

OZONIZACIÓN DEL ANTIBIÓTICO TRIMETOPRIM: EVOLUCIÓN DE LA TOXICIDAD DURANTE LA DEGRADACIÓN

Cristina Quispe^{*a}, Luis Astudillo^a, Jorge Villaseñor^a, Álvaro Delgadillo^{*b}

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta la degradación del compuesto farmacéutico Trimetoprim (TMP) por ozonización en medio acuoso. Este proceso presentó una cinética de pseudo-primer orden y los productos de degradación fueron identificados usando espectrometría de masas acoplado a cromatógrafo de gases (GC-MS) y cromatografía líquida (HPLC). En base a los compuestos detectados se propone una ruta de degradación. La evolución de la toxicidad durante las reacciones de ozonización se siguió midiendo la toxicidad aguda con *Daphnia magna*. Interesantemente, se observó un aumento de la toxicidad en la solución después de los 60 minutos de reacción, probablemente debido a la generación de productos tóxicos durante la degradación.

Palabras clave: ozonización, toxicidad, antibiótico, *Daphnia magna*.

OZONATION OF THE ANTIBIOTIC TRIMETHOPRIM: TOXICITY EVOLUTION DURING THE DEGRADATION REACTIONS

ABSTRACT

Herein we report the degradation of the pharmaceutical compound trimethoprim (TMP) in water using ozonation. This process was described by a pseudo first order reaction kinetics and the main degradation products were identified using Gas Chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS) and HPLC. Based in the detected compounds, a degradation pathway was proposed. The evolution of the toxicity along with the ozonation reaction was followed measuring acute toxicity with *Daphnia magna*. An increase in the toxicity of the solutions was observed after 60 minutes of reaction time, probably due to the generation of the toxic degradation products.

Key words: ozonation, pharmaceuticals compounds, degradation, toxicity.

INTRODUCCIÓN

La presencia de compuestos farmacéuticos en el medio ambiente acuoso ha atraído la atención de muchos investigadores en los últimos años¹⁻⁶. Esta clase de compuestos se ha encontrado en plantas de tratamiento (STP) de efluentes, producto de la eliminación o excreción del consumo humano⁷⁻⁹, y en aguas naturales debido al uso en la crianza de animales¹⁰. Entre los medicamentos los antibióticos generan gran preocupación debido a la posibilidad de inducir resistencia en las cepas bacterianas¹¹. Diversos estudios han demostrado que las bacterias en las aguas residuales son más resistentes a los antibióticos que las bacterias encontradas en otros

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

^b Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
adelgadillo@userena.cl

lugares¹². Además, muchos antibióticos son perjudiciales para los organismos acuáticos, como las algas y crustáceos de agua dulce y marinos¹³. La presencia de este tipo de compuesto en efluentes de aguas residuales y aguas superficiales, son un claro indicio de la ineficiencia de las tecnologías de tratamiento convencionales.

El proceso de ozonización es una poderosa herramienta para degradar contaminantes recalcitrantes en el agua¹⁴. El ozono puede degradar los contaminantes por una vía directa e indirecta. El primero implica la reacción del ozono molecular con grupos funcionales de la molécula a degradar^{15,16}, mientras que en el segundo caso se involucra la descomposición del ozono en el agua para producir radicales hidroxilo¹⁷, uno de los oxidantes¹⁸ conocidos más poderosos. La eficiencia del radical hidroxilo ha sido demostrada en la degradación de diferentes xenobióticos, como los pesticidas¹⁹, colorantes²¹ y diversos compuestos orgánicos persistentes²².

Si bien la mayoría de los estudios de ozonización se han centrado en la cinética de degradación, menos atención se ha dado a los productos de degradación y su toxicidad relativa. En general, la velocidad de oxidación de los compuestos orgánicos es calculada siguiendo la desaparición del compuesto a degradar en función del tiempo. Este enfoque puede proporcionar valiosa información acerca del proceso de oxidación; sin embargo, debido a la posibilidad de formación de especies intermediarias persistentes, la degradación total del compuesto de partida no siempre corresponde a la mineralización total de los compuestos orgánicos a CO₂ y H₂O. Por lo tanto, es importante investigar en detalle el mecanismo de oxidación e identificar los posibles compuestos intermediarios.

El principal objetivo de nuestra investigación fue observar la ozonización del antibiótico trimetoprim (TMP) (utilizado en la acuicultura y en seres humanos para el tratamiento de infecciones del tracto urinario, FDA²³), identificar posibles especies transitorias generadas durante su destrucción y proponer una vía de degradación.

Ensayos de toxicidad aguda, de las muestras recogidas en diferentes intervalos de tiempo durante el proceso de ozonización, se llevaron a cabo mediante la medición de inmovilización del microcrustáceo *Daphnia magna*. Los resultados obtenidos son discutidos, teniendo en cuenta que, en determinadas circunstancias, el proceso de oxidación de los compuestos orgánicos puede producir compuestos mucho más tóxicos que el compuesto de partida.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

El compuesto farmacéutico trimetoprim (98%) (TMP) fue provisto por Aldrich. Todos los solventes usados fueron grado HPLC, el alcohol terbutílico fue provisto por Merck. Las soluciones de reacción fueron preparadas con agua destilada-desionizada.

Reacciones de ozonización

Las reacciones de ozonización fueron realizadas en un reactor tipo Batch provisto de una doble cámara con circulación externa de agua, a 25 °C, con un sistema de toma de muestras para líquidos. El reactor fue cargado en cada reacción con 90 mL de solución acuosa de TMP a una concentración de 50 mg/L ± 2 mg/L y alimentado con ozono a una concentración de 16 ± 1 mg L⁻¹ a un flujo de 50 ± 2 mL min⁻¹. La concentración de ozono fue monitoreada espectroscópicamente a una absorbancia de 254 nm con un coeficiente de extinción molar (ε) de 2900 M⁻¹ cm⁻¹. 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

La concentración de TMP durante el proceso de ozonización fue monitoreada por HPLC Perkin Elmer 200 autosampler, a λ 220 nm UV-Vis, columna MERCK Chromolith Performance RP-18e 100-4.6 mm, con una fase móvil $H_2O:MeOH$, 70:30 a un flujo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. El agua fue previamente acidificada a pH 3 usando H_3PO_4 .

Los ácidos orgánicos fueron cuantificados usando una columna específica para ácidos TRANSGENOMIC ORH-801 (6,5 mm x 300 mm), H_2SO_4 0,01 N como fase móvil a un flujo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Los intermediarios fueron identificados utilizando un cromatógrafo de gases (GC) Perkin Elmer con una columna capilar Quadrex acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico (EI). El carbono orgánico total (TOC) fue determinado en un equipo Shimadzu 5000.

Ensayo de ecotoxicidad

Los ensayos de toxicidad se realizaron de acuerdo a normas internacionales ISO 6341 para la determinación de inhibición de la movilidad del microcrustáceo *Daphnia magna*²⁴. 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 (24 h), al término del cual se cuentan el número de dáfidos muertos. Se reporta la inmovilización como EC_{50-24h} expresando en porcentaje de mortandad de los organismos expuestos, asumiendo dicha respuesta fisiológica, como equivalente a mortalidad o muerte ecológica de los ejemplares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La degradación de la solución acuosa de TMP ($50 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$) se logró con ozono a un flujo constante de $16 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ a pH 7. La figura 1 muestra la disminución de la concentración de TMP versus el tiempo de reacción, así como la cantidad de carbono orgánico total (TOC) durante la reacción de degradación. La degradación completa del antibiótico se logró durante la primera hora de ozonización (90% de TMP se degradó después de 30 minutos). Debido a que el flujo de ozono se mantuvo constante, la disminución de la concentración correspondió a un modelo de pseudo-primer orden, con una constante de $8,6 \times 10^{-2}$ calculada a partir de los datos experimentales.

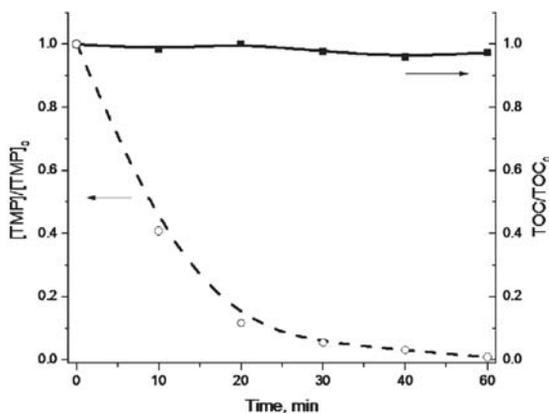


Figura 1. Evolución de TMP/TMP_0 y TOC/TOC_0 en presencia de O_3 durante 60 min. de reacción.

El mecanismo de degradación del ozono puede ocurrir por dos vías: una vía directa y una vía indirecta a las condiciones empleadas en estos experimentos. Con el objetivo de investigar la contribución de los dos mecanismos posibles durante la degradación se realizaron experimentos en presencia de un atrapador de radicales libres, como lo es el alcohol terbutílico. Este atrapador reacciona lentamente con el ozono a una velocidad constante de $< 3 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y rápidamente con los radicales hidroxilos a una velocidad de $< 7,6 \times 10^5 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-127}$.

En los experimentos de degradación de TMP, en presencia y ausencia del alcohol terbutílico, la constante de reacción observada estuvo dentro de los errores experimentales. Los resultados anteriores sugieren que la degradación de TMP con ozono ocurre principalmente por la vía directa. La figura 1 también indica el TOC medido a diferentes tiempos de reacción, observando que éste se mantiene prácticamente constante durante todo el proceso de ozonización. Estos resultados indican que la mineralización del antibiótico, es decir la completa conversión del TMP a CO_2 y H_2O , no se llevó a cabo, durante el tiempo de reacción estudiada. Existen referencias bibliográficas que indican que en algunos casos la mineralización completa de algunos contaminantes no se consigue²⁵. Algunos compuestos, como el ácido fórmico y el ácido oxálico, conocidos como compuestos recalcitrantes, son muy resistentes a la degradación y permanecen en la solución²⁵.

Ruta de degradación

El análisis cromatográfico de la solución de degradación, a diferentes intervalos de tiempo, muestra una mezcla compleja de productos de degradación. La caracterización completa de estas soluciones requiere un detallado análisis químico y es complejo identificar a cada una de ellas. Sin embargo, en el presente estudio se ha podido detectar los principales productos de degradación usando GC-MS y HPLC. La estructura química del TMP posee grupos funcionales capaces de reaccionar directamente con el ozono molecular. Se sabe que el ozono reacciona con grupos amino, anillos aromáticos y grupos éter que están presentes en la molécula de TMP. La reacción del ozono con los grupos amino es más rápida que con los grupos aromáticos o éter. Por lo tanto, el sitio más probable para el ataque del ozono sería sobre el anillo de pirimidina. Oxidaciones sucesivas del anillo conducen a la formación del 3,4,5-trimetoxibenzaldehído, productos de degradación de éste y la formación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, como los ácidos fórmico, oxálico y glioxílico. El ataque del ozono a la molécula orgánica con grupos amino es similar al reportado en la degradación de la cafeína²⁶ (figura 2).

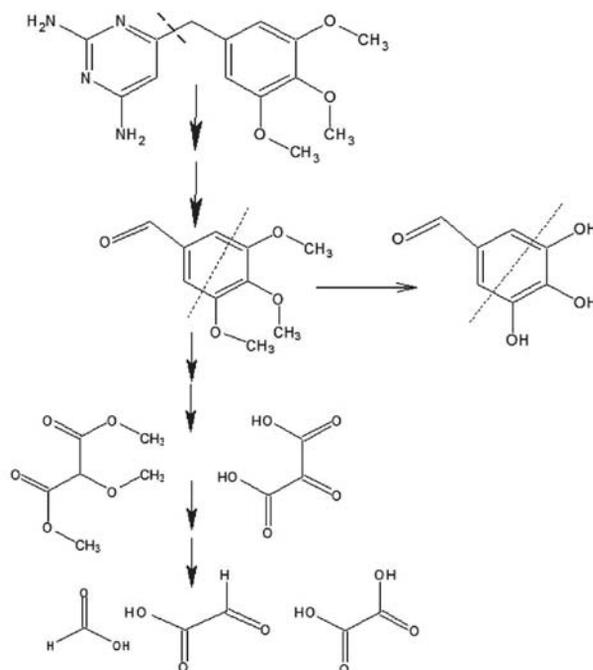


Figura 2. Ruta de degradación propuesta para el trimetoprim (TMP) en presencia de ozono.

Ensayo de ecotoxicidad

Con el objetivo de conocer la toxicidad relativa del TMP en solución durante el proceso de degradación se realizaron experimentos utilizando el bioindicador *Daphnia magna* a diferentes intervalos de tiempo. En el presente estudio se encontró que la toxicidad del TMP fue $> 100 \text{ mg L}^{-1}$. Nuestros resultados fueron similares a los encontrados por Kim y colaboradores¹⁷ donde reportaron un $EC_{50-24h} = 176,7 \text{ mg L}^{-1}$. En el presente estudio la figura 3 muestra la evolución de la toxicidad relativa de la solución de TMP (expresado como porcentaje de sobrevivencia de los dáfidos) durante el proceso de ozonización. La solución inicial de TMP a una concentración de 50 mg L^{-1} no provoca muerte de los dáfidos a las condiciones de trabajo. A medida que ocurre la reacción de degradación la solución generada provoca una disminución en el porcentaje de sobrevivencia de los dáfidos, observándose la muerte completa de la población en estudio a los 20 minutos de reacción. El EC_{50-24h} , expresado como el porcentaje de la dilución de la muestra a los 60 minutos de reacción, es de 11%. Un mayor tiempo de ozonización de la reacción, en las mismas condiciones no muestra una mejora sustancial en la toxicidad de la solución ($EC_{50-24h} = 9\%$) así como en la evolución del TOC. El incremento de la toxicidad de estas soluciones podría atribuirse a la degradación del antibiótico en moléculas más pequeñas y más tóxicas, como 3,4,5-trimetoxibenzaldehído y sus correspondientes derivados fenólicos.

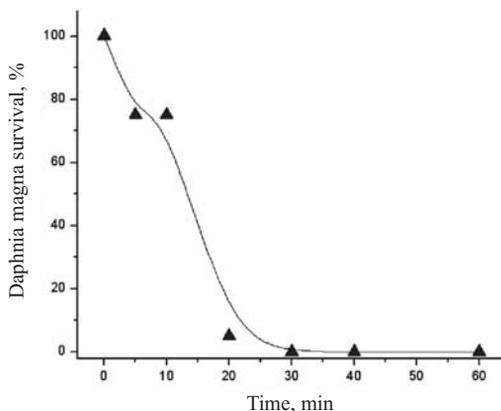


Figura 3. Evolución de la toxicidad durante el proceso de ozonización.

CONCLUSIONES

- El TMP es degradado eficientemente por el ozono a estas condiciones de trabajo, con un grado de mineralización escaso, observándose una mezcla compleja de productos de degradación.
- La solución con los productos de degradación muestra una mayor toxicidad que la solución inicial de TMP, para el bioindicador *Daphnia magna*.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Proyecto Bicentenario de Ciencia y Tecnología PSD-16. Se agradece al Dr. Héctor Mansilla por las mediciones del TOC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Heberer, T. *Toxicol Lett.*, **2002**, 131, 5-17.
2. Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P. *Chemosphere*, **2003**, 50, 1319-1330.
3. ones, O.A.H., Voulvoulis, N., Lester, J.N. *Crit. Rev. Toxicol.*, **2004**, 34, 335-350.
4. Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D. *Aquat. Toxicol.*, **2006**, **76**, 122-159.
5. Martínez, M.J., Hernando, M.D., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R. *Talanta*, **2009**, **77**, 1518-1527.
6. Vermeirssen, E.L.M., Eggen, R.I.L., Escher, B.I., Suter, M.J. *Chimia*, **2008**, 62, 389-394.
7. Khetan, S.K., Collins, T.J. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 2319-2364.
8. Vieno, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L. *Water Research*, **2007**, 41, 1001-1012.
9. Choi, K., Kim, Y., Jung, J., Kim, M.H., Kim, C.S., Kim, N.H., Park, J. *Environ. Toxicol. Chem.*, **2008**, 27, 711-719.
10. Andreozzi, R., Canterino, M., Marotta, R., Paxeus, N. *J. Hazard. Mater.*, **2005**, 122, 243-250.
11. Kemper, N. *Ecol. Indic.*, **2008**, 8, 1-13.
12. Alanis, A.J. *Arch. Med. Res.*, **2005**, 36, 697-705.

13. Le, T.X., Munekage, Y. *Mar. Pollut. Bull.*, **2004**, 49, 922-929.
14. Ternes, T.A., Stüber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., Teiser, B. *Water Research*, **2003**, 37, 1976-1982.
15. Staehelin, S., Hoigne, J. *Environ. Sci. Technol.*, **1985**, 19, 1206-1212.
16. Staehelin, S., Hoigne, J. *Environ. Sci. Technol.*, **1982**, 16, 676-681.
17. Kim, Y., Choi, K., Jung, J.Y., Park, S., Kim, P.G., Park, J. *Environ. Int.*, **2007**, 33, 370-375.
18. von Gunten, U. *Water Research*, **2003**, 37, 1443-1467.
19. Ikehata, K., El-Din, M.G. *Ozone-Sci. Eng.*, **2005**, 27, 83-114.
20. Khare, U.K., Bose, P., Vankar, P.S. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2007**, 82, 1012-1022.
21. Franco, D.V., Jardim, W.F., Boodts, J.F.C., Da Silva, L.M. *Clean*, **2008**, 36, 34-44.
22. Ning, B., Graham, N.J.D., Zhang, Y.P. *Chemosphere*, **2007**, 68, 1173-1179.
23. FDA. Food and Drug Administration. www.fda.gov/cvm/FOI/106-965s042606.pdf.
24. International Organization for Standardization (I.S.O.) 6341. British Standards Institute, London, **1996**.
25. Quispe, C., Villaseñor, J., Pecchi, G., Reyes, P. *J. Chil. Chem. Soc.*, **2006**, 51, 1049-1052.
26. Dalmazio, I., Santos, L.S., Lopes, R.P., Eberlin, M.N., Augusti, R. *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 5982-5988.
27. Hoigné, J., Bader, H. *Water Research*, **1983**, 17, 173-183.