

## DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS FARMACÉUTICOS EN AGUA POR OZONIZACIÓN

Cristina Quispe<sup>\*a</sup>, Luis Astudillo<sup>a</sup>, Jorge Villaseñor<sup>a</sup>, Álvaro Delgadillo<sup>b</sup>

### RESUMEN

La degradación de dos  $\beta$ -bloqueadores atenolol y el nadolol (50 ppm) por ozonización fue realizada. En las condiciones de trabajo utilizadas, a diferentes condiciones de pH 3, 7 y 9, se logró una degradación mayor al 90% para nadolol y alrededor del 60% para atenolol al cabo de una hora de reacción. Se determinaron los productos de degradación mayoritarios siendo éstos ácidos orgánicos de bajo peso molecular. La toxicidad relativa de las soluciones fue evaluada utilizando el ensayo de *Daphnia magna*. La toxicidad de las soluciones tratadas, en todas las condiciones de trabajo, fue menor que la toxicidad de la solución inicial. El mayor descenso de toxicidad se obtuvo a pH = 9.

**Palabras clave:** ozonización, compuestos farmacéuticos, degradación, toxicidad.

## DEGRADATION OF PHARMACEUTICALS COMPOUNDS IN WATER BY OZONATION

### ABSTRACT

The degradation of two  $\beta$ -blockers, atenolol and nadolol (50 ppm), was conducted using ozonation. At the working conditions, pH 3, 7 and 9, a degradation of 90% for nadolol and about 60% for atenolol was achieved after one hour of reaction. The main degradation products were identified as low molecular weight organic acids. The relative toxicity of the solutions was evaluated using the *Daphnia magna* test. It was found that the toxicity of the treated solutions, under all the working conditions, was lower than the toxicity of the initial solution. The biggest decrease in toxicity was obtained at pH = 9

**Key words:** ozonation, pharmaceutical compounds, degradation, toxicity.

### INTRODUCCIÓN

Los compuestos farmacéuticos ahora son reconocidos como una nueva clase de contaminantes y han sido objeto de una creciente preocupación e interés científico<sup>1</sup>. La razón por la que este tipo de compuestos pueden ser peligrosos para el medio ambiente es que estas sustancias, generalmente desarrolladas con el objetivo de producir un efecto biológico en los seres humanos, pueden afectar también a otros organismos vivos de forma no predecible. Estos compuestos ingresan al medio acuático después de su ingestión y posterior excreción, ya sea sin ser modificados o en la forma de metabolitos del compuesto inicial<sup>2</sup>.

---

<sup>a</sup> Instituto de Química de Recursos Naturales, Universidad de Talca, Av. Las Lircay s/n, Casilla 747, Talca, Chile, equispe@utalca.cl

<sup>b</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

Las aguas residuales urbanas y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (STP) se encuentran contaminados por la inadecuada eliminación de diversos compuestos farmacéuticos<sup>3</sup>. Diferentes investigadores<sup>1,4</sup> han reportado que algunos compuestos farmacéuticos no son eliminados durante los tratamientos de aguas residuales ni biodegradados en el medio ambiente, lo que significa su ingreso a una amplia gama de matrices ambientales, incluida la superficie terrestre, agua potable, así como suelos<sup>5,6</sup>. Después del tratamiento, las aguas residuales que contengan residuos farmacéuticos y productos de degradación pueden ser descargadas directamente a los ambientes acuáticos, donde los productos farmacéuticos han sido transformados o podrían generar otros compuestos<sup>7</sup>.

Los residuos de compuestos farmacéuticos pueden tener un efecto sustancial en el medio ambiente comparable o superior a la de los productos químicos agrícolas<sup>7,8</sup>. El modo de acción desconocido de los compuestos farmacéuticos en organismos menores dificulta la predicción de su toxicidad. Sin embargo, la exposición crónica a los productos farmacéuticos tiene el potencial de ocasionar numerosos efectos sub-letales, como son cambios metabólicos o de reproducción en organismos no objetivo<sup>1</sup>.

Las técnicas utilizadas por las plantas de tratamiento de aguas residuales no son adecuadas para garantizar una eliminación significativa de las trazas de contaminantes. Por lo tanto, el uso de tecnologías reforzadas como ozonización, procesos de oxidación avanzada (AOPs) o filtración por membrana puede ser de gran relevancia para el futuro.

El proceso de ozonización es una poderosa herramienta para degradar los contaminantes presentes en agua<sup>9</sup>. El ozono puede degradar los contaminantes de una forma directa, es decir, oxida la materia orgánica por reacción directa y de una forma indirecta<sup>10</sup>, la que implica su descomposición previa en agua para producir radicales hidroxilo, uno de los oxidantes<sup>11</sup> más potentes empleados en el tratamiento de agua.

La eficacia de este método ha sido demostrada en la degradación de diferentes xenobióticos, como los plaguicidas<sup>12</sup>, tintes<sup>13,14</sup> o compuestos orgánicos persistentes<sup>15</sup>. Si bien la mayoría de los estudios de ozonización se han centrado en la cinética de degradación de los compuestos a degradar, existe poca atención e información de los productos de degradación y su toxicidad relativa, antes y al final del tratamiento.

En el presente trabajo presentamos la ozonización de los compuestos farmacéuticos atenolol y nadolol utilizados como modelo de compuestos  $\beta$ -bloqueadores y detectados en los recursos de agua, al igual que la detección de los principales productos de degradación y la evaluación de la toxicidad de las soluciones acuosas después del tratamiento.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reactivos

Los compuestos farmacéuticos nadolol (NAD) y atenolol (ATE) fueron provistos por Sigma. Todos los solventes usados en este trabajo fueron grado HPLC provistos por Merck. Las soluciones de reacción fueron preparadas con agua destilada-desionizada.

## Reacciones de ozonización

Las reacciones de ozonización fueron realizadas en un reactor provisto de una doble cámara con circulación externa de agua, para mantener la temperatura constante<sup>16</sup>, provisto de un sistema de toma de muestras para líquidos y gases. El reactor fue cargado en cada reacción con 90 mL de solución acuosa de nadolol (NAD) y atenolol (ATE) a una concentración de 50 mg/L y 2 mg/L.

El O<sub>3</sub> como agente oxidante, fue producido por un generador OZOCAV a partir de aire, llegando al reactor a un flujo constante de 50 L/min. La concentración de ozono fue monitoreada espectroscópicamente a una absorbancia de 254 nm con un coeficiente de extinción molar de 2900 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. El O<sub>3</sub> ingresa al reactor por medio de una frita colocada en el fondo del reactor<sup>17</sup>.

El tiempo de reacción total fue de 60 min durante el cual se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo, para posteriormente ser analizadas de acuerdo a la metodología analítica establecida.

## Métodos analíticos

Para determinar la concentración de ATE y NAD durante el proceso de ozonización, se utilizó un equipo de HPLC Perkin Elmer 200 autosampler, a  $\lambda$  220 nm UV-Vis, columna MERCK Chromolith Performance RP-18e 100-4.6 mm, fase móvil metanol/agua sistema isocrático, a un flujo (0,6 ml/min); el agua fue previamente acidificada hasta pH 2,7 usando HCl, volumen de inyección (20  $\mu$ l), temperatura (20 °C), tiempo de corrida (20 min).

Respecto a la determinación de los compuestos ácidos, éstos fueron monitoreados utilizando una columna TRANSGENOMIC Organic acid columns ORH-801, fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N, a un flujo (0,3 mL/min), volumen de inyección (20  $\mu$ l), temperatura (35 °C), tiempo de corrida (20 min) a  $\lambda$  = 200 nm Uvis.

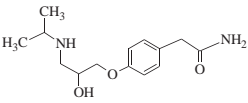
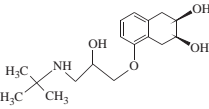
## Ensayo de ecotoxicidad

Los ensayos de toxicidad se realizaron utilizando el microcrustáceo *Daphnia magna*, de acuerdo a la Norma Chilena<sup>18</sup>. La metodología empleada, permite determinar o medir el efecto inhibitorio de una sustancia bajo condiciones de prueba, sobre la movilidad de neonatos de *Daphnia magna*. Para ello se utilizan los neonatos (menos de 24 h de edad) los cuales son expuestos bajo condiciones de laboratorio a diluciones de las muestras, en un tiempo determinado (48 h), al término del cual se cuentan el número de dáfñidos muertos. Expresando el porcentaje de mortandad de los organismos expuestos (no presentan movilidad), asumiendo dicha respuesta fisiológica, como equivalente a mortalidad o muerte ecológica de los ejemplares.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estructura de los compuestos estudiados se encuentra en la tabla 1. Utilizando estos compuestos se prepararon soluciones acuosas a pH 3, 5 y 9, cada una de ellas de concentración 50  $\pm$  2 mg/L. Estas soluciones fueron luego degradadas por reacción con un flujo constante de ozono 50  $\pm$  1 mL/min de concentración 16  $\pm$  1 mg/L.

**Tabla 1:** Número de registro de CAS, estructura química y uso/origen del compuesto farmacéutico.

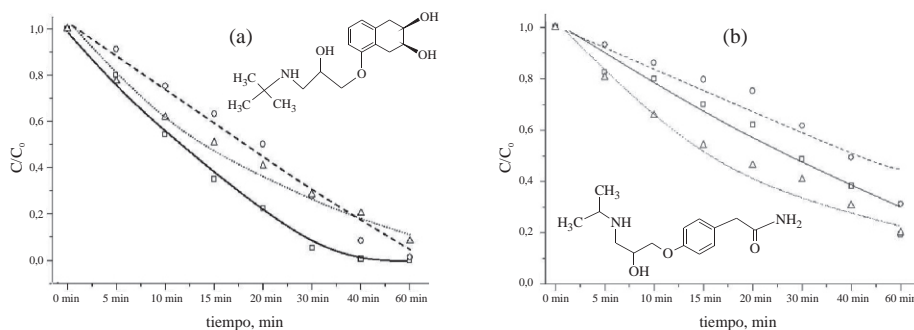
Sustancia	CAS RN	Estructura
Atenolol	29122-68-7	
Nadolol	42200-33-9	

### Reacciones de degradación

Las figuras 1a y 1b grafican las curvas de degradación para NAD y ATE, respectivamente. En estos gráficos se representa la relación de la concentración del compuesto bajo estudio respecto a su concentración inicial ( $C/C_0$ ) durante las reacciones de ozonización, para las tres condiciones de pH utilizadas.

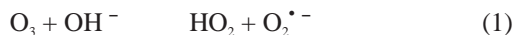
Como se puede observar en la figura 1a, en los tres casos una virtual degradación total de NAD se logró a los 60 minutos de reacción. Una gráfica semejante se obtiene para el caso de ATE, figura 1b, salvo que al cabo de una hora de reacción el porcentaje de degradación alcanza, en promedio, el 80 %.

En general, la influencia del pH de la solución es relativamente moderada. Es conocido que el ozono degrada los contaminantes orgánicos por dos vías diferentes: una vía directa en la que el ozono ataca directamente grupos funcionales reactivos de las moléculas orgánicas y una vía indirecta en donde el ozono se descompone en agua para generar radicales hidroxilo, que son oxidantes poderosos.



**Figura 1.** Ozonización del compuesto farmacéutico (a) nadolol(NAD) y (b) atenolol(ATE) ambos a pH 3 (□), pH 7 (△) y pH 9 (○).

La descomposición del  $O_3$  para dar radicales hidroxilo es una reacción compleja, que sucede en varias etapas:



Una de las reacciones iniciales, ecuación (1) es dependiente del pH ya que es controlada por la concentración de los iones hidroxilo<sup>19</sup>.

La escasa influencia del pH en la velocidad de degradación de estos compuestos, sugiere que el principal mecanismo de degradación es la reacción directa, la cual es independiente del pH.

### Ruta de degradación

Los resultados cromatográficos de los experimentos realizados muestran que, en paralelo a la degradación de los compuestos iniciales, se producen una serie de reacciones de degradación en las que se descomponen a su vez los intermediarios de reacción. Todas estas reacciones de degradación, en total, generan una mezcla compleja de productos, en los que destacan los ácidos orgánicos de bajo peso molecular.

La figura 2 muestra una posible ruta para la formación de los ácidos orgánicos detectados durante el proceso de ozonización del NAD. La oxidación del compuesto y sus mayores intermediarios, debido a la acción de la molécula de  $O_3$  y de los radicales hidroxilo, produce la ruptura del anillo bencénico del compuesto y la formación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, como el ácido oxálico, ácido glioxílico y ácido fórmico. El ácido oxálico y ácido glioxílico, a su vez, podrían generar la formación del ácido fórmico.

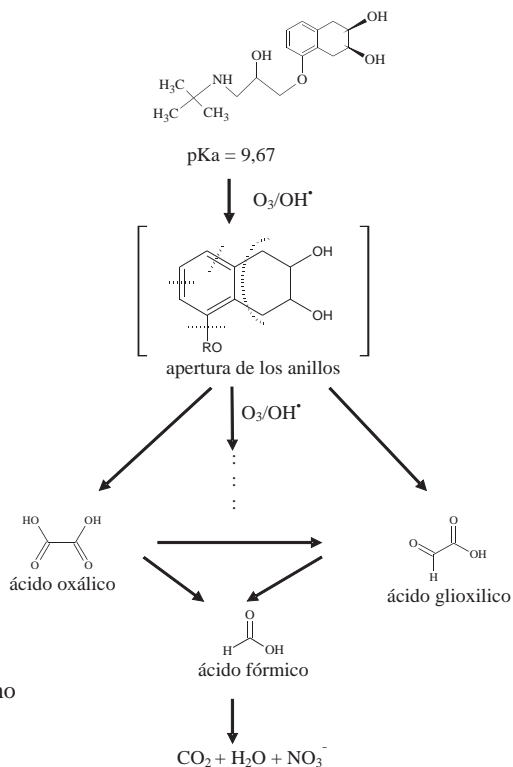
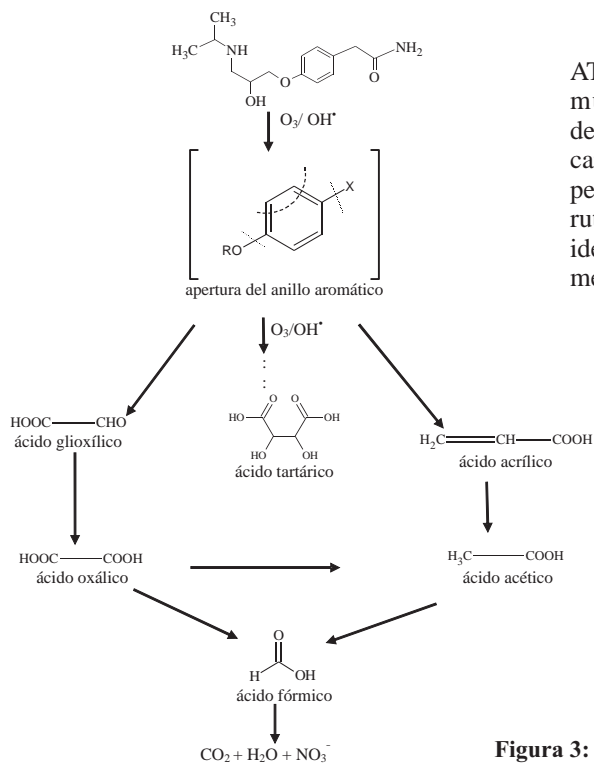


Figura 2: Ruta de reacción del nadolol con ozono



En el caso de la degradación del ATE los resultados cromatográficos muestran que en paralelo a la degradación, se generaron una mayor cantidad de ácidos orgánicos de bajo peso molecular. La figura 3 muestra la ruta de degradación de ATE basada en la identificación de intermediarios por medio de HPLC.

**Figura 3:** Ruta de reacción del atenolol con ozono

Al igual que para el NAD, los primeros intermediarios se producirían por la ruptura del anillo bencénico generando, entre otros, ácido tartárico, ácido acrílico, ácido acético, ácido fórmico, ácido glicoxílico y ácido oxálico.

La formación del ácido fórmico es posible que pueda ser por ruptura del ácido oxálico, acético o de una ruptura inicial de la molécula.

### Ensayos de ecotoxicidad

Uno de los objetivos de este estudio es verificar que la mezcla de los subproductos generados no presente una toxicidad mayor que la de los compuestos a degradar. Si bien esto sucede en la mayoría de los casos, nosotros como también otros autores, hemos encontrado sistemas en los que la toxicidad de las soluciones degradadas, a un tiempo de reacción determinado, es mayor que la de los productos iniciales.

Por ejemplo, hemos encontrado que en el caso de la ozonización del compuesto farmacéutico trimetoprim, genera mayor toxicidad los subproductos a similares condiciones de flujo de  $O_3$  comparado con el compuesto de partida<sup>20</sup>.

Para estudiar la evolución de la toxicidad durante la degradación de los compuestos en estudio, se evaluó la toxicidad al inicio y al término de la reacción.

Se determinaron valores de  $CI_{50-48h}$  de  $21,6 \pm 3$  mg/L para NAD y de  $25,3 \pm 3$  mg/L para ATE en su forma pura. A medida que la reacción de degradación procede, se genera una mezcla compleja de productos de degradación. Por esta razón, el  $CI_{50}$  de la mezcla de productos se reporta como el porcentaje de muestra en una solución diluida que produce la muerte del 50 % de los dáfhnidos.

La tabla 2, contiene los resultados de los experimentos de ecotoxicidad para los compuestos NAD y ATE. La concentración inicial de los dos compuestos farmacéuticos en las condiciones de trabajo empleadas, 50 mg/L, es mayor al  $CI_{50}$  del compuesto puro. Debido a esto, al inicio de la reacción de degradación el porcentaje de sobrevivencia de los dáfhnidos es 0 %. Ya que el  $CI_{50}$  de estos compuestos es aproximadamente el doble de la concentración de trabajo, una dilución de aproximadamente 50 % es necesaria para alcanzar el 50 % de muerte de los dáfhnidos. En ambos casos se puede observar que la degradación de los compuestos bajo estudio produce un descenso en la toxicidad.

**Tabla 2.** Ecotoxicidad con *Daphnia magna* de la solución inicial y final de los compuestos farmacéuticos NAD y ATE. Se reporta como  $CI_{50}$  expresado en % en base a las diluciones de la muestra.

Muestras	Solución inicial*	Solución después de 60 minutos de reacción		
		pH 3	pH 7	pH 9
NAD	$43 \pm 3$ %	$75 \pm 3$ %	$92 \pm 3$ %	No se observó muerte de dáfhnidos
ATE	$50 \pm 4$ %	$82 \pm 3$ %	$85 \pm 3$ %	No se observó muerte de dáfhnidos

\*Solución inicial a 50mg/L.

$CI_{50-48h}$  = Estimación de la concentración de la muestra que inmoviliza el 50% de los organismos en 48h, expresada en porcentaje de muestra.

En la tabla 2 se puede observar que el descenso de la toxicidad es mayor en soluciones básicas, mientras que en condiciones ácidas el descenso de la toxicidad es menor. Si bien no se observó una gran influencia del pH en la velocidad de degradación de los compuestos bajo estudio, estos resultados sugieren que el pH sí tiene influencia en la composición de las mezclas de productos de degradación.

Esto está en concordancia con estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación acerca de la ozonización del pesticida pentaclorofenol, donde se observó que la composición y naturaleza de la mezcla de productos de descomposición podían ser influenciados por el pH de la solución inicial<sup>21</sup>.

Una de las razones que puede explicar las diferencias en la toxicidad respecto al pH es una mayor participación de la ruta indirecta de degradación, es decir la generación de radicales hidroxilo. En condiciones básicas se favorece su producción, por lo que, la degradación de los intermediarios, causantes de la toxicidad, debería transcurrir en mayor extensión.

### CONCLUSIONES

- Ambos compuestos farmacéuticos se degradan eficientemente aplicando dosis bajas de ozono.
- El análisis cromatográfico indica la producción de una mezcla compleja de productos de degradación; pese a ello, el ensayo de *Daphnia magna* indica que la toxicidad, luego de una hora de reacción, es menor que la de los compuestos iniciales.

### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Proyecto Bicentenario de Ciencia y Tecnología PSD-16.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Daughton, C.G., Ternes, T.A. *Environ. Health Perspect*, **1999**, 107, 907-938.
2. Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev F., Holten Lützhaft H.C. and Jørgensen S.E. *Chemosphere*, **1998**, 36, 357.
3. Heberer T., In: R.A. Meyers, Editor, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, **2000**, 7, 6501-6546.
4. Zwiener S., Frimmel F.H. *Water Research*, **2000**, 34, 1881.
5. Kolpin, D.W., Skopec, M., Meyer, M.T., Furlong E.T. and Zaugg, S.D. *Sci. Tot. Environ*, **2004**, 328, 119-130.
6. Halling-Sorensen B., Lykkeberg, A., Ingerslev, F., Blackwell, P. Tjornelund, J. *Chemosphere*, **2003**, 50, 1331-1342.
7. Ternes, T.A., *Water Research*, **1998**, 32, 3245-3260.
8. Cleuvers, M., *Toxicology Letters*, **2003**, 142, 185-194.
9. Ternes, T.A., St. uber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., Teiser, B., *Water Research*, **2003**, 37, 1976-1982.
10. Staehelin, J., Hoigne, J., *Environ. Sci. Technol.*, **1985**, 79, 1206-1213.
11. Urs von Gunten, *Review Water Research* **2003**, 37, 1443.
12. Ikehata, K., El-Din, M.G., *Ozone: Science and Engineering*, **2005**, 27, 83-114.
13. Franco D.V., Jardim W.F., Boodts J.F.C., Da Silva L.M., *Clean-Soil air Water*, **2008**, 36, 34-44.
14. Khare U.K., Bose P., Vankar P.S., *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2007**, 82, 1012-1022.
15. Ning, B., Graham, N.J.D., Zhang, Y., *Chemosphere*, **2007**, 68, 1173-1179.



16. Villaseñor J., Mansilla H., *Journal of Photochemistry and Photobiology*, **1996**, 93, 205-209.
17. Pines, D.S., Reckhow, D.A., *Ozone: Science and Engineering*, **2003**, 25, 25-39.
18. Norma Chilena Oficial, NCh2083.Of., **1999**, Chile.
19. Staehelin J., Hoigné J., *Environmental Science and Technology*, **1982**, 16, 676-681.
20. Quispe, C., Astudillo, L., Villaseñor, J., Delgadillo A., (manuscrito en preparación).
21. Quispe, C., Villaseñor, J., Pecchi, G., Reyes, P., (manuscrito en preparación).