



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Facultad de Química

## DETERMINACIÓN DE KETOROLACO EN EL EFLUENTE DE UNA PLANTA TRATADORA HOSPITALARIA POR MEDIO DE MUESTREO PASIVO

TESIS

para obtener el Grado de:

Maestro en Ciencias Químicas

Presenta:

**Q.F.B. Héctor Hugo Ortega Soto**

Dirigido por:

Dr. Jorge Javier Ramírez García

Dra. Paula Alejandrina Gamboa Suárez

M. en C. Q. Angie Michelle Dávila Estrada



Toluca, Estado de México, 2017

# AGRADECIMIENTOS

- ✚ A mi **Comité de Tutores**, por los conocimientos, experiencias y amistad.
  
- ✚ **Revisores y Sinodales**, por el tiempo que generosamente me dedicaron para revisar este trabajo.
  
- ✚ Al **Laboratorio de Análisis Instrumental** de la Facultad de Química de la UAEMex.
  
- ✚ Al **CONACyT** por la beca 501830.
  
- ✚ El financiamiento de este trabajo se realizó mediante el **CONACyT** **"PROYECTOS DE DESARROLLO CIENTÍFICO PARA RESOLVER PROBLEMAS NACIONALES"** con clave **215997**.

# ÍNDICE

**ÍNDICE**

ÍNDICE.....	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
1. RESUMEN.....	12
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1 Plantas tratadoras de agua.....	14
2.2 Fármacos en aguas residuales.....	16
2.3 Ketorolaco.....	21
2.4 Consumo de ketorolaco en el Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos”.....	24
2.5 Muestreo y tratamiento de la muestra.....	26
2.5.1 Muestreo directo o por puntos.....	27
2.5.1.1 Extracción en fase sólida.....	27
2.5.1.2 Micro-extracción por fase sólida.....	29
2.5.1.3 Extracción líquido-líquido.....	30
2.5.1.4 Micro-extracción en fase líquida (LPME).....	30
2.5.1.5 Extracción acelerada de solventes.....	30
2.5.1.6 Liofilización.....	31
2.6 Muestreo biológico.....	32
2.7 Muestreo pasivo.....	33
2.8. Métodos de análisis para ketorolaco.....	36
2.9. Validación de métodos analíticos.....	39
2.9.1. Precisión.....	40
2.9.2. Linealidad del sistema.....	41
2.9.3. Especificidad.....	41
2.9.4. Exactitud.....	41
2.9.5. Repetibilidad.....	41
2.9.6. Linealidad del método.....	42
2.9.7. Precisión del método o precisión intermedia.....	42

2.9.8. Estabilidad analítica la muestra .....	42
2.9.9. Límite de detección.....	42
2.9.10. Límite de cuantificación .....	43
2.9.11. Robustez.....	43
2.9.12. Tolerancia .....	43
3 JUSTIFICACIÓN.....	45
4 HIPÓTESIS .....	47
5 OBJETIVOS.....	49
5.1. Objetivo general.....	49
5.2. Objetivos específicos .....	49
6 METODOLOGÍA.....	51
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
7.1. Etapa 1. Desarrollo y optimización de condiciones cromatográficas.....	56
7.1.1. Determinación de longitud de onda de trabajo.....	56
7.1.2. Determinación de condiciones cromatográficas.....	57
7.1.3. Metodología analítica propuesta para validación.....	64
7.2. Etapa 2. Validación de metodología analítica.....	65
7.2.1. Especificidad.....	67
7.2.2. Adecuabilidad del sistema.....	69
7.2.3. Precisión del sistema.....	70
7.2.4. Linealidad del sistema.....	70
7.2.5. Linealidad del método.....	72
7.2.6. Repetibilidad.....	74
7.2.7. Precisión intermedia.....	75
7.2.8. Límite de detección y cuantificación.....	76
7.3. Etapa 3. Gestión del permiso para el muestreo del efluente.....	78
7.4. Etapa 4. Muestreo de agua del efluente de la planta tratadora hospitalaria.....	79
7.5. Etapa 5. Determinación de la cantidad de ketorolaco en las muestras.....	82
7.6. Determinación de cinética de degradación fotolítica y tiempo de vida media de ketorolaco en agua.....	84

7.6.1. Metodología analítica para la determinación de ketorolaco en la degradación fotolítica.	84
7.6.2. Validación del método analítico para la determinación de ketorolaco en la degradación fotolítica.	85
7.6.3. Cinética de degradación fotolítica de ketorolaco con luz Ultravioleta (UV).	88
7.6.4. Cinética de degradación fotolítica de ketorolaco con luz blanca.	95
8 CONCLUSIONES.	97
9 ANEXOS.	100
ANEXO A. Artículo enviado para su publicación.	100
ANEXO B. Fórmulas para la determinación de parámetros cromatográficos.	125
ANEXO C. Fórmulas utilizadas para la determinación de parámetros estadísticos.	127
10 REFERENCIAS.	130

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Operaciones unitarias utilizadas durante el tratamiento de aguas residuales (Elaboración propia con información de DISEPROSA, 2015).....	14
Tabla 2. Concentraciones de ketorolaco reportadas en diferentes matrices.....	21
Tabla 3. Propiedades fisico-químicas de ketorolaco. (Merck & Co. Inc., 2006).....	23
Tabla 4. Estructuras químicas de los productos de degradación de ketorolaco (Elaboración propia con información de Salaris et al., 2010; Kalariya et al., 2014).....	23
Tabla 5. Aplicaciones de utilización de cartuchos de SPE en compuestos orgánicos en matrices acuosas.....	28
Tabla 6. Ventajas y desventajas de las técnicas de muestreo.....	35
Tabla 7. Metodologías analíticas por CLAR para la identificación y cuantificación de ketorolaco.....	37
Tabla 8. Metodologías analíticas por CLAR para la identificación y cuantificación de ketorolaco en aguas residuales.....	38
Tabla 9. Parámetros de validación en función a la naturaleza del método (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002).....	40
Tabla 10. Condiciones cromatográficas probadas durante el desarrollo de la metodología.....	63
Tabla 11. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de ketorolaco en agua residual.....	65
Tabla 12. Resultados obtenidos en la validación de método analítico para la cuantificación de ketorolaco en agua residual.....	66
Tabla 13. Resultados de adecuabilidad del sistema.....	69
Tabla 14. Resultados de precisión del sistema.....	70
Tabla 15. Resultados de linealidad del sistema.....	71
Tabla 16. Resultados estadísticos de linealidad del sistema.....	71
Tabla 17. Resultados de recuperación de la linealidad del método.....	73
Tabla 18. Resultados estadísticos de la linealidad del método.....	74
Tabla 19. Resultados estadísticos del recobro en la linealidad del método.....	74
Tabla 20. Resultados del recobro en la repetibilidad.....	75
Tabla 21. Resultados estadísticos del recobro en la repetibilidad.....	75
Tabla 22. Resultados de precisión intermedia.....	76
Tabla 23. Límite de detección y cuantificación. Área bajo la curva con respecto a la concentración de ketorolaco.....	77
Tabla 24. Resultados estadísticos de límite de detección y cuantificación.....	77
Tabla 25. Recursos personales y físicos del Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos”.....	80

Tabla 26. Resultados de cuantificación de ketorolaco en muestras del efluente de la planta tratadora por muestreo puntual.....	83
Tabla 27. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de ketorolaco en la degradación fotolítica.....	85
Tabla 28. Resultados de la validación del método analítico para la cuantificación de ketorolaco en la degradación fotoilítica.....	86
Tabla 29. Resultados del comportamiento de degradación fotolítica por radiación UV con celda de cuarzo.....	90
Tabla 30. Resultados obtenidos para el ajuste de cada modelo de orden de reacción evaluado para la degradación fotolítica UV en celda de cuarzo.....	91
Tabla 31. Resultados del comportamiento de degradación fotolítica por radiación UV con celda de vidrio.....	92
Tabla 32. Resultados obtenidos para el ajuste de cada modelo de orden de reacción evaluado para la degradación fotolítica UV en celda de vidrio.....	93



**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Diagrama de una planta de tratamiento de aguas residuales general (DISEPROSA, 2015).	16
Figura 2. Estructura química del ketorolaco (Merck & Co. Inc., 2006).	22
Figura 3. Consumo de ketorolaco (gramos por mes) en el Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos” durante el 2015.	25
Figura 4. Consumo de ketorolaco (gramos por mes) en el Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos” durante el 2015.	26
Figura 5. Espectro de absorción UV-VIS de solución de Ketorolaco a 10 µg/mL en metanol.	56
Figura 6. Cromatograma de solución de ketorolaco obtenido en el experimento 1.	58
Figura 7. Cromatograma de solución de ketorolaco obtenido en el experimento 2.	59
Figura 8. Cromatograma de solución de ketorolaco obtenido en el experimento 3.	60
Figura 9. Cromatograma de solución de ketorolaco obtenido en el experimento 4.	61
Figura 10. Cromatograma de solución de ketorolaco obtenido en el experimento 5.	62
Figura 11. Cromatograma de solución de ketorolaco obtenido en el experimento 6.	63
Figura 12. Cromatograma Blanco (metanol). Cuantificación de ketorolaco en agua residual.	67
Figura 13. Cromatograma solución de Referencia de ketorolaco. Cuantificación de ketorolaco en agua residual.	68
Figura 14. Cromatograma de muestra de agua de planta tratadora hospitalaria. Cuantificación de ketorolaco en agua residual.	68
Figura 15. Gráfica área bajo la curva con respecto a la concentración de ketorolaco.	72
Figura 16. Concentración recuperada con respecto a la concentración adicionada.	73
Figura 17. Límite de detección y cuantificación. Área bajo la curva con respecto a la concentración de ketorolaco.	78
Figura 18. Acta informativa de aprobación del protocolo y muestreo en el Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos”.	79
Figura 19. Plano arquitectónico de la planta tratadora de agua residual del Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos”.	81
Figura 20. Corte longitudinal de la planta tratadora de agua residual del Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos”.	82
Figura 21. Cromatograma Blanco (agua). Cuantificación de ketorolaco en la degradación fotolítica.	87
Figura 22. Cromatograma solución de referencia. Cuantificación de ketorolaco en la degradación fotolítica.	87

Figura 23. Cromatograma muestra de degradación fotolítica UV de ketorolaco. Cuantificación de ketorolaco en la degradación fotolítica. _____	88
Figura 24. Esquema del sistema para la degradación fotolítica. a) recirculador y termostato de agua, b) fuente de radiación, c) contenedor, d) parrilla de agitación, e) salida de agua, f) entrada de agua y g) celda de reacción. _____	89
Figura 25. Comportamiento de degradación fotolítica UV de ketorolaco con celda de cuarzo. _____	90
Figura 26. Degradación fotolítica UV de ketorolaco con celda de cuarzo ajustado al modelo de primer orden. _____	91
Figura 27. Comportamiento de degradación fotolítica UV de ketorolaco con celda de vidrio. _____	92
Figura 28. Degradación fotolítica UV de ketorolaco con celda de vidrio ajustado al modelo de primer orden. _____	93
Figura 29. Comportamiento de degradación fotolítica de ketorolaco con radiación visible. _____	95

# RESUMEN

## 1. RESUMEN

Las aguas residuales contienen contaminantes químicos que pueden ser nocivos para la salud pública. Las que son provenientes específicamente de hospitales se caracterizan porque contienen una gran variedad de sustancias químicas como son disolventes, agentes de contraste para rayos X, desinfectantes, así como productos farmacéuticos y pueden llegar a ser hasta 15 veces más tóxicas que las aguas residuales domésticas.

El presente proyecto trata del desarrollo, validación e implementación de dos metodologías analíticas. La primera, para la cuantificación de ketorolaco en un efluente de agua residual de una planta tratadora hospitalaria. La segunda para la cuantificación de ketorolaco en el estudio de su degradación fotolítica *in situ*.

La metodología se realizó por diferentes etapas; la primera, implicó la determinación de las condiciones cromatográficas para la cuantificación de ketorolaco por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

Posteriormente se realizó la validación, los parámetros evaluados durante esta etapa fueron: especificidad, adecuabilidad, precisión del sistema, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, linealidad del sistema, linealidad del método y límite de detección y cuantificación. En todos los parámetros se cumplieron con las especificaciones; por lo que se garantiza que los resultados arrojados por esta metodología son confiables.

Finalmente, se realizó la cuantificación de ketorolaco sobre las muestras obtenidas del efluente de una planta tratadora de agua residual de un hospital ubicado en la ciudad de Toluca, México, teniendo un promedio de  $0.2117 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , con un coeficiente de variación de 22.3%.

# ANTECEDENTES

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Plantas tratadoras de agua

Se denomina tratamiento de agua al conjunto de operaciones de tipo físico, químico y biológico con la finalidad de eliminar o reducir la contaminación o características no deseables del agua. Una planta de tratamiento suele incluir una etapa de pre-tratamiento, un tratamiento primario, secundario y terciario (DISEPROSA, 2015). En la Tabla 1 se describen estas operaciones unitarias.

**Tabla 1. Operaciones unitarias utilizadas durante el tratamiento de aguas residuales (Elaboración propia con información de DISEPROSA, 2015).**

OPERACIÓN UNITARIA	DESCRIPCIÓN	OBJETIVO
Filtración	El agua proveniente del efluente pasa a través de una rejilla de retención o criba de captura	Separar la materia sólida no biodegradable
Pre-digestión anaerobia	El agua es colectada en una cisterna en donde da comienzo una digestión bacteriana en condiciones anaeróbicas con la consiguiente reducción en la demanda biológica de oxígeno	Inicio de la degradación de materia orgánica
Aireación extendida	El agua atraviesa por diferentes cámaras de aeración en donde pasan por constante agitación una corriente de aire. La interacción entre las microburbujas de aire y la materia disuelta y suspendida en las aguas va dando lugar a la generación y desarrollo de colonias bacterianas que se alimentan del material biológico y orgánico que va entrando al proceso.	Degradación de materia orgánica
Clarificación y sedimentación	Separación del agua de los lodos que precipitan al fondo de cámaras por acción gravitatoria.	Separación de agua de la materia sólida degradada
Desinfección	El sobrenadante sale de las cámaras de clarificación y pasa por un sistema de dosificación de algún desinfectante (generalmente hipoclorito de sodio), en el que tiene lugar la desinfección final y el abatimiento prácticamente total de la carga biológica del agua.	Eliminación de la carga biológica
Recirculación de lodos	Los lodos precipitados al fondo de las cámaras de clarificación, son introducidos nuevamente en cámaras de aireación.	Eliminación de materia orgánica de los lodos
Filtración y esterilización	El agua se filtra a través de un filtro de lecho profundo, de diferentes materiales que permiten la separación de la carga bacteriana del agua.	Eliminación de carga bacteriana

En forma general, la unión de varias operaciones unitarias se les denomina etapa, generalmente la planta de tratamiento de agua residual convencional consta de cuatro etapas: pre-tratamiento, tratamiento primario, secundario y terciario.

El pre-tratamiento busca el acondicionamiento del agua residual para facilitar las siguientes etapas. Como ejemplo se tiene la filtración por rejilla.

El tratamiento primario o físico-químico, busca reducir la materia suspendida por medio de sedimentación o precipitación.

El tratamiento secundario o biológico se realiza con el objetivo de eliminar la contaminación orgánica disuelta, que no se elimina a través de procedimientos físico-químicos, consiste en la oxidación aerobia de la materia orgánica o la eliminación anaerobia en reactores cerrados.

El tratamiento terciario no es más que el pulido de los tratamientos anteriores, de manera que se mejore alguna de las características del agua, de tal manera que si se emplea de manera intensiva, el agua tratada pueda ser apta para el abastecimiento de necesidades agrícolas, industriales o para su potabilización.

En la Figura 1, se presenta el diagrama de una planta de tratamiento de aguas residuales general.

Como se puede observar, no existen operaciones unitarias en las plantas de tratamiento de agua que se dediquen en exclusiva a la remoción, eliminación y/o degradación de fármacos. Estos se consideran como variables y dependen de las propiedades de la cada una de las sustancias, por lo que en algunos casos apenas se observa una disminución en la cantidad de fármacos en el agua después del tratamiento (Radjenovic *et al.*, 2007; Liscio *et al.*, 2009; Rosal *et al.*, 2010; Miranda-García *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Bailly *et al.*, 2013; Amdany *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2015; Martínez Bueno, *et al.*, 2016).

Liscio y colaboradores en el 2009, observaron que las plantas de tratamiento de aguas residuales no eliminan completamente los compuestos con propiedades estrogénicas y androgénicas (Liscio *et al.*, 2009).

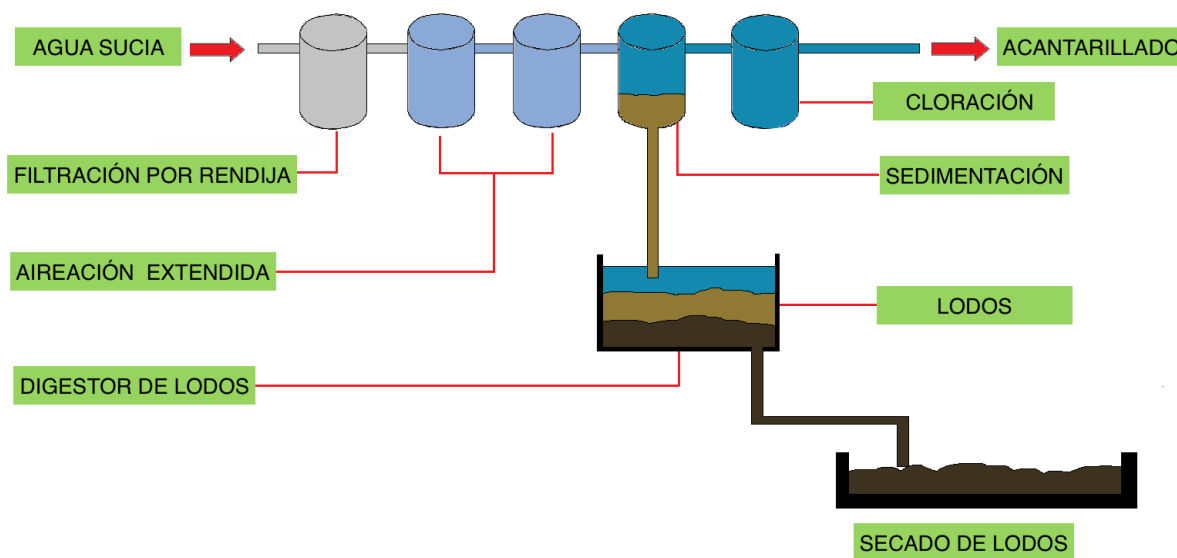


Figura 1. Diagrama de una planta de tratamiento de aguas residuales general (DISEPROSA, 2015).

Oliveira y colaboradores en el 2015, realizaron un estudio en diferentes hospitales para determinar la cantidad de fármacos y productos de cuidado personal antes y después del tratamiento y observó que no se eliminaban completamente (Oliveira *et al.*, 2015).

## 2.2 Fármacos en aguas residuales

El Gobierno Mexicano, a través de la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SERMANAT-1997 establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público y define las aguas residuales de la siguiente manera a:

*“Aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas”*



Los contaminantes emergentes se definen como nuevos productos químicos que no cuentan con alguna regulación en cuanto a la determinación de concentraciones máximas permisibles en agua residual y los efectos que estos producen en el medio ambiente y en la salud humana son desconocidos (Bell *et al.*, 2011; Deblonde *et al.*, 2011; Corcoll *et al.*, 2014; Bailly *et al.*, 2013).

En general, cuando se habla de contaminantes emergentes se refiere a fármacos, los cuales llegan al ambiente a través de la excreción humana o animal, la mala disposición de medicamentos sin usar y desechos los industriales. La concentración de éstos contaminantes en el ambiente puede ser de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  hasta  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Kostopoulou y Nikolaou, 2008; Bell *et al.*, 2011; Deblonde *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Bailly *et al.*, 2013; Morais *et al.*, 2014; Al-Tarawneh *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015).

Los contaminantes emergentes pueden ser encontrados en diferentes matrices ambientales, por ejemplo: agua potable y residual, sedimentos y lodos, dependiendo de su hidrofobicidad pueden encontrarse en mantos acuíferos o ser adsorbidos en partículas sólidas. Las fuentes más importantes de contaminación de este tipo de compuestos son los hogares, plantas de tratamiento, hospitales y plantas farmacéuticas.

Las aguas residuales provenientes de hospitales son una mezcla compleja, capaz de generar serios problemas ambientales, pudiendo llegar a ser de 5 a 15 veces más tóxica que las aguas residuales domésticas (Ramos, 2013). Se caracterizan porque contienen una gran variedad de sustancias químicas que pueden ser nocivas para la salud como son disolventes, desinfectantes, así como productos farmacéuticos (Ramos, 2008; Muñoz y Chaparro, 2014; Moreno *et al.*, 2012).

De acuerdo a Ramos en el 2013, los hospitales generan aguas residuales en un intervalo de 100 a 1400 L/cama día. Un ejemplo es el hospital militar de San Luis Potosí (México), genera un volumen de 26 a 32 L de agua residual por día (Ramos, 2008; Ramos, 2013).

Datos revisados por Bailly y colaboradores en el 2013, indican que las aguas residuales de un hospital de Australia contribuía con mas del 15 % de dos farmacos de los 30 analizados

en agua ambiental. Ésta estimación se realizó mediante análisis químicos y fueron confirmados mediante datos del consumo del hospital (Bailly *et al.*, 2013).

A pesar que la cantidad de fármacos en el agua puede considerarse baja, la exposición continua a esta puede elevarse a un largo plazo y causar efectos sobre el ecosistema y la salud humana, que podrían pasar por desapercibidos o considerados como evoluciones normales hasta que pasan a ser irreversibles. Estos efectos adversos dependen también de la susceptibilidad, toxicidad y degradación del compuesto en cuestión (Radjenovic *et al.*, 2007; Ramos, 2013; Chen *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2014).

Actualmente se han realizado investigaciones para la determinar los efectos directos que producen la presencia de fármacos específicos en el ambiente y a pesar de la importancia aún muchos efectos adversos de los fármacos en el medio ambiente son desconocidos.

Un estudio realizado por SanJuan-Reyes y colaboradores determinó que la presencia de Anti-inflamatorios No Esteroideos (AINEs) en un efluente de una planta de fabricación de fármacos produce stress oxidativo a *Cyprinus carpio* (carpa común), el daño de este tipo fue más evidente en las branquias de los peces (SanJuan-Reyes *et al.*, 2013).

De acuerdo con estudios realizados en el 2013 por Bartskova y colaboradores, concluyeron que la presencia de ibuprofeno en concentraciones de entre 0.0001 y 0.8 mg·L<sup>-1</sup>, incrementa la actividad antioxidante y biotransformación de encimas de *Danio rerio* y aumenta su peroxidación lipídica (Bartskova *et al.*, 2013).

Cruz y colaboradores en el 2014, realizaron un estudio para la determinación de los Anti-inflamatorios No Esteroideos (AINEs), naproxeno, ibuprofeno y ketoprofeno en agua superficial de receptores de aguas residuales no tratadas de la ciudad de Tapachula Chiapas, mediante tres campañas de muestreo. La identificación y cuantificación se realizó por medio de una metodología analítica validada por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. La concentración de los AINEs presente en las muestras fueron para naproxeno de 17.83 a 142.50 µg·L<sup>-1</sup>, ketoprofeno de 5.30 a 67.87 µg·L<sup>-1</sup> e ibuprofeno 3.97 a 31.30 µg·L<sup>-1</sup> (Cruz *et al.*, 2014).

Corcoll y colaboradores en el 2014, realizaron un estudio en donde determinaron que la exposición de ibuprofeno y diclofenaco a concentraciones de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  sobre biopelículas, provoca tolerancia a éstos AINEs, esto fue medido a través de eficiencia fotosintética y actividad de la  $\beta$ -glucosidasa (Corcoll *et al.*, 2014).

En el 2015 Zenobio y colaboradores evaluaron el efecto que producía la presencia de fármacos y productos de cuidado personal (PPCP, por sus siglas en inglés de Pharmaceutical and Personal Care Products) en peces nativos del refugio nacional de vida silvestre Baca en el estado de Colorado, Estados Unidos de Norteamérica, y observó que la presencia de PPCP produce un gonadosomático (GSI) bajo, estados de gametos inmaduros y en su estado reproductivo (Zenobio *et al.*, 2015).

Estudios realizados por Islas-Flores y colaboradores, indican que la exposición del AINEs ibuprofeno (en concentraciones de  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) induce stress oxidativo en hígado, sangre y branqueas de *Cyprinus carpio* (Islas-Flores *et al.*, 2014).

Galar-Martínez y colaboradores en el 2014, realizaron un estudio para determinar los efectos tóxicos ketorolaco sobre *Cyprinus carpio*. En su estudio Galar-Martínez concluyó que el ketorolaco en un intervalo de concentración de 1 a  $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  provocó stress oxidativo y citotoxicidad, específicamente en hígado, cerebro y sangre de *Cyprinus carpio* (Galar-Martínez *et al.*, 2014).

El efecto a la exposición de diferentes concentraciones de AINEs (diclofenaco sódico y naproxeno sódico) sobre las plantas fue estudiado por Schmidt y Redshaw en el 2015, encontrando que sí afectan el crecimiento de estas. Sin embargo, esta inhibición del crecimiento va a depender de la especie que se trate (Schmidt y Redshaw, 2015).

Al igual que el ibuprofeno, diclofenaco y naproxeno, el ketorolaco es un fármaco del grupo de los AINEs y diferentes autores reportan su presencia en diferentes matrices. A continuación se presentan algunos de ellos.

En el 2006, Gómez y colaboradores determinaron la cantidad de diferentes fármacos (entre ellos el ketorolaco) presentes en efluentes de agua residual de un hospital en Almería, España. La determinación se realizó por medio de un muestreo por puntos y la

metodología analítica por Cromatografía de Líquidos acoplado a un detector de espectrometría de masas (CL/MS). Encontraron un intervalo de concentración de ketorolaco entre  $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $59.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y un promedio de  $4.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Gómez *et al.*, 2006).

Rosal y colaboradores en el 2010, realizaron un estudio sobre la remoción de fármacos que se encuentran en agua residual de una planta de tratamiento en Alcalá de Henares, España, por medio de un tratamiento biológico seguido de un tratamiento por ozonación y determinaron que la cantidad de ketorolaco disuelta en el influente fue en promedio de  $0.407 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y en el efluente un promedio de  $0.228 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Rosal *et al.*, 2010).

Deblonde y colaboradores en el 2011, realizaron un estudio en donde recabaron información sobre la concentración de diferentes fármacos y químicos sobre influentes y efluentes de plantas de tratamiento de agua residual en Estados Unidos de América. Reportaron una concentración de ketorolaco en el influente de  $0.407 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y en el efluente de  $0.228 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Deblonde *et al.*, 2011; Gavrilesco *et al.*, 2015).

En ríos de España se determinaron diferentes fármacos y productos de cuidado personal. Martínez-Bueno y colaboradores identificaron y determinaron la presencia de ketorolaco en las muestras. Sin embargo, como éste fármaco no era parte de sus objetivos no se realizó la cuantificación (Martínez-Bueno *et al.*, 2012).

En el 2014, Al-Terawneh y colaboradores realizaron un estudio para determinar la cantidad de diferentes fármacos entre ellos el ketorolaco en influentes y efluentes de diferentes plantas tratadoras de agua residual en Jordania, realizando un muestreo por puntos y realizando un pool de esas muestras. Sin embargo, no detectó en ninguna de ellas aunque la metodología analítica utilizada implicaba cromatografía de líquidos acoplada a un detector de masas (Al-Tarawneh *et al.*, 2014).

Oliveira y colaboradores en el 2015, determinaron la cantidad de diferentes fármacos y productos de cuidado personal en influentes y efluentes de plantas tratadoras de agua residual de diferentes hospitales en New Jersey, Estados Unidos de América. El muestreo que realizaron fue por puntos y la cuantificación por medio de CLAR acoplado a detector

de masas. El fármaco ketorolaco fue uno de los cuantificados, encontrándolo en intervalos de concentración desde  $0.03 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $1.15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Oliveira *et al.*, 2015).

A manera de resumen, en la Tabla 2 se muestran las concentraciones de ketorolaco reportados por diferentes autores en diferentes matrices.

Tabla 2. Concentraciones de ketorolaco reportadas en diferentes matrices.

MATRÍZ	CONCENTRACIÓN REPORTADA ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	TIPO DE MUESTREO	LUGAR	AUTOR
Efluente de agua residual hospitalaria	Mínimo = 0.2 Máximo = 59.5	Puntual	España	Gómez <i>et al.</i> , 2006
Plantas de tratamiento de agua residual	0.013 – 4.070	Puntual	España	Martínez Bueno <i>et al.</i> , 2007
Plantas de tratamiento de agua residual	Influente Mínimo < 2.0 Máximo = 2.793  Efluente Mínimo < 2.0 Máximo = 0.607	Puntual	España	Rosal <i>et al.</i> , 2010
Plantas de tratamiento de agua residual	Influente = 0.407 Efluente = 0.228	Puntual	Estados Unidos de América	Deblonde <i>et al.</i> , 2011 Gavrilescu <i>et al.</i> , 2015
Plantas de tratamiento de agua residual	No detectado	Puntual	Jordania	Al-Tarawneh <i>et al.</i> , 2014
Agua residual hospitalaria	Mínimo = 0.12 Máximo = 1.15	Puntual	Estados Unidos de América	Oliveira <i>et al.</i> , 2015

### 2.3 Ketorolaco

El primer documento en donde se describe el ketorolaco fue en la patente norteamericana número 4,089,969 por Muchowsky y Kluge en 1978, en donde se describe su procedimiento de síntesis química, además se propone su uso para el tratamiento de la inflamación, dolor y pirexia en mamíferos, la cual debe estar acompañada de excipientes no-tóxicos para su administración (Muchowsky y Kluge, 1978).

El ketorolaco tiene propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas y está indicado en el tratamiento a corto plazo del dolor leve a moderado en el postoperatorio y

en traumatismos musculoesqueléticos, además del dolor causado por cólico nefrítico. Este fármaco está contraindicado cuando el paciente presenta úlcera gastro-duodenal activa, hemorragia digestiva, a pacientes con insuficiencia renal moderada o grave (PLM, 2015).

La actividad analgésica del ketorolaco se debe a la eliminación de formación de prostaglandinas, por medio de la inhibición de la enzima prostaglandin sintetasa (Olives *et al.*, 2012).

El ketorolaco es metabolizado por hidroxilación y conjugación con ácido glucónico. La vía renal es la ruta primaria de excreción del fármaco, aproximadamente del 92% de la dosis, de estos el 40% en forma de metabolitos y un 60% como ketorolaco. Aproximadamente del 6% de la dosis es excretada por heces (PLM, 2015; U.S. Food and Drug Administration, 2015).

Otros autores indican que la excreción del ketorolaco por vía renal es de entre un 55% a 60%, mientras que por vía hepática se lleva a cabo entre el 40% a 45%. Cuando la administración de la dosis se realiza vía intravenosa, el 91% de la dosis es excretada en 24 horas (Kulo *et al.*, 2014).

De acuerdo a varios autores, a continuación se presentan los nombres químicos del ketorolaco: (O'Connor *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2015; Boyka *et al.*, 2012; Merck & Co. Inc., 2006)

- (±)-5-benzoyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine-1-carboxylic acid
- 5-benzoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo [1,2-a] pyrrole-1-carboxylic acid,

En la Figura 2 se muestra la estructura química del ketorolaco.

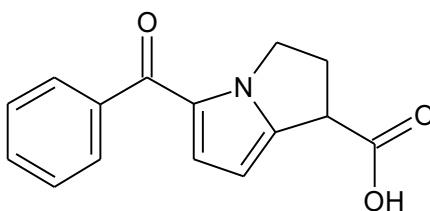


Figura 2. Estructura química del ketorolaco (Merck & Co. Inc., 2006).

Los datos de propiedades físico-químicas fueron obtenidos del The Merck Index y se presentan en la Tabla 3 (Merck & Co. Inc., 2006).

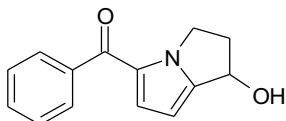
Tabla 3. Propiedades físico-químicas de ketorolaco. (Merck & Co. Inc., 2006)

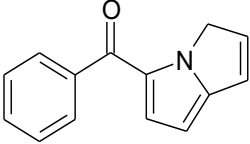
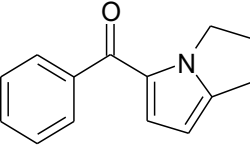
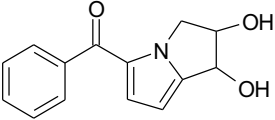
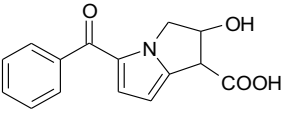
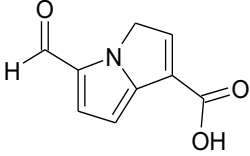
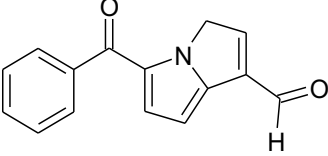
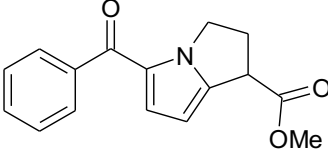
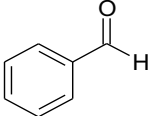
PROPIEDAD	VALOR
CAS	74103-06-3
Descripción	Cristales a partir de acetato de etilo + éter
Punto de fusión:	160° C – 161°C
Masa Molecular	255.27 g/mol
Formula Condensada	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>
Fórmula Porcentual	C 70.58%, H 5.13%, N 5.49%, O 18.80%
Máxima absorbancia UV (metanol)	312 nm
pKa	3.49 ± 0.02
LD <sub>50</sub> (oral en ratones)	200 mg/Kg

De acuerdo al software EPI Suite, desarrollado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de América (USEPA), en el apartado de KWOWIN, indica que el logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua (log de K<sub>ow</sub>) del ketorolaco es 2.32 (U.S. Environmental Protection Agency, 2013).

Durante el desarrollo de metodologías analíticas que son diseñadas como indicativas de estabilidad, es común la caracterización de las estructuras químicas de los productos de degradación. Salaris y colaboradores en el 2010 y Kalariya y colaboradores en el 2014, realizaron la caracterización de los productos de degradación de ketorolaco bajo diferentes condiciones de stress. En la Tabla 4, se muestran las estructuras de los productos de degradación de ketorolaco.

Tabla 4. Estructuras químicas de los productos de degradación de ketorolaco (Elaboración propia con información de Salaris *et al.*, 2010; Kalariya *et al.*, 2014).

Id	Estructura	Masa molecular (g·mol <sup>-1</sup> )
K-1		228.1

K-2		210.1
K-3		212.1
K-4		244.1
K-5		272.1
K-6		178.0
K-7		238.1
K-8		270.1
K-9		107.0

#### 2.4 Consumo de ketorolaco en el Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos”

En el Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos” ubicado en Toluca, Estado de México, el consumo promedio por mes en el primer semestre del 2013 de ketorolaco fue de 505.83 gramos, lo que implicaría 16 806.7 unidades de dosis de 30 mg cada una.



Los datos de consumo de ketorolaco otorgados por personal de la farmacia del Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos”, durante los años 2015 y 2016 se muestran en la Figura 3 y Figura 4.

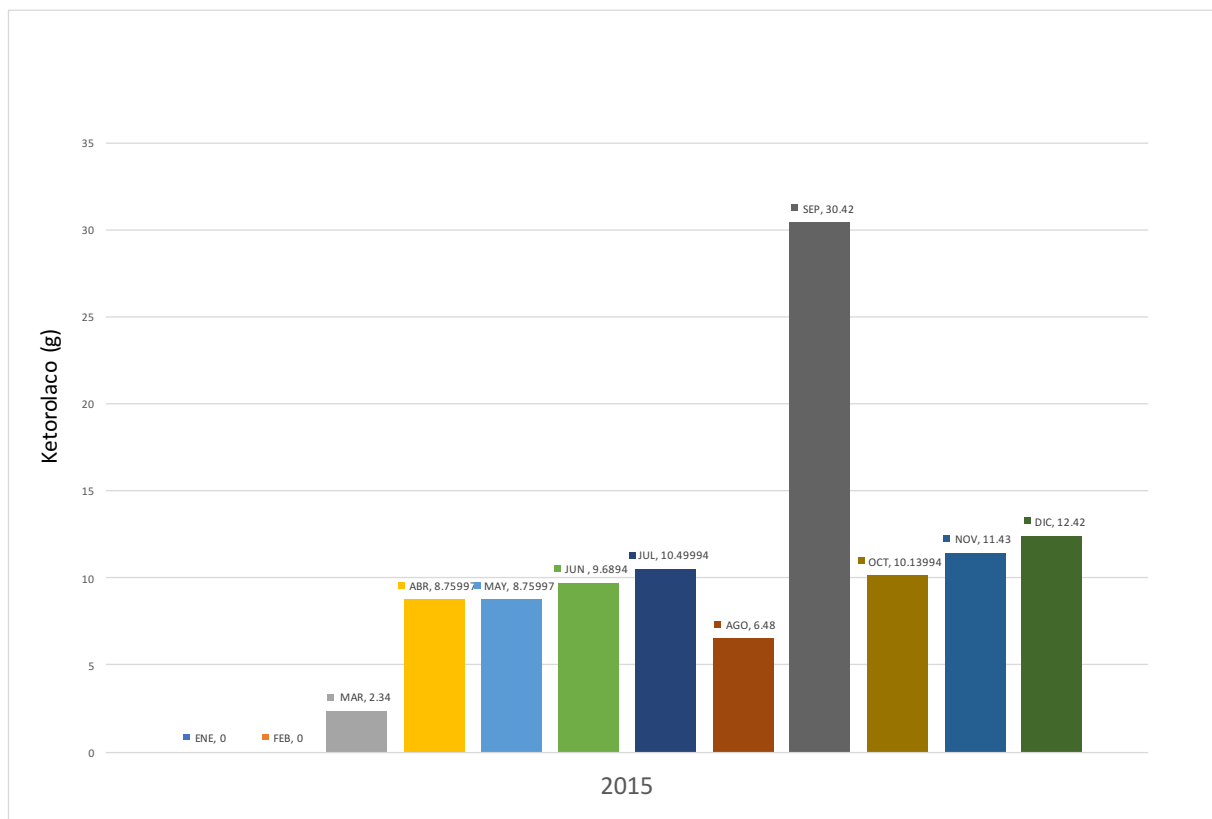


Figura 3. Consumo de ketorolaco (gramos por mes) en el Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos” durante el 2015.

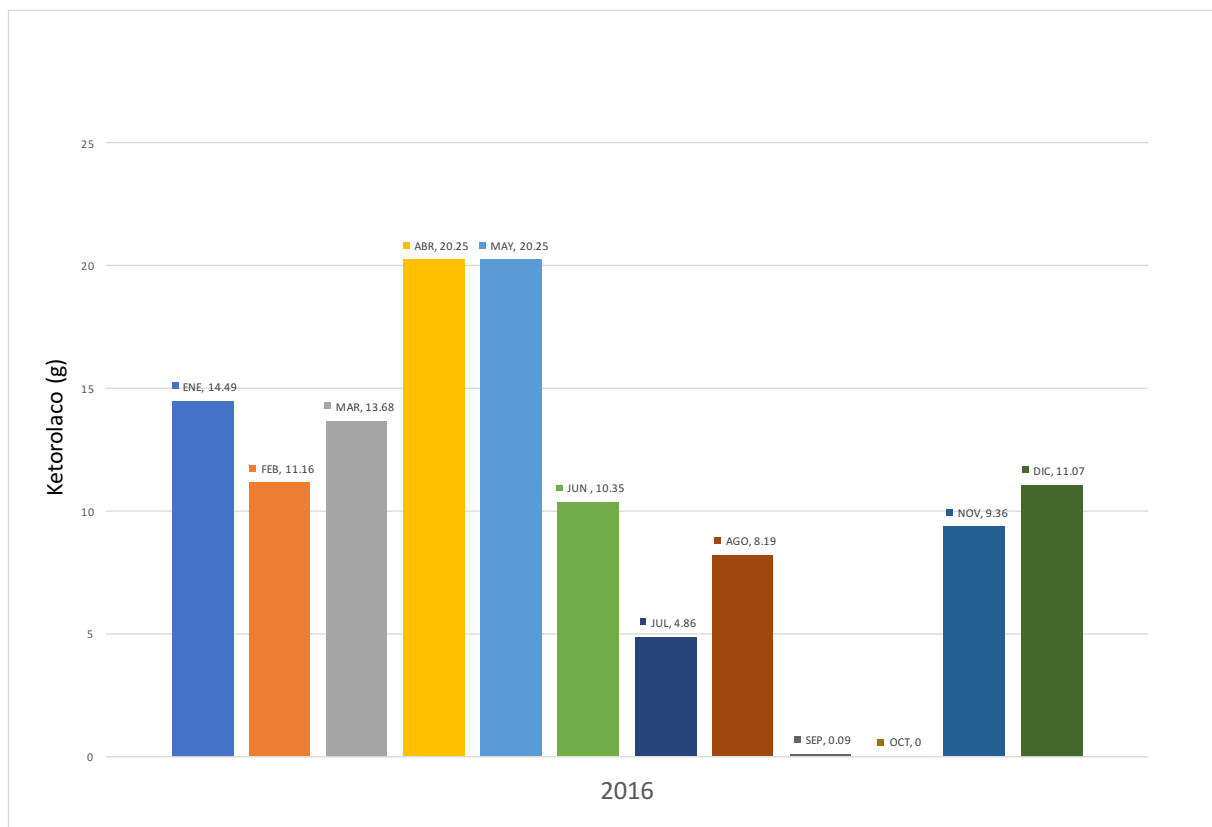


Figura 4. Consumo de ketorolaco (gramos por mes) en el Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos” durante el 2015.

## 2.5 Muestreo y tratamiento de la muestra

El muestreo y la preparación de la muestra es una etapa importante en el análisis, se debe definir perfectamente su estrategia, lo cual depende del tipo de información que se desea obtener y evitar errores ya que no pueden realizarse correcciones posteriormente (Kostopoulou y Nikolaou, 2008).

En general existen 3 tipos de técnicas para el muestreo en matrices acuáticas: el muestreo por puntos, el muestreo biológico y muestro pasivo (Aguilar, 2010).

### 2.5.1 Muestreo directo o por puntos.

Es la técnica más utilizada en el monitoreo de sistemas acuáticos. Consiste en la toma representativas (generalmente uno o más litros de agua ambiental o agua de desecho), con frecuencia y puntos establecidos en donde se intuye la presencia del analito.

El uso de esta técnica de muestreo implica ventajas que se deben considerar cuando es utilizada en la estrategia del muestreo, algunas se enlistan a continuación: (Alvarez *et al.*, 2005; Kostopoulou y Nikolaou, 2008; Greenwood *et al.*, 2009; Zenobio *et al.*, 2015; Martinez Bueno, *et al.*, 2016).

- La más utilizada en el monitoreo de sistemas acuáticos.
- Se obtienen datos por tiempo y lugar determinado.
- Adecuada para muestreo en condiciones estáticas.
- Tiempo corto durante el muestreo.
- Puede modificarse el volumen de muestreo dependiendo del límite de detección y cuantificación.

Sin embargo, este tipo de muestreo en la mayoría de los casos debe ir acompañado de un pre-tratamiento antes de ser analizado por Cromatografía de Gases o CLAR. Algunas técnicas de pre-tratamientos de la muestra se enlistan a continuación:

#### 2.5.1.1 Extracción en fase sólida.

Extracción en Fase Solida (por sus siglas en inglés SPE). La separación se lleva a cabo por una retención selectiva de los analitos en una fase sólida adsorbente y los demás compuestos de la matriz son separados debido a que son excluidos de la retención, dicha retención se puede llevar a cabo por diferentes fenómenos como son puentes de hidrógeno, fuerzas de Vander-Waals, efectos de hidrofobicidad, interacciones de electrones  $\pi$  o procesos de intercambio iónico (Olives *et al.*, 2012).

La utilización de estos tipos de sistemas permite una limpieza y concentración de la muestra. Sin embargo, los sistemas SPE tienen ciertas desventajas como a continuación se enuncian (Fatta *et al.*, 2007):

- Compromete la productividad, debido a que son de mecanismo manual.
- Existe exposición a matrices que pueden ser de carácter tóxico, lo que incrementa los riesgos a la salud.
- Tiene problemas de reproducibilidad debido a la variación de lote a lote y al manejo manual.

Gómez y colaboradores en el 2007 y Martínez-Bueno *et al.*, 2007 utilizaron la técnica SPE para la extracción de diferentes tipos de fármacos de un efluente de agua residual, entre ellos el ketorolaco. Empleó un cartucho Oasis HBL<sup>®</sup> a un pH de 7 y obtuvo un recobro mayor al 75% en la mayoría de los analitos estudiados (Gómez *et al.*, 2007; Martínez-Bueno *et al.*, 2007).

La extracción de fármacos de efluentes de agua con técnicas SPE, puede ser compleja, que se debe verificar el pH del agua, así como el tipo de compuesto orgánico que se trata de extraer, si es ácido, alcalino o neutro.

Los cartuchos Oasis MXC<sup>®</sup> son probados a pH 1.5 a 3.0 para la extracción de compuestos ácidos, alcalinos y neutros a valores bajos de pH. La unión con compuestos alcalinos se realiza por intercambio catiónico, cuando estos se encuentran en su forma ionizada. Mientras que los compuestos ácidos y neutros se retienen por medio de fase reversa.

Licholt EN<sup>®</sup> puede extraer compuestos orgánicos polares a través de interacciones hidrofóbicas a un pH de 7 se obtienen recobros de alrededor del 70% (Fatta *et al.*, 2007).

En la Tabla 5 se muestran algunas aplicaciones para utilización de cartuchos de SPE en la extracción de compuestos orgánicos en matrices acuosas:

**Tabla 5. Aplicaciones de utilización de cartuchos de SPE en compuestos orgánicos en matrices acuosas.**  
(Elaboración propia con información de Gómez *et al.*, 2007; Fatta *et al.*, 2007).

Cartucho SPE	pH	Tipo de Compuestos
Oasis MXC <sup>®</sup>	1.5 – 3.0 7.0 – 7.5	Compuestos orgánicos polares Omeprazol
Licholt EN <sup>®</sup>	3.0 – 9.0	Compuestos orgánicos polares
Bakerbond C18 <sup>®</sup>	8.0 – 9.0	Amoxicilina
Oasis HLB <sup>®</sup>	7.0 8.5 – 9.0 7.0	Omeprazol Amoxicilina Ketorolaco

### 2.5.1.2 Micro-extracción por fase sólida.

En la microextracción en fase sólida o SPME (por sus siglas en inglés de Solid-Phase Microextraction) al igual que la SPE, la extracción se realiza por la atracción de los compuestos de interés por medio de un material adsorbente y que se trata de una capa; la cual es una fibra cubierta de un material adsorbente y en este caso la cantidad de los componentes extraídos es proporcional a la cantidad que se encuentra en la muestra (Kostopoulou y Nikolaou, 2008).

La SPME es una técnica de pretratamiento libre de disolventes, la cual integra la extracción, concentración y limpieza de la muestra. Se basa en la partición del analito entre la muestra y una fase estacionaria encontrada en una membrana sólida polimérica, la cual a su vez se encuentra montada en la aguja de una jeringa (Olives *et al.*, 2012).

En ocasiones la utilización de SPE es más conveniente; sin embargo, la técnica SPME tiene propiedades y ventajas que la pueden hacer más atractiva para su utilización, como son las siguientes:

- Es más rápido que el SPE
- Requiere 100 veces menos de solventes orgánicos
- Requiere menos volumen de muestra
- Las fibras pueden ser reutilizadas

Las fibras o membranas más utilizadas en el SPME son poliacrilatos, dimetilsiloxano-divinilbenceno, C18 y carbowax –divinilbenceno (Kostopoulou y Nikolaou, 2008).

### **2.5.1.3 Extracción líquido-líquido**

La extracción líquido-líquido se basa en la transferencia del analito que se encuentra en una muestra acuosa a un solvente que es inmiscible en agua. Para la utilización de este tipo de pre-tratamiento de la muestra es muy importante considerar dos variables: la naturaleza y afinidad del analito con el solvente extractor y el pH de la muestra (Olives *et al.*, 2012).

La utilización de este sistema de pre-tratamiento y extracción tiene diferentes inconvenientes como son la formación de emulsiones, la utilización de altos volúmenes de solventes orgánicos, además de que se involucran más pasos, como disolución, filtración, centrifugación, evaporación, secado y reconstitución (Olives *et al.*, 2012).

### **2.5.1.4 Micro-extracción en fase líquida (LPME)**

La micro-extracción en fase líquida o LPME (por sus siglas en inglés, *Liquid Phase Microextraction*) utiliza el mismo fundamento que la extracción líquido-líquido. Sin embargo, este pre-tratamiento utiliza una mínima cantidad de solvente inmiscible en agua (Olives *et al.*, 2012).

En el 2013, Larsson y colaboradores realizaron la cuantificación de AINEs (ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno), durante varias etapas de una planta tratadora de agua residual en Lund, Suecia. Utilizando membranas de polipropileno y un buffer captador de di-*n*-hexil éter (Larsson *et al.*, 2013).

### **2.5.1.5 Extracción acelerada de solventes**

La extracción acelerada de solventes ASE (por sus siglas en inglés: Accelerated Solvent Extractor) utiliza el mismo principio que el sistema de extracción Soxhlet. A diferencia del Soxhlet, la técnica ASE utiliza volúmenes de solvente mucho menores (<50 mL); la presión y temperatura elevadas que se utilizan en la técnica ASE se lleva a cabo en sistemas cerrados; el tiempo para realizar la extracción es menor a 20 min, mientras que para Soxhlet pueden utilizarse ciclos de 8 hasta 24 horas (Gan *et al.*, 1999).

Bu y colaboradores en el 2014, utilizaron la ASE para la extracción y posterior cuantificación de diferentes contaminantes orgánicos de sedimentos del río Haihe, China. El tratamiento de la muestra constó de una ASE de 5 g de sedimento con una mezcla de diclorometano-acetona (1:1 v/v), posteriormente, los extractos fueron limpiados con cromatografía de permeación de gel y finalmente, una extracción en fase sólida. La determinación de los contaminantes orgánicos se realizó por medio de la técnica de estándar adicionado y cromatografía de gases acoplado a un detector de masas, obteniendo recobros desde 84.1% a 128.6% (Bu *et al.*, 2014).

### 2.5.1.6 Liofilización

La liofilización o secado en frío es un proceso en el cual el agua contenida en una muestra es removida. El proceso de liofilización se lleva a cabo por medio de la congelación de la muestra y posteriormente colocada bajo vacío lo que provoca que el agua en estado sólido pase directamente a estado gaseoso sin pasar por el estado líquido (U.S. Food and Drug Administration, 2014).

El proceso de liofilización comprende 3 etapas: congelado, sublimación (secado primario) y desorción (secado secundario) (U.S. Food and Drug Administration, 2014).

La liofilización presenta las siguientes ventajas:

- Remueve el agua sin utilizar calor excesivo.
- Permite la concentración de la muestra
- El proceso de liofilización permite la estabilidad de los analitos

La liofilización incluye las siguientes desventajas:

- La utilización de un equipo costoso.
- Se incrementa la manipulación de la muestra.
- Se incrementa el tiempo del pre-tratamiento de la muestra.

## 2.6 Muestreo biológico

Se realiza por medio de organismos vivos que son utilizados como bio-indicadores o bien como bio-monitores. Existen dos tipos de estrategias para el muestreo biológico; la activa, consiste en seleccionar la especie adecuada para el muestreo en un punto y trasladarla al área que se quiere monitorizar. La segunda es la pasiva, en donde consiste en recoger a las especies en su hábitat natural (Aguilar, 2010).

Este tipo de muestreo arroja información sobre sustancias potencialmente persistentes o bio-acumulativas, así como información toxicológica. Así, se puede tener un estimado del promedio de la concentración del contaminante a lo largo de un periodo de tiempo, el que puede llegar a ser de hasta meses (Greenwood *et al.*, 2009).

La bio-acumulación da un referencia de los niveles de concentración del contaminante y puede ser usado para la comparación entre sitios o tiempos y determinar la variación entre ellos (Greenwood *et al.*, 2009).

Sin embargo, el muestreo biológico presenta algunas limitaciones que se presentan a continuación (Greenwood *et al.*, 2009; Söderström *et al.*, 2009):

- No es posible la exposición de organismos a ambientes severamente contaminados.
- Los organismos utilizados en el muestreo deben estar perfectamente caracterizados y mantenidos en ambientes controlados para evitar que contengan el contaminante a determinar antes de ser expuestos.
- El tratamiento del tejido antes de su análisis es costoso, debido a la complejidad de la matriz.
- En algunos casos no es posible concluir que el contaminante no está presente en el agua o no hubo una bio-acumulación.
- Algunos contaminantes son excretados o metabolizados por los organismos utilizados.
- Generalmente, implica la muerte del organismo en estudio.



- Existe demasiada variabilidad entre los datos obtenidos, debido a la propia variación entre los organismos utilizados (edad, peso, especie, etc.).

En el 2007, Ramírez y colaboradores realizaron un estudio para la determinación de 23 fármacos y 2 metabolitos en 2 ríos de Texas, Estados Unidos. Utilizado peces para el muestreo (*Lepomis sp.*) y cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de masas para realizar el análisis del tejido de los peces (Ramírez *et al.*, 2007).

Liscio y colaboradores en el 2009, realizaron la comparación entre muestreador biológico y muestreador pasivo, para la determinación de estrógenos en una planta tratadora de agua residual en Genoa, Italia. Como organismo biológico utilizaron el mejillón *Unio pictonum* y como muestreador pasivo utilizaron un muestreador integrado para compuestos orgánicos polares (POCIS en inglés), concluyendo que existe una buena correlación entre los resultados obtenidos en la actividad estrogénica de los mejillones y los equivalentes estrogénicos encontrados en las POCIS (Liscio *et al.*, 2009).

## 2.7 Muestreo pasivo.

En éste tipo de muestreo, el analito fluye desde el medio que se desea muestrear hacia un medio colector como resultado de un gradiente de concentración entre ambos, por medio de difusión pasiva. El flujo de materia se mantiene hasta alcanzar un equilibrio o bien hasta que la sesión del muestreo se finalice por el usuario. El analito es retenido en un medio colector y posteriormente extraído para su análisis (Aguilar, 2010 y Morin *et al.*, 2012).

Los muestreadores pasivos se constituyen de una fase receptora que es altamente afín a los compuestos que se desean determinar, por lo que son retenidos en ésta y una membrana de difusión, que separa la fase receptora del agua a muestrear y que sin embargo, permite la transferencia de analito a la fase receptora (Greenwood *et al.*, 2009 y Morin *et al.*, 2012).

Los muestreadores pasivos han sido diseñados para el monitoreo de concentraciones de diferentes compuestos como son, compuestos orgánicos polares, compuestos orgánicos no

polares, metales pesados, compuestos órgano-metálicos y compuestos orgánicos volátiles (Greenwood *et al.*, 2009).

Como el tiempo de exposición de los muestreadores pasivos es largo (desde semanas hasta meses), este tipo de muestreadores pueden ser utilizados para el monitoreo ambiental en donde la concentración del analito fluctúe con respecto al tiempo causado por diferentes factores como la temporada del año, descargas esporádicas o ilegales de contaminantes industriales o tormentas pluviales (Greenwood *et al.*, 2009).

Debido a que los tiempos de muestreo son más prolongados y que el muestreador integra grandes volúmenes de agua, los analitos del efluente son pre-concentrados durante el muestreo, esto eleva el límite de detección y cuantificación de la metodología analítica utilizada (Greenwood *et al.*, 2009; Zenobio *et al.*, 2015; Martínez Bueno *et al.*, 2016).

Además, en general los muestreadores pasivos no requieren energía lo que facilita su uso en lugares remotos, para obtener datos representativos solo es necesario realizar algunos análisis, lo que reduce el costo y evita la descomposición de los analitos durante su transporte o almacenamiento (Zabiegala *et al.*, 2010).

Existen factores que pueden modificar la colección de los analitos, entre ellas se encuentran: la concentración del analito u otros compuestos, presión, temperatura, salinidad de la muestra y flujo o turbulencia (Zabiegala *et al.*, 2010; Söderström *et al.*, 2009).

Cabe mencionar que ésta técnica no puede reemplazar los procedimientos convencionales de análisis, lo más recomendable es realizar una combinación de ésta técnica con la técnica biológica (Zabiegala *et al.*, 2010).

En general, los muestreadores pasivos tienen ciertas desventajas, las cuales se citan a continuación:

- Crecimiento de una biocapa que limite la difusión del analito para que sea retenido en el material adsorbente.

- La retención depende de la temperatura y la turbulencia del efluente que se desea muestrear.
- Se debe realizar un estudio para cada analito que se desee muestrear para determinar la respuesta del muestreador con respecto al tiempo de muestreo para la determinación de la cantidad promedio por unidad de tiempo.

La utilización de muestreadores pasivos provee información sobre concentraciones promedio que solo serían posibles obtener realizando un gran número de muestreos puntuales, que suelen ser costosos y logísticamente complicados (Greenwood *et al.*, 2009).

Existen disponibles un gran número de dispositivos de muestreadores pasivos, diseñados para diferentes tipos de compuestos. Sin embargo, en todos los casos usan el mismo fundamento la adsorción del analito sobre un material por difusión pasiva.

A manera de resumen, en la Tabla 6 se muestran algunas ventajas y desventajas de las técnicas de muestreo de sistemas acuáticos.

**Tabla 6. Ventajas y desventajas de las técnicas de muestreo.**

<b>Técnica</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Muestreo por Puntos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La más utilizada en el monitoreo de sistemas acuáticos</li> <li>• Se obtienen datos por tiempo y lugar determinado.</li> <li>• Adecuada para muestreo en condiciones estáticas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es costoso.</li> <li>• Requiere tiempo.</li> <li>• Producen grandes variaciones.</li> <li>• Se favorece la transformación de las especies a analizar durante el transporte al laboratorio.</li> </ul>
<b>Muestreo Biológico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Favorece la determinación de contaminantes que se encuentran a baja concentración.</li> <li>• La monitorización es continua y efectiva.</li> <li>• Proceso económico.</li> <li>• Permite preservar la naturaleza del analito.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las especies seleccionadas para el muestreo solo pueden sobrevivir en su hábitat.</li> <li>• Los analitos puede ser metabolizados.</li> <li>• La bio-acumulación varía de individuo a individuo.</li> </ul>
<b>Muestreo Pasivo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capaz de monitorizar de forma continua niveles determinados de contaminantes en el agua.</li> <li>• No requiere supervisión.</li> <li>• El muestreo es más representativo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No es selectivo a un compuesto en específico.</li> <li>• La adsorción se ve afectada con la turbulencia del efluente.</li> <li>• Debe realizarse una calibración previa.</li> </ul>

## 2.8. Métodos de análisis para ketorolaco

La definición de *Cromatografía* fue introducida por primera vez en 1906 por el Químico Botánico Michael Tswett, derivado del griego *Chroma* – color y *Grapho* – escritura. Tswett realizó un trabajo en donde describía la separación de pigmentos coloreados de plantas en bandas por medio de columnas de tiza y otros materiales como polisacáridos. Tswett observó el efecto de las separaciones usando diferentes materiales en la columna y de su tamaño de partícula (Braithwaite y Smith, 1999).

La *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) define la cromatografía de la siguiente manera:

*“Un método físico de separación en el cual los componentes a separar son distribuidos entre dos fases, una de ellas está fija (fase estacionaria) y la otra se mueve a una dirección definida (fase móvil)”* (International Union of Pure and Applied Chemistry, 2012).

La cromatografía de líquidos de alta resolución o CLAR es de las técnicas analíticas más utilizadas, debido al desarrollo impresionante de equipos cada vez más exactos y precisos, así como el uso de nuevos materiales en la fase estacionaria que la hacen más eficiente, económica, resistente y selectiva, lo que la hace de las más rentables para la separación y cuantificación de analitos en matrices complejas.

A continuación en la Tabla 7 se muestran algunas metodologías por medio de la técnica CLAR para la identificación y cuantificación de ketorolaco en diferentes matrices analíticas, que van desde fabricación del mismo fármaco, en productos farmacéuticos, superficies de equipos de fabricación farmacéutica para la evaluación de limpieza, etc.

Tabla 7. Metodologías analíticas por CLAR para la identificación y cuantificación de ketorolaco.

MATRÍZ	COLUMNA	FASE MÓVIL	FLUJO (mL·min <sup>-1</sup> )	DETECCIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	AUTOR
Separación de isómeros en plasma humano	Chiral –AGP 100 x 4.0 mm 5.0 µm	Buffer de formato de amonio 10 mM pH 4.70 : ACN Gradiente	Gradiente	Espectrometría de Masas	4.47 y 11.71	Sabyasachi <i>et al.</i> , 2011
Formulación Farmacéutica	LiChrosorb C18 250 x 4.6 mm 5.0 µm	Buffer Acetato de Sodio 0.1 M pH 5.0 : ACN : THF (23:75:2 % v/v) Isocrático	1.0	UV 230 nm	3.05	Boyka <i>et al.</i> , 2012
Materia Prima (Determinación de impurezas)	X-Bridge C8 75 x 3.0 mm 2.5 µm 44° C	THF: Buffer de Fosfato monobásico de amonio 0.05 mM pH 3.0 (28:72 % v/v) Isocrático	1.7	UV 313 nm	2.048	O'Connor <i>et al.</i> , 2012
Materia Prima (Separación de Isómeros)	Chiral –AGP 100 x 4.0 mm 5.0 µm	Buffer Fosfato monobásico de sodio 0.1M pH 4.5 : Isopropanol (98:2 % v/v) Isocrático	1.0	UV 322 nm	6.4 y 8.4	Dubey <i>et al.</i> , 2012
Superficies de equipos de fabricación	Symmetry C18 250 x 4.6 mm 5.0 µm	Agua : Metanol Ácido acético glacial (54:45:1 % v/v) Isocrático	1.2	UV 313 nm	-	Modi <i>et al.</i> , 2013
Determinación de Ketorolaco en plasma y orina	Hypersil BDS C18 250 x 4.6 mm 5.0 µm	Buffer de fosfato monobásico de potasio 15 mM pH 3.0 : ACN (60:40 %v/v) Isocrático	1	UV 313 nm	7.97	Kulo <i>et al.</i> , 2014
Separación de enantiómeros y metabolitos en plasma y orina	Chiral –AGP 100 x 4.0 mm 5.0 µm	Buffer Fosfato monobásico de sodio 50 mM pH 5.5 : Isopropanol (95:5 % v/v) isocrático	0.5	UV 313 nm	7.9	Kulo <i>et al.</i> , 2014
Formulación Farmacéutica	Inersil ODS C18 150 x 4.6 mm 5.0 µm 30° C	Buffer de fosfato monobásico de potasio 100 mM pH 4.5 : ACN (60:40 %v/v) Isocrático	0.8	PDA 316 nm	2.9	Rao <i>et al.</i> , 2015

En la Tabla 8 se muestran diferentes metodologías analíticas para la cuantificación de ketorolaco en agua residual reportadas por diferentes autores.

Tabla 8. Metodologías analíticas por CLAR para la identificación y cuantificación de ketorolaco en aguas residuales.

MATRIZ	COLUINA	FASE MÓVIL	FLUJO ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )	DETECCIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	AUTOR
Efluente de agua residual hospitalaria	Purospher Star RP-18 endcapped (125mm x 2.0 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	ACN:Ácido Fórmico 0.1% Gradiente	0.2	LC-ESI-MS/MS	18.96	Gómez <i>et al.</i> , 2006
Plantas de tratamiento de agua residual	Zorbax SB C18 (250 mm x 3.0 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	ACN:Ácido Fórmico 0.1% Gradiente	0.2	LC-ESI-TOF-MS/MS	30.4	Martínez-Buena <i>et al.</i> , 2007
Agua de ríos y agua residual	Agilent XDB C18 (50mm x 4.6 mm, 1.8 $\mu\text{m}$ )	ACN:Ácido Fórmico 0.1% Gradiente	0.6	LC-ESI-QTOF-MS/MS	8.32	Gómez <i>et al.</i> , 2010
Plantas de tratamiento de agua residual	ZORBAX SB C18 (250 mm x 3.0 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	ACN:Ácido Fórmico 0.1% Gradiente	0.2	QTRAP MS/MS system	-	Rosal <i>et al.</i> , 2010
Agua de ríos	Zorbax Eclipse XDB C8 (150 mm x 4.6 mm) 5 $\mu\text{m}$	ACN:Ácido Fórmico 0.1% Gradiente	0.5	TOF MS and MS/MS mode	-	Martínez-Buena <i>et al.</i> , 2012
Plantas de tratamiento de agua residual	Zorbax Eclipse XDB RP-C18 (150 x 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ )	ACN:Ácido Fórmico 0.1% Gradiente	0.7	LC-ESI-MS/MS	11.8	Al-Tamwether <i>et al.</i> , 2014
Agua residual hospitalaria	Waters Acquity BEH C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 $\mu\text{m}$ )	ACN:Acetato amonio 5mM Gradiente	0.3	LCMS	4.77	Olivier <i>et al.</i> , 2015

## 2.9. Validación de métodos analíticos.

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013 “Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos” define validación de la siguiente manera:

*“Validación, a la evidencia documental generada a través de la recopilación y evaluación de los datos obtenidos en la calificación y de las pruebas específicas, basadas en el conocimiento del proceso, sistema o método, para demostrar funcionalidad, consistencia y robustez”.* (Secretaría de Salud, 2013)

A su vez, el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México (CNQFB) por medio de su Guía de Validación de Métodos Analíticos define de una manera más precisa la validación de métodos analíticos:

*“Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada”.* (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002)

La validación de métodos analíticos tiene como objetivo demostrar que la metodología analítica es adecuada para el propósito que fue diseñado (International Conference on Harmonisation, 2005).

En función a la aplicación de la metodología analítica a validar, se necesita desarrollar diferentes parámetros de validación, en la Tabla 9, se indican que parámetros deben realizarse en función a la naturaleza del método.

A continuación, se definen cada uno de los parámetros que se evalúan durante una validación de metodología analítica, así como sus criterios de aceptación.

**Tabla 9. Parámetros de validación en función a la naturaleza del método (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002).**

PARÁMETRO	Contenido / Potencia / Valoración	Pruebas de Impurezas		Identificación
		Contenido	Límite	
Precisión / Adecuabilidad del sistema	SI	SI	SI <sup>c</sup>	*
Linealidad del Sistema	SI	SI	NO	NO
Especificidad <sup>a</sup>	SI	SI	SI	SI
Exactitud y Repetibilidad	SI	SI	NO	NO
Linealidad del Método	SI	SI	NO	NO
Precisión Intermedia <sup>b</sup>	SI	SI	NO	NO
Estabilidad Analítica <sup>b</sup>	*	*	NO	NO
Límite de Detección	NO	NO	SI	NO
Límite de Cuantificación	NO	SI	NO	NO
Robustez	*	*	*	NO
Tolerancia	*	*	*	NO

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

a. La Falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte como por ejemplo cromatografía de capa fina.

b. También es definido como un estudio de Tolerancia.

c. Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

### 2.9.1. Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002).

La *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) en su guía “*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*” indica que la precisión expresa el grado de dispersión entre una serie de medidas obtenidas de múltiples muestras de una misma muestra homogénea bajo condiciones preestablecidas (International Conference on Harmonisation, 2005).

La precisión se expresa usualmente en términos como varianza, desviación estándar o coeficiente de variación de las series de medidas. Por lo que el criterio de aceptación para este parámetro es un coeficiente de variación (CV) menor o igual a 1.5% para seis repeticiones.



### **2.9.2. Linealidad del sistema**

La linealidad es la habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado (International Conference on Harmonisation, 2005; Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002).

### **2.9.3. Especificidad**

Es la habilidad para determinar inequívocamente el analito en presencia de otros componentes. Típicamente estas pueden tratarse de impurezas, degradados, matriz, etc. (International Conference on Harmonisation, 2005).

El CNQFB define la especificidad como la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002).

El criterio de aceptación que se indica es que la respuesta analítica solo se debe al analito de interés.

### **2.9.4. Exactitud**

Es la concordancia entre un valor obtenido empleando el método y un valor de referencia. Es decir, la exactitud nos indica el grado de concordancia que existe entre la cantidad de analito obtenido por medio del método analítico y la cantidad verdadera presente en la muestra (International Conference on Harmonisation, 2005; Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002).

### **2.9.5. Repetibilidad**

La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. También puede ser denominada precisión intra-ensayo (International Conference on Harmonisation, 2005).

La repetibilidad es la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002).

#### **2.9.6. Linealidad del método**

La linealidad del método nos indica el grado de concordancia que existe entre la cantidad de analito obtenido por medio del método analítico y la cantidad verdadera presente en la muestra a diferentes niveles de concentración, generalmente en un intervalo que va desde el 70% hasta el 120% de la concentración de trabajo (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002).

#### **2.9.7. Precisión del método o precisión intermedia**

Precisión de un método analítico, expresado como concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días, diferentes equipos (International Conference on Harmonisation, 2005; Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002).

#### **2.9.8. Estabilidad analítica la muestra**

Una información que es muy útil durante el análisis de una muestra es el tiempo en el cual ésta es estable para su exacta cuantificación y por tal motivo la estabilidad analítica de la muestra se define como:

*“Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas”* (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002)

#### **2.9.9. Límite de detección**

Es la concentración mínima del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada de una manera exacta, bajo las condiciones de operación

establecidas (International Conference on Harmonisation, 2005; Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002).

#### **2.9.10. Límite de cuantificación**

Es la concentración mínima del analito en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas. El límite de cuantificación es un parámetro para determinaciones cuantitativas de compuestos a bajos niveles y es usado particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación (International Conference on Harmonisation, 2005; Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002).

#### **2.9.11. Robustez**

Capacidad de un método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método (International Conference on Harmonisation, 2005; Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002).

#### **2.9.12. Tolerancia.**

Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como puede ser marca de reactivos, equipos y columnas (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002).

# JUSTIFICACIÓN

### 3 JUSTIFICACIÓN

Las aguas residuales provenientes de hospitales se caracterizan porque contienen una gran variedad de sustancias químicas como son disolventes, agentes de contraste para rayos X, desinfectantes, así como productos farmacéuticos.

Las aguas residuales provenientes de hospitales pueden llegar a ser de 5 a 15 veces más tóxicas que las aguas provenientes de los hogares, por lo que este tipo de efluentes constituyen un riesgo potencial para el ser humano y el ambiente.

Estudios determinan que la presencia de ketorolaco en agua, produce stress oxidativo en especies de peces y como fue observado por diferentes autores, las plantas tratadoras de agua residual no eliminan por completo los fármacos, para garantizar que el procedimiento de tratamiento del agua es adecuado y evitar riesgos en la salud pública, es fundamental implementar una metodología analítica que permita la detección, identificación y cuantificación de ketorolaco en una matriz compleja como lo es el agua residual de una planta tratadora hospitalaria.

# HIPÓTESIS

#### **4 HIPÓTESIS**

Es posible la cuantificación de ketorolaco en efluente de agua residual de una planta tratadora hospitalaria por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) como técnica de análisis.

# OBJETIVOS



## 5 OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

- Desarrollar una metodología analítica para la identificación y cuantificación de ketorolaco, en un efluente de agua residual de una planta tratadora hospitalaria.

### 5.2. Objetivos específicos

- Determinar las condiciones cromatográficas que permitan la identificación y cuantificación de ketorolaco.
- Validación de la metodología analítica de acuerdo a los parámetros indicados en las Guías de Validación ICH.
- Realizar el muestreo en el efluente de la planta de tratamiento hospitalaria.
- Determinar la cantidad de ketorolaco en las muestras del efluente de la planta de tratamiento hospitalaria.
- Determinar las condiciones para la separación cromatográfica de ketorolaco y sus productos de degradación fotolítica en medio acuoso para su posterior cuantificación.
- Realizar el estudio de cinética de degradación fotolítica en medio acuoso de ketorolaco.

# METODOLOGÍA

## 6 METODOLOGÍA

### **Etapa 1: Desarrollo y optimización de condiciones cromatográficas.**

Con el propósito de obtener una buena separación cromatográfica, durante el desarrollo y optimización de las condiciones cromatográficas se realizaron diferentes experimentos modificando cada una de las variables. Estas variables fueron: columna cromatográfica, fase móvil, volumen de inyección, velocidad de flujo y temperatura.

Se realizaron ensayos para determinar cuál tipo de columna cromatográfica era la óptima para la detección y cuantificación de ketorolaco en las muestras. Los tipos de columna probados fueron:

- A. Waters X-Terra C<sub>18</sub> 5 µm 250 x 4.6 mm
- B. Phenomenex LunaC<sub>18</sub> 3 µm 150 x 4.6 mm
- C. Waters Symmetry C<sub>18</sub> 3 µm 250 x 4.6 mm
- D. Agilent Zorbax C<sub>8</sub> 5 µm 250 x 4.6 mm

Para realizar modificaciones en la selectividad y retención del ketorolaco, se propuso el uso de los siguientes disolventes y modificadores de pH en diversas proporciones para conformar la fase móvil final, los disolventes y modificadores de pH probados fueron los siguientes:

- Acetonitrilo
- Metanol
- Agua
- Acetato de amonio
- Fosfato de potasio tribásico
- Ácido fosfórico
- Ácido fórmico
- Ácido acético

La velocidad de flujo probada durante los experimentos fue en un intervalo  $0.1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta  $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , mientras que el volumen de inyección probado fue de  $10 \mu\text{L}$  y  $20 \mu\text{L}$  y una temperatura de la columna en un intervalo de  $20^\circ \text{C}$  hasta  $40^\circ \text{C}$ .

## **Etapas 2: Validación de la metodología analítica.**

Una vez que se encontraron las condiciones óptimas para el análisis por CLAR, en donde se obtuvo la mejor selectividad y sensibilidad para la detección y cuantificación de ketorolaco, se procedió a realizar su validación, por medio del análisis de los siguientes parámetros:

Especificidad.

Se realizó el análisis por CLAR bajo las condiciones obtenidas en la etapa 1 a diferentes muestras que se consideraban pudieran interferir en el análisis y así garantizar que la señal analítica obtenida pertenece exclusivamente al analito. Se determinó la resolución entre picos obtenidos y ésta en todos los casos fue mayor a 2.0.

Linealidad del sistema.

Se preparó por triplicado una curva de calibración de 8 puntos y se obtuvo el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el cual fue mayor a 0.98.

Linealidad del método.

Se determinó el porcentaje de recuperación por triplicado de 4 concentraciones conocidas que correspondían a los niveles bajo, medio y alto de la curva de calibración. El porcentaje de recuperación debía encontrarse entre el 98.0 -102.0 %. El porcentaje de recuperación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ recuperado} = (\text{Concentración obtenida} / \text{Concentración adicionada}) (100)$$

Precisión del sistema.

A partir de las lecturas obtenidas en la prueba de linealidad para cada punto, se obtuvieron los coeficientes de variación. El coeficiente de variación debía ser menor a 2.0 %. El

coeficiente de variación se calculó con la fórmula:  $C.V. = [(s)(100)] / \bar{x}$  donde C.V. es el coeficiente de variación, s es la desviación estándar y  $\bar{x}$  es el promedio.

Precisión intermedia.

Dos analistas en dos días diferentes realizaron tres determinaciones por día de una misma solución de concentración conocida al punto medio de la curva de calibración. Muestras por analista: 6. Muestras por prueba: 12. Se determinó la diferencia absoluta entre los resultados obtenidos de cada analista expresados como porcentaje de recobro. La diferencia absoluta entre analistas debía ser menor a 3.0 %.

Límite de detección.

Se realizó una curva de calibración a niveles bajos de concentración, se calculó la desviación estándar de la ordenada al origen, relacionándola con la pendiente de la curva de acuerdo a la siguiente fórmula:  $LD = 3.3s / p$  donde, s es la desviación estándar de la ordenada al origen y p es la pendiente.

Límite de cuantificación.

Se realizó una curva de calibración a niveles bajos de concentración, se calculó la desviación estándar de la ordenada al origen, relacionándola con la pendiente de la curva de acuerdo a la siguiente fórmula:  $LC = 10s / p$  donde, s es la desviación estándar de la ordenada al origen y p es la pendiente.

Las fórmulas para realizar la determinación de parámetros cromatográficos y parámetros estadísticos se encuentran en el Anexo B y Anexo C de esta tesis.

### **Etapa 3. Gestión del permiso para el muestreo del efluente.**

Se solicitó el permiso para la realización del muestreo a la Subdirección de Enseñanza, Investigación y Calidad del Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos” de la ciudad de Toluca en el Estado de México, mediante la redacción de una carta de exposición de motivos y donde se explicó de manera detallada el alcance del proyecto.

**Etapa 4. Muestreo de agua del efluente de la planta tratadora hospitalaria.**

Como parte del proceso del muestreo y con la intención de obtener información sobre el Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos” se realizó una investigación para determinar los recursos personales y físicos, el consumo medio de agua potable y características de la planta tratadora de agua residual.

El muestreo se realizó durante 3 días de manera puntual, tomando 4 L de agua residual en la fosa previa a la etapa de cloración.

**Etapa 5. Determinación de la cantidad de ketorolaco en las muestras.**

La determinación de ketorolaco en las muestras se realizó por medio de la metodología analítica desarrollada y validada en las etapas 1 y 2.

**Etapa 6. Determinación de cinética de degradación fotolítica y tiempo de vida media de ketorolaco en agua.**

Con el objetivo de determinar la persistencia del ketorolaco en el agua de la planta tratadora hospitalaria, se realizó un estudio de cinética de degradación fotolítica *in vitro*, sobre soluciones acuosas sometidas a radiación de luz ultravioleta y radiación de luz visible o blanca, tomando muestras a diferentes tiempos y fueron analizadas por CLAR.

Para tal efecto se desarrolló y validó una metodología analítica que permitió la separación de ketorolaco y sus productos de degradación fotolítica. La validación consistió en el análisis de los parámetros de validación indicados en la etapa 2.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Etapa 1. Desarrollo y optimización de condiciones cromatográficas.

El desarrollo de las condiciones cromatográficas implica la selección de diferentes variables como: columna cromatográfica, fase móvil, volumen de inyección, temperatura y en el caso de la detección por absorción ultravioleta-visible, es necesario determinar la longitud de onda de trabajo.

#### 7.1.1. Determinación de longitud de onda de trabajo.

Como prueba inicial para el desarrollo de la metodología analítica se determinó la longitud de onda de trabajo para el monitoreo en CLAR, por lo que se realizó la determinación del espectro de absorción de soluciones de ketorolaco en metanol como disolvente, en un espectrofotómetro UV-VIS, marca Perkin-Elmer, modelo Lambda 50. El valor obtenido fue de 318 nm tal y como se muestra en la Figura 5.

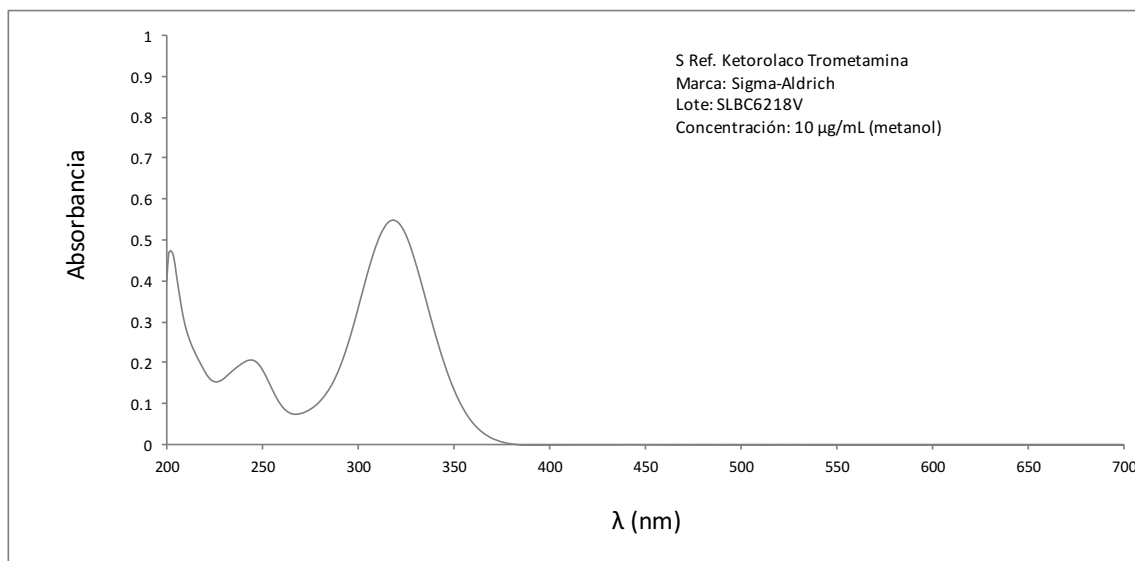


Figura 5. Espectro de absorción UV-VIS de solución de Ketorolaco a 10 µg/mL en metanol.



### 7.1.2. Determinación de condiciones cromatográficas.

Durante las pruebas para la determinación de las condiciones cromatográficas se estudiaron principalmente diferentes columnas cromatográficas, proporciones de fase móvil, volumen de inyección y velocidad de flujo.

Cabe mencionar que la composición de fase móvil que se estudió fue metanol – agua acidificada con ácido fórmico, esto se debe a que se intentó, por un lado, tener una fase móvil menos contaminante con un disolvente orgánico amigable con el medio ambiente y por otra parte el uso de ácido fórmico como modificador de pH para la posible transferencia a CLAR acoplada a espectrometría de masas, en donde la utilización de sales amortiguadoras de pH es restringido. Por estos motivos, la composición inicial de fase móvil fue metanol – agua acidificada con ácido fórmico al 0.5%.

#### Experimento 1.

El primer experimento para la determinación de las condiciones cromatográficas fue la inyección de una solución de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ketorolaco, se utilizó una columna marca Waters Symmetry C18, de 250 mm de longitud, 3.0 mm de diámetro interno y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, como fase móvil una mezcla de 55% (v/v) de metanol con 45% (v/v) de agua acidificada con ácido fórmico al 0.5%, una velocidad de flujo de  $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  y un volumen de inyección de 25  $\mu\text{L}$  y una longitud de onda en el detector de 318 nm.

En la Figura 6 se muestra el cromatograma obtenido bajo las condiciones descritas anteriormente.

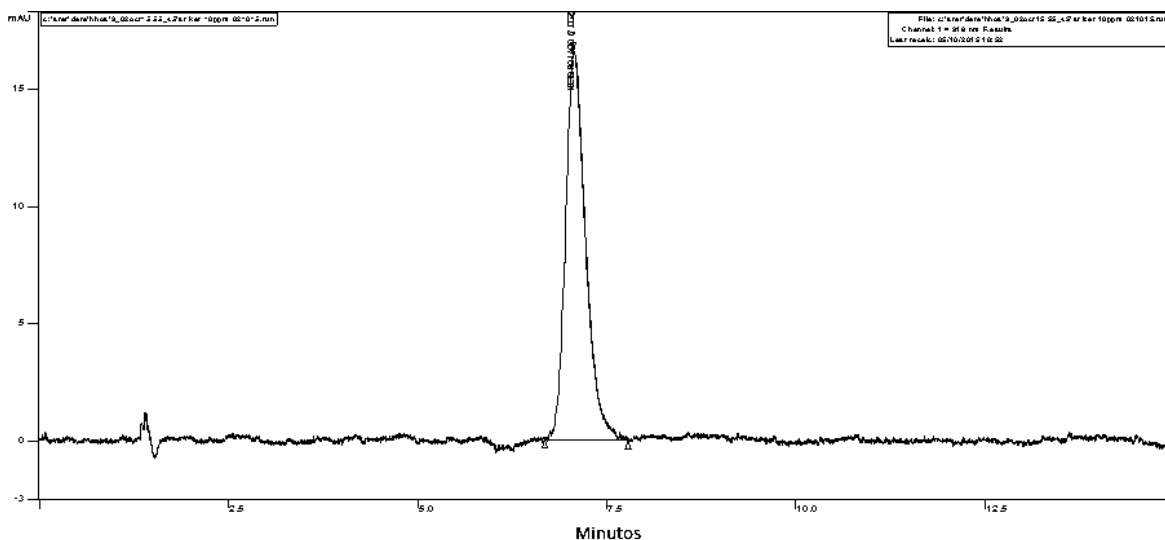


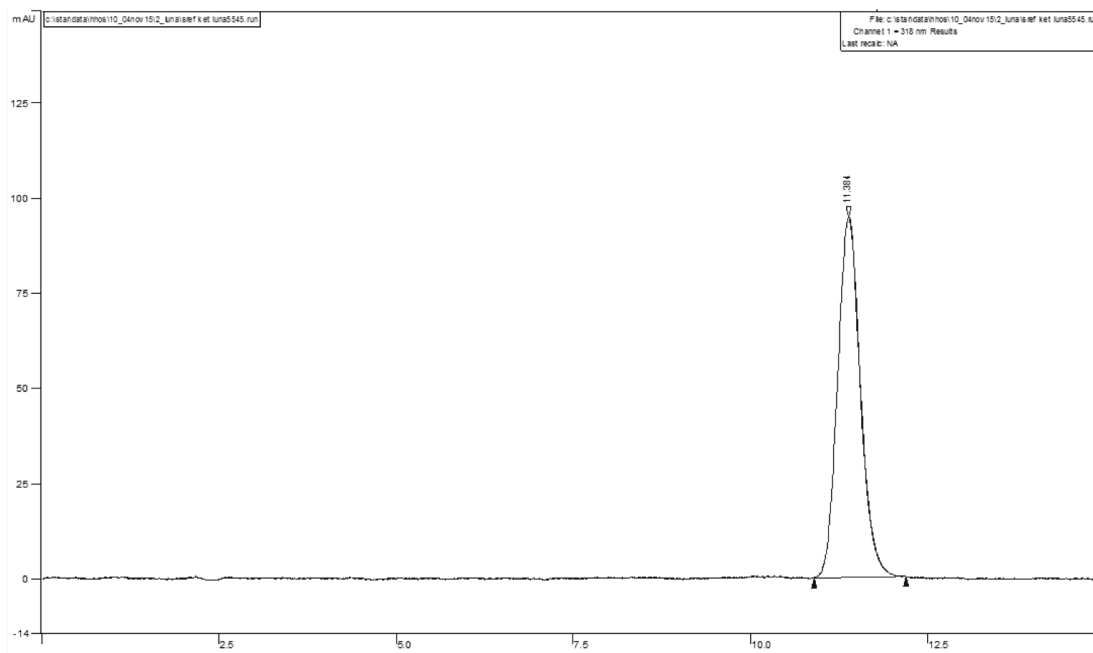
Figura 6. Cromatograma de solución de ketorolaco obtenido en el experimento 1.

Como se puede observar, se obtuvo un pico visiblemente simétrico, con un tiempo de retención de 7.05 minutos. Sin embargo, el número de platos teóricos fue de 1,530 que de acuerdo a las guías no es suficiente ya que este número tiene que ser de por los menos 2,000.

### Experimento 2.

Con la intención de aumentar los platos teóricos, se decidió realizar un cambio en la columna cromatográfica, la cual disminuye el tamaño de partícula para aumentar la eficiencia, para tal caso, la columna utilizada en el experimento 2 fue de la marca Phenomenex Luna C18 de 150 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 3.5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, como fase móvil una mezcla de 55% (v/v) de metanol con 45% (v/v) de agua acidificada con ácido fórmico al 0.5%, una velocidad de flujo de 0.7  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  y un volumen de inyección de 25  $\mu\text{L}$  y una longitud de onda en el detector de 318 nm.

El cromatograma obtenido bajo estas condiciones se muestra en la Figura 7.



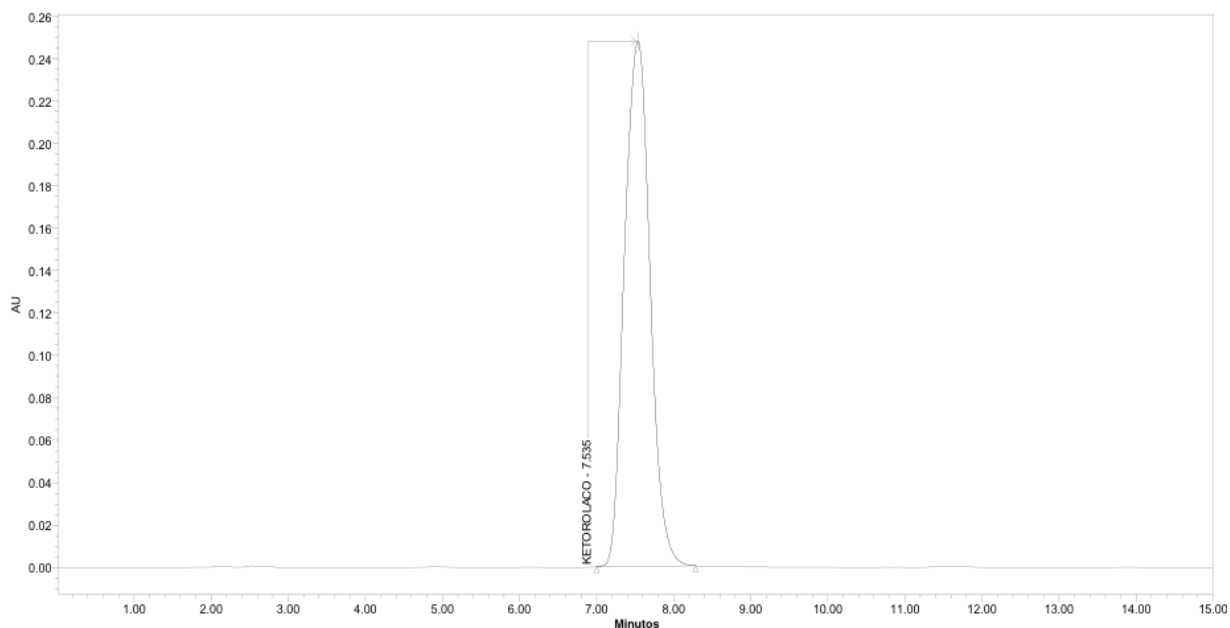
**Figura 7. Cromatograma de solución de ketorolaco obtenido en el experimento 2.**

El tiempo de retención del pico obtenido es de 11.38 minutos y el número de platos teóricos fue de 2 500, por lo que se ve favorecido. Sin embargo, en esta ocasión, el tiempo de retención fue considerado como alto, teniendo en cuenta que solo se trata de 1 pico, por lo que se decidió realizar un cambio en la proporción de la fase móvil, que permita la disminución del tiempo de retención.

### **Experimento 3.**

Con el fin de disminuir el tiempo de retención del pico de ketorolaco en el cromatograma, se aumentó la proporción de componente orgánico (metanol) en la fase móvil, quedando en 65% v/v metanol y 35% v/v agua acidificada con ácido fórmico al 0.5%.

En la Figura 8 se muestra el cromatograma obtenido en el experimento 3, aumentando la composición de metanol al 65% v/v.



**Figura 8. Cromatograma de solución de ketorolaco obtenido en el experimento 3.**

Los resultados obtenidos en el cromatograma muestran una disminución en el tiempo de retención a 7.53 minutos, como se había previsto al aumentar el componente orgánico. También se observó un aumento en el número de platos teóricos que es de 2 442, por lo que podría ser utilizado como método de cuantificación de ketorolaco.

#### **Experimento 4.**

Con el fin de observar el comportamiento del pico de ketorolaco con otro tipo de columnas, se realizó un experimento utilizando la columna Waters X-Terra MS C18 de 250 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Teniendo como fase móvil 65% v/v metanol y 35% v/v agua acidificada con ácido fórmico al 0.5%, un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  y una velocidad de flujo de 0.7  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . En la Figura 9 se muestra el cromatograma obtenido bajo las condiciones cromatográficas descritas.

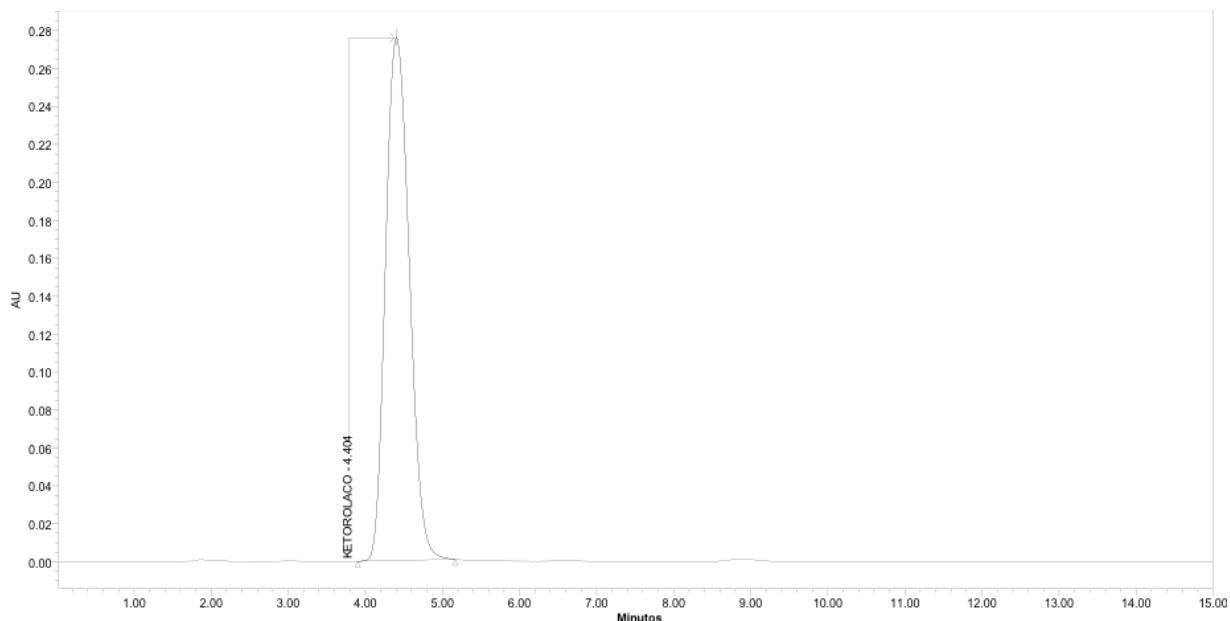


Figura 9. Cromatograma de solución de ketorolaco obtenido en el experimento 4.

El tiempo de retención del pico de ketorolaco obtenido bajo estas condiciones fue de 4.40 minutos. Sin embargo, el número de platos teóricos fue de 975 y un factor de capacidad ( $k'$ ) de 1.4, por lo que estas condiciones no son adecuadas para la separación y posterior cuantificación del ketorolaco.

### Experimento 5

Para el experimento 5, se realizó el cambio de columna cromatográfica utilizando una columna Agilent Zorbax SB C8 de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno con tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , como fase móvil se utilizó 65% v/v metanol y 35% v/v agua acidificada con ácido fórmico al 0.5%, un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  y una velocidad de flujo de 0.7  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . El cromatograma resultante bajo estas nuevas condiciones se muestra en la Figura 10.

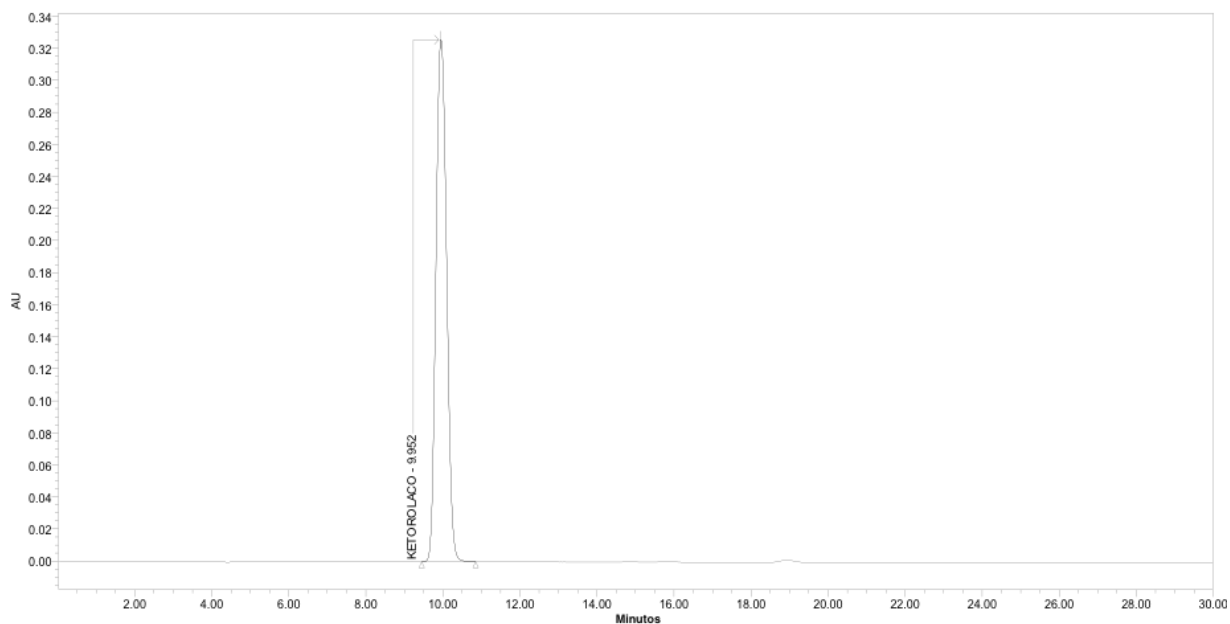


Figura 10. Cromatograma de solución de ketorolaco obtenido en el experimento 5.

El tiempo de retención resultante es de 9.952 minutos, la  $k'$  aumentó a 4.5, el número de platos teóricos es de 6 168 y finalmente el factor de coe (T) de 1.1, por lo que con estas condiciones cromatográficas los parámetros obtenidos son adecuados para identificación y cuantificación de ketorolaco. Sin embargo, se desea obtener un tiempo de retención más corto.

### Experimento 6

Con el fin de disminuir el tiempo de retención del pico de ketorolaco y el consumo de metanol HPLC, se decidió realizar cambio en la composición de la fase móvil y velocidad de flujo, quedando las condiciones cromatográficas de la siguiente manera. Columna cromatográfica Agilent Zorbax SB C8 de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno con tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , fase móvil 60% v/v metanol y 40% v/v agua acidificada con ácido fórmico al 0.5%, un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  y una velocidad de flujo de 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . La Figura 11 muestra el cromatograma obtenido bajo estas condiciones.

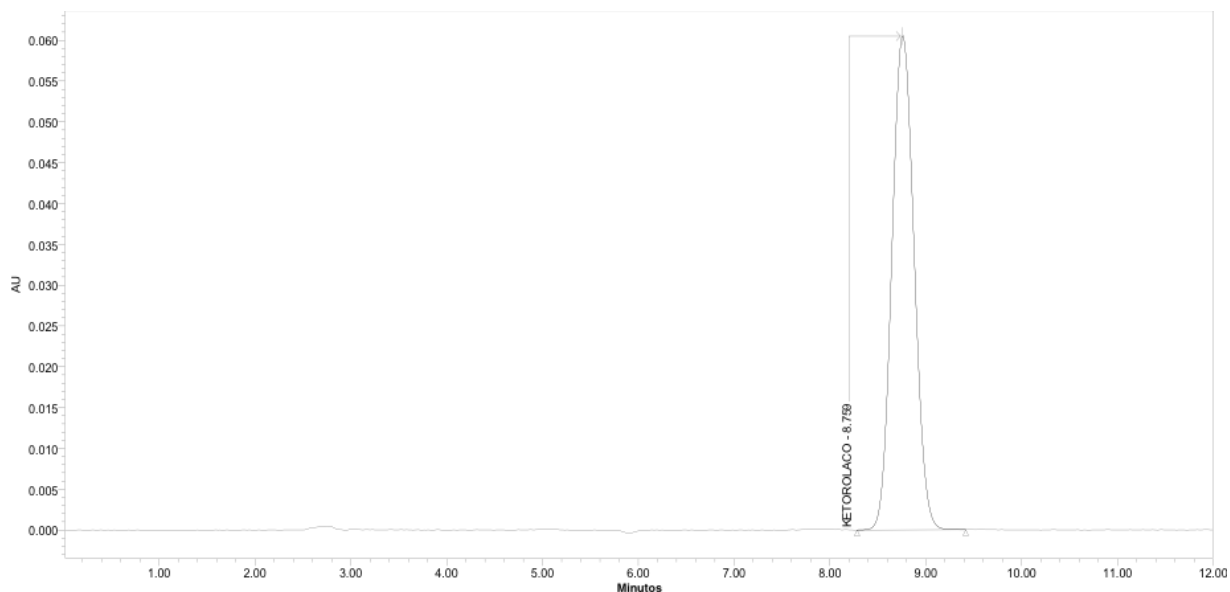


Figura 11. Cromatograma de solución de ketorolaco obtenido en el experimento 6.

El tiempo de retención obtenido fue de 8.76 minutos, el número de platos teóricos fue de 6746, con un factor de capacidad de 3.9 y factor de simetría de 1.1.

A manera de resumen la Tabla 10 muestra las condiciones cromatográficas probadas durante el desarrollo de la metodología analítica.

Tabla 10. Condiciones cromatográficas probadas durante el desarrollo de la metodología.

EXPERIMENTO	COLUMNA	FASE MÓVIL (Metanol – agua acidificada)	FLUJO (mL•min <sup>-1</sup> )	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	PLATOS TEÓRICOS
1	Waters Symmetry C18, de 250 mm x 3.0 mm 5 µm	55% - 45%	0.7	7.05	1530
2	Phenomenex Luna C18 de 150 mm x 4.6 mm 3.5 µm	55% - 45%	0.7	11.38	2500
3	Phenomenex Luna C18 de 150 mm x 4.6 mm 3.5 µm	65% - 35%	0.7	7.53	2442
4	Waters X-Terra MS C18 de 250 mm x 4.6 mm 5 µm	65% - 35%	0.7	4.40	975
5	Agilent Zorbax SB C8 de 250 mm x 4.6 mm 5 µm	65% - 35%	0.7	9.95	6168

6	Agilent Zorbax SB C8 de 250 mm x 4.6 mm 5 $\mu$ m	60% - 40%	1.0	8.76	6746
---	---	-----------	-----	------	------

De acuerdo a los resultados obtenidos durante las pruebas de desarrollo y optimización de condiciones cromatográficas, las utilizadas en el experimento 6 son las que presentaron mejores resultados ya que el número de platos teóricos fue el mayor obtenido y se concluyó que éstas condiciones son las que se validarían en la etapa 2.

### 7.1.3. Metodología analítica propuesta para validación.

Con los experimentos realizados anteriormente se considera que la metodología analítica que se procede a validar es la siguiente:

#### Preparación de la Solución de Referencia

Pesó aproximadamente con exactitud 14.6 mg de Sustancia de referencia de ketorolaco trometamina equivalente a 10.0 mg de ketorolaco base y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL. Se adicionó aproximadamente 4 mL de metanol HPLC y se sonicó durante 3 minutos, se aforó y mezcló con metanol. Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L de la solución anterior y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con metanol HPLC. Obteniendo una concentración aproximada de ketorolaco 10  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>.

#### Preparación de la Muestra.

Se tomó un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) Waters Sep-pak C18 vac 6cc y se adicionó 5 mL de metanol grado HPLC y se eluyó a una velocidad de 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, después se adicionaron 5 mL de agua grado Milli-Q y se eluyó a una velocidad de 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup> y se desecharon ambas eluciones.

Tomó una alícuota de 250 mL de la muestra de agua proveniente de la planta tratadora hospitalaria y se eluyó en el cartucho de SPE a una velocidad de 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup> sin permitir



que el material adsorbente se secase. Ya que toda la muestra fue eluída, se lavó con 5 mL de agua grado Milli-Q. Y se desecharon las eluciones.

Se midieron exactamente 10 mL de metanol grado HPLC y se eluyeron a una velocidad de  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , hasta sequedad recolectando todo el metanol para realizar el análisis por CLAR.

### Condiciones Cromatográficas.

En la Tabla 11 se muestran las condiciones cromatográficas para la separación y cuantificación de ketorolaco.

Tabla 11. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de ketorolaco en agua residual.

Condición	Valor
Equipo	CLAR con detector UV-VIS
Columna cromatográfica	Agilent Zorbax SB C8 250x4.6 mm 5 $\mu\text{m}$
Fase Móvil	Metanol : Agua Acidificada (60% - 40%) v/v
Velocidad de Flujo	$1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Volumen de Inyección	20 $\mu\text{L}$
Longitud de Onda	318 nm

Agua acidificada.

En un matraz volumétrico de 1 000 mL que contenía aproximadamente 100 mL de agua Milli-Q, se disolvieron 5.6 mL de ácido fórmico 88% mezclando lentamente. Se llevó al aforo con agua Milli-Q.

### 7.2. Etapa 2. Validación de metodología analítica.

Teniendo el desarrollo de una metodología analítica con la que se obtuvieron parámetros cromatográficos deseados, se dispuso a realizar la validación de dicha metodología. Los parámetros de validación evaluados fueron los siguientes: especificidad, adecuabilidad del

sistema, precisión del sistema, linealidad del sistema, linealidad del método, repetibilidad, precisión intermedia, límite de detección y límite de cuantificación.

En la Tabla 12 se resumen los resultados obtenidos en la validación de la metodología analítica para la cuantificación de ketorolaco.

**Tabla 12. Resultados obtenidos en la validación de método analítico para la cuantificación de ketorolaco en agua residual.**

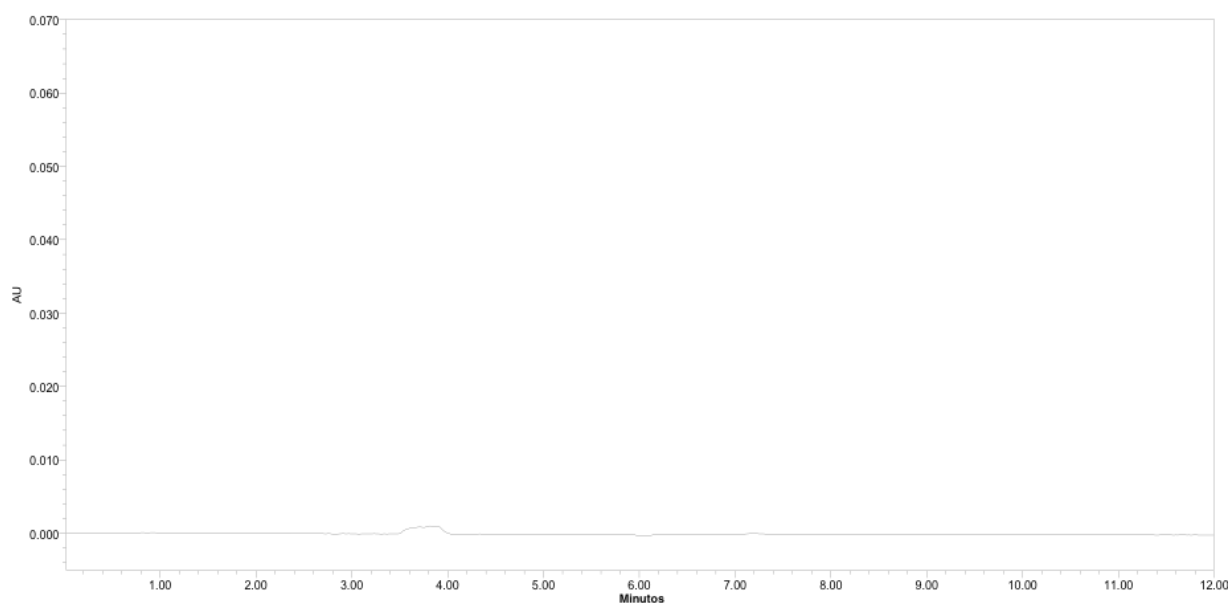
PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CONCLUSIÓN
Especificidad	La respuesta del método únicamente se debe al analito	La respuesta del método únicamente se debe al analito	CUMPLE
Precisión del Sistema	C.V. $\leq$ 2.0%	0.8	CUMPLE
Adecuabilidad	C.V. $\leq$ 2.0% $k' > 2$ $T < 2$ $R > 2$	0.6 3.9 1.1 No Aplica	CUMPLE
Linealidad del Sistema	$r^2 \geq 0.98$ $IC_{(b1)}$ no debe incluir el cero	0.9971 93773.5 - 98383.7	CUMPLE
Repetibilidad	$IC_{(\mu)}$ debe incluir el 100% C.V. $\leq$ 2.0%	100.6 - 99.1 0.7	CUMPLE
Linealidad del Método	$r^2 \geq 0.98$ $IC_{(b1)}$ debe incluir la unidad $IC_{(b0)}$ debe incluir el cero $CV_{y/x} \leq 2.0\%$ $IC_{(\mu)}$ debe incluir el 100% C.V. $\leq$ 2.0%	0.9992 0.979 - 1.011 0.668 - -0.586 1.1 101.0 - 98.9 1.8	CUMPLE
Precisión Intermedia	C.V. $\leq$ 2.0%	1.8	CUMPLE
Límite de Detección	Límite de Detección $r^2 \geq 0.98$ $IC_{(b1)}$ no debe incluir el cero	0.00934433 0.9983 8.66E+04 - 9.09E+04	$\mu g \cdot mL^{-1}$ CUMPLE
Límite de Cuantificación	Límite de Cuantificación $r^2 \geq 0.98$ $IC_{(b1)}$ no debe incluir el cero	0.02831616 0.9983 8.66E+04 - 9.09E+04	$\mu g \cdot mL^{-1}$ CUMPLE

A continuación se presentan y detallan los resultados obtenidos en cada uno de éstos parámetros.

### 7.2.1. Especificidad.

Para la evaluación del parámetro de especificidad se inyectaron bajo las condiciones cromatográficas descritas, diferentes muestras que pudieran interferir en la señal analítica del ketorolaco. Estas muestras fueron: blanco (metanol), solución de referencia de ketorolaco y muestra obtenida de agua de planta de tratamiento hospitalaria.

En las siguientes figuras se presentan los cromatogramas obtenidos de cada una de las soluciones inyectadas para la determinación de la especificidad.



**Figura 12. Cromatograma Blanco (metanol). Cuantificación de ketorolaco en agua residual.**

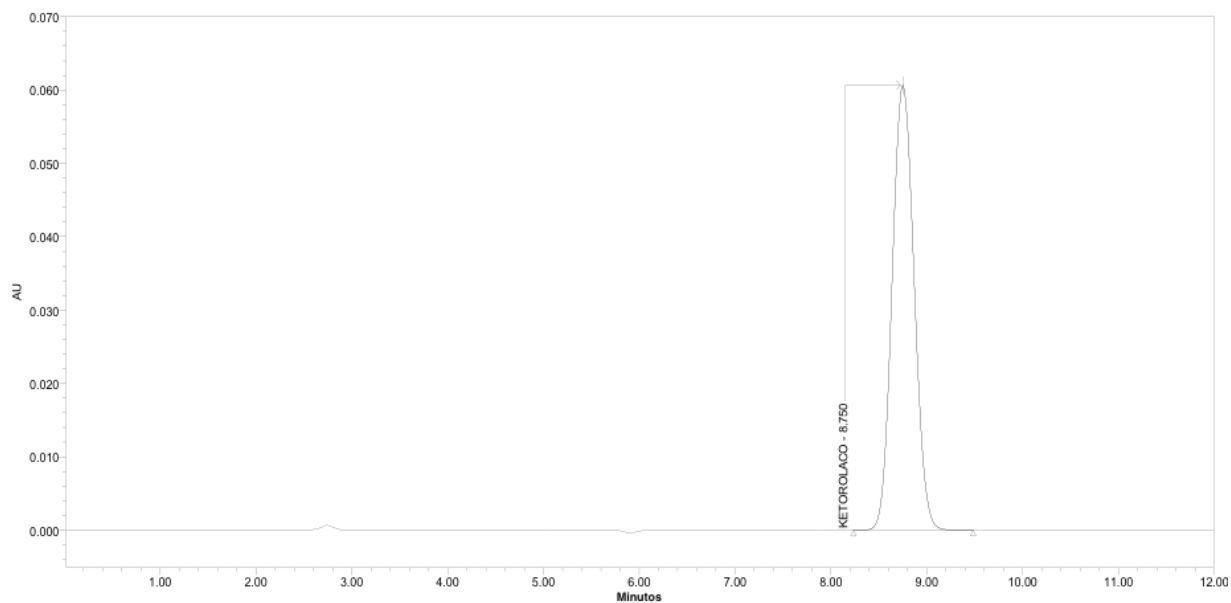


Figura 13. Cromatograma solución de Referencia de ketorolaco. Cuantificación de ketorolaco en agua residual.

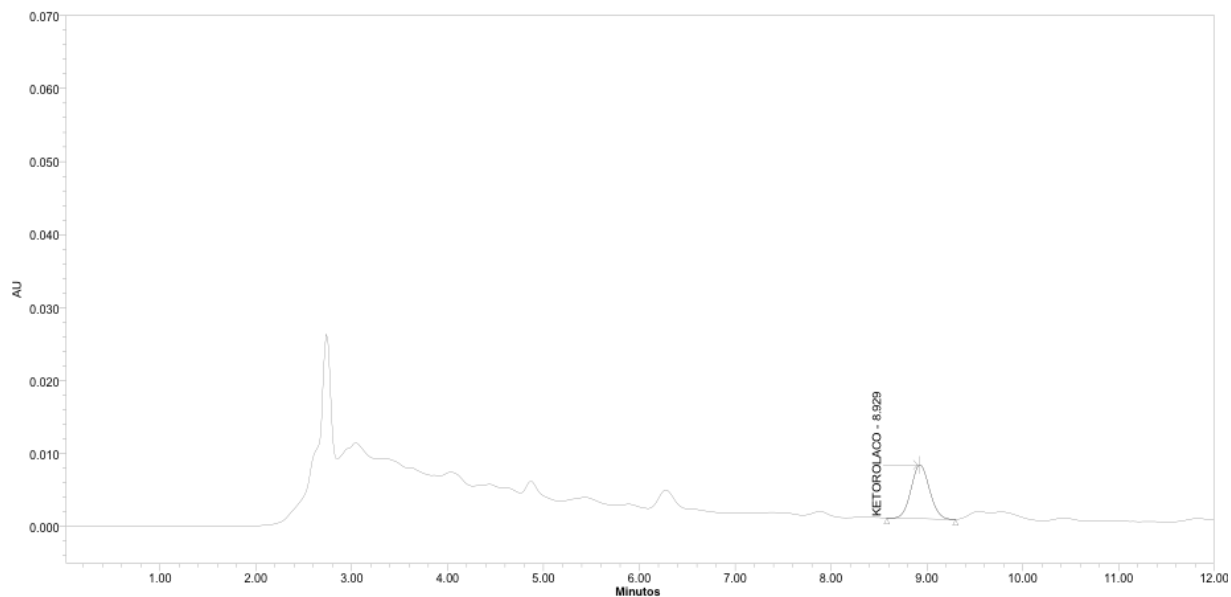


Figura 14. Cromatograma de muestra de agua de planta tratadora hospitalaria. Cuantificación de ketorolaco en agua residual.

Con los resultados obtenidos en el parámetro de especificidad, se puede observar que no existe interferencia alguna en la señal analítica por parte de los componentes de la matriz, ni por los posibles productos de degradación de ketorolaco en el tiempo de retención

obtenido en la solución de referencia (8.7 minutos). Esto se puede deber a dos causas, la primera, que existe una buena separación entre el pico de ketorolaco y los demás componentes de la muestra por una buena selección de las condiciones cromatográficas y la segunda, es la longitud de onda de trabajo en el detector, ya que mientras que la mayoría de los compuestos orgánicos tienen su máximo de absorción en la región del espectro de 200 nm a 260 nm aproximadamente, el ketorolaco bajo estas condiciones de trabajo tuvo su máximo a 318 nm.

Por lo tanto, la metodología analítica es específica para la cuantificación de ketorolaco en agua residual de una planta tratadora hospitalaria.

### 7.2.2. Adecuabilidad del sistema.

Durante la determinación de la adecuabilidad del sistema, se inyectó una solución de referencia por sextuplicado bajo las condiciones descritas, comprobando el tiempo de retención, área bajo la curva, platos teóricos, factor de capacidad y factor de coileo. En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos en la prueba.

**Tabla 13. Resultados de adecuabilidad del sistema.**

INYECCIÓN	ÁREA BAJO CURVA (ABC)	TIEMPO RETENCIÓN (TR)	PLATOS TEÓRICOS (N)	FACTOR DE CAPACIDAD (k')	FACTOR DE COLEO (T)
1	974408	8.8	6746.69	3.86	1.07
2	966252	8.8	6858.86	3.86	1.07
3	967470	8.7	6858.02	3.85	1.07
4	978283	8.7	6776.35	3.84	1.07
5	980139	8.8	6841.84	3.86	1.07
6	976962	8.7	6899.08	3.85	1.07
<b>PROMEDIO</b>	<b>973919.0</b>	<b>8.7</b>	<b>6830.1</b>	<b>3.9</b>	<b>1.1</b>
<b>DES VEST</b>	<b>5789.7</b>	<b>0.0</b>	<b>57.2</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
<b>CV</b>	<b>0.6</b>	<b>0.2</b>	<b>0.8</b>	<b>0.2</b>	<b>0.0</b>

Como se observa, en todos los casos se cumple con las especificaciones emitidas en las guías de validación; tiempo de retención constante, los platos obtenidos fueron de 6830.1 (mayor a 2000), el factor de capacidad de 3.9 (mayor a 2.0) y un factor de coileo de 1.1 (menor a 2.0). La conclusión es que el sistema es adecuado para la determinación de ketorolaco.

### 7.2.3. Precisión del sistema.

En la precisión del sistema se prepararon a partir de una solución *stock* un sextuplicado de soluciones de referencia de ketorolaco, cada una de estas soluciones fue inyectada en el cromatógrafo, determinando el coeficiente de variación de las áreas bajo la curva resultante. Los resultados obtenidos de muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14. Resultados de precisión del sistema.**

Muestra	ÁREA BAJO CURVA (ABC)
1	952316
2	945880
3	955973
4	964145
5	953362
6	966513
<b>PROMEDIO</b>	<b>956364.8</b>
<b>DES VEST</b>	<b>7733.2</b>
<b>CV</b>	<b>0.8</b>

El coeficiente de variación obtenido durante la prueba fue de 0.8%, mientras que el criterio de aceptación indicado para esta prueba es de 2.0%, por lo que se concluye que el sistema es preciso.

### 7.2.4. Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema fue evaluada mediante la preparación de soluciones de referencia de ketorolaco a diferentes niveles de concentración del 20% al 400%, equivalente al intervalo de  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Realizando cada nivel de concentración por triplicado a partir de una sola solución *stock*. Los resultados obtenidos en la determinación de la linealidad del sistema se muestran en la Tabla 15 y la Tabla 16. La gráfica correspondiente a la señal analítica (área bajo la curva) con respecto a la concentración se muestra en la Figura 15.

Tabla 15. Resultados de linealidad del sistema.

%	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	ABC	$X^2$	$Y^2$	XY
20	2.0753	171060	4.307E+00	2.926E+10	355007.1260
	2.0753	172758	4.307E+00	2.985E+10	358531.0480
	2.0753	180911	4.307E+00	3.273E+10	375451.2695
40	4.1507	351834	1.723E+01	1.238E+11	1460348.1486
	4.1507	358053	1.723E+01	1.282E+11	1486161.1887
	4.1507	358024	1.723E+01	1.282E+11	1486040.8191
80	8.3013	805982	6.891E+01	6.496E+11	6690736.6629
	8.3013	805200	6.891E+01	6.483E+11	6684245.0091
	8.3013	779000	6.891E+01	6.068E+11	6466749.7046
100	10.3767	956746	1.077E+02	9.154E+11	9927851.2722
	10.3767	935457	1.077E+02	8.751E+11	9706942.0385
	10.3767	958169	1.077E+02	9.181E+11	9942617.2941
120	12.4520	1166251	1.551E+02	1.360E+12	14522182.2395
	12.4520	1074062	1.551E+02	1.154E+12	13374242.8521
	12.4520	1111942	1.551E+02	1.236E+12	13845925.4172
180	16.6027	1622708	2.756E+02	2.633E+12	26941326.0067
	16.6027	1615502	2.756E+02	2.610E+12	26821686.9865
	16.6027	1632797	2.756E+02	2.666E+12	27108830.5966
200	20.7534	2197147	4.307E+02	4.827E+12	45598201.9035
	20.7534	1951959	4.307E+02	3.810E+12	40509724.9248
	20.7534	1968341	4.307E+02	3.874E+12	40849706.6118
400	41.5067	3876582	1.723E+03	1.503E+13	160904271.5227
	41.5067	4000576	1.723E+03	1.600E+13	166050857.9339
	41.5067	3924950	1.723E+03	1.541E+13	162911869.4028
SUMA	348.6566	32976011	8347.0109	75694245104533	794379507.9794

Tabla 16. Resultados estadísticos de linealidad del sistema.

ESTADÍSTICO			
n	24		
PENDIENTE	96079	$S_{b1}$	1111.5
ORDENADA	-21767	$t_{0.95}$	2.074
$r^2$	0.9971	$IC_{(b1)}$	93773.459
$S_{y/x}$	63675.7		98383.660

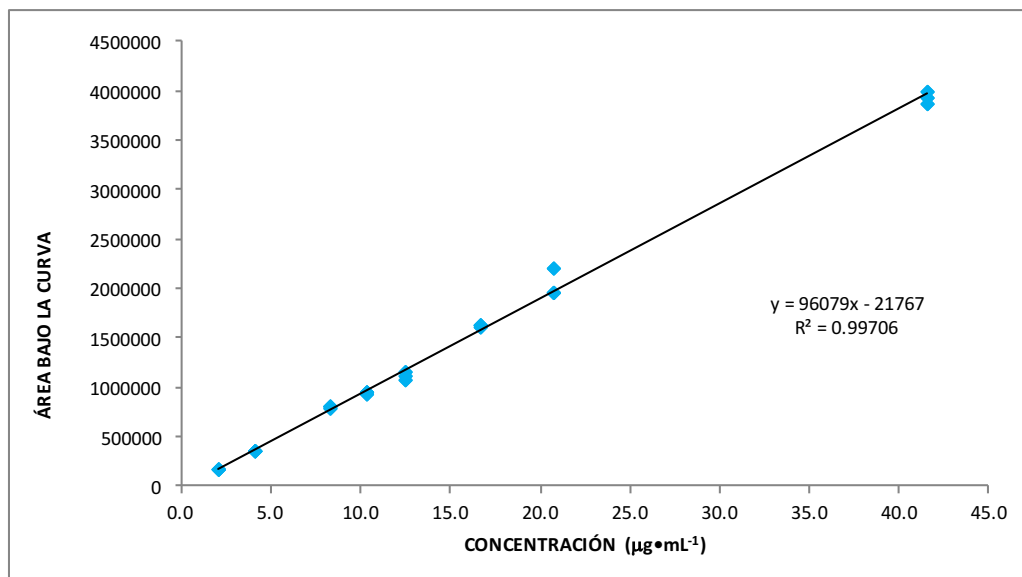


Figura 15. Gráfica área bajo la curva con respecto a la concentración de ketorolaco.

El coeficiente de determinación  $r^2$  obtenido fue de 0.99706 cumple con el criterio de aceptación (mayor a 0.98), mientras que el intervalo de confianza para la pendiente obtenido no incluye el cero. Con los resultados obtenidos durante la determinación de la linealidad del sistema se concluye que el intervalo de linealidad es de  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  hasta  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  equivalente del 20% al 400%. Por lo que éste se considera como el intervalo de trabajo.

#### 7.2.5. Linealidad del método.

Para la evaluación de la linealidad del método se llevó a cabo la cuantificación a 5 niveles de concentración de soluciones adicionadas con ketorolaco en concentraciones conocidas. Los niveles de concentración fueron de 40%, 100%, 140%, 200% y 400%, cada una por triplicado, graficando la cantidad adicionada *versus* cantidad recuperada en la cuantificación. Los resultados de recuperación se muestran en Tabla 17. En Tabla 18 se muestran los resultados estadísticos de la linealidad del método, mientras que en la Tabla 19, se muestran los resultados estadísticos del recobro. La Figura 16 muestra la gráfica obtenida de la concentración recuperada con respecto a la concentración adicionada.



Tabla 17. Resultados de recuperación de la linealidad del método.

NIVEL (%)	MUESTRA	Concentración Adicionada ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Concentración Recuperada ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	% RECUPERADO	PROMEDIO
40%	M1	4.3677	4.3993	100.7	101.8
	M2	4.3134	4.4053	102.1	
	M3	4.3406	4.4488	102.5	
100%	M1	10.9193	10.7398	98.4	98.9
	M2	10.7836	10.8083	100.2	
	M3	10.8514	10.6333	98.0	
140%	M1	15.2870	14.7534	96.5	98.4
	M2	15.0971	15.1662	100.5	
	M3	15.1920	14.9114	98.2	
200%	M1	21.8385	21.8902	100.2	101.3
	M2	21.5672	22.0334	102.2	
	M3	21.7029	22.0118	101.4	
400%	M1	43.6770	44.2996	101.4	99.4
	M2	43.1345	42.3892	98.3	
	M3	43.4057	42.7699	98.5	

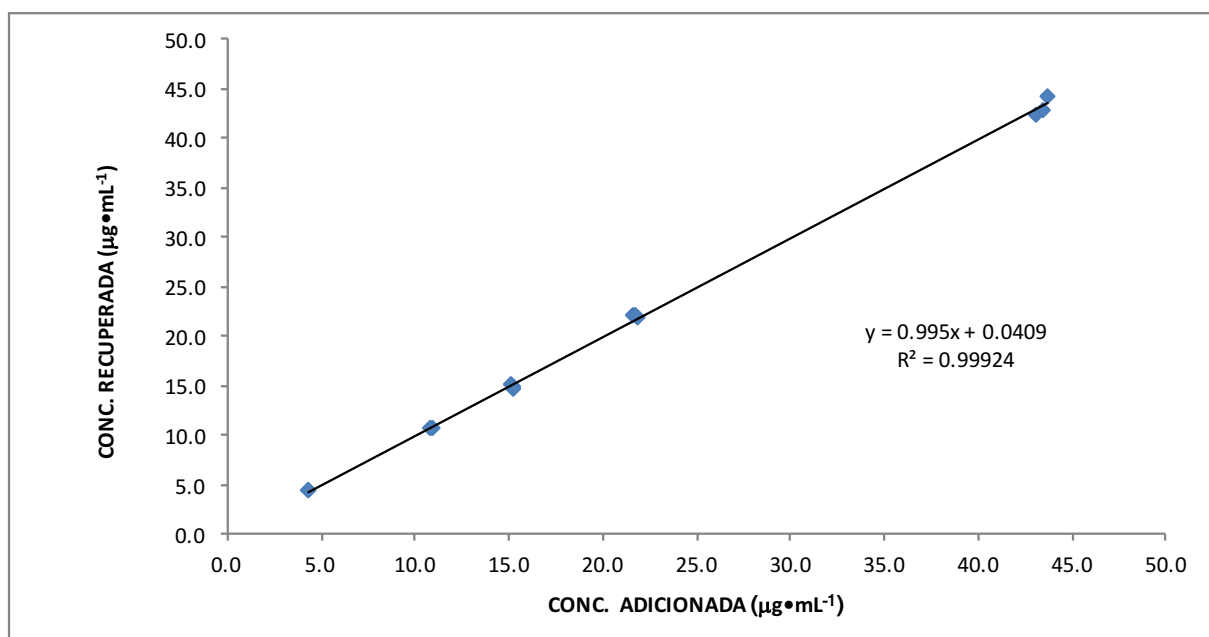


Figura 16. Concentración recuperada con respecto a la concentración adicionada.

Tabla 18. Resultados estadísticos de la linealidad del método.

ESTADÍSTICO			
n	15		
PENDIENTE	0.9950	S <sub>b1</sub>	0.0076
ORDENADA	0.0409	t <sub>0.95</sub>	2.1604
r <sup>2</sup>	0.9992	IC <sub>(β 1)</sub>	0.9786
S <sub>y/x</sub>	0.3942		1.0114
S <sub>b0</sub>	0.2903	IC <sub>(β 0)</sub>	0.6681
CV <sub>y/x</sub>	1.1041		-0.5863

Tabla 19. Resultados estadísticos del recobro en la linealidad del método.

Recobro			
Promedio	99.9	Estadístico T <sub>0.95</sub>	2.145
desv. Est.	1.8	IC <sub>(μ)</sub>	101.0
C.V.	1.8		98.9

Los resultados obtenidos durante la determinación del parámetro de linealidad del método muestran que la gráfica de concentración recuperada con respecto a la concentración adicionada tiene un coeficiente de determinación  $r^2$  de 0.9992, el intervalo de confianza de la pendiente incluye al uno y el intervalo de confianza para la ordenada al origen incluye el cero, por lo que el método es lineal en el intervalo de concentración desde 40% hasta 400%. Por otro lado, el promedio de recobro obtenido fue de 99.9%, con un coeficiente de variación de 1.8% y un intervalo de confianza de la media que incluye el 100%. El método es exacto en el intervalo de concentración probado.

### 7.2.6. Repetibilidad.

Durante la repetibilidad se llevó a cabo la cuantificación de 6 soluciones de concentración adicionada al 100% de ketorolaco, determinando el porcentaje de recuperación de cada solución. En la Tabla 20 y en la Tabla 21 se muestran los resultados estadísticos.

Tabla 20. Resultados del recobro en la repetibilidad.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN ADICIONADA ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	CONCENTRACIÓN RECUPERADA ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	% RECUPERACIÓN	PROMEDIO
M1	11.1227	11.0622	99.5	99.8
M2	10.8514	10.9214	100.6	
M3	10.9193	10.8678	99.5	
M4	10.9871	11.0686	100.7	
M5	10.7836	10.7544	99.7	
M6	10.6480	10.5358	98.9	

Tabla 21. Resultados estadísticos del recobro en la repetibilidad.

ESTADÍSTICO	
PROMEDIO	99.8
DESVIACION EST	0.7
C.V.	0.7
n	6
Estadístico T <sub>0.95</sub>	2.571
IC <sub>(μ)</sub>	100.6
	99.1

El promedio obtenido de la recuperación de la 6 muestras fue de 99.8%, con un coeficiente de variación de 0.7% y un intervalo de confianza para la media que incluyó el 100%, por lo que se asegura que la metodología es repetible al realizar la cuantificación de soluciones con concentración al 100%.

### 7.2.7. Precisión intermedia.

Se realizó la cuantificación de 3 muestras por dos analistas diferentes en 2 días distintos, la comparación de resultados obtenidos por ambos analistas se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Resultados de precisión intermedia.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO					
	DIA 1	DIA 2	PROM	DES VEST	CV
A1	99.0	99.5	99.7	1.0	1.0
	98.4	100.6			
	101.1	99.5			
A2	100.0	95.3	99.9	2.5	2.5
	99.7	100.4			
	102.7	101.4			
PROM	100.2	99.4	PROMEDIO GLOBAL (n=12)		99.8
DES VEST	1.6	2.2	DES VEST GLOBAL		1.8
CV	1.6	2.2	CV GLOBAL		1.8

Los resultados obtenidos en la determinación de la precisión intermedia fueron de un promedio global (n=12) de 99.8% con un coeficiente de variación de 1.8%. La metodología analítica es reproducible por diferentes analistas en días distintos.

#### 7.2.8. Límite de detección y cuantificación.

Se realizó mediante la preparación de soluciones de referencia de ketorolaco a diferentes niveles de concentración, a partir de 0.05% al 5%, equivalente al intervalo de 0.005  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Cada nivel de concentración se preparó por triplicado a partir de una sola solución *stock*. En la Tabla 23 se muestra el área bajo la curva con respecto a la concentración de ketorolaco. Mientras que en la Tabla 24 se observan los resultados estadísticos obtenidos durante la determinación de límite de detección y cuantificación. En la Figura 17 se observa la gráfica de área bajo la curva con respecto a la concentración de ketorolaco.

Tabla 23. Límite de detección y cuantificación. Área bajo la curva con respecto a la concentración de ketorolaco.

%	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	ABC
	0.00546	1060
0.05	0.00546	1097
	0.00546	1201
	0.01092	1474
0.10	0.01092	1824
	0.01092	1764
	0.05460	5282
0.50	0.05460	5322
	0.05460	5538
	0.10919	8613
1.00	0.10919	8497
	0.10919	8308
	0.54596	48730
5.00	0.54596	49082
	0.54596	48927

Tabla 24. Resultados estadísticos de límite de detección y cuantificación.

ESTADÍSTICO			
<b>n</b>	15		
<b>PENDIENTE</b>	88721.3775	<b>S<sub>b1</sub></b>	1003.9
<b>ORDENADA</b>	229.9398	<b>t<sub>0.95</sub></b>	2.160
<b>r<sup>2</sup></b>	0.9983	<b>IC<sub>(b1)</sub></b>	8.66E+04
<b>S<sub>y/x</sub></b>	792.3907		9.09E+04
<b>LD</b>	<b>0.0093</b>	<b>S<sub>b0</sub></b>	251.2249
<b>LC</b>	<b>0.0283</b>	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	

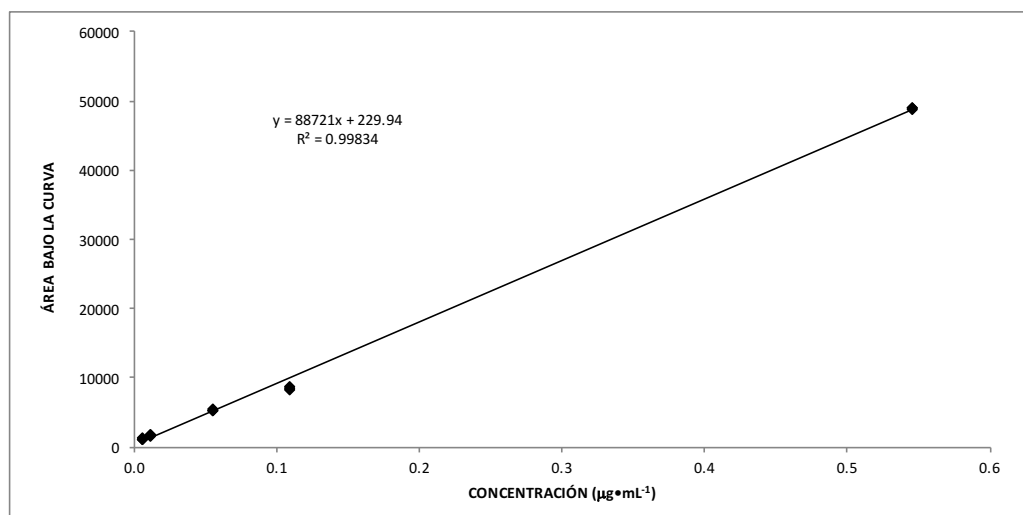


Figura 17. Límite de detección y cuantificación. Área bajo la curva con respecto a la concentración de ketorolaco.

Los resultados obtenidos concluyen que el límite de detección del método es de  $0.00934433 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y el límite de cuantificación es de  $0.02831616 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Finalmente, con los resultados obtenidos durante el proceso de validación se demuestra que se desarrolló una metodología analítica por CLAR para la cuantificación de ketorolaco en agua residual, que es exacta y precisa, con un límite de detección y cuantificación que identifica y cuantifica las muestras que se desean analizar.

### 7.3. Etapa 3. Gestión del permiso para el muestreo del efluente.

Para la obtención del permiso para el muestreo del efluente de la planta tratadora hospitalaria se realizó el trámite en el Hospital “Lic. Adolfo López Mateos” de la ciudad de Toluca, Estado de México, dependiente del Instituto de Salud del Gobierno del Estado de México, el trámite incluyó la redacción de una carta de exposición de motivos, indicando los objetivos y alcance del proyecto. Posteriormente, se entregó a revisión el protocolo de la investigación al Comité de enseñanza, investigación y ética del hospital, de tal manera que quedaron perfectamente entendidos objetivos, alcance y metodología a realizar durante el proyecto.

Después de la revisión del protocolo, éste fue aprobado por lo que se autorizó el muestreo. En la Figura 18 se muestra el acta informativa de la autorización del muestreo.

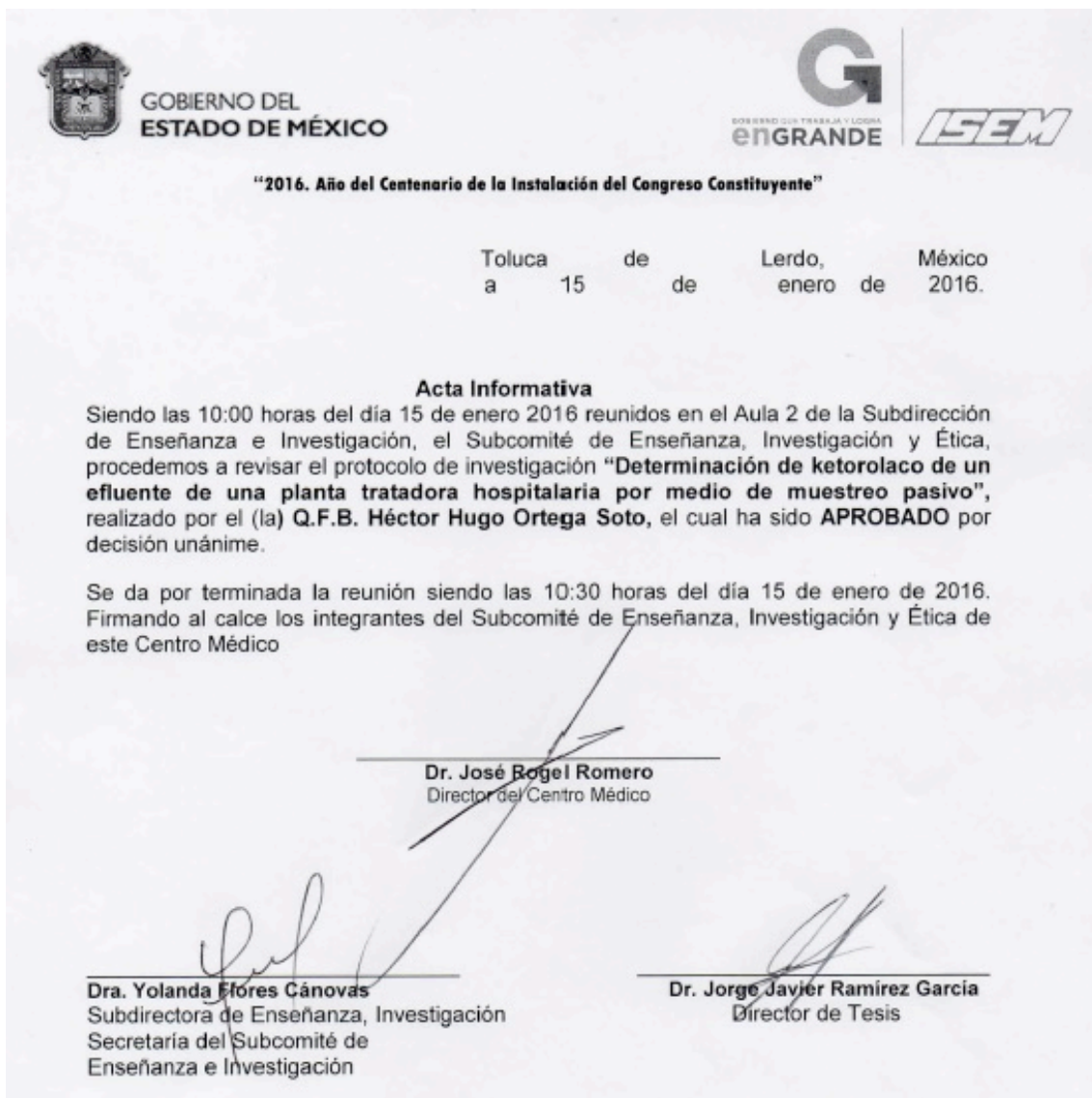


Figura 18. Acta informativa de aprobación del protocolo y muestreo en el Centro Médico "Lic. Adolfo López Mateos".

#### 7.4. Etapa 4. Muestreo de agua del efluente de la planta tratadora hospitalaria.

Con la intención de determinar las características del hospital en donde se llevó a cabo el muestreo, se realizó una investigación para encontrar información que nos permitió saber los recursos personales y físicos.

De acuerdo a los datos incluidos en la página web del “Centro Médico Lic. Adolfo López Mateos” éste hospital cuenta con los siguientes recursos: (Instituto de Salud del Estado de México, 2016)

**Tabla 25. Recursos personales y físicos del Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos”.**

<b>Recursos personales y físicos del hospital</b>	
<b>Personal</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 40 médicos</li> <li>• 174 paramédicos</li> <li>• 495 enfermeras</li> <li>• 47 técnicos de laboratorio y Rayos X</li> <li>• 119 recursos de Confianza</li> </ul>
<b>Físicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 200 camas censables</li> <li>• 58 camas no censables</li> <li>• 46 consultorios</li> <li>• 7 quirófanos</li> <li>• 12 camas de Terapia Intensiva</li> <li>• 1 sala de Hemodinamia</li> <li>• 8 camas de Hemodiálisis</li> <li>• Aulas de Enseñanza</li> <li>• Auditorio</li> <li>• Helipuerto</li> </ul>

Según datos del área de mantenimiento del hospital, el consumo medio de agua potable en el hospital es de 180 000 L por día, los cuales después de ser utilizados, son descargados directamente a una planta tratadora de agua residual. Ésta planta cuenta con diferentes operaciones en el tren de tratamiento, los planos del diseño de la planta tratadora se muestran en la Figura 19 y



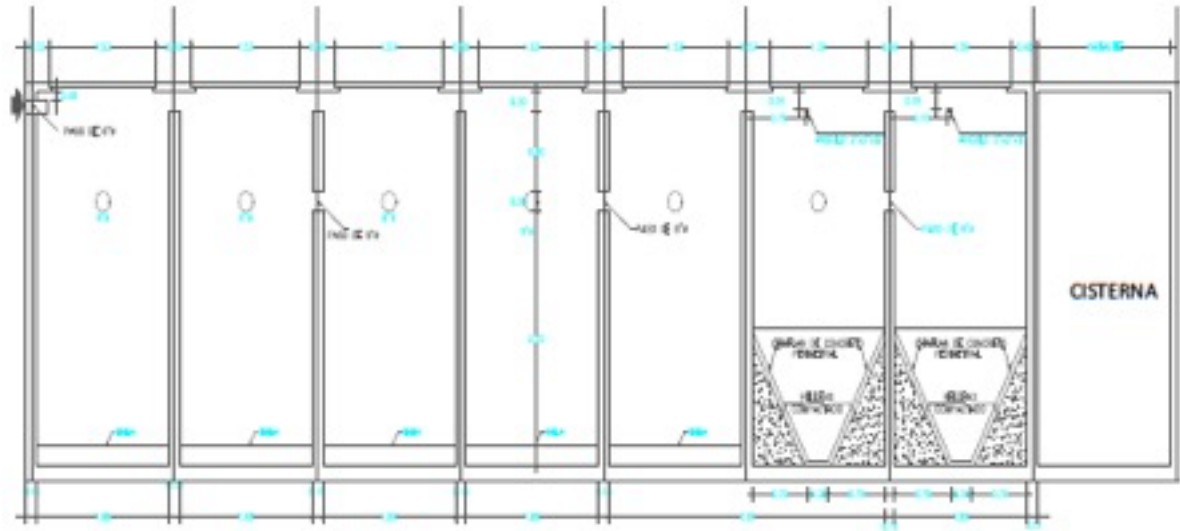


Figura 20.



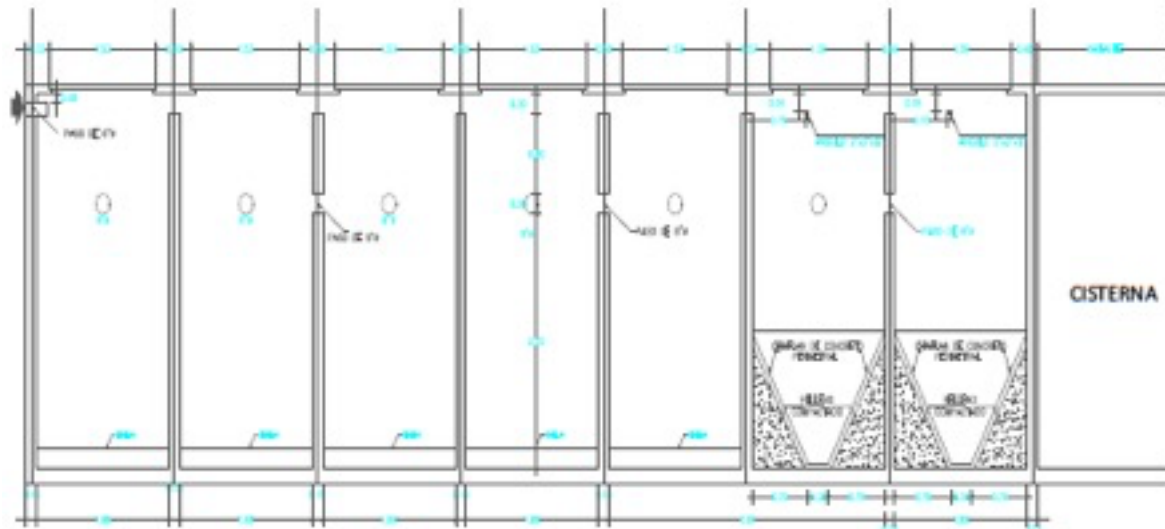


Figura 20. Corte longitudinal de la planta tratadora de agua residual del Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos”.

La cuantificación de ketorolaco se realizó sobre el efluente de una planta tratadora de agua residual de un hospital ubicado en la ciudad de Toluca, Estado de México, México. Las muestras fueron tomadas en la última fosa antes del proceso de cloración y de su descarga final a la red municipal, a aproximadamente 2 metros de profundidad que es un punto medio de acuerdo a los planos de la planta.

El muestro se realizó durante 3 días (8, 10 y 12 de mayo de 2017), tomando 4 L de agua residual y transfiriéndola a contenedores de vidrio ámbar. Las muestras fueron mantenidas en refrigeración inmediatamente después de ser tomadas y dejadas a temperatura ambiente antes de su análisis.

#### 7.5. Etapa 5. Determinación de la cantidad de ketorolaco en las muestras.

Posterior a la etapa de muestreo, cada muestra fue procesada y analizada por triplicado por CLAR bajo las condiciones cromatográficas descritas anteriormente.

Los resultados obtenidos en el análisis por CLAR se muestran en la Tabla 26.

**Tabla 26. Resultados de cuantificación de ketorolaco en muestras del efluente de la planta tratadora por muestreo puntual.**

FECHA DE MUESTREO	MUESTRA	CONC. MUESTRA ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	PROMEDIO	DESVIACIÓN	CV	PROMEDIO GLOBAL (n=9)	CV global
08 mayo 2017	M1_1	0.2109	0.2258	0.016	7.0	0.2117	22.3
	M1_2	0.2424					
	M1_3	0.2242					
10 mayo 2017	M2_1	0.2590	0.2559	0.013	5.0		
	M2_2	0.2667					
	M2_3	0.2419					
12 mayo 2017	M3_1	0.1658	0.1534	0.014	9.4		
	M3_2	0.1376					
	M3_3	0.1568					

La cuantificación de muestras obtenidas del efluente de la planta de tratamiento de agua residual proveniente del Centro Médico “Lic. Adolfo López Mateos” de la ciudad de Toluca, se resume a una concentración promedio de  $0.2117 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , con un CV de 22.3%.

Los resultados de cuantificación de ketorolaco en agua residual demuestra que el método analítico desarrollado y validado en este trabajo puede ser utilizado con este fin, es cierto que los detectores de espectrometría de masas acoplados a sistemas CLAR son los más utilizados para este tipo de aplicación, debido a su mayor sensibilidad, pero suelen ser más costos y de manejo más especializado; la metodología propuesta en esta investigación utiliza un detector de espectrofotometría UV-VIS el cual es más económico y ampliamente usado y con los resultados obtenidos se puede considerar como una opción en la cuantificación de trazas de ketorolaco en agua residual.

## 7.6. Determinación de cinética de degradación fotolítica y tiempo de vida media de ketorolaco en agua.

Se realizó un estudio de degradación fotolítica *in vitro*, utilizando por separado radiación ultravioleta y radiación de luz visible, sobre soluciones acuosas de ketorolaco, con el objetivo principal de deducir la persistencia del ketorolaco en el efluente de la planta tratadora hospitalaria por medio de la determinación de la cinética de degradación.

El seguimiento de la disminución de la concentración de ketorolaco en la reacción de degradación con forme el paso del tiempo se llevó a cabo por medio de una metodología analítica basada en CLAR con detección de espectrofotometría uv-vis, la cual fue desarrollada y validada de acuerdo a las guía de validación de ICH y CNQFB.

Ésta metodología analítica es diferente a la utilizada para la determinación ketorolaco en agua residual, principalmente en la composición de fase móvil y velocidad de flujo, estos cambios se realizaron con el objetivo de permitir una completa separación del ketorolaco de sus posibles productos de degradación y éstos no interfieran en la cuantificación.

A continuación se describe la metodología analítica para la determinación de ketorolaco en la degradación fotolítica.

### 7.6.1. Metodología analítica para la determinación de ketorolaco en la degradación fotolítica.

#### Preparación de la Solución de Referencia

Se pesó aproximadamente con exactitud 18.4 mg de Sustancia de referencia de ketorolaco trometamina equivalente a 12.5 mg de ketorolaco base y se transfirió a un matraz volumétrico de 250 mL. Se adicionó aproximadamente 50 mL de agua Milli-Q y sonicó durante 5 minutos, se aforó con agua Milli-Q. La concentración aproximada de ketorolaco fue  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### Preparación de la Muestra.

Se pesó aproximadamente con exactitud 18.4 mg de Sustancia de referencia de ketorolaco trometamina equivalente a 12.5 mg de ketorolaco base y transfirió a un matraz volumétrico de 250 mL. Se adicionó aproximadamente 50 mL de agua Milli-Q y sonicó durante 5 minutos, se aforó con agua Milli-Q. La concentración aproximada de ketorolaco fue de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . De la solución anterior, transfirió aproximadamente 75 mL a cada una de las celdas y éstas a su vez a la cámara en donde se lleva a cabo la degradación fotolítica.

Agua acidificada.

En un matraz volumétrico de 1 000 mL que contenía aproximadamente 100 mL de agua Milli-Q, se disolvió 5.6 mL de ácido fórmico 88% mezclado lentamente. Se aforó con agua Milli-Q.

Condiciones Cromatográficas.

En la Tabla 27 se muestran las condiciones cromatográficas para la separación y cuantificación de ketorolaco en la degradación fotolítica.

**Tabla 27. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de ketorolaco en la degradación fotolítica.**

Condición	Valor
Equipo	CLAR con detector UV-VIS
Columna cromatográfica	Agilent Zorbax SB C8 250x4.6 mm 5 $\mu\text{m}$
Fase Móvil	Metanol : Agua Acidificada (50% - 50%) v/v
Velocidad de Flujo	1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Volumen de Inyección	20 $\mu\text{L}$
Longitud de Onda	323 nm

### 7.6.2. Validación del método analítico para la determinación de ketorolaco en la degradación fotolítica.

La metodología analítica fue validada determinando los parámetros de especificidad, adecuabilidad, precisión del sistema, linealidad del sistema, linealidad del método,

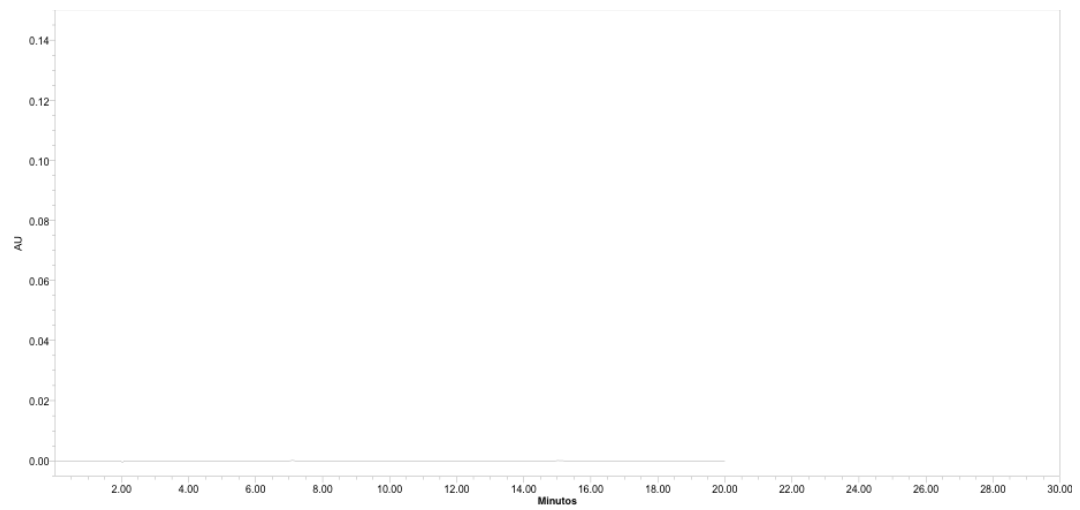
repetibilidad, precisión intermedia, límite de detección y límite de cuantificación, tal y cual como se indica en la etapa 2.

La Tabla 28 muestra los resultados obtenidos durante la validación de la metodología analítica para la determinación de ketorolaco en la degradación fotoilítica.

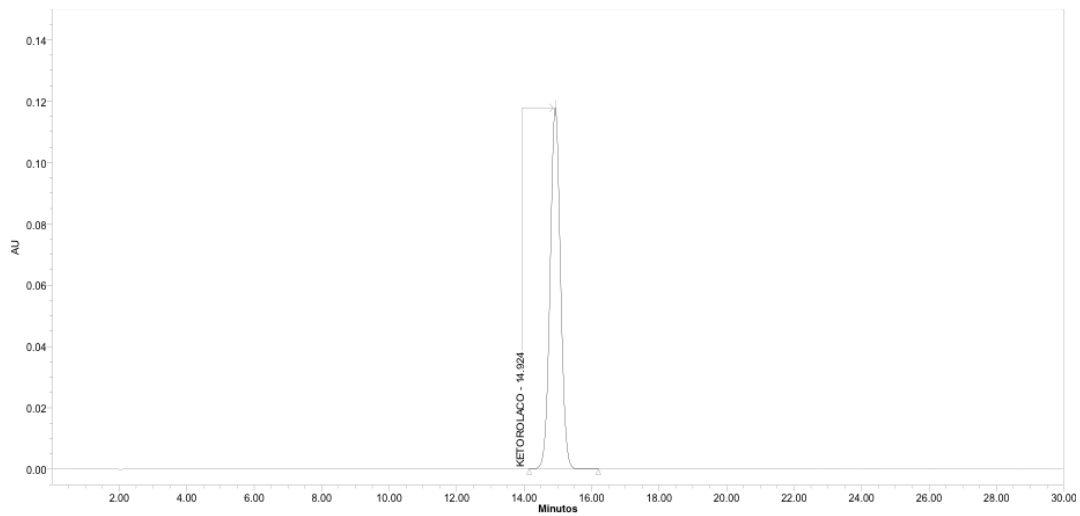
**Tabla 28. Resultados de la validación del método analítico para la cuantificación de ketorolaco en la degradación fotoilítica.**

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	CONCLUSIÓN
Especificidad	La respuesta del método únicamente se debe al ana	La respuesta del método únicamente se debe al analito	CUMPLE
Precisión del Sistema	$C.V. \leq 2.0\%$	1.4	CUMPLE
Adecuabilidad	$C.V. \leq 2.0\%$ $k' > 2$ $T < 2$ $R > 2$	1.0 6.8 1.0 No Aplica	CUMPLE
Línealidad del Sistema	$r^2 \geq 0.98$ $IC_{(beta)}$ no debe incluir el cero	0.9987 60356.8- 62318.6	CUMPLE
Repetibilidad	$IC_{(mu)}$ debe incluir el 100%	102.2 - 100.0	CUMPLE
Línealidad del Método	$C.V. \leq 2.0\%$ $r^2 \geq 0.98$ $IC_{(beta)}$ debe incluir la unidad $IC_{(beta)}$ debe incluir el cero $CV_{y/x} \leq 2.0\%$ $IC_{(mu)}$ debe incluir el 100%	0.9993 0.974 - 1.020 2.121 - -2.090 0.7 100.7 - 99.0	CUMPLE
Precisión Intermedia	$C.V. \leq 2.0\%$	0.9	CUMPLE
Límite de Detección	Límite de Detección $r^2 \geq 0.98$ $IC_{(beta)}$ no debe incluir el cero	0.00283698 1.0000 1.22E+06- 1.23E+06	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}$ CUMPLE
Límite de Cuantificación	Límite de Cuantificación $r^2 \geq 0.98$ $IC_{(beta)}$ no debe incluir el cero	0.00859690 1.0000 1.22E+06- 1.23E+06	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}$ CUMPLE

Durante la evaluación del parámetro de especificidad se llevó a cabo la inyección de diferentes muestras que pudieran interferir en el análisis. En la Figura 21 se muestra el cromatograma blanco. El correspondiente a la solución de referencia se observa en la Figura 22; mientras que el cromatograma correspondiente a una muestra se solución de ketorolaco degradada con radiación UV se observa en la Figura 23.

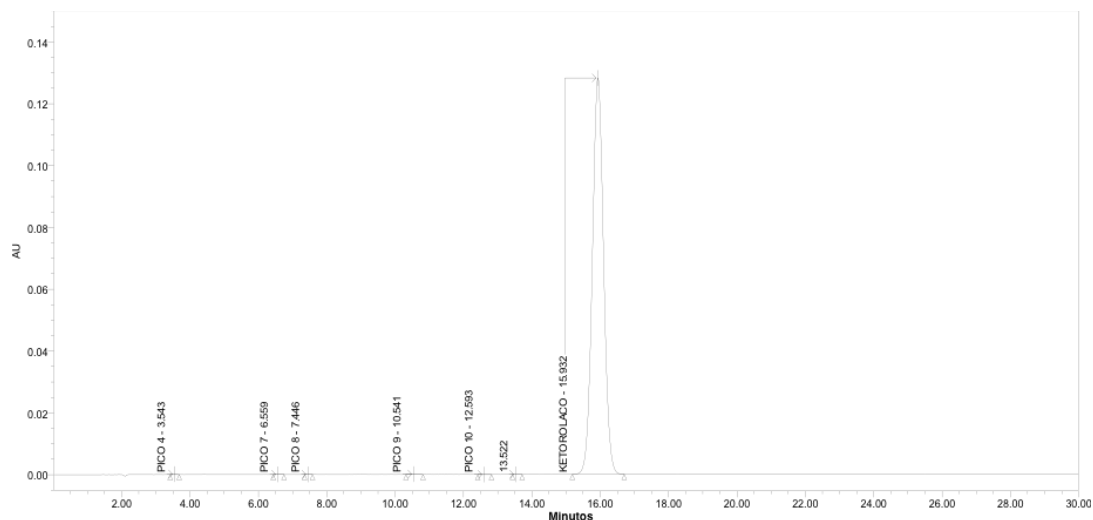


**Figura 21. Cromatograma Blanco (agua). Cuantificación de ketorolaco en la degradación fotolítica.**



**Figura 22. Cromatograma solución de referencia. Cuantificación de ketorolaco en la degradación fotolítica.**





**Figura 23. Cromatograma muestra de degradación fotolítica UV de ketorolaco. Cuantificación de ketorolaco en la degradación fotolítica.**

Como se puede observar (Tabla 28), todos los parámetros analizados durante la validación de la metodología analítica para la cuantificación de ketorolaco en la degradación fotolítica cumplen perfectamente con los criterios de aceptación indicados por las guías ICH y CNQFB para la validación de métodos analíticos. Por lo tanto, el método analítico desarrollado para la cuantificación de ketorolaco en la degradación fotolítica es específico, preciso y exacto, por lo que puede ser utilizado para la determinación de ketorolaco en la degradación fotolítica.

### **7.6.3. Cinética de degradación fotolítica de ketorolaco con luz Ultravioleta (UV).**

Para la determinación de la cinética de degradación fotolítica de ketorolaco por radiación UV, se montó un sistema que consiste principalmente de los siguientes componentes: una celda que permite el flujo de la radiación, un sistema que permite que la celda de reacción permanezca a temperatura constante, una fuente de radiación UV, que para este caso se trata de una lámpara de mercurio que emite radiación a 254 nm y esto se encuentra dentro de una cámara de radiación forrada de polietileno negro que evita la reflexión de la radiación. En la Figura 24 se muestra un esquema del sistema utilizado para la degradación fotolítica UV.

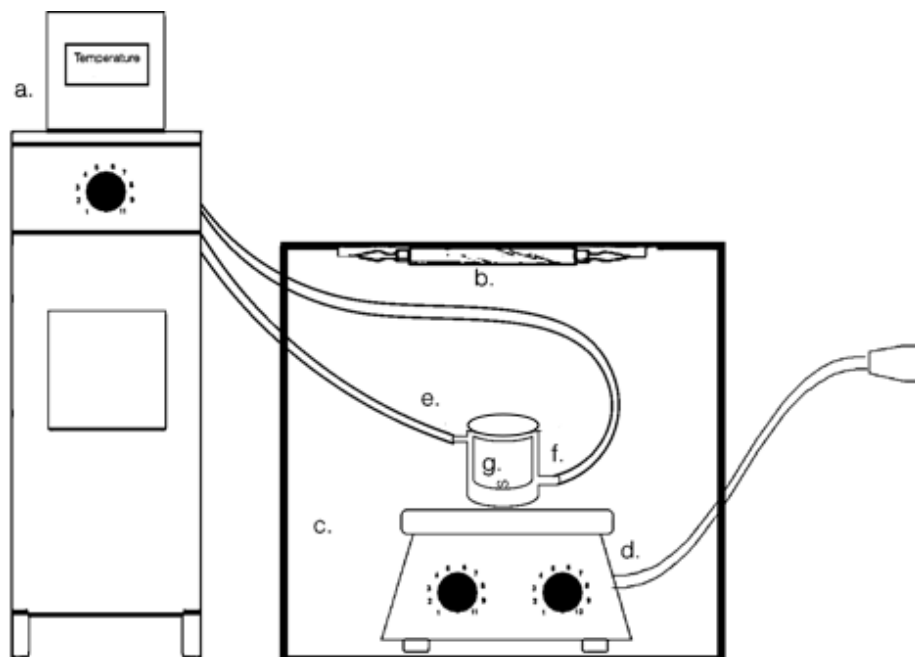


Figura 24. Esquema del sistema para la degradación fotolítica. a) recirculador y termostato de agua, b) fuente de radiación, c) contenedor, d) parrilla de agitación, e) salida de agua, f) entrada de agua y g) celda de reacción.

Para la experimentación se colocó aproximadamente 100 mL de una disolución de ketorolaco en agua con concentración de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  aproximadamente) dentro de la celda de reacción e iniciando la radiación, manteniendo la temperatura de la celda a  $18 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se tomaron 2 mL de la muestra al tiempo indicado. Posteriormente cada muestra fue colocada dentro de viales para su análisis por CLAR bajo las condiciones descritas anteriormente. Esta metodología se realizó por triplicado utilizando dos materiales en las celdas, una de vidrio y la segunda de cuarzo. Los resultados obtenidos durante degradación de ketorolaco utilizando una celda de cuarzo se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Resultados del comportamiento de degradación fotolítica por radiación UV con celda de cuarzo.

TIEMPO (h)	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3
	KETOROLACO $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	KETOROLACO $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	KETOROLACO $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
0	0.0001997875	0.0001997875	0.0001932206
0.5	0.0002023158	0.0002009421	0.0001949987
1	0.0002029341	0.0002005465	0.0001943721
3	0.0002083404	0.0001981625	0.0001913357
4	0.0002037832	0.0001924920	0.0001882330
5	0.0002009338	0.0001825738	0.0001775599
6	0.0002066012	0.0001646013	0.0001573098
7	0.0001835656	0.0001230821	0.0001170299
8	0.0001611106	0.0001001495	0.0000955237
9	0.0001383091	0.0000897662	0.0000864861
22	0.0000135506	0.0000051354	0.0000045894
25	0.0000097583	0.0000024875	0.0000023666
47	0.000007281	0.000004353	0.000004399

La Figura 25 muestra la gráfica del comportamiento de degradación fotolítica UV de ketorolaco con respecto al tiempo de exposición de la radiación utilizando la celda de cuarzo.

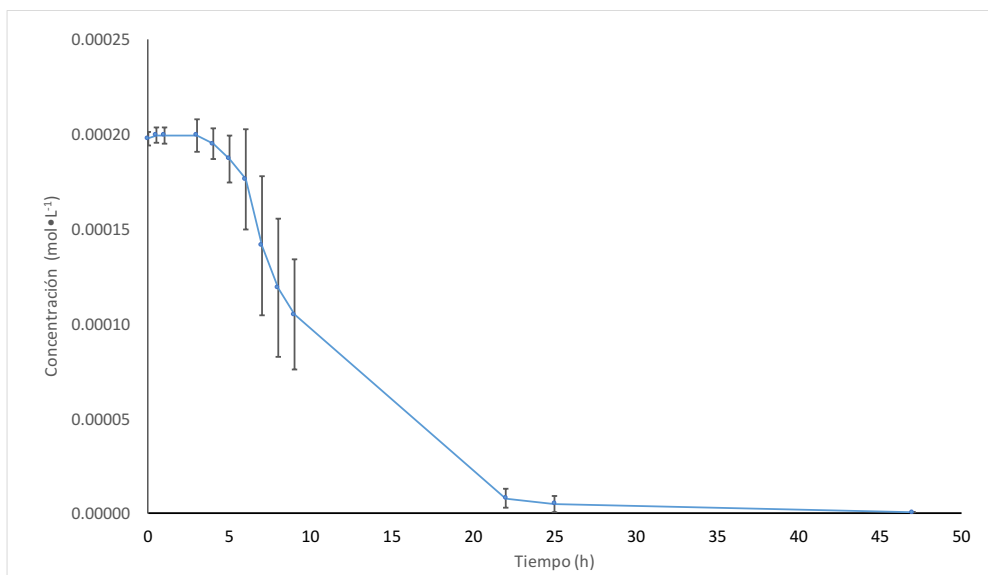


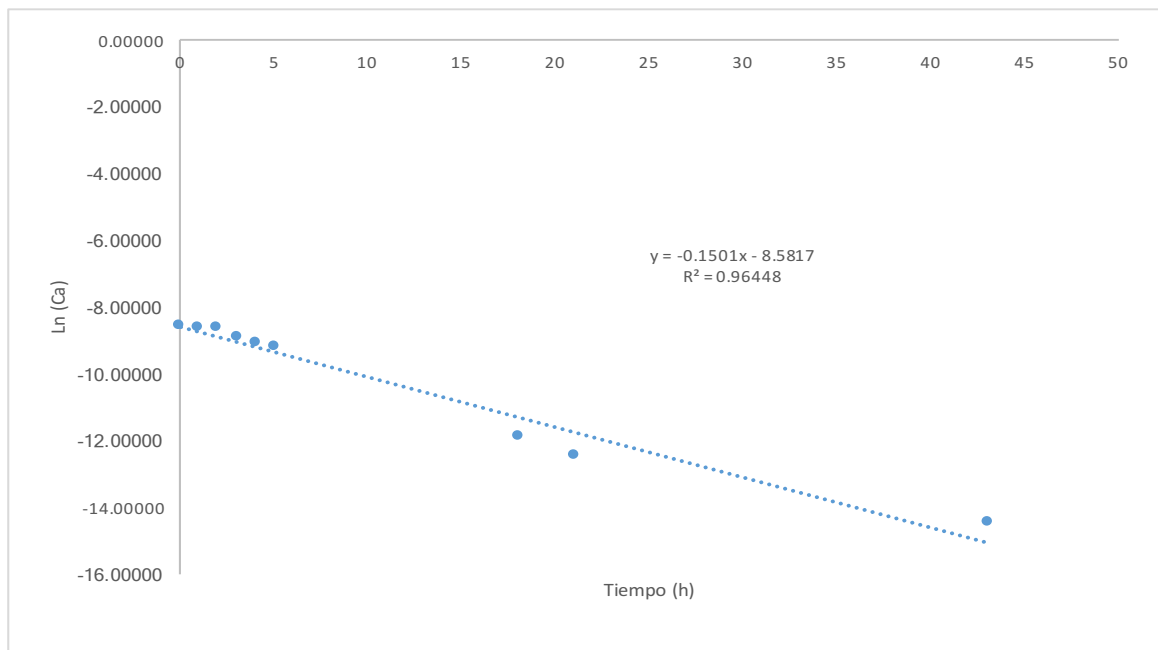
Figura 25. Comportamiento de degradación fotolítica UV de ketorolaco con celda de cuarzo.

Con los datos obtenidos de concentración de ketorolaco con respecto al tiempo de radiación, se realizó el ajuste a cada modelo de orden de reacción por el método integral, se encontró que el modelo que mejor se ajusta a los datos es el de primer orden. En la

Tabla 30, se muestran los resultados obtenidos para el ajuste de cada modelo de orden de reacción evaluado. En la Figura 26 se muestran la gráfica correspondiente a la degradación fotolítica UV de ketorolaco ajustado al modelo de primer orden.

**Tabla 30. Resultados obtenidos para el ajuste de cada modelo de orden de reacción evaluado para la degradación fotolítica UV en celda de cuarzo.**

	Orden Cero	Orden 0.5	Primer Orden	Segundo Orden	Tercer Orden
$r^2$	0.73875	0.83203	0.96448	0.84459	0.74090
PENDIENTE	$\varphi=C86$	-0.000343586	-0.150064471	41782.13885	82446693965
ORDENADA	0.00015503	0.01247417	-8.58165691	-173075.9028	-4.15494E+11



**Figura 26. Degradación fotolítica UV de ketorolaco con celda de cuarzo ajustado al modelo de primer orden.**

Por otra parte, se realizó el mismo estudio utilizando una celda de vidrio, los resultados del comportamiento de degradación fotolítica por radiación UV con celda de vidrio de muestran en la Tabla 31.

Tabla 31. Resultados del comportamiento de degradación fotolítica por radiación UV con celda de vidrio.

TIEMPO (h)	KETOROLACO mol•L <sup>-1</sup>	KETOROLACO mol•L <sup>-1</sup>	KETOROLACO mol•L <sup>-1</sup>
0	0.0001997875	0.0001998795	0.0001932206
0.5	0.0002026705	0.0002106548	0.0001954665
1	0.0002056083	0.0002105228	0.0001961782
3	0.0002008196	0.0002160907	0.0001930885
4	0.0002065633	0.0002139506	0.0001944466
5	0.0002036863	0.0002155775	0.0001940309
6	0.0002161062	0.0002203178	0.0001911975
7	0.0002103000	0.0002125620	0.0001891770
8	0.0001987619	0.0002131418	0.0001897707
9	0.0002015581	0.0002130867	0.0001865387
22	0.0000687568	0.0000921094	0.0000651286
25	0.0000593007	0.0000793814	0.0000546627
47	0.0000057127	0.0000120341	0.0000087230

En la Figura 27 se muestra la gráfica del comportamiento de degradación fotolítica UV de ketorolaco con respecto al tiempo de exposición de la radiación utilizando la celda de vidrio.

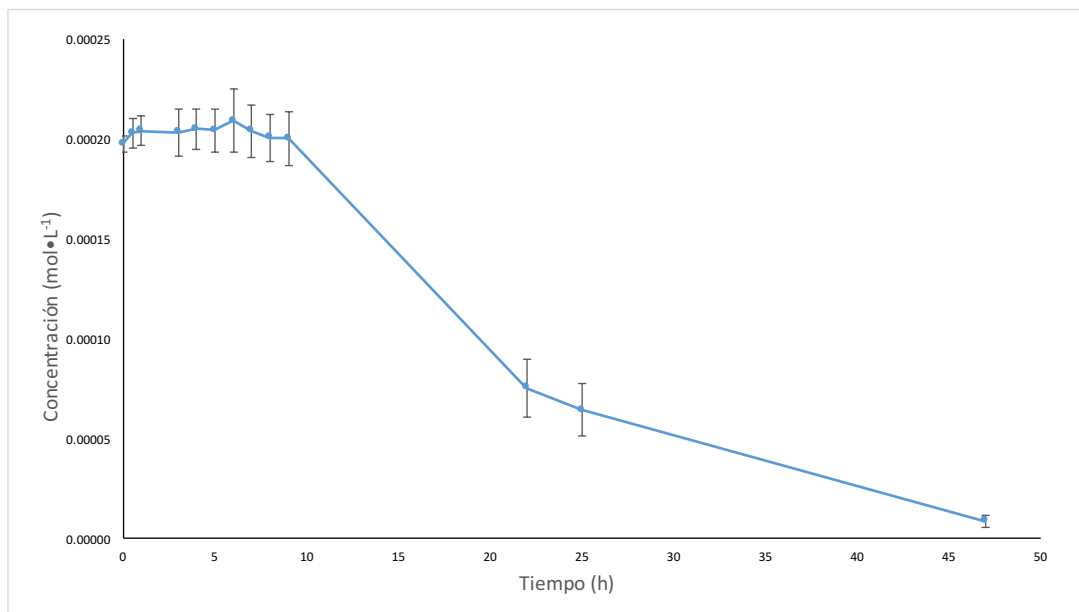


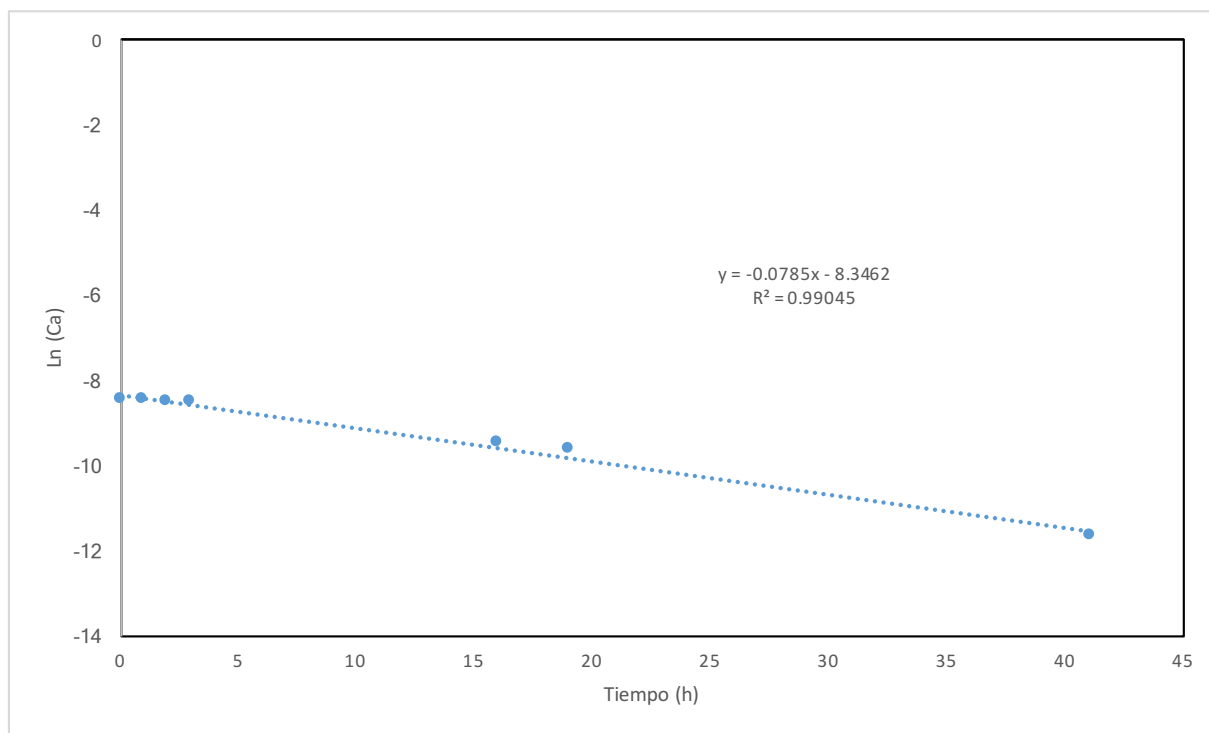
Figura 27. Comportamiento de degradación fotolítica UV de ketorolaco con celda de vidrio.

Al igual que en el caso de la degradación con celda de cuarzo, con los datos obtenidos se ajustaron a los diferentes modelos de orden de reacción por el método de integración. En la Tabla 32 se muestran los resultados obtenidos en el ajuste a los diferentes modelos

encontrando que el modelo de primer orden es el que mejor se ajusta para la degradación fotolítica UV en celda de vidrio. En la Figura 28 se muestran la gráfica correspondiente a la degradación fotolítica UV de ketorolaco ajustado al modelo de primer orden.

**Tabla 32. Resultados obtenidos para el ajuste de cada modelo de orden de reacción evaluado para la degradación fotolítica UV en celda de vidrio.**

	Orden Cero	Orden 0.5	Primer Orden	Segundo Orden	Tercer Orden
$r^2$	0.90668	0.97841	0.99045	0.82688	0.75341
<b>PENDIENTE</b>	-5.38715E-06	-0.000297298	-0.078457358	2672.927729	367414094.4
<b>ORDENADA</b>	0.00020065	0.01443065	-8.34618794	-6528.277364	-1812310704



**Figura 28. Degradación fotolítica UV de ketorolaco con celda de vidrio ajustado al modelo de primer orden.**

Entonces bien, si los datos obtenidos durante la degradación fotolítica con radiación UV con celda de cuarzo y vidrio indican que se ajustan mejor a un modelo de primer orden, esto se determinó ya que se obtuvo un coeficiente de correlación mayor que los demás modelos de orden de reacción evaluados y aunado a que el estudio de residuales no indica que exista una tendencia en el error.

Para el caso de la degradación de ketorolaco con celda de cuarzo, la reacción se ajusta a la Ecuación 1.

$$\ln \frac{C_0}{C_A} = k t \quad \text{Ecuación 1}$$

Si despejamos el tiempo en la Ecuación 1 y sustituimos las concentraciones  $C_0$  y  $C_{1/2}$  podemos obtener el tiempo de vida media para radiación UV con celda de cuarzo el cual es de 4.8 horas.

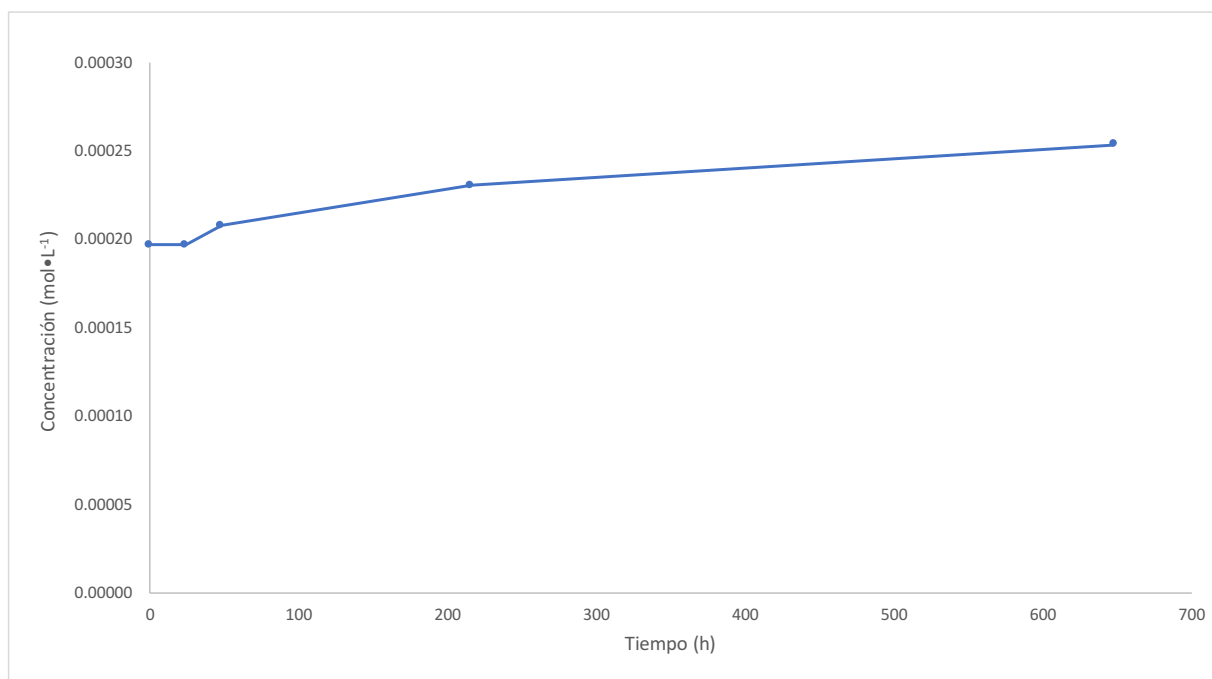
$$t_{1/2} = \frac{\ln \frac{C_0}{C_{1/2}}}{k} \quad \text{Ecuación 2}$$

Esto quiere decir que bajo las condiciones propuestas en el estudio de degradación fotolítica UV tardaría 4.8 horas en degradarse la mitad de la concentración inicial.

La diferencia en el tiempo en que se inicia la reacción de degradación entre los órdenes de reacción cambiando el tipo de celda, se puede deber a que la celda de material de cuarzo permite que la radiación UV llegue directamente hasta la solución de ketorolaco, mientras que el vidrio absorbe esta radiación por lo que no llega directamente a la solución, debido a esto, puede existir una diferencia en la energía necesaria para la degradación, obteniendo una diferencia entre los órdenes y velocidades de reacción.

#### 7.6.4. Cinética de degradación fotolítica de ketorolaco con luz blanca.

En los experimentos realizados para la degradación fotolítica con radiación visible, no se obtuvo una degradación significativa aún después de 648 horas de radiación; por lo que no se pudo obtener su orden de reacción ni su tiempo de vida media, de hecho, al paso del tiempo se observó un aumento en la concentración de ketorolaco en las muestras analizadas que se pudo deber a la disminución del volumen de la muestra al realizar los muestreos y al aumento de la temperatura. En la Figura 29 se observa la gráfica de comportamiento de la degradación fotolítica con radiación visible.



**Figura 29. Comportamiento de degradación fotolítica de ketorolaco con radiación visible.**

Este comportamiento se puede deber a que la energía emitida por la radiación visible no es energéticamente suficiente para que se lleve a cabo una reacción que permitiera la degradación de ketorolaco, para tal caso, se considera realizar estudios que en donde se lleve a cabo los dos tipos de radiaciones al mismo tiempo y discernir si existe diferencia con los resultados presentados en este trabajo.



# CONCLUSIONES

## 8 CONCLUSIONES.

Durante el desarrollo de este proyecto se obtuvieron 2 metodologías analíticas para la cuantificación de ketorolaco basándose en la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución con un detector de espectrofotometría UV.

La primera metodología se utilizará para la cuantificación de ketorolaco en agua residual, proveniente de una planta tratadora de aguas residuales. Cumpliendo plenamente con los parámetros de validación, especialmente la especificidad, ya que el carácter complejo de la matriz de la muestra; en donde no solo se encuentran disueltos un sin fin de compuestos, si no también fármacos y se demostró que el sistema cromatográfico propuesto resolvía perfectamente este problema, separando los compuestos no deseados en los primeros minutos del cromatograma para que posteriormente eluya el pico de interés sin interferencia de ningún tipo.

La aplicación de esta metodología se llevó a cabo en la cuantificación de ketorolaco en agua residual de una planta tratadora de agua residual de un hospital ubicado en la ciudad de Toluca, México, obteniendo como resultado una concentración promedio de  $0.2117 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  durante 3 días.

La segunda metodología fue diseñada para la determinación de ketorolaco en la degradación fotolítica, esta metodología fue desarrollada con el fin de determinar la cinética de degradación fotolítica en solución acuosa con dos diferentes radiaciones, una en el intervalo ultravioleta del espectro y la segunda en el lado visible o blanca del espectro. Durante la validación de esta metodología se demostró que es capaz de cuantificar de manera exacta precisa y específica el ketorolaco aún después de que la muestra haya sido degradada fotolíticamente, separando perfectamente el ketorolaco de sus productos de degradación para su posterior cuantificación.

Los estudios de cinética de degradación fotolítica para ketorolaco en solución muestran que es de primer orden, con un tiempo de vida media de 4.8 horas cuando se realiza la degradación con radiación UV, mientras que la radiación con luz blanca los resultados obtenidos no muestran una degradación significativa después de 648 horas de exposición

por lo que no fue posible la determinación de orden de reacción ni el tiempo de vida media bajo estas condiciones.

Se sugiere para estudios posteriores, la identificación de los productos de degradación presentes, así como la deducción del mecanismo que prevalece en la degradación fotolítica de ketorolaco, esto se puede lograr mediante el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de espectrometría de masas.

# ANEXOS

## 9 ANEXOS

## ANEXO A. Artículo enviado para su publicación.



## 6781310.v1 (Research Article)

<b>Title</b>	DETERMINATION OF KETOROLAC IN THE EFFLUENT OF A TREATING PLANT OF A HOSPITAL AND KINETICS STUDY OF ITS PHYSIOLIC DEGRADATION
<b>Journal</b>	International Journal of Photoenergy
<b>Issue</b>	Towards Sustainability: Photochemical and Electrochemical Processes Applied for Environmental Protection (PEPEP)
<b>Manuscript Number</b>	6781310 (Research Article)
<b>Submitted On</b>	2017-06-08
<b>Author(s)</b>	Hugo Ortega, Jorge Ramírez, Paula Gamboa, Angie Dávila
<b>Editor</b>	
<b>Status</b>	Under Review

**Asunto:** 6781310: Your manuscript has been accepted

**Fecha:** jueves, 23 de noviembre de 2017, 01:47:11 hora estándar central

**De:** Juan M. R. Rodríguez

**A:** jjramirezg@uaemex.mx

**CC:** jrodriguez@uni.edu.pe, ortegahhugo@hotmail.com, pags\_17@hotmail.com, edimich8@hotmail.com

Dear Dr. Ramírez,

The review process of Research Article 6781310 titled "DETERMINATION OF KETOROLAC IN THE EFFLUENT FROM A HOSPITAL TREATING PLANT AND KINETICS STUDY OF ITS PHOTOLYTIC DEGRADATION" by Hugo Ortega, Jorge Ramírez, Paula Gamboa and Angie Dávila submitted to International Journal of Photoenergy has been completed. I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in the journal.

The special issue for which the paper is being processed is "Towards Sustainability: Photochemical and Electrochemical Processes Applied for Environmental Protection"

The publication process of your manuscript will be initiated upon the receipt of electronic files. Please log in to the Manuscript Tracking System at the link below using your username and password, and upload the electronic files of your final accepted version within the next 2-3 days.

<http://mts.hindawi.com/author/6781310/upload.files/>

The electronic files should include the following:

- 1- Source file of the final accepted manuscript (Word or TeX/LaTeX).
- 2- PDF file of the final accepted manuscript.
- 3- Editable figure files (each figure in a separate EPS/PostScript/Word file) if any, taking into consideration that TIFF, JPG, JPEG, BMP formats are not editable.

Thank you again for submitting your manuscript to International Journal of Photoenergy.

Best regards,

Juan M. R. Rodríguez  
[jrodriguez@uni.edu.pe](mailto:jrodriguez@uni.edu.pe)

## DETERMINATION OF KETOROLAC IN THE EFFLUENT FROM A HOSPITAL TREATING PLANT AND KINETICS STUDY OF ITS PHOTOLYTIC DEGRADATION

H.H. Ortega-Soto; J.J. Ramírez-García\*; P.A. Gamboa-Suarez; A. Dávila-Estrada.

Laboratorio de Análisis Instrumental. Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón esq. Paseo Tollocan, C.P. 50120, Toluca, Estado de México, México

Correspondence: J. J. García-Ramírez. E-mail: [jiramirezg@uaemex.mx](mailto:jiramirezg@uaemex.mx). Phone/Fax: +52 (722) 217-3890

### ABSTRACT

In this work, two specific, sensitive and rapid analytical methods were developed. One of them for the determination of ketorolac in a hospital wastewater treatment plant where there is no interference with other organic substances; the other one for the determination of the degradation kinetics in aqueous medium. Ketorolac was extracted from wastewater samples through solid phase extraction cartridges (SPE), then it was identified and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). Ketorolac was detected in concentrations between 0.1376 and 0.2667  $\mu\text{g/L}$ . Photolytic degradation was performed on aqueous solutions of ketorolac tromethamine, reference substance, at a concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$ . Samples were in direct contact with ultraviolet light in a dark chamber, equipped with two mercury lamps (254 nm) at a radiation source of 15W. The results of the photolytic degradation were adjusted to a first-order model, obtaining a half-life of 4.8 hrs.

### Keywords

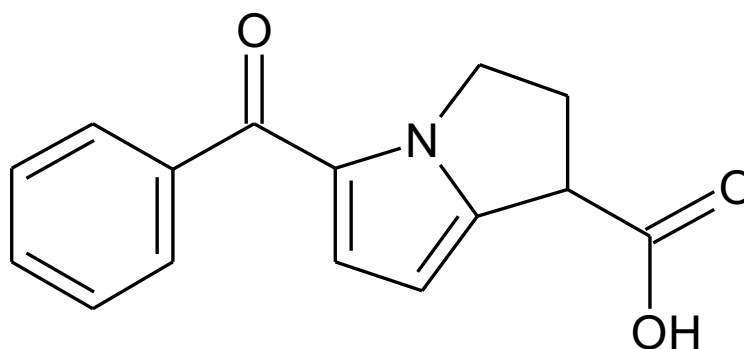
Ketorolac, waste water, treatment plant, degradation products, photolytic degradation.

### 1. Introducción

Ketorolac is a drug that has analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties and is indicated in the short-term treatment of mild to moderate pain postoperatively and in musculoskeletal trauma, in addition to pain caused by nephritic colic. This drug is contraindicated when the patient has active gastro-duodenal ulcer, gastrointestinal bleeding, in patients with moderate or severe renal impairment. [1]

The analgesic activity of ketorolac is due to the elimination of formation of prostaglandins, through the inhibition of the enzyme prostaglandin system. [1]

The chemical structure of ketorolac is shown in Figure 1.



**Figure 30. Chemical structure of ketorolac.**

Ketorolac is metabolized by hydroxylation and conjugation with glucuronic acid. The renal route is the primary route of excretion of both the drug and its metabolites which is approximately 92% of the dose, about 40% as metabolites and 60% as ketorolac. Approximately 6% of the dose is excreted in feces. [2]

Data obtained in a study to determine the toxic effects of ketorolac on *Cyprinus carpio*, Galar-Martínez and collaborators in 2014, concluded that ketorolac in a concentration range of 1 to 60 mg/L caused oxidative stress and cytotoxicity, specifically in liver, brain and blood.

Different authors indicate that the wastewater treatment plants do not remove the drugs in their entirety, because they do not have unitary operations that devote their process to the removal or elimination of drugs, since they depend on the physico-chemical properties of each substance, for which in some cases, barely persists a decrease in the quantity of drugs after treatment [4-6].

Several studies have determined the presence of ketorolac in different matrices. For example; Gómez in 2006 determined that the amount of ketorolac in the effluent of a hospital treatment plant ranged between 0.2 µg/L and 59.5 µg/L. Oliveira in 2015, determined ketorolac in influent and effluent from wastewater treatment plants of different hospitals, finding it in concentration ranges from 0.03 µg/L to 1.15 µg/L [6,7].

Because drug concentrations in waste water are in the order of µg/L and in some cases ng/L, the use of high-performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometry detector is very common. Which is significantly more sensitive than spectrophotometry detectors, but has the disadvantage that it is more expensive; however, the methodology presented in this research uses UV spectrophotometry detection and a suitable sensitivity has been demonstrated by validation that can allow the quantification of ketorolac in waste water in a less expensive way and can be replicated in other laboratories that do not have a mass spectrometry detector.

The objective of this work is to develop and validate analytical methodologies by high resolution liquid chromatography for the quantification of ketorolac in waste water of a hospital treatment plant and a second methodology that is capable of separating and quantifying ketorolac in solution and that can be used for the determination of the kinetics of photolytic degradation. And thus, determine the persistence of ketorolac in the effluent of a hospital treatment plant.

## **2. Methodology**

### **2.1 Materials and instruments.**

Sigma-Aldrich® ketorolac tromethamine reference substance was used, formic acid of the brand Fermont® 88% analytical reagent grade. The Fermont® brand chromatographic grade methanol, and the water used was HPLC grade from the Millipore® Milli-Q brand purification equipment, the cartridges used for solid phase extraction (SPE) were SEP-PAK®, vac 6cc (1g) C18, corresponding to the Waters® brand.

The high-performance liquid chromatography equipment used for the development and validation of analytical methods was Waters® brand and consisted of a model



1525 pump, a model 717 automatic injector system and a model 2487 dual wave spectrophotometric detector. The software Controller of the chromatographic system was Waters® Breeze®.

## 2.2 Analytical Methodology.

### 2.2.1 Quantification of ketorolac in waste water.

The reference solutions and samples used are of a concentration of 10 µg/mL of ketorolac, using ketorolac tromethamine reference substance, which is dissolved in chromatographic grade methanol.

The mobile phase is a mixture of methanol with acidified water in a ratio of 60%: 40% v/v. The acidified water is prepared by the dilution of 5.6 mL of 88% formic acid and brought to 1000 mL capacity with Milli-Q water.

Validation of the methodology and analysis of the samples were carried out under the following chromatographic conditions: the column used is an Agilent® Zorbax SB C8 brand of 250 x 4.6 mm with a particle size of 5 µm; flow velocity of 1.0 mL/min; the injection volume of 20 µL at a wavelength for detection of 318 nm.

The samples from the hospital treatment plant were extracted by SPE, the cartridges were previously conditioned with 5 mL of methanol chromatographic grade and later with 5 mL of Milli-Q water. The extraction was carried out to 250 mL of residual water, at the end a wash was performed with 10 mL of Milli-Q water. The elution of the sample was performed with 5 mL of methanol chromatographic grade. This solution was injected into the liquid chromatograph under the above described conditions and quantified by comparing the external standard of 10 µg/mL of ketorolac.

### 2.2.2 Ketorolac determination in aqueous solution.

The reference solutions and samples used are of a concentration of 50 µg/mL of ketorolac, using ketorolac tromethamine reference substance, which is dissolved in Milli-Q water.

The mobile phase is a mixture of methanol with acidified water in a 50%: 50% v/v ratio. The acidified water is prepared by the dilution of 5.6 mL of 88% formic acid and brought to 1000 mL capacity with Milli-Q water.

Validation of the methodology and analysis of the samples were carried out under the following chromatographic conditions: the column used is an Agilent® Zorbax SB C8 brand of 250 x 4.6 mm with a particle size of 5  $\mu\text{m}$ ; flow rate of 1.5 mL/min; the injection volume of 20  $\mu\text{L}$  at a wavelength for detection of 323 nm.

### 2.2.3 Validation of the analytical method.

The analytical methodologies were validated based on the guide for the validation of analytical methods of the International Conference on Harmonization (ICH) determining the parameters of specificity, suitability, system accuracy, system linearity, method linearity, repeatability, detection and quantification limits [8].

The evaluation of the specificity was carried out by means of the injection, under the previously described conditions, from different samples that could interfere with the ketorolac analytical signal. These injected samples belong to a target, reference solution and forced degradations by stress conditions of the reference solutions (acid, basic and photolytic degradation).

A six-fold injection of a ketorolac reference solution determined the suitability of the system. The calculation of the chromatographic parameters was performed using the Breeze® liquid chromatograph software.

The determination of linearity of the system was performed by analyzing 8 levels of ketorolac reference concentration (by triplicate), corresponding to 10% to 400% of the working concentration (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the residual water quantification and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for determination of photolytic degradation). The slope, ordered to the origin, coefficient of determination by linear regression was calculated; In addition to the calculation of confidence interval for the slope ( $\text{IC}_{\beta 1}$ ).

The precision parameter was performed at three levels: system, repeatability and intermediate accuracy. The evaluation of the precision of the system was carried out by the injection of 6 reference solutions of ketorolac at work concentration, coming from the same stock; calculating the average, standard deviation and coefficient of variation.

The determination of the repeatability was performed by independently preparing a six-fold solution of ketorolac at the working concentration, for its subsequent quantification with the comparison with an external standard, determining the percentage of recovery, the average recovery rate of the six solutions, as well as standard deviation and coefficient of variation.

Intermediate precision was evaluated by quantifying 3 samples containing the working concentration, the analysis was carried out by 2 analysts on two different days ( $n = 12$ ). The average of recovery, standard deviation and coefficient of variation was obtained.

Accuracy was determined by calculating the recovery of three levels of ketorolac in triplicate ( $n = 9$ ), quantification using an external standard, obtaining the recovery of each of the samples, the mean recovery, the standard deviation, coefficient of variation and confidence interval for the mean ( $IC_{\mu}$ ).

The limits of detection and quantification were determined by performing a calibration curve at three levels of concentration. Subsequently, the slope, ordered to the origin, standard deviation of the regression and coefficient of determination were calculated, all by linear regression.

#### 2.2.4 Quantification of wastewater samples from the treatment plant

The samples were taken in a timely manner from a wastewater treatment plant of a hospital located in the city of Toluca, in the state of Mexico, Mexico. The samples were refrigerated immediately after being taken for further processing by SPE using the methodology indicated above.

#### 2.3 Photolytic degradation kinetics

The system for the determination of degradation kinetics consists mainly of the following components: a quartz cell placed on a stirring grid that contains the sample and allows the flow of radiation, a recirculating water bath kept the cell at a constant temperature, and the source of UV radiation from a mercury lamp at 254 nm. These

components were inside a glass tank lined with black polyethylene that prevents reflection of the radiation. Figure 2 shows the scheme for the photolytic degradation.

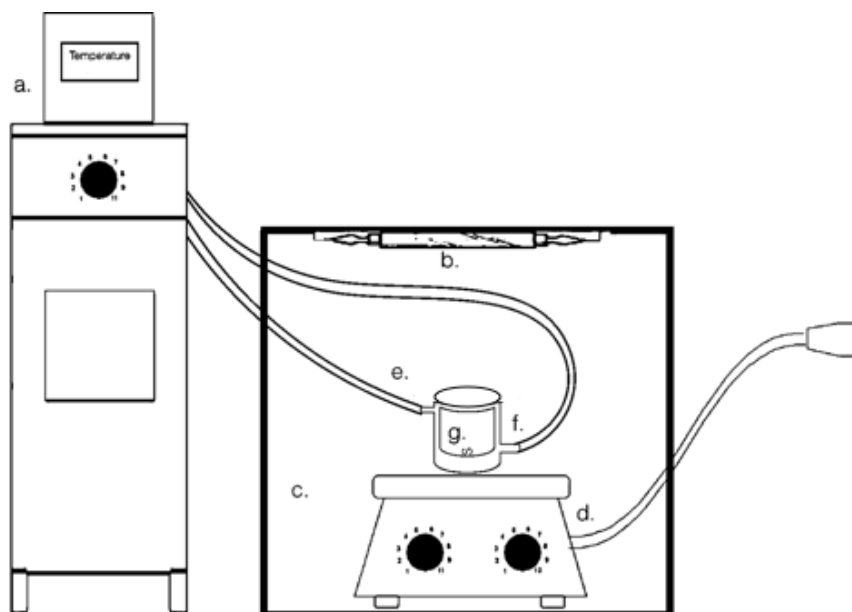


Figure 2: Photolytic degradation system. a) water, b) radiation source, c) container, d) agitation plate e) and f) in and off recirculation water, g) reaction cell

For the experimentation, 100 mL of a solution of ketorolac in water with a concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$  ( $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L approx.) were placed inside the reaction cell and initiating the radiation, keeping the temperature of the cell at 18 ° C. Samples of 2 mL of the ketorolac solution were taken at different times. Subsequently, each sample was placed inside vials for analysis by HPLC under the conditions described above. This methodology was carried out in triplicate for each of the radiations.

### 3. Results and discussion

3.1 Analytical method validation for the quantification of ketorolac and its degradation products.

The specificity of the analytical methodologies was demonstrated by the chromatograms obtained from the individual injection of different and possible

components of the real sample, due to the fact that degradation products were not available in pure way, forced degradations were carried out on a solution of reference substance of ketorolac. In Figure 3 and Figure 4 the chromatograms obtained for the determination of degradation products can be observed. In the case of the methodology for the quantification of ketorolac in wastewater, the chromatograms are shown in Figure 5 and Figure 6.

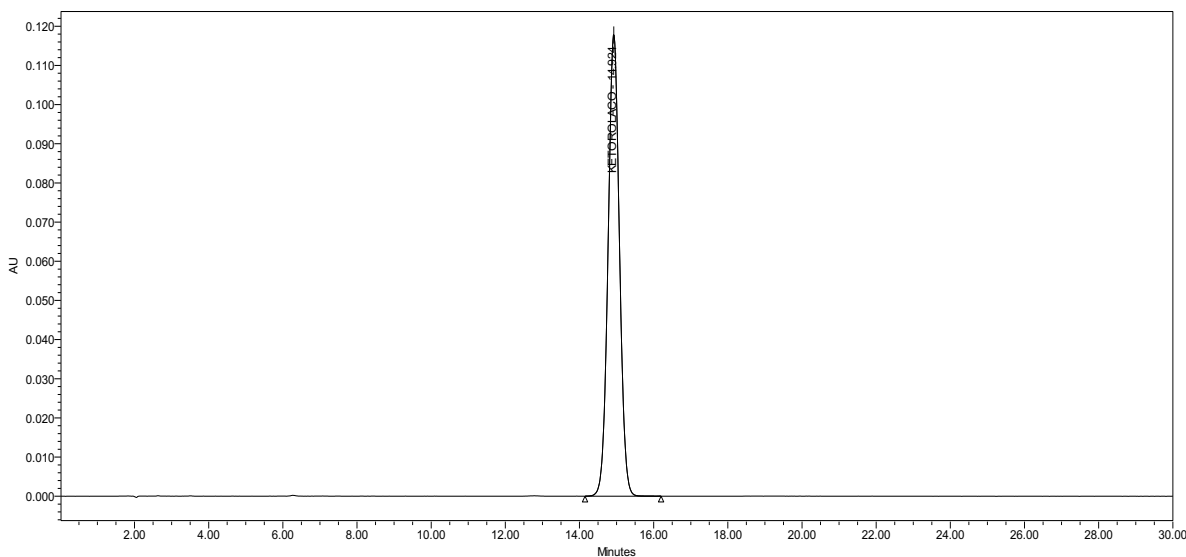


Figure 3: Chromatogram for the reference solution of ketorolac.

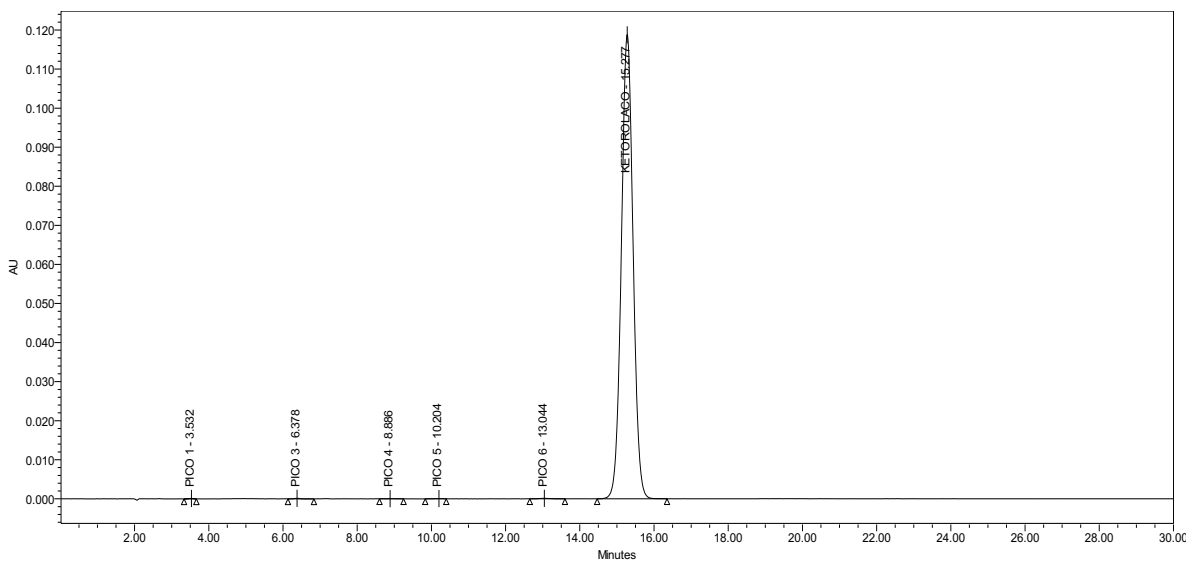


Figure 4: Chromatogram for the photolytic degradation of ketorolac and its degradation products.

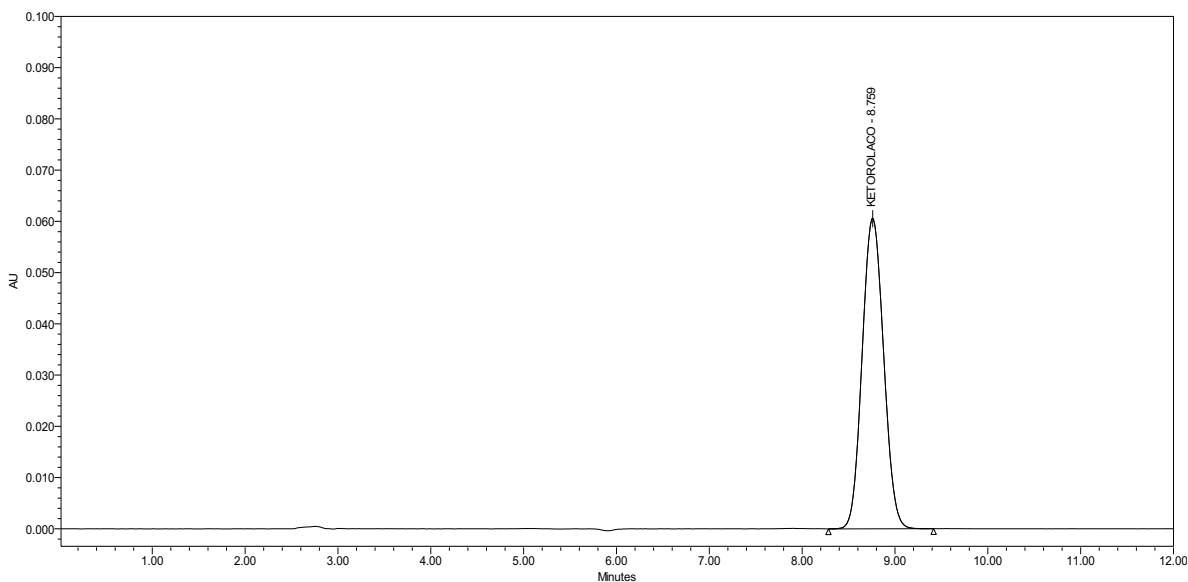


Figure 5: Chromatogram for the reference solution of ketorolac in wastewater determination.

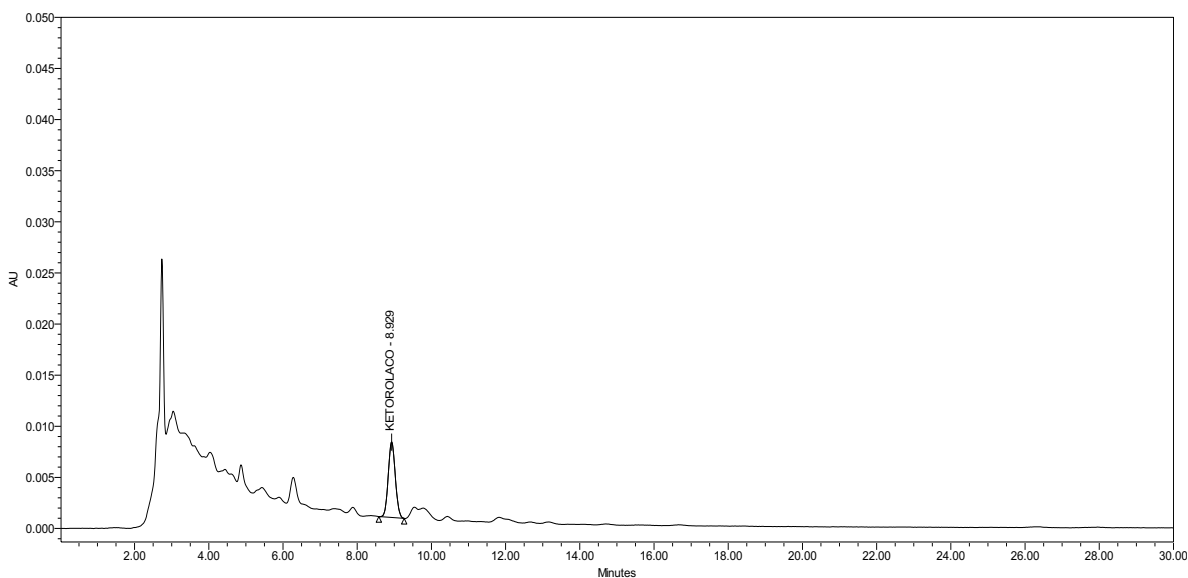


Figure 6: Chromatogram for the sample wastewater hospital treatment plant.

During the determination of the suitability of the system, a six-fold reference solution was injected under the described conditions, checking the retention time, area under the curve, theoretical plates, capacity factor and collection factor. Table 1 shows the results obtained in the test for the two methodologies.

Table 1: Suitability results for the system.

PARAMETER	KETOROLAC IN WASTEWATER	KETOROLAC AND DEGRADATION PRODUCTS
Retention time (Rt)	8.7 min	14.1 min
Peak area	973919.0	2888463.2
Teorical Plates (N)	6830.1	11096.6
Capacity Factor (K')	3.9	6.8
Tailing (T)	1.1	1.0

The results obtained in the precision parameter for quantification of ketorolac in residual water are shown in Table 2.

Table 2. Precision results for ketorolac in wastewater.

PRECISION			
	Precision of the system n=6	Repeatability n=6	Inter-day precision n=12
AVERAGE	956364.8	99.8	99.8
STANDARD DESVIATION	7733.2	0.7	1.8
RSD %	0.8	0.7	1.8
STADISTIC T <sub>0.95</sub>	-	2.571	-

<b>IC (<math>\mu</math>)</b>	-	100.6	-
	-	99.1	-

The results obtained in the precision parameter for quantification of ketorolac and degradation products are shown in Table 3.

Table 3. Precision results for ketorolac and its degradation products.

<b>PRECISION</b>			
	<b>Precision of the system</b>	<b>Repeatability</b>	<b>Inter-day precision</b>
	<b>n=6</b>	<b>n=6</b>	<b>n=12</b>
<b>AVERAGE</b>	2911596.8	101.1	100.1
<b>STANDARD DESVIATION</b>	41727.1	1.0	0.9
<b>RSD %</b>	1.4	1.0	0.9
<b>STADISTIC T<sub>0.95</sub></b>	-	2.571	-
<b>IC (<math>\mu</math>)</b>	-	102.17	-
	-	100.01	-

The linearity was evaluated at 8 levels of concentration and in the two methodologies with a coefficient of determination > 0.98. Table 4 shows the results obtained for the linearity of the system.



Table 4. Linearity results for the system.

PARAMETER	KETOROLAC IN WASTEWATER	KETOROLAC AND DEGRADATION PRODUCTS
SLOPE	96078.6	61337.7
ORIGIN	- 21767.2	- 29360.2
RANGE	2.07 – 41.5	5.05 – 107.8
$r^2$	0.9970	0.9986
IC ( $\beta_0$ )	93773.5 – 98383.7	60356.8 – 62318.6

Figure 7 and Figure 8 show the graphs concentration vs. area under the curve for the linearity of the system.

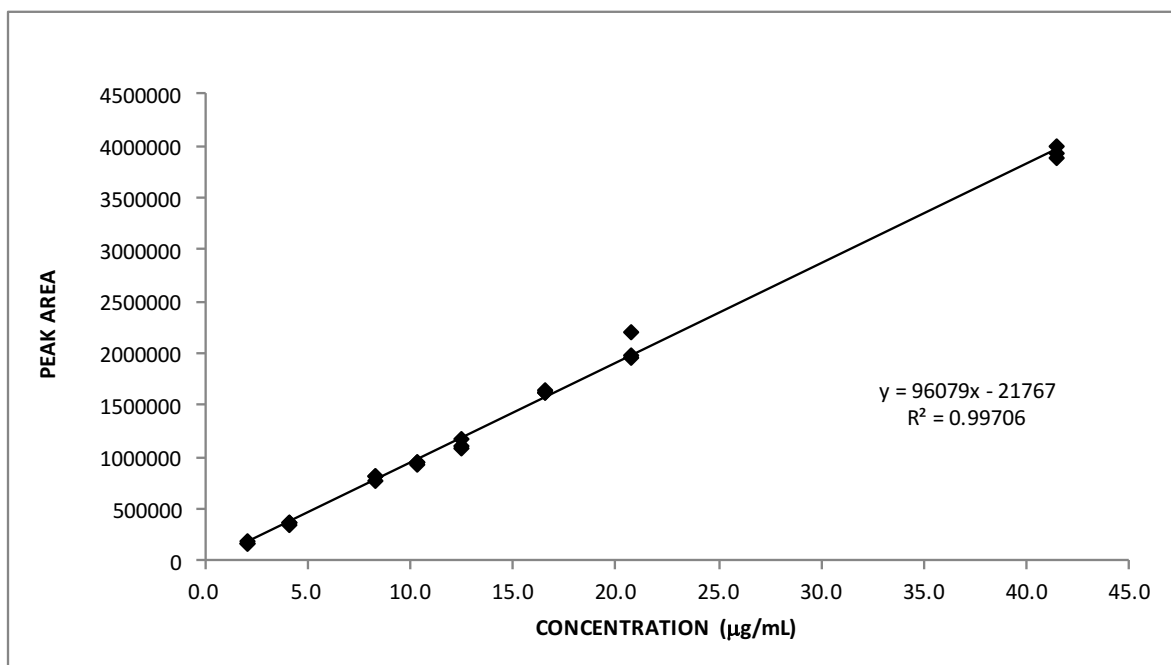


Figure 7: Linearity determination of ketorolac in wastewater.

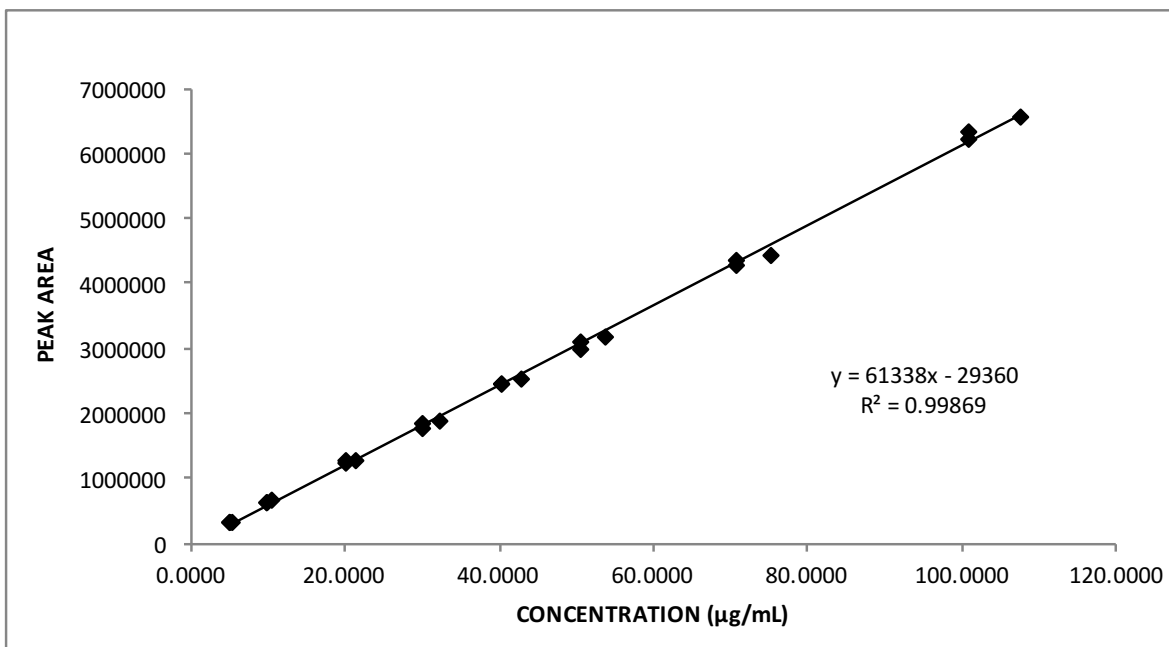


Figure 8: Linearity of ketorolac degradation products.

The accuracy of the method was determined by quantifying added water with an exact amount of ketorolac at three concentration levels, by triplicate each.

In the case of the determination of ketorolac in residual water, the levels of 40%, 100% and 400% were evaluated. The results are shown in Table 5, in all samples analyzed, a recovery between 98.0% and 102.5% is obtained, obtaining a global average (n = 9) 100.0%, with a coefficient of variation of 1.8%.

Table 5. Accuracy results for ketorolac in wastewater.

Level	% Recovery	Average	SD	RSD%	Global average n=9	SD n=9	RSD% Global n=9
	100.7						
<b>40%</b>	102.1	101.8	0.9	0.9	100.0	1.8	1.8
	102.5						
<b>100%</b>	98.4	98.9	1.2	1.2			

	100.2			
	98.0			
	101.4			
<b>400%</b>	98.3	99.4	1.7	1.8
	98.5			

Graphing the data added quantity vs quantity recovered, gives a coefficient of determination of 0.999, slope of 0.9931 and the ordinate to the origin passes through zero. (Figure 9).

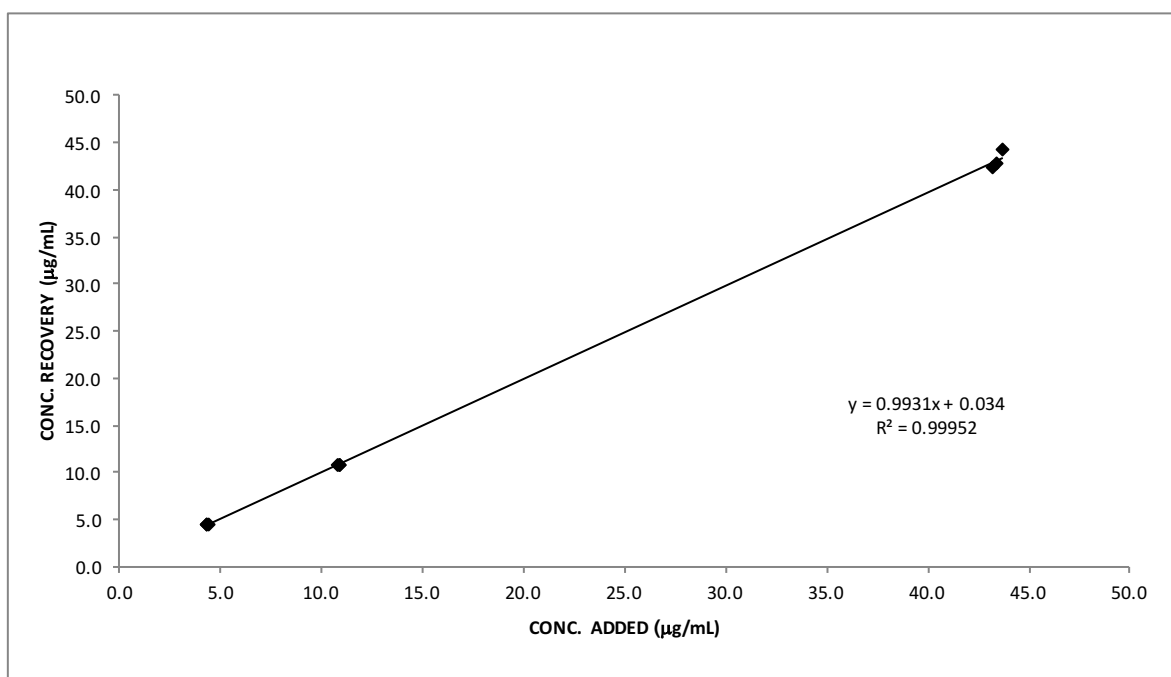


Figure 9: Accuracy for ketorolac in wastewater.

The accuracy results obtained for ketorolac and degradation products are shown in Table 6, all recovery results are between 98.0% and 101.2%, with a global mean ( $n = 9$ ) of 99.8% and a coefficient of variation of 1.1%. By plotting the added concentration

versus concentration recovered (Figure 10) a coefficient of determination ( $r^2$ ) of 0.9993 was obtained; a slope of 0.9973 and an ordinate to the origin near zero.

Table 6: Accuracy results for ketorolac in the degradation products.

Level	% Recovery	Average	SD	RSD%	Global average n=9	SD n=9	RSD% Global n=9
	101.0						
40%	99.5	100.4	0.8	0.8			
	100.7						
	98.5						
100%	100.8	99.1	1.5	1.5	99.8	1.1	1.1
	98.0						
	99.3						
400%	99.6	100.0	1.0	1.0			
	101.2						

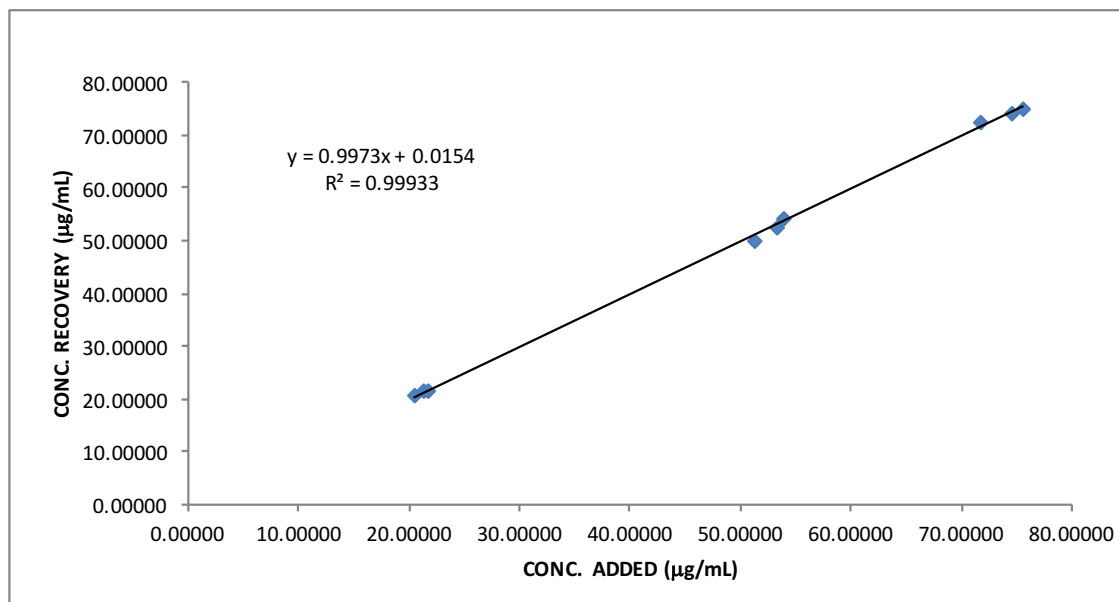


Figure 10: Accuracy for ketorolac in the degradation products.

The limit of detection and quantification for both methodologies was determined by analyzing a standard curve at low concentration levels.

For the quantification of ketorolac in residual water the limit of detection and quantification were 0.00934  $\mu\text{g/mL}$  and 0.02832  $\mu\text{g/mL}$  respectively, and an  $r^2$  of 0.998. The calibration curve obtained during the determination is shown in Figure 11.

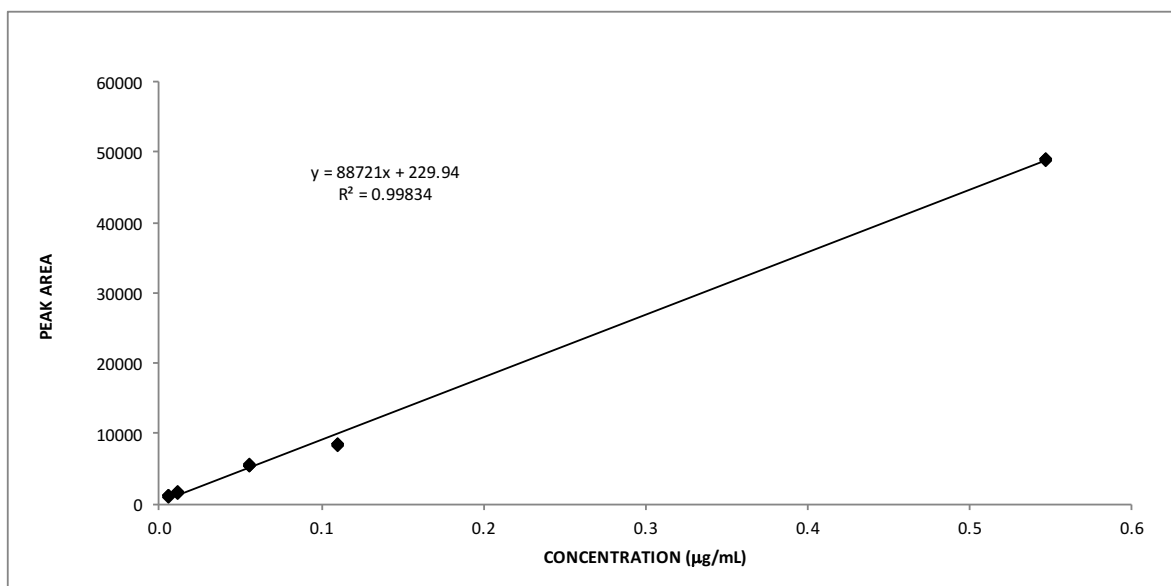


Figure 11: LOD and LOQ for ketorolac in wastewater.

Figure 12 shows the curve obtained for the limit of detection and quantification in the methodology for the determination of ketorolac in the presence of its degradation products, which obtained a coefficient of determination of 0.99998. The calculated limit of detection was 0.00283  $\mu\text{g/mL}$ , while the quantification limit was 0.00859  $\mu\text{g/mL}$ .

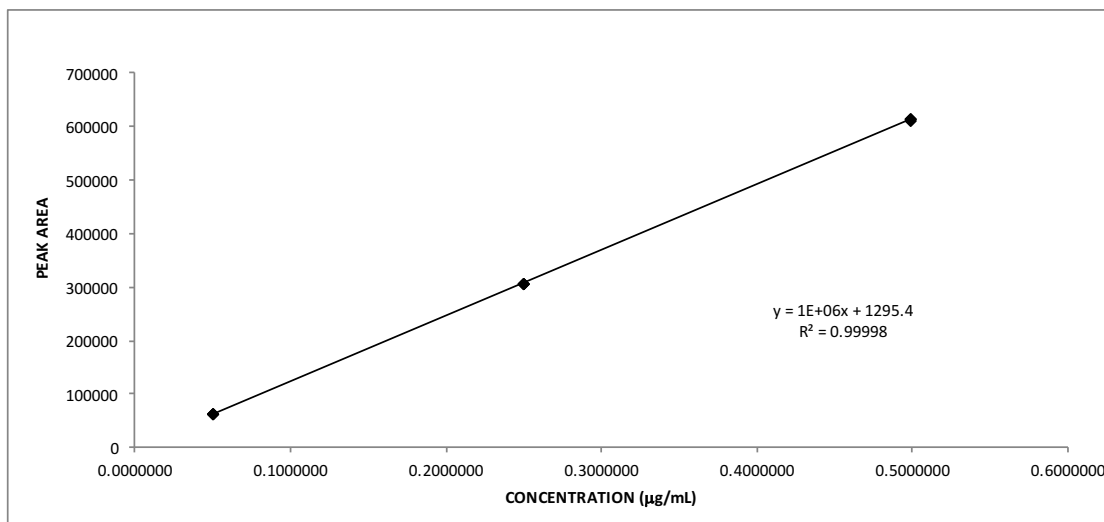


Figure 12: LOD and LOQ for ketorolac the degradation products.

### 3.2 Quantification of ketorolac in waste water from a hospital treatment plant

The results obtained by high-resolution liquid chromatography on samples obtained from the effluent from a hospital waste water treatment plant located in the city of Toluca, State of Mexico, Mexico, are shown in Table 7, each sample was analyzed by triplicate.

Table 7: Quantification results for ketorolac samples in wastewater.

SAMPLE	CONC. (µg/L)	AVERAGE	DS	RSD%	AVERAGE GLOBAL (n=9)	RSD global
M1_1	0.2109					
M1_2	0.2424	0.2258	0.016	7.0		
M1_3	0.2242					
M2_1	0.2590				0.2117	22.3
M2_2	0.2667	0.2559	0.013	5.0		
M2_3	0.2419					
M3_1	0.1658					
M3_2	0.1376	0.1534	0.014	9.4		

M3\_3 0.1568

### 3.3 Photolytic degradation kinetics

The results obtained by the high-resolution liquid chromatography analysis on the samples generated in photolytic degradation with UV radiation are shown in Table 8.

Table 8: Degradation results for ketorolac with ultraviolet radiation.

TIME (h)	SAMPLE 1	SAMPLE 2	SAMPLE 3
	KETOROLAC	KETOROLAC	KETOROLAC
	mol/L	mol/L	mol/L
0	0.0001997875	0.0001997875	0.0001932206
0.5	0.0002023158	0.0002009421	0.0001949987
1	0.0002029341	0.0002005465	0.0001943721
3	0.0002083404	0.0001981625	0.0001913357
4	0.0002037832	0.0001924920	0.0001882330
5	0.0002009338	0.0001825738	0.0001775599
6	0.0002066012	0.0001646013	0.0001573098
7	0.0001835656	0.0001230821	0.0001170299
8	0.0001611106	0.0001001495	0.0000955237
9	0.0001383091	0.0000897662	0.0000864861
22	0.0000135506	0.0000051354	0.0000045894
25	0.0000097583	0.0000024875	0.0000023666
47	0.0000007281	0.0000004353	0.0000004399

These results concentration (mol/L) with respect to time (h) can be observed in Figure 13.

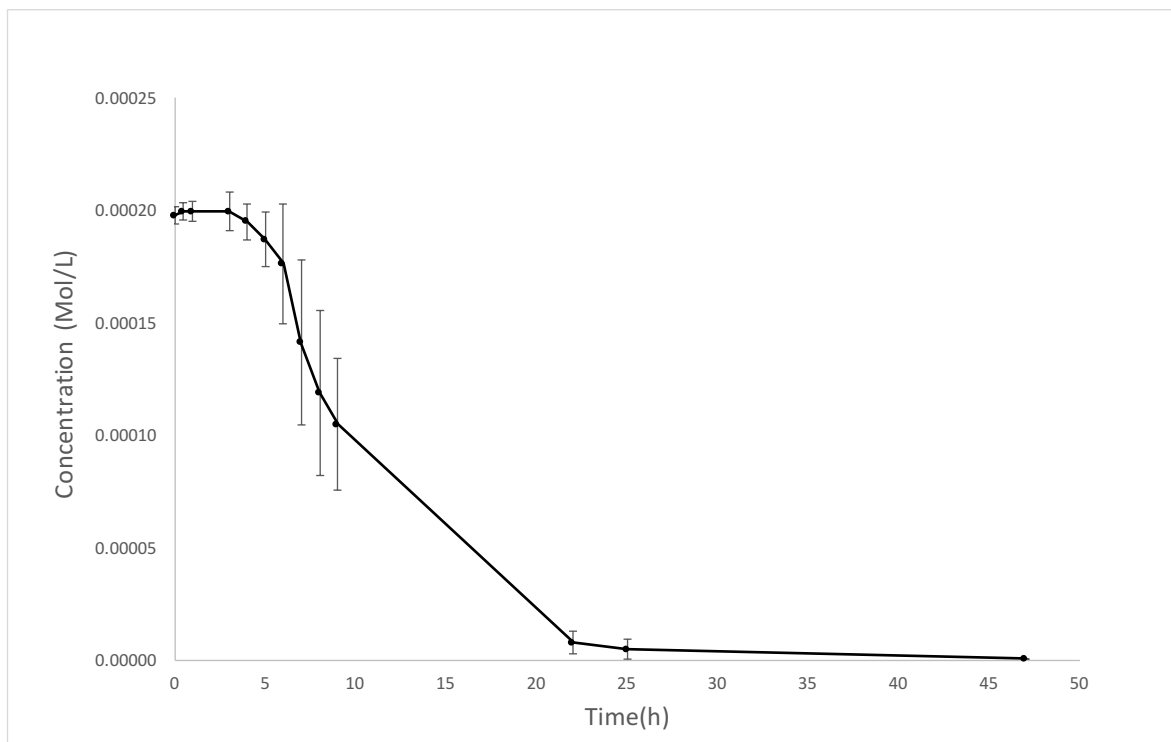


Figure 13: Kinetics degradation of ketorolac with ultra-violet radiation.

With the data obtained in Table 8, calculations were made for the determination of the order of reaction according to the equations indicated by Fogler. Each of the reaction orders was determined slope, ordered to the origin and coefficient of determination ( $r^2$ ). The results are shown in Table 9.

Table 9: Determination of the degradation reaction order of ketorolac with ultraviolet radiation.

	Order zero	First Order	Second Order	Third Order
$r^2$	0.79859	0.96387	0.79912	0.69190
<b>Slope</b>	-5.3194E-06	0.145164843	36424.29224	70745005450
<b>Origin</b>	0.00018896	-0.41326464	-191771.8568	-4.20727E+11



As can be seen in Table 9, the order of reaction 1 or first order has the highest determination coefficient with respect to the others, doing a study of residuals it is observed that there is no marked tendency.

Figure 14 shows the first order kinetics, as mentioned above, this is the model that best fits the data obtained by both coefficient of determination and study of residuals. The plot of residuals for the first-order kinetics for UV photolytic degradation of ketorolac is shown in Figure 15.

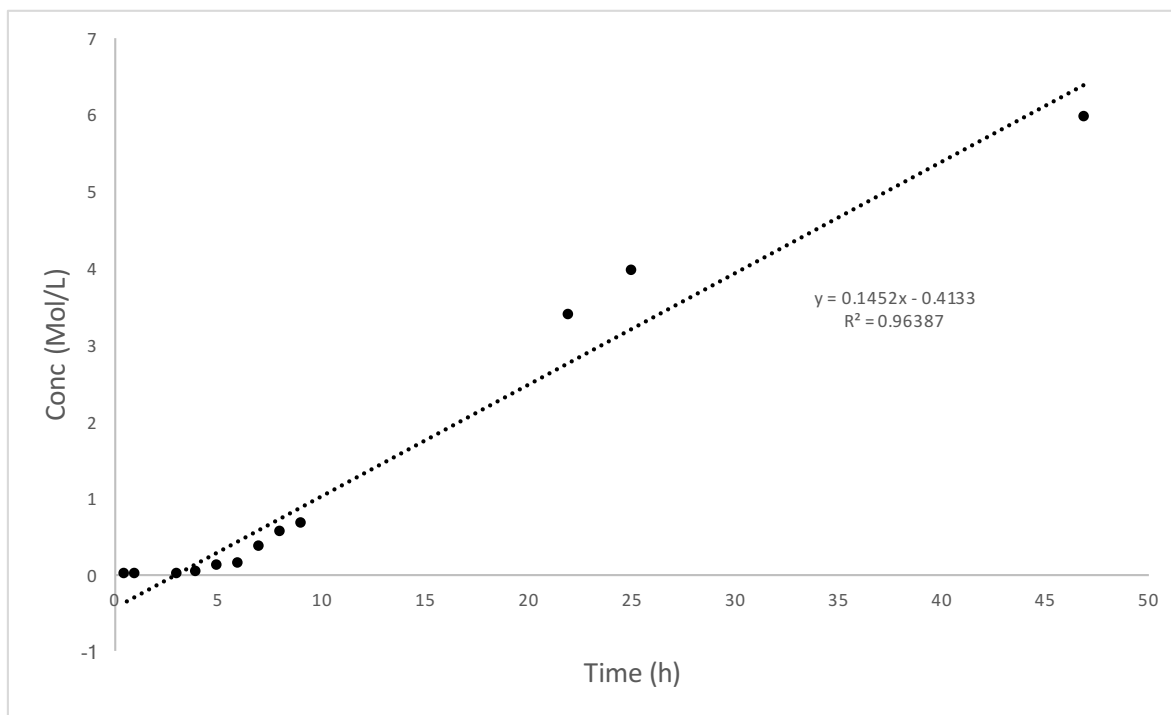


Figure 14: First order kinetic degradation of ketorolac using UV radiation.

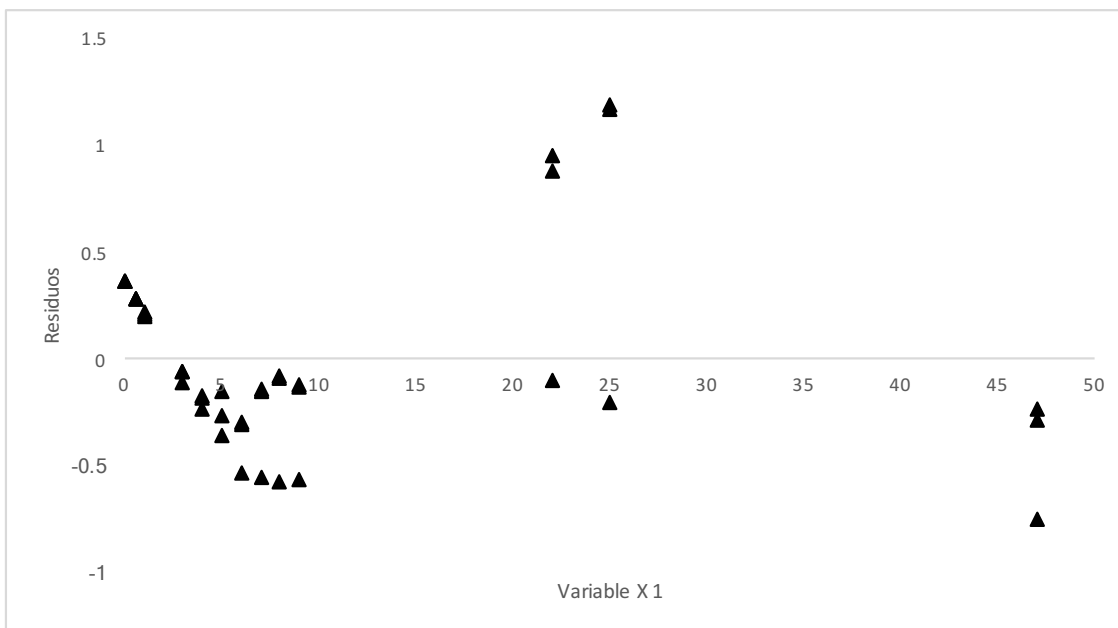


Figure 15: First order residuals analysis.

The results obtained during the validation process show that there are two methodologies, one for the quantification of ketorolac in residual water and the second, for the quantification of ketorolac and the presence of its photolytic degradation products, which are accurate and precise, with a limit of detection and quantification low enough to be able to identify and quantify the samples from hospital wastewater that were analyzed.

As can be observed in the chromatograms obtained in the specificity tests, there is no interference by the matrix or degradation products in the quantification of ketorolac, this can be due to two causes, the first, that there is a good separation between the ketorolac peak and the other components of the sample due to a good selection of the chromatographic conditions and the second, is the working wavelength in the detector, since while most organic compounds have their maximum absorption in the region of the spectrum of 200 nm to about 260 nm, the ketorolac under these working conditions had its maximum at 323 nm and 318 nm respectively.

The quantification of samples obtained from the effluent from the waste water treatment plant from a hospital, after being treated by SPE, obtained an average

concentration of 0.2117  $\mu\text{g/L}$ , with a CV of 22.3%, which can be considered high, May be due to the type of point sampling and the treatment that was performed, which causes a wide variation.

The results of quantification of ketorolac in waste water shows that it can be used for this purpose, it is true that liquid chromatography coupled to mass spectrometry detectors systems are the most used for this type of application because of their greater sensitivity and more specialized handling, nevertheless it represents higher costs. That is why, the methodology proposed in this research uses a spectrophotometry detector which is cheaper and widely used; with the results obtained the samples can be considered as an option in the quantification of traces of ketorolac in residual water.

When the data obtained during photolytic degradation with UV radiation was determined, it was determined that this kinetics is of the first order, so that the data conform to Equation 1 [9], since a correlation coefficient greater than 0.98 and in addition to the fact that the study of residuals does not indicate that there is a trend in error:

$$\ln \frac{C_0}{C_A} = k t \quad \text{Equation 1}$$

By deducing from the above equation we can obtain the average life time for UV radiation which is 4.8 hours

$$t_{1/2} = \frac{\ln \frac{C_0}{C_{1/2}}}{k} \quad \text{Equation 2}$$

## Conclusions

Two analytical methodologies were obtained for the quantification of ketorolac, the first for its quantification in residual water and the second for the determination of its photolytic degradation products, in both cases it is guaranteed that the results obtained by these methodologies are reliable because they comply completely with the validation parameters studied.

The quantification of ketorolac in residual water of a wastewater treatment plant of a hospital located in the city of Toluca, Mexico, was carried out, resulting in an average concentration of 0.2117  $\mu\text{g/L}$ .

Photolytic degradation kinetics studies for ketorolac show that it is first order with a half-life of 4.8 hours for degradation with UV radiation.

## Acknowledgments

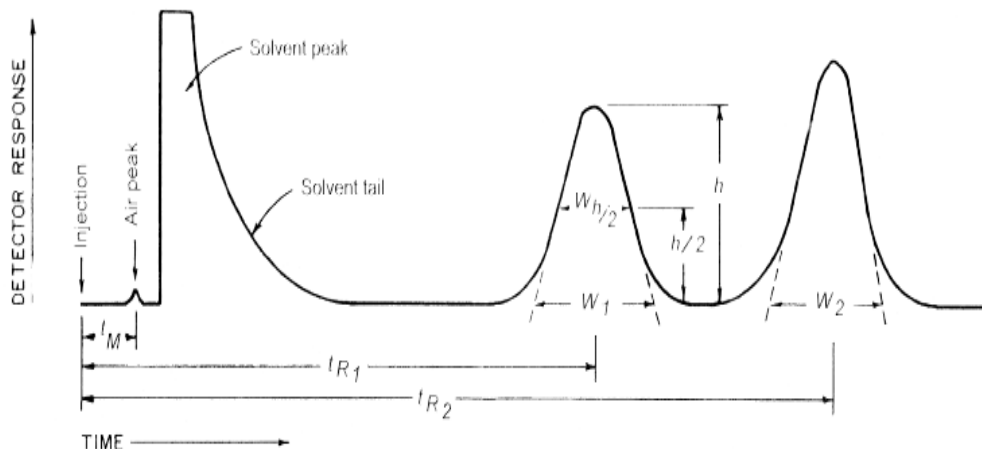
To the National Council of Science and Technology (CONACyT) for financing through "SCIENTIFIC DEVELOPMENT PROJECTS TO SOLVE NATIONAL PROBLEMS" with key 215997.

To CONACyT for the scholarship 501830.

## References

- [1] A. L. Olives, V. González-Ruiz y M. A. Martín, "Insolation and quantitative methods for analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs", *Anti-inflammatory & antu-allergy. Agents in medicinal chemistry*, vol. 11, no. 1, pp. 65-95, 2012.
- [2] U.S. Food and Drug Administration, "U.S. Food And Drug Administration", 27 jul 2015. [Online]. Available: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2010/022382Orig1s000Approv.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2010/022382Orig1s000Approv.pdf). [last access: 24 Jul 2015].
- [3] M. Galar-Martínez, S. García-Medina, L. M. Gómez-Oliván, I. Pérez-Coyotl, J. Mendoza-Monrroy y E. Arrazola-Morgain, "Oxidative stress and genotoxicity induced by ketorolac on the common carp *Cyprinus carpio*", *Environ. Toxicol.*, 2015.
- [4] R. Amdany, L. Chimuka y E. Cukrowska, "Determination of naproxen, ibuprofen and triclosan in wastewater using the polar organic chemical integrative sampler (POCIS): A laboratory calibration and field application" *Water SA*, vol. 40, no. 3, pp. 407-414, 2014.
- [5] M. J. Martinez Bueno, S. Herrera, D. Munaron, C. Boillot, H. Fenet, S. Chiron y E. Gomez, "2POCIS passive samplers as a monitoring tool for pharmaceutical residues and their transformation products in marine environment", *Environ Sci Pollut Res*, vol. 23, p. 5019–5029, 2016.
- [6] T. S. Oliveira, M. Murphy, N. Mendola, V. Wong, D. Carlson y L. Waring, "Characterization of pharmaceuticals and personal care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS", *Science of the total environment*, Vols. 518-519, pp. 459-479, 2015.
- [7] M. J. Gómez, M. Petrovic, A. R. Fernández-Alba y D. Barceló, "Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters", *J. Chromatogr A*, vol. 1114, pp. 224-233, 2006.
- [8] International Conference on Harmonisation, "ICH Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)", 2005.
- [9] S. Fogler, "Elements of chemical reaction engineering", 3th ed., New Delhi: Prentice-Hall of India Private Limited, 2004.

## ANEXO B. Fórmulas para la determinación de parámetros cromatográficos.



Tiempo de Retención ( $t_R$ ): es el lapso de tiempo entre la inyección de la muestra y la máxima respuesta del pico eluido. (The United States Pharmacopeial Convention, 2014)

Tiempo Muerto ( $t_M$ ): es el tiempo requerido para la elución de los compuestos no retenidos.

Volumen Muerto ( $V_M$ ): es el volumen de fase móvil requerida para la elución de los compuestos no retenidos y se calcula a partir del tiempo muerto ( $t_m$ ) y de la velocidad de flujo (F):

$$V_m = t_m \times F$$

Número de Platos Teóricos (N): es la medida de la eficiencia de la columna.

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

Retención Relativa (r): es la proporción del tiempo de retención ajustado de un compuesto respecto a otro usado como referencia obtenidos bajo las mismas condiciones:

$$r = \frac{t_{R2} - t_m}{t_{R1} - t_m}$$

Retención Relativa (TRR): es la proporción del tiempo de retención sin ser ajustado de un compuesto respecto a otro usado como referencia obtenidos bajo las mismas condiciones:

$$TRR = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

Factor de Capacidad ( $K'$ ): También se conoce como factor de retención y se define como la cantidad de sustancia que se encuentra en la fase estacionaria entre la cantidad de sustancia que se encuentra en la fase móvil, y se calcula como:

$$K' = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$

Resolución ( $R_s$ ): es la separación que hay entre dos componentes en una mezcla.

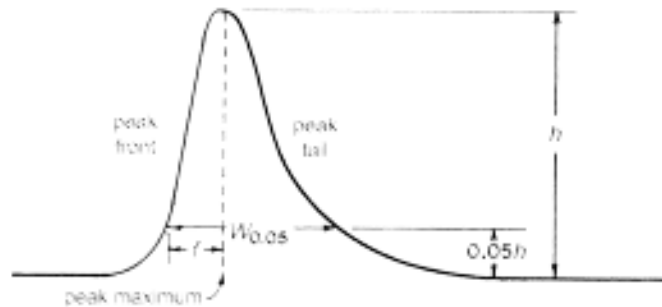
$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

Selectividad ( $\alpha$ ): o factor de separación es la retención relativa entre dos picos adyacentes.

$$\alpha = \frac{K'_2}{K'_1}$$

Factor de Coleo ( $A_s$ ): o también conocido como factor de asimetría o coleo de pico se calcula mediante la siguiente formula:

$$A_s = \frac{W_{0.05}}{2f}$$



**ANEXO C. Fórmulas utilizadas para la determinación de parámetros estadísticos .**

Media Aritmética:

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

Desviación Estándar

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

Coefficiente de Variación

$$CV = \frac{s}{\hat{y}} 100$$

Intervalo de Confianza para la Media Poblacional

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

Pendiente

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



Ordenada al Origen

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

Coefficiente de Determinación

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

Intervalo de Confianza para la Pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

Intervalo de Confianza para la Ordenada al Origen

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b0}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

Coefficiente de Variación de la Regresión

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} 100$$

## 10 REFERENCIAS

1. Al-Tarawneh, I.; El-Dosoky, M. y Bahadir, M., (2014). “Studies on human pharmaceuticals in Jordanian wastewater samples”. *Clean-Soil Air Water*, 42, pp. 1-8.
2. Alvarez, D.; Stacelberg, P.; Petty, J., Huckins, J.; Furlong, E., Zaugg, S. y Meyer, M., (2005). “Comparison of a novel passive sampler to standar water-column sampling of organic contaminants associated with wastewater effluents entering a New Jersey stream”. *Chemosphere*, 61, pp. 610-622.
3. Aguilar, R., (2010). “Desarrollo del muestreador pasivo chemcatcher para la monitorización y cuantificación mediante GC-IPC-MS de mercurio y compuestos organoestánicos en medios acuáticos”. *Universidad Complutense de Madrid*. Madrid España.
4. Amdany, R.; Chimuka, L. y Cukrowska, E., (2014). Determination of naproxen, ibuprofen and triclosan in wastewater using the polar organic chemical integrative sampler (POCIS): A laboratory calibration and field application”. *Water SA*, 40 (3), pp. 407-414.
5. Bailly, E.; Levi, Y. y Karolak, S., (2013). “Calibration and field evaluation of polar organic chemical integrative sampler (POCIS) for monitoring pharmaceuticals in hospital wastewater”. *Environmental Pollution*, 174, pp. 100-105.
6. Bartoskova, M.; Dobsikova, R.; Stancova, V.; Zivna, D.; Blahova, J.; Marsalek, P. y Faggio, C., (2013). “Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress”. *Neuroendocrinology Letters*, 34, pp. 102-108.
7. Bell, K. Y.; Wells, M. J.; Traexler, K. A.; Pellegrin, M.-L.; Morse, A. y Brandy, J., (2011). “Emerging pollutants”. *Water Environment Research*, 83 (10), pp. 1906-1984.
8. Boyka, G. T.; Ivanka, P. P. y Plamen, T. P., (2012). “HPLC determination of Ketorolac Tromethamine in tablet dosage forms”. *Der Pharmacia Sinica*, 3 (4), pp. 400-403.
9. Braithwaite, A. y Smith, F. J., (1999). *Chromatographic methods 5th*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
10. Bu, Q.; Wang, D.; Liu, X. y Wang, Z., (2014). “A high throughout semi-quantification method for screening organic contaminants in river sediments”. *J. Environ. Manage.*, 143, pp. 135-139.
11. Chen, Y. S.; Yu, S.; Hong, Y. W.; Lin, Q. Y. y Li, H. B., (2013). “Pharmaceutical residues in tidal surface sediments of three rivers in southeastern China at detectable and measurable levels”. *Environ Sci Pollut Res*, 20, pp. 8391-8403.

12. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos AC, (2002). *Guía de validación de métodos analíticos*. D.F., México.
13. Corcoll, N.; Acuña, V.; Barceló, D.; Casellas, M.; Guasch, H.; Huerta, B. y Sabater, S., (2014). "Pollution-induced community tolerance to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in fluvial biofilm communities affected by WWTP effluents". *Chemosphere*, 112, pp. 185-193.
14. Cruz-Estaban, S.; Cruz-López, L.; Malo, E. A.; Valle-Mora, J.; Infante-Matha, D. M.; Santiesteban-Hernandez, A. y Bello-Mendoza, R., (2014). "Presencia de anti-inflamatorios no esteroideos en cuerpos de agua superficial de Tapachula, Chiapas, México". *Revista AIDIS de ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica*, 7 (2), pp. 105-114.
15. Dai, G.; Wang, B.; Huang, J.; Dong, R.; Deng, S. y Yu, G., (2015). "Occurrence and source apportionment of pharmaceuticals and personal care products in Beiyun River of Beijing, China". *Chemosphere*, 119, pp. 1033-1039.
16. Deblonde, T.; Cossu-Leguille, C. y Hartemann, P., (2011). "Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature". *International journal of hygiene and environmental health*, 214, pp. 442-448.
17. DISEPROSA, (2015). "Plantas de Tratamiento de Aguas". *Interempresas.Net*. [En línea] Disponible en:  
  
[https://www.interempresas.net/FeriaVirtual/Catalogos\\_y\\_documentos/87264/Plantas\\_de\\_Tratamiento\\_de\\_Aguas.pdf](https://www.interempresas.net/FeriaVirtual/Catalogos_y_documentos/87264/Plantas_de_Tratamiento_de_Aguas.pdf) [Accesado el 07 de Junio de 2015].
18. Dubey, S. K.; Hemanth, J. y Venkatesh, C. K., (2012). "New chiral reverse phase HPLC method for enantioselective analysis of Ketorolac using chiral AGP column". *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2 (6), pp. 462-465.
19. Fatta, D.; Nikolaou, A.; Archilleos, A. y Meriç, S., (2007). "Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater". *Trends in Analytical Chemistry*, 26 (6), pp. 515-533.
20. Fogler, S., (2004). *Elements of chemical reaction engineering* (Third edition ed.). New Delhi: Prentice-Hall of India Private Limited.
21. Galar-Martínez, M.; García-Medina, S.; Gómez-Oliván, L. M.; Pérez-Coyotl, I.; Mendoza-Monrroy, J. y Arrazola-Morgain, E., (2015). "Oxidative stress and genotoxicity induced by ketorolac on the common carp *Cyprinus carpio*". *Environ. Toxicol.*

22. Gan, J.; Papierni, S.; Koskinen, W. y Yates, S., (1999). "Evaluation of accelerated solvent extraction (ASE) for analysis of pesticide residues in soil". *Environ. Sci. Technol.*, 33, pp. 3249-3253.
23. Gavrilescu, M.; Demnerova, K.; Aamand, J., Agathos, S. y Fava, F., (2015). "Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation". *New Biotechnology*, 32 (1), pp. 147-156.
24. Greenwood, R.; Mills, G. A. y Vrrara, B., (2009). "Potential applications of passive sampling for monitoring non-polar industrial pollutants in the aqueous environment in support of REACH". *J. Chromatogr. A*, 1216, pp. 631-639.
25. Gómez, M. J.; Gómez-Ramos, M.; Malato, O. y Fernández-Alba, A., (2010). "Rapid automated screening, identification and quantification of organic micro-contaminants and their main transformation products in wastewater and river waters using liquid chromatography–quadrupole-time-of-flight mass spectrometry with an accurate-mass database". *Journal of Chromatography A*, 1217, pp. 7038-7054.
26. Gómez, M. J.; Malato, O.; Ferrer, I.; Agüera, A. y Fernandez, A. F., (2007). "Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-time-of flight-mass spectrometry to evaluate pharmaceuticals in effluents. Apilot monitoring study". *Journal Environment Monit.*, 9, pp. 718-729.
27. Gómez, M. J.; Petrovic, M.; Fernández-Alba, A. R. y Barceló, D., (2006). "Determination of pharmaceuticals of varius therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters". *J. Chromatogr A*, 1114, pp. 224-233.
28. Instituto de Salud del Estado de México, (2016). "Centro Médico Lic. Adolfo López Mateos". [En línea] Disponible en:  
<http://salud.edomex.gob.mx/cmalmateos/antecedentes.html> [Accesado el 18 de Mayo de 2017]
29. International Conference on Harmonisation, (2005). *ICH Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*.
30. International Union of Pure and Applied Chemistry, (2012). *Compendium of Chemical Terminology (2.3.2 ed.)*.
31. Islas-Flores, H.; Gómez-Oliván, L. M.; Galar-Martínez, M.; García-Medina, S.; Neri-Cruz, N. y Dublán-García, O., (2014). "Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative|stress biomarkers". *Environ. Sci. Pollut. Res.*

32. Kalariya, P. D., (2014). "Characterization of forced degradation products of ketorolac tromethamine using LC/ESI/Q/TOF/MS/MS and silico toxicity prediction". *Journal of mass spectrometry*, 49, pp. 380-391.
33. Kostopoulou, M. y Nikolaou, A., (2008). "Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices". *Trends in Analytical Chemistry*, 27 (11), pp. 1023-1035.
34. Kulo, A.; Mulabegovic, N.; Loga-Zec, S.; Allegaert, K.; de Hoon, J. y Verbesselt, R., (2014). "Determination of Racemic Ketorolac, Ketorolac Enantiomers and Their Metabolites in Human Plasma and Urine by LC-UV, Applied in Clinical Study During and After Pregnancy". *Chromatographia*, 77, pp. 803-812.
35. Larsson, E.; Rabayah, A. y Jönsson, J. Å., (2013). "Sludge removal of nonsteroidal anti-inflammatory drugs during wastewater treatment studied by direct hollow fiber liquid phase microextraction". *Journal of Environmental Protection*, 4, pp. 946-955.
36. Liscio, C.; Magi, E.; Di Carro, M.; Suter, M. J. F. y Vermeirssen, E., (2009). "Combining passive samplers and biomonitors to evaluate endocrine disrupting compounds in a wastewater treatment plant by LC/MS/MS and bioassay analyses". *Environmental Pollution*, 157, pp. 2716-2721.
37. Lv, M.; Sun, Q.; Hu, L.; Li, J.; Cai, X. y Yu, C. P., (2014). "Pharmaceuticals and personal care products in mesoscale subtropical watershed and their application as sewage markers". *Journal of Hazard Materials*, 280, pp. 696-705.
38. Martínez-Bueno, M. J.; Agüera, A.; Gomez, M.; Hernando, M. D.; Garcia Reyes, J. F. y Fernandez-Alba, A. R., (2007). "Application of Liquid Chromatography/ Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry to the Determination of Pharmaceuticals and Related Contaminants in Wastewater". *Anal. Chem*, 79, pp. 9372-9384.
39. Martinez-Bueno, M. J.; Herrera, S.; Munaron, D.; Boillot, C.; Fenet, H.; Chiron, S. y Gomez, E., (2016). "POCIS passive samplers as a monitoring tool for pharmaceutical residues and their transformation products in marine environment". *Environ Sci Pollut Res*, 23, pp. 5019-5029.
40. Martínez-Bueno, M. J.; Ulaszewska, M. M.; Gomez, M. J.; Hernando, M. y Fernández-Alba, A., (2012). "Simultaneous measurement in mass and mass/mass mode for accurate qualitative and quantitative screening analysis of pharmaceuticals in river water". *J. Chromatogr. A*, 1256, pp. 80-88.
41. Merck & Co. Inc., (2006). *The Merck Index* (14th ed.). (M. O'Neil, Ed.) New Jersey, USA, USA: Chapman Hall.

42. Miranda-García, N.; Suárez, S.; Sánchez, B.; Coronado, J.; Malato, S. y Maldonado, M. I., (2011). "Photocatalytic degradation of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plant effluents using immobilized TiO<sub>2</sub> in a solar pilot plant". *Appl. Catal. B- Environ.*, 103, pp. 294-301.
43. Modi, P. B.; Vairale, A. S. y Sivaswaroop, P., (2013). "Development and Validation of HPLC method for determination of Ketorolac Tromethamine residues on the surface of manufacturing equipment". *Asian Journal of Research in Chemistry*, 5 (2), pp. 259-264.
44. Morais, S. A.; Delerue-Matos, C. y Gabarrell, X., (2014). "An uncertainty and sensitivity analysis applied to the prioritisation of pharmaceuticals as surface water contaminants from wastewater treatment plant direct emissions". *Sci. Total Environ.*, 490, pp. 342-350.
45. Moreno Vergara, E. L.; Leal Ascencio, M. T.; Castillo González, E. y Galicia Sánchez, M. Á., (2012). "Características de las aguas residuales de un hospital en la ciudad de Xalapa Veracruz". *XXII CONGRESO NACIONAL DE HIDRÁULICA*. Acapulco, Guerrero.
46. Morin, N.; Miege, C.; Randon, J. y Coquery, M., (2012). "Chemical calibration, performance, validation and applications of the polar organic chemical integrative sampler (POCIS) in aquatic environments". *Trends in Analytical Chemistry*, 36, pp. 144 - 174.
47. Muchowsky, J. M. y Kluge, A. F., (1978). *United States of America Patente n° 4,089,969*.
48. Muñoz Ortiz, C. E. y Chaparro, T. R., (2014). "Combinacion de procesos de oxidación avanzada y procesos aerobios para el tratamiento de aguas residuales hospitalarias". *AFINIDAD*, LXXI (565), pp. 63-67.
49. Oliveira, T. S.; Murphy, M.; Mendola, N.; Wong, V.; Carlson, D. y Waring, L., (2015). "Characterization of pharmaceuticals and personal care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS". *Science of the total environment*, 518-519, pp. 459-479.
50. Olives, A. L.; González-Ruiz, V. y Martín, M. A., (2012). "Insolation and quantitative methods for analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Anti-inflammatory & antu-allergy*". *Agents in medicinal chemistry*, 11 (1), pp. 65-95.
51. O'Connor, N.; Geary, M.; Wharton, M. y Curtin, L., (2012). "Development and validation of a rapid chromatographic method for analysis of Ketorolac Tromethamine and its related production impurities". *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02 (05), pp. 15-21.
52. PLM. (2015). *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. [En línea] Disponible en : [http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/prods/PRODS/Ketorolaco.htm](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Ketorolaco.htm) [Accesado el 26 de Mayo de 2015]

53. Radjenovic, J.; Petrovic, M. y Barceló, D., (2007). "Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor". *Anal Bioanal Chem*, 387, pp. 1365-1377.
54. Ramírez, A. J.; Mottaleb, M. A.; Brooks, B. W. y Chambliss, K. C., (2007). "Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Anal Chem.*, 79 (8), pp. 3155-3163.
55. Ramos Alvariño, C., (2008). "Aguas residuales generadas en hospitales". *Ingeniería hidráulica y ambiental*, XXIX (2), pp. 56-60.
56. Ramos Alvariño, C., (2013). "Comportamiento de los indicadores sanitarios y ecotoxicológicos de las aguas residuales con trazas de medicamentos". *Revista Cubana de Química*, XXV (2), pp. 180-205.
57. Rao, B. K.; Golkonda, R.; Illuru, J. K. y Chintala, R., (2015). "A novel stability indicating RP-HPLC method for determination of Ketorolac Tromethamine in pharmaceutical formulations". *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8 (2), pp. 354-359.
58. Rosal, R.; Rodriguez, A.; Perdigón-Melón, J. A.; Petre, A.; García-Calvo, E.; Gómez, M. J. y Fernandez-Alba, A. R., (2010). "Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation". *Water Res.*, 44 (2), pp. 578-588.
59. Schmidt, W. y Redshaw, C., (2015). "Evaluation of biological endpoints in crop plants after exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Implications for phytotoxicological assessment of novel contaminants". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112, pp. 212-222.
60. Söderström, H.; Lindberg, R. H. y Fick, J., (2009). "Strategies for monitoring the emerging polar organic contaminants in water with emphasis on integrative passive sampling". *J. Chromatogr. A*, 1216, pp. 623-630.
61. Salaris, M., (2010). "Acid and base degraded products of ketorolac". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 52, pp. 320-322.
62. Sabyasachi, P.; Anil, K. P.; Sunil, S. I.; Arshad, H. K.; Tausif, M.; Sachin, R. y Rakesh, J. (2011). "A validated High-Performance Liquid Chromatography-Tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method for simultaneous determination of R(+)-Ketorolac and S(-)-Ketorolac in human plasma and its application to a bioequivalence study". *Chromatography Research International*, 2011, pp. 11.



63. SanJuan-Reyes, N.; Gómez-Oliván, L. M.; Galar-Matínez, M.; Vieyra-Reyes, P.; García-Medina, S.; Isalas-Flores, H. y Neri-Cruz, N., (2013). "Efluent from an NSAID-Manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus carpio*". *Water air soil pollut*, 224, pp. 1689.
64. Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. (1998). Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997. "Límites máximos permisible de contaminante para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público." *Diario Oficial de la Federación*.
65. Secretaria de Salud. (2013). Norma Ofical Mexicana NOM-059-SSA1-2013. "Buenas practicas de fabricación de Medicamentos". *Diario Oficial de la Federación*.
66. U.S. Environmental Protection Agency. (2013). "Exposure Assessment tool and models" *Environmental Protection Agency*. [En línea] Disponible en:  
<http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm> [Accesado el 25 de Julio de 2015].
67. U.S. Food and Drug Administration. (2014). "Guide to inspections of lyophilization of parenterals" *Lyophilization of parenteral (7/93)*. [En línea] Disponible en:  
<http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/ucm074909.htm> [Accesado el 03 de Agosto de 2015].
68. U.S. Food and Drug Administration. (2015). "CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH: APPLICATION NUMBER 22382Orig1s000" *U.S. Food And Drug Administration*. [En línea] Disponible en:  
[http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2010/022382Orig1s000Approv.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2010/022382Orig1s000Approv.pdf) [Accesado el 24 de Julio de 2015]
69. Zabiegala, B.; Kot-Wasik, A.; Urbanowicz, M. y Namiesnik, J., (2010). "Passive sampling as a tool for obtaining reliable analytical information in invironmental quality monitoring". *Anal Bioanal Chem*, 396, pp. 273-296.
70. Zenobio, J. E.; Sanchez, B. C.; Leet, J. K.; Archuleta, L. C. y Sepúlveda, M. S., (2015). "Presence and effects of pharmaceutical and personal care products on the Baca national wildlife refuge, Colorado". *Chemosphere*, 120, pp. 750-755.