

PERSISTENCIA Y DEGRADACIÓN DE MICROCONTAMINANTES EN AGUA SUPERFICIAL SEGÚN ENSAYOS DE LABORATORIO: CELECOXIB. DETECCIÓN DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN MEDIANTE UNA PREPARACIÓN DE MUESTRA SPE.

Juan José Jiménez^{1,2}, Beatriz Estibáliz Muñoz¹

¹Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Valladolid. 47011-Valladolid

²Instituto de Procesos Sostenibles. Universidad de Valladolid. 47011-Valladolid

Email: jjimenez@qa.uva.es

1. Introducción

Hoy en día existe cierta preocupación por la persistencia, movilidad y toxicidad de los contaminantes emergentes en los ecosistemas acuáticos ya que los tratamientos efectuados en las plantas de depuración de aguas residuales, principal ruta de introducción de estos microcontaminantes en el medioambiente, no eliminan completamente estos compuestos en los efluentes sometidos a depuración. En el caso de las drogas farmacéuticas existen datos en la bibliografía sobre la incidencia en agua superficial de muchas de ellas, especialmente de aquellas de mayor prescripción o consumo, pero la información sobre su persistencia y/o degradación en condiciones medioambientales es escasa; a este respecto la mayoría de datos disponibles se han obtenido principalmente en estudios destinados a conocer la estabilidad de medicamentos comerciales, y manteniendo las drogas bajo condiciones de stress. Del mismo modo, también existen trabajos que intentan predecir el comportamiento de las drogas en masas de agua superficial a partir de su comportamiento en condiciones forzadas durante cortos periodos de tiempo.

El celecoxib es un inhibidor selectivo de la enzima ciclooxigenasa empleado para el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas por su actividad antiinflamatoria pero también presenta cierta actividad antimicrobiana [1, 2] además de propiedades quimioterapéuticas contra ciertos cánceres [3]. Estas últimas características convierten al celecoxib en un microcontaminante potencialmente tóxico para los microorganismos presentes en un ecosistema acuático. Además, los influentes y efluentes de una depuradora de aguas residuales han sido muestreados durante varios meses concluyéndose que los tratamientos de depuración habituales eran ineficaces para la eliminación de celecoxib, e identificando un producto de degradación mediante la utilización de bases de datos [4]. Así pues, como consecuencia de los posibles efectos dañinos, resulta conveniente obtener información sobre el comportamiento del celecoxib en los ecosistemas acuáticos y, particularmente, en agua de río.

La persistencia y transformación de un microcontaminante orgánico se puede evaluar a escala de laboratorio mediante una sistemática predictiva que conlleva diferentes experimentos para discernir la importancia de los procesos químicos, fotoquímicos y biológicos en la degradación del microcontaminante [5-7]. Además de ensayos en condiciones forzadas se plantean también ensayos en condiciones no forzadas, y a largo plazo, para simular el comportamiento del microcontaminante en una masa de

agua. Las muestras acuosas en estudio se analizan mediante cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución con detección de espectrometría de masas empleando como analizador una combinación Q-TOF, e inyectándolas directamente o después de una extracción en fase sólida (SPE). Las estructuras de los productos de degradación detectados se pueden elucidar tentativamente a partir de las fórmulas moleculares de los iones y la fragmentación observada en espectros masas-masas de alta resolución. Por otra parte, la capacidad de los métodos de análisis multiresiduo basados en una preparación de muestra SPE para detectar esos productos de degradación puede ser evaluada, estableciéndose determinadas características analíticas básicas. En esta publicación se expone la metodología y resultados de estabilidad obtenidos para el celecoxib en agua de río.

2. Estudios de degradación

Los ensayos de degradación para evaluar la persistencia de un microcontaminante en agua de río (pH 7.8, DQO 4.7 mg/L) y detectar sus productos de degradación se resumen a continuación.

2.1 Degradación biológica

Se realizan ensayos de degradación biológica a temperatura ambiente en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas [8], y en ciertos casos en presencia de un medio de cultivo a 35°C para favorecer el crecimiento de microorganismos. Para ello se usa agua de río dopada a una concentración de 100 µg/L. Se preparan también blancos y disoluciones de control conteniendo azida sódica 0.020%, en paralelo a las muestras de estudio, y se muestrean las disoluciones semanalmente, durante 5 semanas.

En el estudio en condiciones aeróbicas se deposita 50 mL de agua de río en un Erlenmeyer cubierto con papel de aluminio para evitar su exposición a la luz solar, pero permitiendo el intercambio de aire con el exterior con la ayuda de un agitador oscilante. En los ensayos anaeróbicos se prepara un lote de viales de 15 mL, completamente llenos con agua de río para evitar la presencia de aire en el espacio en cabeza, cerrados, y protegidos también de la luz solar, consumiendo un vial por cada punto de muestreo. Para los ensayos en medio de cultivo se utiliza un cultivo de triptona y soja (TSB) preparando una mezcla agua/medio de cultivo 80/20 (v/v). Un volumen de 50 mL de mezcla era depositado en botellas de 250 mL, que eran cerradas y mantenidas en una estufa a 35 °C, en oscuridad.

2.2 Degradación en condiciones forzadas

Se evalúa la degradación química y fotoquímica (sin ninguna restricción a la radiación) del microcontaminante en agua de río dopada (100 µg/L). Los experimentos de degradación química se llevan a cabo en una estufa a temperatura de 70 °C, y en oscuridad, con la finalidad de evaluar la importancia de las reacciones químicas en disolución en el proceso de degradación. La cinética de las reacciones de hidrólisis y polimerización en condiciones ambientales suele ser relativamente lenta por lo que se recomienda un aumento de la temperatura para conocer su posible influencia. El muestreo se realiza semanalmente.

Para los experimentos de degradación fotoquímica forzada se introduce la muestra dopada en recipientes de cuarzo cerrados que se exponen directamente a la luz solar, durante uno o más días, situándolos en el exterior del laboratorio (en la repisa de una ventana por ejemplo), con orientación sur. Alternativamente, y sobre todo para compuestos de gran estabilidad como es el caso del celecoxib, las muestras dopadas se pueden exponer directamente a la radiación de una lámpara (8 W) cuya emisión está centrada en 254 nm. Se preparan también blancos y disoluciones de control protegidas con papel de aluminio. Alícuotas de estas disoluciones se recogen semanalmente también.

2.3 Degradación en condiciones no forzadas

Los procesos naturales que suceden en una masa de agua a lo largo del tiempo se pueden simular en el laboratorio para estimar la persistencia de un contaminante. Para ello se ha considerado una estrategia sencilla consistente en depositar un volumen de agua de río (2.5 L) dopado el microcontaminante en un contenedor de vidrio (4 L) transparente, con cierre hermético, el cual se abriría semanalmente para muestrear una alícuota de agua y renovar el aire en contacto con la superficie del agua; el recipiente se mantiene en condiciones ambientales dentro del laboratorio (18-21 °C) expuesto directamente a la radiación solar y al ciclo natural día-noche.

En las condiciones de experimentación la radiación solar debe pasar a través de la ventana de vidrio del laboratorio y a través del vidrio del recipiente, los cuales absorben principalmente radiación UV. De este modo, el comportamiento de los microcontaminantes en la disolución del recipiente simula su comportamiento en una masa de agua ya que en ésta la transmisión de la radiación solar, sobre todo la radiación UV, disminuye con la profundidad. La atenuación de la radiación a través del vidrio de la ventana y del recipiente se estima a partir de medidas de transmitancia del vidrio en un espectrofotómetro UV-visible. Así se verificó que la radiación transmitida hacia la masa de agua, en este trabajo, era un 40 % de la radiación incidente a una longitud de onda de 350 nm, un 1.3 % a 320 nm, un 0.02 % a 310 nm, un 8×10^{-4} % a 305 nm y 8×10^{-5} % a 290 nm. La experimentación se mantiene durante varios meses muestreando semanalmente 25 mL de agua si se pretende hacer una SPE.

3. Análisis de las muestras

3.1 Preparación de muestra para el análisis cromatográfico

Las alícuotas muestreadas en los ensayos de laboratorio (habitualmente volúmenes de 2-25 mL) se pueden inyectar directamente en el sistema cromatográfico previa filtración a través de filtros de 0.20 µm, si bien es recomendable realizar una SPE y una redisolución posterior de los extractos, para concentrar los analitos, en particular aquellos productos de degradación generados en muy pequeña cantidad cuya detección e identificación se favorece cuando están presentes en mayor concentración.

En este trabajo se ha realizado una SPE sobre cartuchos EBH (Scharlab) de 60 mg de fase estacionaria. Los cartuchos de extracción eran primeramente activados mediante la elución sucesiva de 6 mL de metanol y 6 mL de agua por gravedad. A continuación se llevaba a cabo la elución del volumen de muestra de agua y la fase estacionaria se lavaba con 3 mL de una mezcla agua-metanol 80:20 (v/v). Posteriormente el cartucho se secaba mediante la circulación forzada de aire durante 3 minutos y finalmente se eluía por gravedad, utilizando para ello 4 mL de metanol. El extracto en metanol, recogido en viales, era llevado a sequedad en un sistema de evaporación centrífuga, calentando a 40 °C durante 30 minutos. Dicho extracto se redisolvió en 0.5 mL de metanol, se filtraba sobre un filtro de PTFE de 0.20 µm de tamaño de poro y se emplazaba en viales de inyección para el correspondiente análisis cromatográfico.

3.2 Determinación mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas

Las muestras eran inyectadas en un cromatógrafo de líquidos de ultra-alta presión (UPLC, Acquity, Waters) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución equipado con analizadores cuadrupolo y tiempo de vuelo en serie (QTOF, Maxis Impact, Bruker). La separación cromatográfica, en fase inversa, se realizó en una columna BEH C18 (Waters), de 5 cm de longitud, 2.1 mm de diámetro interno y un tamaño de partículas de 1.7 µm, empleando un gradiente de fase móvil agua/acetonitrilo, conteniendo ambos un 0.1 % (v/v) de ácido fórmico. El porcentaje de acetonitrilo aumentaba de un 25 % inicial hasta el 80 % en 4.5 minutos, volviendo al 25 % en 1 minuto para reequilibrar la columna, a un flujo de 0.5 mL/min. La columna se mantenía a temperatura ambiente. Se inyectó un volumen de 7 µL.

Los parámetros de operación de la fuente de ionización electrospray, en modo negativo, optimizados para el celecoxib eran: presión de nebulización 2 bar; voltaje de fragmentación, 1000 V; voltaje del capilar, 4000 V, temperatura del gas de secado (N₂), 200 °C; flujo de gas, 6 L/min. Los ajustes de calibración del eje de masas se hicieron con

formiato sódico 10 mM disuelto en 2-propanol/agua y los experimentos MS/MS basados en la disociación inducida por colisión (CID) se realizaron con N₂ como gas de colisión. La cuantificación del celecoxib se hizo en modo MS, mediante calibración lineal a partir de las áreas de pico integradas en los cromatogramas extraídos para el ión [M-H]⁻, con un rango de masa ±0.01 Da. De modo similar, las áreas de pico de los productos de degradación fueron integradas en los cromatogramas extraídos para sus correspondientes iones [M-H]⁻. Los productos de degradación detectados en los ensayos han sido identificados, tentativamente, a partir de la medida de la masa exacta del pseudoión molecular, que proporciona una fórmula molecular, y de la información estructural obtenida en los espectros masas-masas (MS/MS) de alta resolución.

4. Resultados

4.1 Degradación del celecoxib

La droga celecoxib es resistente a la degradación biológica en agua de río, incluso en presencia de un medio de cultivo para favorecer el crecimiento de microorganismos. Al determinar la concentración inicial de celecoxib y la concentración al cabo de 5 semanas en los ensayos de degradación biológica por quintuplicado se comprobó que no existía diferencia significativa en los valores medios (p<0.05). En cuanto a las posibles reacciones químicas en medio acuoso el celecoxib es muy poco susceptible de ser degradado, la concentración inicial disminuía sólo un 1.3% después de mantener la muestra acuosa a 70 °C durante 8 semanas (Tabla 1).

Tabla 1: Concentración inicial y final de celecoxib (n=5).

Degradación	Ensayo	Concent. inicial (µg/L)	Concent. final (µg/L)	Tiempo transcurrido (semanas)
Aeróbica	1	101.4	100.2	5
	2	99.2	99.2	5
Anaeróbica	1	100.8	100.0	5
	2	99.4	99.2	5
Medio de cultivo	1	100.8	100.0	5
	2	100.4	99.8	5
Fotoquímica, luz solar	1	101.4	97.8**	8
	2	100.0	96.4**	8
Térmica	1	100.6	99.2	8
	2	100.0	98.8	8
No forzada	1	100.8	97.6**	36
	2	100.2	97.0**	36

**Diferencia significativa (p<0.05)

La concentración de celecoxib en las disoluciones expuestas directamente a la radiación solar disminuía un 3.4% después de la exposición durante 8 semanas mientras que en su exposición a la radiación de una lámpara UV la degradación era relativamente rápida. En este último caso sólo se detectó durante 5 días y la disminución de la concentración seguía una cinética de primer orden, con una vida media de 2.75 días. Estos resultados sugieren que el celecoxib es un compuesto básicamente estable en agua superficial, susceptible de ser degradado fotoquímicamente

pero muy lentamente. La escasa degradación de celecoxib en los ensayos no forzados es coherente con los datos obtenidos en condiciones no forzadas. Después de 32 semanas, la concentración disminuía sólo un 3.1%.

4.2 Detección e identificación de productos de degradación

La presencia de productos de degradación fue establecida mediante la observación de nuevos picos cromatográficos en los cromatogramas MS que no estaban presentes en los blancos. El ión [M-H]⁻ de cada producto de degradación se fragmentó mediante CID a determinadas energías de colisión para obtener información estructural (Figura 1). La Tabla 2 muestra los principales productos de degradación.

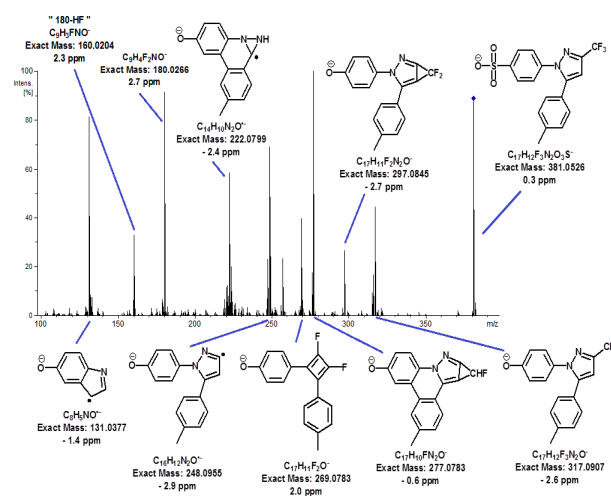


Figura 1: Espectro MS/MS del compuesto DP381. Energía de colisión: 48 eV. Masa exacta y error experimental en su medida.

Algunos productos de degradación se originan mediante procesos de oxidación como es el caso de DP394, (oxidación de un metilo terminal a aldehído), DP410 (oxidación de un metilo terminal a ácido carboxílico) y DP396 (un derivado hidroxilado en el que la posición del grupo OH no puede ser establecida mediante los patrones de fragmentación). DP381 sería el correspondiente ácido sulfónico del celecoxib (sustitución de NH₂ por OH). Varias fenantridinas fueron observadas después de exponer el celecoxib a la radiación. En ellas dos átomos de hidrógeno próximos entre sí son eliminados formándose un nuevo ciclo de 6 miembros. Así, DP378 procede directamente del celecoxib y DP408 es la fenantridina formada a partir de DP410.

Solamente DP381 y DP410 habían sido descritos previamente en la bibliografía ya que son productos de degradación observados en procesos metabólicos de los seres vivos [9-11]. DP410 ha sido detectado en aguas superficiales [4].

Tabla 2: Tiempo de retención (TR) y fórmula molecular de las estructuras de los productos de degradación.

TR (min)	Fórmula molecular	Compuesto
1.72	C ₁₇ H ₁₃ F ₃ N ₃ O ₃ S	Celecoxib hidroxilado (DP396)
1.86	C ₁₇ H ₁₁ F ₃ N ₃ O ₄ S	Ácido 4-[1-(4-sulfoaminofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il]benzoico (DP410)
1.96	C ₁₇ H ₁₂ F ₃ N ₂ O ₃ S	Ácido 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]bencenosulfónico (DP381)
2.15	C ₁₇ H ₉ F ₃ N ₃ O ₄ S	Ácido 2-trifluorometil-9-sulfonamina-H-pirazol[1,5-f]fenantridina-6-carboxílico (DP408)
2.20	C ₁₇ H ₁₁ F ₃ N ₃ O ₃ S	4-[5-(4-formilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]bencenosulfonamida (DP394)
2.72	C ₁₇ H ₁₃ F ₃ N ₃ O ₂ S	4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]bencenosulfonamida (Celecoxib)
2.88	C ₁₇ H ₁₁ F ₃ N ₃ O ₂ S	2-trifluorometil-6-metil-H-pirazol[1,5-f]fenantridina-9-sulfonamida (DP378)

4.3 Incidencia de los productos de degradación. Ruta de degradación

La incidencia de los productos de degradación aumenta con el tiempo (Tabla 3). DP396, DP410 y DP381 resultaron ser los compuestos mayoritarios y es presumible que éstos puedan ser detectados en el análisis de muestras reales aunque sus cantidades relativas al compuesto original sean mínimas. DP408, DP394 y DP378 fueron detectados en cantidades mucho menores.

Tabla 3: Áreas de pico de los productos de degradación (referidas al área de pico inicial de celecoxib, al que se asigna un valor de 100) en los ensayos no forzados.

	Ensayo 1	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 2
Semanas:	24	36	24	36
DP396	0.21	0.39	0.23	0.43
DP410	0.39	0.66	0.38	0.67
DP381	0.42	0.79	0.39	0.75
DP408	--	0.05	--	0.04
DP394	0.01	0.05	0.01	0.05
DP378	--	0.01	--	0.01

-- : no detectado.

En cuanto al origen de estos productos de degradación en los ensayos no forzados, y presumiblemente en una masa de agua natural, se deduce que DP396 se forma a partir de las reacciones químicas en disolución de acuerdo con los ensayos forzados en los que se observó también. DP381 se formaría principalmente mediante reacciones fotoquímicas

y DP410 exclusivamente mediante reacciones fotoquímicas. Los otros 3 compuestos, minoritarios, se formarían también mediante reacciones fotoquímicas aunque la contribución de las reacciones químicas en la formación de DP394 parece notable también. Una ruta de degradación de celecoxib en agua de río es esquematizada en la Figura 2.

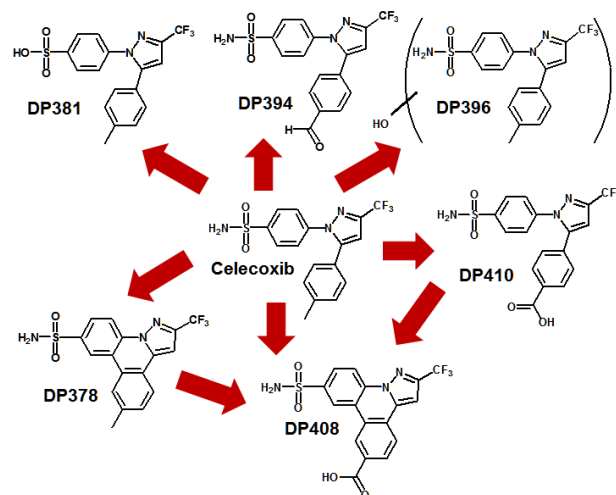


Figura 2: Ruta de degradación del celecoxib.

La toxicidad de los productos de degradación con una estructura bien definida puede ser predicha para ciertos biomarcadores ambientales mediante el software TEST de la US Environmental Protection Agency que aplica relaciones Q-SARs ([toxicity-estimation-software-tool-test](#)). Así se comprueba que DP381 y DP410 tienen una toxicidad similar al celecoxib para la especie *Daphnia Magna*, un pequeño crustáceo conocido vulgarmente como “mosca de agua”, mientras que las fenantridinas DP408 y DP378 eran 2 y 6 veces, respectivamente, más tóxicas que el celecoxib. Para la especie *Pimephales Promelas*, un ciprínido, las toxicidades de los productos de degradación eran similares a la del celecoxib.

4.4 Detección de los productos de degradación mediante un método multiresiduo

Asumiendo que los productos de degradación mayoritarios encontrados en los ensayos de laboratorio son aquellos que probablemente pueden ser detectados en el análisis de muestras reales de agua superficial se han calculado sus tasas de recuperación y precisión mediante el método de análisis descrito, con el fin de verificar si se pueden monitorizar conjuntamente con el principio activo. Para ello se ha dopado 1 L de muestra de agua de río con una disolución que contenía los productos de degradación y se ha realizado la extracción en fase sólida. Dado que no se dispone de patrones analíticos se ha planificado la siguiente estrategia para calcular las tasas de recuperación. Alícuotas de agua dopadas con celecoxib a elevada concentración (1 mg/L)

fueron sometidas a los ensayos de degradación para generar los productos de transformación y se usaron después para dopar el agua de río, libre de analitos, con el fin de calcular las recuperaciones.

Es necesario disponer de una disolución de referencia conteniendo los analitos para calcular las tasas de recuperación después de la preparación de muestra. En esta experimentación esta disolución fue preparada mediante dilución de la disolución con productos de degradación usada para dopar las muestras de agua; la dilución se hacía de manera que se obtuvieran concentraciones (o áreas de pico) iguales a aquellas que se obtendrían en los extractos de muestras si la recuperaciones fueran del 100%. Evidentemente, las concentraciones de los productos de degradación no son conocidas pero las áreas de pico medidas proporcionan una indicación de su cantidad en estas disoluciones.

Tabla 4: Recuperación y precisión (RSD) en el análisis de los productos de degradación (n=5).

	Área de pico (referencia)	Recuperación (%)	RSD (%)
DP396	8655	84	6.6
DP410	17163	81	7.3
DP381	15749	84	6.6

Como se observa en la Tabla 4 las recuperaciones son del 80% con una repetitividad del orden del 6-7% por lo que estos productos de degradación podrían ser detectados mediante los métodos de análisis multiresiduo comúnmente usados para el análisis de aguas superficiales.

5. Conclusiones

El celecoxib es una droga relativamente persistente en agua de río bajo condiciones medioambientales. Las reacciones fotoquímicas son más importantes que las reacciones químicas en disolución, a pH 7.8, para preveer su degradación. La degradación biológica es insignificante.

Se han propuesto estructuras tentativas para 5 de los 6 productos de degradación principales encontrados. Un derivado hidroxilado, y los derivados ácidos carboxílico y sulfónico, son los principales productos de degradación a largo plazo. Estos pueden ser detectados mediante los métodos multiresiduo basados en una extracción SPE.

6. Bibliografía

[1] K. Kaur, V. Kumar, G. Kumar, Trifluoromethylpyrazoles as anti-inflammatory and antibacterial agents: A review, *J. Fluorine Chem.* 178 (2015) 306–326.

[2] S. Thangamani, W. Younisand, M.N. Seleem, Repurposing celecoxib as a topical antimicrobial agent, *Front. Microbiol.* 6 (2015). <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00750>.

[3] F.S. Garcia Praça, M.V. Lopes Badra, M. Guimaraes, M.B. Riemma, Celecoxib determination in different layers of skin by a newly developed and validated HPLC-UV method, *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 1237–1244.

[4] S. Triñanes, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, Selective determination of COXIBs in environmental water samples by mixed-mode solid phase extraction and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1420 (2015) 35–45.

[5] J.J. Jiménez, B.E. Muñoz, M.I. Sánchez, R. Pardo, M.S. Vega, Fate of the drug chlorpromazine in river water according to laboratory assays. Identification and evolution over time of degradation products. Sorption to sedimen, *Chemosphere* 162 (2016) 285–292.

[6] J.J. Jiménez, M.I. Sánchez, B.E. Muñoz, R. Pardo, Persistence of alprazolam in river water according to forced and non-forced degradation assays. Adsorption to sediment and long-term degradation products, *Drug Test. Anal.* 9 (2017) 1204–1213.

[7] J.J. Jiménez, R. Pardo, M.I. Sánchez, B.E. Muñoz, Photochemical, thermal, biological and long-term degradation of celecoxib in river water. Degradation products and adsorption to sediment, *J. Hazard. Mat.* 342 (2018) 252–259.

[8] OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 301. Ready Biodegradability (1992).

[9] J. Y. Zhang, Y.F. Wang, C. Dudkowski, D.C. Yang, M. Chang, J. Yuan, S.K. Paulson, A.P. Breau, Characterization of metabolites of celecoxib in rabbits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 1259–1270.

[10] Y. Ma, S. Gao, M. Hu, Quantitation of celecoxib and four of its metabolites in rat blood by UPLC-MS/MS clarifies their blood distribution patterns and provides more accurate pharmacokinetics profiles, *J. Chromatogr. B* 1001 (2015) 202–211.

[11] H.A. Oh, D. Kim, S.H. Lee, B.H. Jung, Simultaneous quantitative determination of celecoxib and its two metabolites using liquid chromatography–tandem mass spectrometry in alternating polarity switching mode, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 107 (2015) 32–39.