no existe incluso al tomar en cuenta las incertidumbres asociadas a los mismos).

Las discrepancias entre los valores de los ensayos de tipo A y C no irradiados (los cuales no fueron agitados) para cada uno de los días son un ejemplo del primer caso, ya que sus valores son relativamente cercanos y existe intersección entre los intervalos definidos por las incertidumbres asociadas. El caso de los ensayos de tipo B y C no irradiados (los cuales fueron agitados), sin embargo, parece ser un ejemplo de lo segundo, pues se observa un fenómeno importante durante los 3 días (y especialmente en el segundo día): la presencia de agitación (tanto en ausencia como en presencia de microplásticos) parece producir una disminución en la concentración de hidroclorotiazida previo a irradiación, lo cual se puede observar en la figura 48 al comparar las áreas de los ensayos de tipo B y D (barras de color naranja y verde respectivamente en la figura) no irradiados con las de los ensayos de tipo A y C (barras de color azul y amarillo) no irradiados. Esto significa que incluso a oscuras, la concentración de hidroclorotiazida disminuyó al someter a los ensayos a agitación.

En la tabla 13 pueden observarse los valores de estas pérdidas de concentración, reflejadas en las disminuciones del valor las áreas del pico asociado a la hidroclorotiazida en los cromatogramas de los ensayos agitados respecto al valor de área promedio de los ensayos no agitados (esto para los ensayos no irradiados en ambos casos).

Tabla 13. Disminución de concentración de los ensayos agitados respecto a los no agitados.

Día	Promedio áreas ensayo A y C (mAU*s)	Pérdida área ensayo B (mAU*s)	Pérdida ensayo B (%)	Pérdida área ensayo D (mAU*s)	Pérdida ensayo D (%)
1	13426	1223	9	2316	17
2	15314	5944	39	6698	44
3	14256	2091	15	1903	13

No se realizaron pruebas para determinar la fuente de este fenómeno, sin embargo, en el caso de los ensayos de tipo D (agitados en presencia de microplásticos), esto pudiera deberse muy probablemente a la sorción del compuesto sobre la superficie de los microplásticos al entrar estos en contacto con la totalidad de la solución gracias al movimiento que los mismos adquirieron por la agitación, por lo que en futuras investigaciones similares, convendría confirmar esta posibilidad intentando desorber y detectar cualquier posible cantidad remanente de hidroclorotiazida sobre los microplásticos. La disminución en el caso de los ensayos agitados en ausencia de microplásticos (ensayos de tipo B) pudiera indicar que también la agitación promovió la sorción del compuesto sobre las paredes de los recipientes que contenían a las soluciones, lo cual por supuesto también influyó en el caso de las soluciones agitadas con microplásticos, pero estas al experimentar la sorción del fármaco tanto sobre los microplásticos como sobre las paredes del recipiente, tuvieron una disminución mayor en la concentración de hidroclorotiazida respecto a la de las soluciones agitada en ausencia de microplásticos (aunque esto parece verse reflejado únicamente para los primeros dos días). A pesar de que la causa más probable de estas disminuciones en la concentración de hidroclorotiazida sin haber irradiado muy probablemente sea la sorción del compuesto sobre los microplásticos o sobre las paredes del recipiente, es necesario realizar estudios adicionales que tomen en cuenta

estos efectos para poder tener resultados más específicos con los cuales discutir el fenómeno más a fondo y determinar a ciencia cierta si en efecto las disminuciones de concentración en los ensayos no irradiados se deben a efectos de sorción, o si este no es el caso. Llama la atención que este efecto de disminución en la concentración del compuesto por posible sorción haya sido mucho más marcado durante el segundo día respecto a los otros dos. Debido a que estas disminuciones se dieron en los ensayos no irradiados, en principio la única diferencia en el segundo día que pudo haber ocasionado esta intensificación del proceso fue la menor temperatura del entorno respecto a los otros dos días. Se ha reportado por algunos autores que la capacidad de sorción de algunos materiales (por ejemplo las zeolitas) puede verse intensificada al disminuir la temperatura del entorno (Wilson et al., 2022), por lo que convendría estudiar en investigaciones futuras si este fenómeno ocurre de forma similar sobre este tipo de microplástico o sobre el borosilicato del cual estaban hechos los recipientes.

En el caso de los ensayos irradiados, se puede observar que indistintamente de las condiciones, la concentración final de todos los ensayos de un mismo día estuvo dentro de rangos muy cercanos entre sí en base a los valores finales alcanzados por las áreas, y estas alcanzaron valores más bajos los días de mayor irradiación (dichas áreas finales fueron graficadas en función de la irradiancia a la que fueron sometidas en la figura 49), lo que pareciera ser un indicio de que posiblemente exista una asíntota o valor límite de concentración final en el proceso de fotodegradación, la cual varía en función de la irradiancia. La existencia certera de dicha asíntota, sin embargo, no puede aseverarse únicamente con los datos obtenidos en estos ensayos, para hacer esto se requieren pruebas adicionales de fotodegradación que contemplen valores de irradiancia intermedios, y, de existir dicha asíntota, las áreas finales (y por lo tanto las concentraciones finales) en las soluciones irradiadas ante dichas irradiancias intermedias deberían seguir la tendencia de la línea esbozada en la figura 50 (en las figura 49 y 50 algunos de los puntos no logran observarse debido a la cercanía entre sus valores, sin embargo todos los ensayos irradiados están contemplados en ellas).

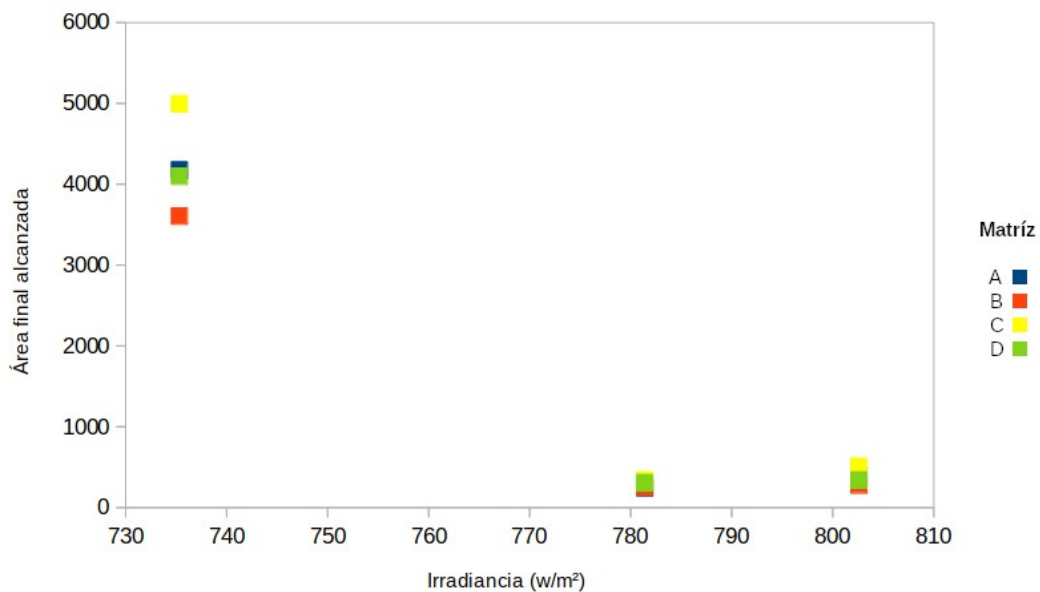


Figura 49. Área final alcanzada de los ensayos irradiados en función de la irradiancia a la que fueron sometidos

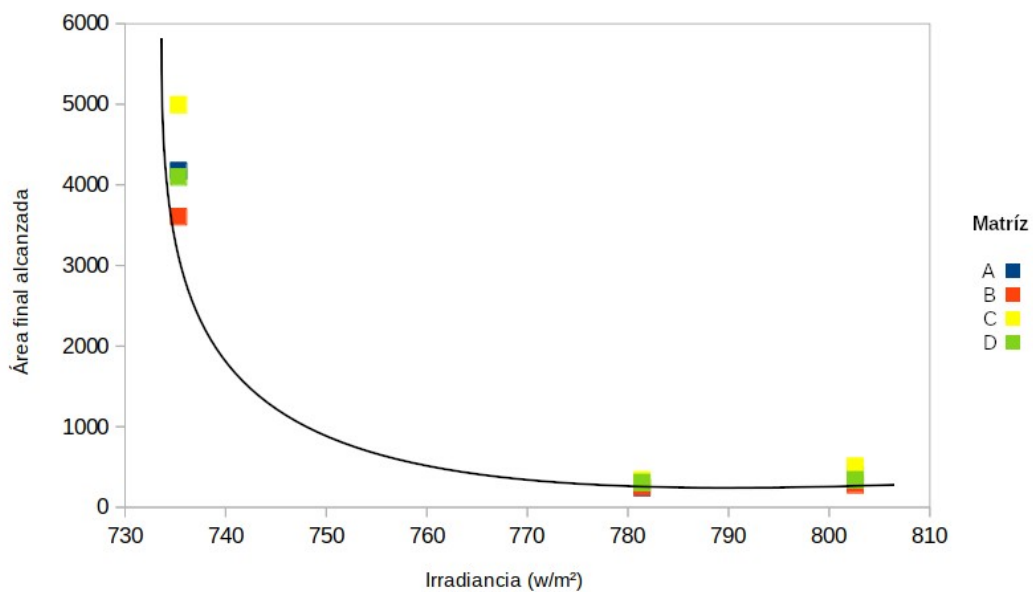


Figura 50. Posible línea asintótica en función de la irradiancia

6.2.4 Tasa de Fotodegradación de la Hidroclorotiazida

Para obtener las tasas de fotodegradación de la hidroclorotiazida se siguió el procedimiento descrito en el anexo 3, utilizando los valores de las áreas del pico asociado al compuesto en los cromatogramas de los ensayos irradiados y los de los ensayos no irradiados para cada uno de los 4 tipos de ensayo en los 3 días de experimentación (los valores de las áreas y de las tasas obtenidas se muestran en la tabla 12). Debido a que en estos cálculos los valores utilizados de las áreas de los ensayos no irradiados fueron valores que ya se habían visto disminuidos por los efectos de sorción que posiblemente ocurrieron durante el proceso experimental, las tasas determinadas indican qué porcentaje de la hidroclorotiazida que permaneció libre en el medio acuoso durante el proceso (es decir, la que no fue sorbida) fue fotodegradada, y por lo tanto, las tasas calculadas ya están corregidas en cuanto a la influencia de los efectos de sorción.

En la Figura 51 se muestran las tasas de fotodegradación obtenidas, el error mostrado en las barras corresponde al error propagado de las áreas utilizadas en los cálculos.

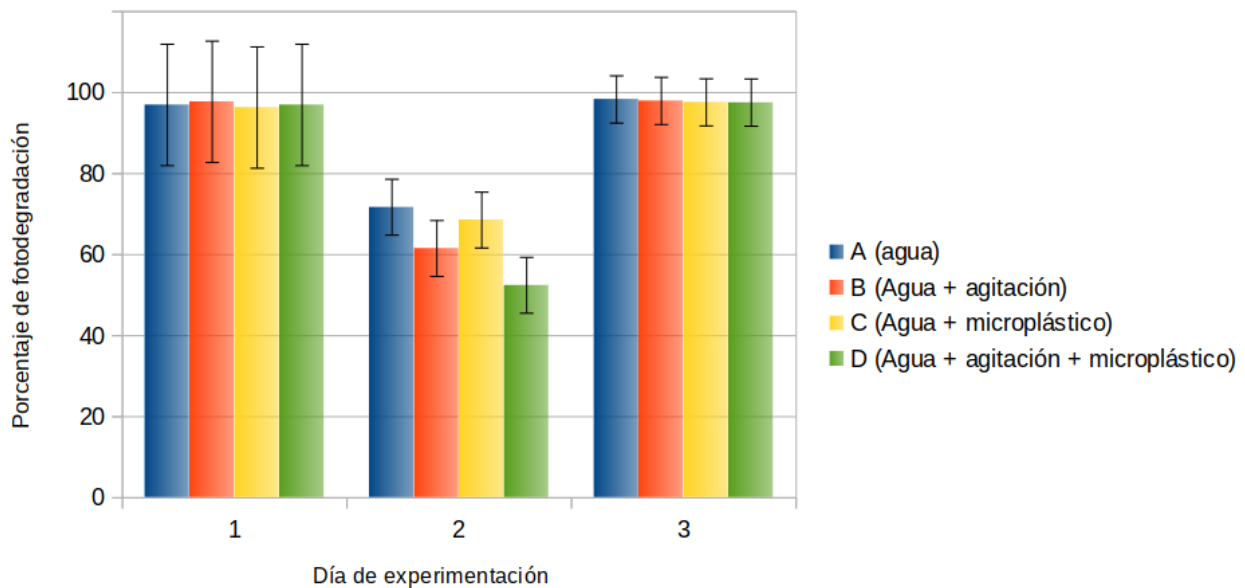


Figura 51. Tasas de fotodegradación de la hidroclorotiazida

En esta gráfica se evidencia que, de los tres días de experimentación, la influencia del clima del día 2 (lluvioso) sobre el proceso fue mucho mayor que la de los otros dos, en los cuales el proceso de fotodegradación consumió a la hidroclorotiazida en casi un 100% indistintamente de las condiciones de presencia o ausencia de microplásticos y de agitación bajo las cuales ocurrió el proceso.

Se pueden hacer comparaciones más elaboradas entre los datos obtenidos el día 2 al haberse observado mayor variabilidad en ellos (consecuencia probablemente del menor avance del proceso de fotodegradación en función a la menor irradiancia de ese día). A primera vista, se observa que la tasa de fotodegradación en el día 2 fue muy cercana para los ensayos de tipo A (los cuales consistían únicamente en la hidroclorotiazida disuelta en agua de río) y C (los cuales consistían en el compuesto disuelto en agua de río en presencia de microplásticos), indicando que la presencia de microplásticos en ausencia de agitación en principio no ejerció una influencia significativa sobre el proceso de fotodegradación, lo cual puede deberse simplemente a que estos microplásticos al permanecer estáticos en un mismo sitio en el fondo del recipiente no entraron en contacto de forma continua con distintas áreas dentro de la solución (caso contrario a los ensayos sometidos a agitación, en los que por el efecto de dicha agitación, los microplásticos se movilizaban concéntricamente a lo largo de todo el recipiente).

En este día, en el caso de los ensayos tipo B y D (sometidos a agitación en ausencia y en presencia de microplásticos respectivamente), sin embargo, se puede observar una disminución más marcada en la eficiencia del proceso de fotodegradación sobre la hidroclorotiazida. Entre estos dos, el ensayo de tipo D muestra una disminución más pronunciada de la eficiencia del proceso que el de tipo B. Aun así, debido a que el ensayo de tipo B pareció mostrar en sí mismo una disminución en la intensidad del proceso, el solo hecho de agitar la solución pareciera estar jugando un papel en la disminución de la intensidad de la fotodegradación, posiblemente debido a una disminución en la probabilidad de contacto entre los fotones que entraban en la

solución y las moléculas del fármaco como consecuencia de una mayor entropía en el medio causada por la agitación. Esto se incrementa en el ensayo de tipo D agitado con microplásticos, pues adicional al efecto producido por la agitación por sí sola, en este caso los microplásticos sí entraron en contacto de forma continua con todas las áreas de la solución, pudiendo haber refractado, reflejado y/o absorbido parte de la radiación lumínica que llegaba a la solución (esto último posiblemente gracias a los anillos aromáticos presentes en la estructura química del poliestireno), impidiendo que esta entrara en contacto con la hidrocortiazida y la fotodegradara.

La conclusión inmediata que se puede obtener a partir de estos resultados es que la influencia de los microplásticos de poliestireno no expandido sobre el proceso de fotodegradación de la hidrocortiazida parece ser mayor en ambientes de alta energía. Estos microplásticos en ausencia de energía en el medio se asientan en el fondo del medio, donde no parecen ejercer (al menos según lo visto en los resultados de estas experiencias) una influencia significativa en la eficiencia del proceso de fotodegradación de la hidrocortiazida. Sería de interés realizar nuevamente estos estudios en investigaciones futuras utilizando otros tipos de microplástico que interactúen de forma distinta con la matriz, como por ejemplo poliestireno expandido, el cual debido a su menor densidad posee una tendencia a flotar en el agua en lugar de hundirse como lo hace su presentación no expandida, lo que pudiera disminuir la capacidad de la radiación solar de entrar en contacto con el fármaco aun en ambientes de baja energía cinética, o existe también la posibilidad de utilizar microplásticos de un tipo de plástico completamente distinto el cual carezca de anillos aromáticos en su estructura (como pudiera ser el polietileno), ya que al no poseer anillos de este tipo capaces de interactuar con la luz ultravioleta, posiblemente influirían de forma distinta sobre la fotodegradación de la hidrocortiazida.

6.2.5 Efecto del Agua de Río

En la tabla 14 se muestran los datos de caracterización del agua del Río Orinoco usada durante la segunda fase experimental.

Tabla 14. Parámetros fisicoquímicos del agua del Río Orinoco utilizada en los ensayos.

Cantidad determinada	Valor
Concentración de Cl^- (mg/L)	6 ± 2
Concentración de Mg^{+2} (mg/L)	3 ± 1
Concentración de Ca^{+2} (mg/L)	4 ± 1
Concentración de OH^- (mg/L)	0 ± 0
Concentración de CO_3^{-2} (mg/L)	0 ± 0
Concentración de HCO_3^- (mg/L)	6 ± 3
pH	$4,79 \pm 0,05$
Sólidos totales disueltos (mg/L)	$21 \pm 2\%$ F.S.
Conductividad $\mu\text{S}/\text{cm}$	$46 \pm 2\%$ F.S.

A primera vista llama la atención el bajo valor de pH obtenido para esta muestra de agua. Según Mora et al. (2007), el pH en el cauce principal del río tiene un valor de 5,28 a 5,30, mientras que algunos cuerpos de agua aledaños poseen pH que pueden llegar a 4 e incluso a 3,96, y el pH de la muestra analizada cae dentro de este rango, sin embargo, también pudo haber influido el tiempo que la misma se tuvo en almacenamiento, el cual fue superior a un año.

Para tener un estimado de la influencia del agua de río utilizada sobre el proceso de fotodegradación, se puede comparar la tasa de fotodegradación promedio experimentada por la solución p4 de la fase inicial de determinación de parámetros (la cual fue preparada con agua destilada sin agitación ni microplásticos) con la del ensayo de tipo A (preparada con agua de río sin agitación ni microplásticos) del día 1 de

experimentación, ambas sometidas a irradiación con luz solar durante 5 horas (10 am a 3 pm) en condiciones de irradiancia similares. Estos valores se encuentran en las tablas 6 y 12 respectivamente, sin embargo se colocan nuevamente en la tabla 15 para poder ser comparados directamente.

Tabla 15. Comparación de la tasa de fotodegradación de las soluciones p4 y A1

Solución	Tasa de fotodegradación
p4	95% ± 1%
1A	97% ± 13%

En principio no se puede observar una gran diferencia entre las tasas de fotodegradación experimentadas por ambas soluciones, por lo que, al menos bajo las condiciones de irradiación a las que fueron sometidas estas soluciones, cualquier posible influencia de las matrices acuosas sobre el proceso de fotodegradación parece haber sido opacada el efecto de la radiación solar sobre el compuesto, pues este fue tan intenso y logró fotodegradar tanto a la hidroclorotiazida que no pudieron observarse diferencias mayores entre las tasas de fotodegradación de ambas soluciones que pudieran ser adjudicadas a las diferencias de composición entre las matrices acuosas de las mismas. En zonas de alta irradiancia como los trópicos se esperaría en principio que, para este fármaco, el proceso de fotodegradación se dé con gran eficiencia indistintamente de la composición iónica de los cuerpos de agua donde ocurra este proceso (al menos si estos poseen concentraciones iónicas similares a las mostradas en la tabla 14). Convendría realizar estudios comparativos bajo condiciones de irradiación reducida (similares a las del día 2 de la segunda fase experimental) para estudiar la influencia que ejerce la composición iónica de los cuerpos acuosos sobre los fenómenos de fotodegradación que ocurren en ellos, lo cual sería de utilidad para tratar de entender este fenómeno en ambientes de clima templado (zonas septentrionales y meridionales alejadas de los trópicos) o durante épocas de mayor nubosidad/menor irradiancia.

7. CONCLUSIONES

- En condiciones de irradiancia solar reducida, la tasa de fotodegradación máxima de la hidroclorotiazida en condiciones de baja energía cinética y ausencia de microplásticos en el medio acuoso fue del $72\% \pm 14\%$, mientras que en condiciones de alta energía cinética y presencia de microplásticos fue del $52\% \pm 13\%$, indicando que los microplásticos de poliestireno no expandido parecen tener la capacidad de disminuir en cierta medida la eficiencia del proceso de fotodegradación de este fármaco, en especial en ambientes de alta energía cinética que los haga circular a lo largo de toda la matriz acuosa.
- En condiciones de irradiancia solar elevada, el proceso de fotodegradación del compuesto parece darse con gran eficiencia indistintamente de las condiciones de presencia o ausencia de agitación y microplásticos, e indistintamente de la composición de la matriz acuosa, ya que se obtuvieron siempre tasas de fotodegradación de la hidroclorotiazida superiores al 96% a pesar de haber variado las condiciones de experimentación.
- Hay indicios de que los posibles efectos de sorción de la hidroclorotiazida sobre los microplásticos de poliestireno no expandido son capaces en cierta medida de causar una disminución de la concentración de esta en medio acuoso, en especial en ambientes de alta energía que provoquen que los microplásticos se dispersen a lo largo de toda la matriz.
- La agitación parece ser capaz de disminuir por sí sola la eficiencia del proceso de fotodegradación incluso en ausencia de microplásticos de poliestireno no expandido (posiblemente debido a una reducción en la probabilidad de contacto entre los fotones de la luz solar y las moléculas de hidroclorotiazida en el medio al incrementarse la entropía del sistema), por lo que en medios acuosos naturales de energía cinética elevada es posible que el compuesto tarde más en ser fotodegradado incluso en ausencia de microplásticos.

8. RECOMENDACIONES

- Como recomendación en ensayos futuros que utilicen montajes de cámara de irradiación similares a los utilizados en estas experiencias, convendría procesar un ensayo por vez colocado siempre en la misma zona de la cámara para evitar posibles influencias de la geometría de la misma.
- Debido a la gran tasa de fotodegradación de la hidroclorotiazida, convendría realizar estudios similares a los realizados en el presente trabajo en condiciones de irradiancia reducida, donde potencialmente se puedan observar con mayor prominencia los efectos las condiciones del medio sobre el proceso de fotodegradación del fármaco.
- Parece existir una relación entre la concentración mínima alcanzada por el fármaco en función de la irradiancia a la que es sometido, convendría realizar estudios de fotodegradación del mismo en un rango amplio de irradiancias para corroborar si en efecto es el caso.
- Convendría realizar estudios sobre el fármaco potencialmente sorbido sobre los microplásticos que permitan determinar si este se fotodegrada de forma similar al fármaco libre en el medio acuoso.

BIBLIOGRAFÍA

Aiken G.R. & Mcknight, Diane & Wershaw,. (1985). An introduction to humic substances in soil, sediments, and water. A Wiley-Interscience Publication. 1-9.

Amaro R., Herrera N., Pereira R., Reategui K. (2024). Optimization of parameters affecting recovery in the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters by HPLC-Fluorescence. Laboratory of Chromatographic Methods, Center for Analytical Chemistry. School of Chemistry. Faculty of Sciences. Universidad Central de Venezuela (UCV).

Awwa, & Wef (1999). Standard Methods for the examination of water and wastewater.

Brigante M, DellaGreca M, Previtiera L, Rubino M, Temussi F. (2005). Degradation of hydrochlorothiazide in water, *Environ Chem Lett*, 2:195–198. doi: 10.1007/s10311-004-0096-1

Brodin T, Piovano S, Fick J, Klaminder J, Heynen M, Jonsson M. (2014). Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations, *Philosophical Transactions Royal Society B*, 369(1656): 20130580, 7-8. doi: 10.1098/rstb.2013.0580

Calisto V, Domingues MR, Esteves VI. (2011). Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments--kinetics and photodegradation products. *Water Research*, 45(18):6097-106. doi: 10.1016/j.watres.2011.09.008. PMID: 21943883.

Chadwick J., Goldhaber M. (1934). "A nuclear 'photo-effect': disintegration of the dipion by γ rays". *Nature*. 134 (3381): 237–238. Bibcode:1934Natur.134..237C. doi:10.1038/134237a0

Chen C, Chen L, Li Y, Fu W, Shi X, Duan J, Zhang W. (2020). Impacts of microplastics on organotins' photodegradation in aquatic environments. *Environmental Pollution*. 267:115686, 4-8. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115686. PMID: 33254701.

Chiang, J.Y., Chen, YC., Chen, YF. (2011). Underwater Image Enhancement: Using Wavelength Compensation and Image Dehazing (WCID). *Advanced Concepts for Intelligent Vision Systems. Lecture Notes in Computer Science*, vol 6915. Springer, Berlin, Heidelberg. Doi: 10.1007/978-3-642-23687-7_34

Chiang C, Olsen J, Basler D, Bånkestad D, Hoch G. (2019). Latitude and Weather Influences on Sun Light Quality and the Relationship to Tree Growth. *Forests*. 10. 610. doi: 10.3390/f10080610

Chowdhury, Pankaj & Sarathy, Siva & Das, Sreejon & Li, Juan & Ray, Ajay & Ray, Madhumita. (2019). Direct UV photolysis of pharmaceutical compounds: Determination of pH-dependent quantum yield and full-scale performance. *The Chemical Engineering Journal*. doi: 10.1016/j.cej.2019.122460

Deng, Y., Zhao, R. (2015). Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment. *Current Pollution Reports* **1**, 167–176. doi: 10.1007/s40726-015-0015-z

Dong, S., Qu, M., Rui, Q., & Wang, D. (2018). Combinational effect of titanium dioxide nanoparticles and nanopolystyrene particles at environmentally relevant concentrations on nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and environmental safety*, *161*, 444–450. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.06.021

Fernández-Perales M, Sánchez-Polo M, Rozalen M, López-Ramón MV, Mota AJ, Rivera-Utrilla J. (2020). Degradation of the diuretic hydrochlorothiazide by UV/Solar radiation assisted oxidation processes. *Journal of Environmental Management*. 257:109973, 2-7. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.109973. PMID: 31868639.

Furman OS, Yu M, Teel AL, Watts RJ. (2013). Water quality parameters controlling the photodegradation of two herbicides in surface waters of the Columbia Basin, Washington. *Chemosphere*, 93(9):1734-41. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.050. PMID: 23800589.

García F, Álvarez M, López V, Rivera J, Sánchez M, Mota A. (2014). Photodegradation of herbicides with different chemical natures in aqueous solution by ultraviolet radiation. Effects of operational variables and solution chemistry. *Chemical Engineering Journal*. 255. 307–315. doi: 10.1016/j.cej.2014.06.047.

Gordon HR, McCluney WR. (1975). Estimation of the depth of sunlight penetration in the sea for remote sensing. *Applied Optics*. 14(2):413-6. doi: 10.1364/AO.14.000413. PMID: 20134900.

Gumieniczek A, Galeza J, Mroczek T, Wojtanowski K, Lipska K, Pietras R. (2018). Kinetics and Characterization of Degradation Products of Dihydralazine and Hydrochlorothiazide in Binary Mixture by HPLC-UV, LC-DAD and LC-MS Methods. *Chromatographia*. 81(8):1147-1162. doi: 10.1007/s10337-018-3555-8. PMID: 30220731

Gunnarsson L, Snape JR, Verbruggen B, Owen SF, Kristiansson E, Margiotta-Casaluci L, Österlund T, Hutchinson K, Leverett D, Marks B, Tyler CR. (2019). Pharmacology beyond the patient - The environmental risks of human drugs. *Environment International*. 129:320-332. doi: 10.1016/j.envint.2019.04.075. PMID: 31150974.

Han KD, Bark KM, Heo EP, Lee JK, Kang JS, Kim TH. (2000). Increased phototoxicity of hydrochlorothiazide by photodegradation. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*, 16(3):121-4. doi: 10.1034/j.1600-0781.2000.d01-17.x. PMID: 10885441.

Health and Medical Care Administration, Region Stockholm. (Versión actualizada 2022 Abr 20) *Hydrochlorothiazide*. Jasuinfo Region Stockholm. <https://janusinfo.se/beslutsstod/lakemedelochmiljo/pharmaceuticalsandenvironment/databaseenven/hydrochlorothiazide.5.30a7505616a041a09b062a9a.html>

Herman LL, Bashir K. (Versión actualizada 2022 jul 19). *Hydrochlorothiazide*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430766/>

Herzfeld, K. F. (1940). Theory of Light Absorption in Simple Aromatic Compounds. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 82(3), 359–367. <http://www.jstor.org/stable/984935>

Huang J, Duan P, Tong L, Zhang W. (2022). Influence of polystyrene microplastics on the volatilization, photodegradation and photoinduced toxicity of anthracene and pyrene in freshwater and artificial seawater. *Science of the Total Environment*, 819:152049. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152049. PMID: 34856264.

Hydrochlorothiazide: Aerobic transformation in aquatic sediment systems. February 2010. Brixham Environmental Laboratory, Brixham, UK. Report No. BR0010/B

Kavitha, V. (2022). Global prevalence and visible light mediated photodegradation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs)-a review. *Results in Engineering*, 14:100469. doi: 10.1016/j.rineng.2022.100469

Lund-Høie K, Friestad H O. (1986). Photodegradation of the Herbicide Glyphosate in Water. *Environmental Contamination and Toxicology*, 36(5):723-9. doi: 10.1007/BF01623575 PMID: 3708176

Manvendra Patel, Rahul Kumar, Kamal Kishor, Todd Mlsna, Charles U. Pittman Jr., Dinesh Mohan. (2019). Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chemical Reviews*, 119 (6), 3510-3673. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00299

Matamoros, V., Duhec, A., Albaigés, J. Bayona, J. (2009). Photodegradation of Carbamazepine, Ibuprofen, Ketoprofen and 17 α -Ethinylestradiol in Fresh and Seawater. *Water Air Soil Pollution* 196, 161 doi: 10.1007/s11270-008-9765-1

Mora Polanco A., Sánchez Calderón L., Lasso Alcalá C., Mac-Quhae Romero C. (2007). Parámetros Físicoquímicos de Algunos Cuerpos de Agua Adyacentes a la Confluencia de los Ríos Orinoco y Ventuari, Estado Amazonas, Venezuela. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas Volumen 41, No. 1, 2007, Pp. 44–59

Olson JM. (2006). Photosynthesis in the Archean era. *Photosynth Research*, 88(2):109-17. doi: 10.1007/s11120-006-9040-5. PMID: 16453059.

Orona-Návar C, García-Morales R, Loge FJ, Mahlknecht J, Aguilar-Hernández I, Ornelas-Soto N. (2022). Microplastics in Latin America and the Caribbean: A review on current status and perspectives. *Journal of Environmental Management*. 309:114698, 2. doi: 10.1016/j.jenvman.2022.114698. PMID: 35183939.

Persico M., Granucci G. (2018) Photochemistry, A Modern Theoretical Perspective. (1era ed.). Springer International Publishing AG. Doi: 10.1007/978-3-319-89972-5

R. M. Pope, E. S. Fry. (1997). "Absorption spectrum (380-700 nm) of pure water. II. Integrating cavity measurements," *Applied Optics*, 36, 8710-8723.

Ramirez AJ, Brain RA, Usenko S, Mottaleb MA, O'Donnell JG, Stahl LL, Wathen JB, Snyder BD, Pitt JL, Perez-Hurtado P, Dobbins LL, Brooks BW, Chambliss CK. (2009). Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12):2587-97, 2592-2596. doi: 10.1897/08-561.1. PMID: 19320536.

Reategui K., Amaro R., Rodríguez L., Salazar C., Fernández R., Smuda J. (2021). Sorption and desorption of phenanthrene and fluorene in mangrove forest soils of the morrocoy national park, venezuelan caribbean. *Geochemical Journal*, Vol. 55, pp. 103 to 115. doi:10.2343/geochemj.2.0621

Ricardo, I.A., Alberto, E.A., Júnior, A.H., Macuvele, D.L., Padoin, N., Soares, C., Riella, H.G., Starling, M.C., & Trovó, A.G. (2021). A critical review on microplastics, interaction with organic and inorganic pollutants, impacts and effectiveness of advanced oxidation processes applied for their removal from aqueous matrices. *Chemical Engineering Journal*, 424, 130282. doi: <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2021.130282>

S. Sanches, M.T. Barreto-Crespo, V.J. Pereira. 2010. Drinking water treatment of priority pesticides using low pressure UV photolysis and advanced oxidation processes, *Water Research*. 44, 1809–1818.

Suppan, P. (1994). *Chemistry and Light*. (1era ed.). The Royal Society of Chemistry.

Tamat SR, Moore DE. (1983). Photolytic decomposition of hydrochlorothiazide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 72(2):180-3. doi: 10.1002/jps.2600720221. PMID: 6834257

Thoorens G., Krier F., Leclercq B., Carlin B., Evrard B. Microcrystalline Cellulose, a Direct Compression Binder in a Quality by Design Environment—A Review. *Int. J. Pharm.* 2014;473:64–72. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.06.055.

Uzelac, M. M., Srđenović Čonić, B., Kladar, N., Armaković, S., & Armaković, S. J. (2022). Removal of hydrochlorothiazide from drinking and environmental water: Hydrolysis, direct and indirect photolysis. *Energy & Environment*, 0(0). doi: 10.1177/0958305X221084035

Vargas, F., Hisbeth, M.V., & Rojas, J.K. (1998). Photolysis and photosensitized degradation of the diuretic drug acetazolamide. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-chemistry*, 118, 19-23. doi:10.1016/S1010-6030(98)00359-1

Vargas F, Rivas C, Díaz Y, Fuentes A. (2003). Photodegradation pathways and the in vitro phototoxicity of pyrazinamide, a phototoxic antitubercular drug. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 72(1-3):87-94. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2003.09.010. PMID: 14644570.

Wayne R P. (1969). *Advances in Photochemistry*, Volume 7. In *Advances in Photochemistry*. doi: 10.1002/9780470133378.ch4

Werner JJ, McNeill K, Arnold WA. (2005). Environmental photodegradation of mefenamic acid. *Chemosphere*. 58(10):1339-46. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.10.004. PMID: 15686751.

Wilson SMW. (2022). The potential of direct air capture using adsorbents in cold climates. *iScience*. doi: 10.1016/j.isci.2022.105564. PMID: 36479149

Wypych G. (2003). *Handbook of Material Weathering*. (3era ed.). ChemTec Publishing

Wypych G. (2012). *Handbook of Polymers*. Elsevier.

Zeng, Zhiqiang & Richardson, Jennifer & Verduzco, Daniel & Mitchell, David & Patton, E. (2009). Zebrafish Have a Competent p53-Dependent Nucleotide Excision Repair Pathway to Resolve Ultraviolet B–Induced DNA Damage in the Skin. *Zebrafish*. 6. 405-15. doi: 10.1089/zeb.2009.0611.

ANEXOS

Anexo 1. Masas de los Microplásticos Utilizados

Día	Usado en tipo ensayo	Irradiado	Cantidad pellets	Tamizados	Masa (g)
1	C (Agua + microplástico)	Sí	30	Sí	0.63
1	D (Agua + agitacion + microplástico)	Sí	30	Sí	0.582
1	C (Agua + microplástico)	No	30	Sí	0.585
1	D (Agua + agitacion + microplástico)	No	30	Sí	0.601
2	C (Agua + microplástico)	Sí	30	Sí	0.637
2	D (Agua + agitacion + microplástico)	Sí	30	Sí	0.605
2	C (Agua + microplástico)	No	30	Sí	0.617
2	D (Agua + agitacion + microplástico)	No	30	Sí	0.658
3	C (Agua + microplástico)	Sí	30	Sí	0.603
3	D (Agua + agitacion + microplástico)	Sí	30	Sí	0.644
3	C (Agua + microplástico)	No	30	Sí	0.619
3	D (Agua + agitacion + microplástico)	No	30	Sí	0.574

Anexo 2. Soluciones Madre Preparadas

Día	Presentación hidroclorotiazida	Cantidad disuelta (mg)	Volúmen (ml)	Solvente
1	Compuesto puro	16 ± 1	250	Acetonitrilo/Agua Río Orinoco 20/80 v/v
2	Compuesto puro	17 ± 1	250	Acetonitrilo/Agua Río Orinoco 20/80 v/v
3	Compuesto puro	16 ± 1	250	Acetonitrilo/Agua Río Orinoco 20/80 v/v

Anexo 3. Modelo de Cálculo Para la Determinación de las Tasas de Fotodegradación de la Hidroclorotiazida a Partir de las Áreas de los Cromatogramas

Para calcular las tasas de fotodegradación de la hidroclorotiazida a partir del área del pico asociado a la misma en los cromatogramas, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\text{Área solución no irradiada} - \text{Área solución irradiada}}{\text{Área solución no irradiada}} \right) * 100 = \% \text{ de fotodegradación}$$

A modo de ejemplo, se hace uso a continuación de la misma con los datos de las áreas bajo la curva de los cromatogramas correspondientes a la solución de tipo A del primer día de irradiación de la segunda fase experimental mostrados en la tabla 12:

$$\left(\frac{13165 \text{ mAU*s} - 403 \text{ mAU*s}}{13165 \text{ mAU*s}} \right) * 100 = 96,93\%$$