

## Desarrollo de un Sistema de Inyección en Flujo Multijeringa para la Monitorización de la Degradación de Agentes Antituberculosos por Fotocatálisis Heterogénea

E.O. Guevara-Almaraz<sup>a</sup>, J.L. Guzmán-Mar<sup>a\*</sup>, L. Hinojosa-Reyes<sup>a</sup>, E. Ruiz-Ruiz<sup>a</sup>, V. Cerdà-Martín<sup>b</sup>, A. Hernández-Ramírez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Fotocatálisis y Electroquímica Ambiental, C.P. 64570. Monterrey, Nuevo León, México.

<sup>b</sup> Universidad de las Islas Baleares, Departamento de Química, Laboratorio de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente, E-07122, Palma de Mallorca, España.

\*E-mail: jorge.guzmanmr@uanl.edu.mx.

Recibido 1 de mayo de 2012, Aceptado 24 de mayo de 2012

### Resumen

En este estudio, se llevó a cabo el desarrollo de un sistema de monitorización en línea del proceso de degradación fotocatalítica de los fármacos antituberculosos isoniazida (ISO) y pirazinamida (PIRA) en solución acuosa, mediante un sistema de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA). Para la monitorización de los fármacos en línea se realizó la separación cromatográfica en una columna C18 de tipo monolítica, empleando como fase móvil 10 mM ácido 1-heptanosulfónico pH 3 y acetonitrilo (98:2), con un caudal de elución de 1 mL/min y volumen de inyección de 200  $\mu$ L. La detección de los fármacos fue por espectroscopia UV (267 nm). Se acopló un reactor fotocatalítico al sistema MSFIA-separación cromatográfica para llevar a cabo la degradación en mezcla de ISO y PIRA aplicando un diseño de experimentos factorial 23 para seleccionar las mejores condiciones del proceso, tomando como variables: tipo de catalizador ( $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$ ), cantidad de catalizador (0.5 y 1.0 g/L) y longitud de onda de irradiación (254 y 365 nm). Aplicando la función de deseabilidad (desirability function) se determinaron los parámetros óptimos para la degradación, los cuales fueron: 1 g/L del catalizador  $\text{TiO}_2$ , y radiación de 365 nm. El proceso de degradación conjunta de los fármacos fue mejorado cuando se incrementó la intensidad de la radiación UV (de 304 a 5500  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) ajustando el pH de la disolución a 7. Se realizaron pruebas control en las condiciones experimentales óptimas: adsorción y fotólisis, y se compararon con la fotocatalisis. Los porcentajes de degradación a 240 min para ISO y PIRA en la mezcla fueron del 100%; mientras que el porcentaje de mineralización fue del 71%.

**Palabras clave:** MSFIA, Automatización, Fotocatálisis Heterogénea, Pirazinamida, Isoniazida

### 1. Introducción

La presencia de contaminantes emergentes como los antibióticos en efluentes, es motivo de preocupación para la salud y seguridad en el ambiente. La contaminación de mantos acuáticos por fármacos se puede atribuir a múltiples fuentes, como las emisiones en los lugares de producción, generación directa de residuos en casas, hospitales y granjas, excreción humana y animal, entre otras [1-4].

Dentro de los antibióticos, destacan los medicamentos contra la tuberculosis, por su amplio uso en los últimos años en México debido a la reincidencia de esta enfermedad [5]; cada año se notifican en promedio 30,000 casos [5,6]. El Estado de Nuevo León se encuentra entre las principales entidades de la República Mexicana en presentar una alta morbilidad y mortalidad a consecuencia de la tuberculosis [7]. Entre los fármacos más ampliamente usados en el tratamiento de esta enfermedad se encuentran la isoniazida y pirazinamida, los cuales se administran de manera conjunta [8].

La isoniazida (ISO) es la base de la mayoría de los regímenes terapéuticos y es el único fármaco empleado como profilaxis contra la infección inicial. La ISO es una molécula totalmente sintética e hidrosoluble. Por otro lado, la pirazinamida (PIRA) es uno de los fármacos antimicobacterianos más antiguos, se

sintetizó a partir de la nicotinamida. La PIRA es una molécula sintética, hidrosoluble y de bajo costo [8]. En la Figura 1 se presenta la estructura química de los fármacos de estudio.

La estabilidad y polaridad de estos compuestos les permite tener una gran movilidad en el medio acuático y así llegar por infiltración y escurrimiento a las aguas subterráneas y superficiales. Los procesos convencionales empleados en el tratamiento de aguas residuales no son capaces de eliminar contaminantes recalcitrantes. Aunque los fármacos se encuentran en bajas concentraciones (<1 mg/L) en mantos de agua sus efectos tóxicos sobre los ecosistemas son importantes [3], por lo que es necesario implementar procesos de tratamiento alternativos para su eficiente remoción y degradación, como es el caso de la fotocatalisis heterogénea [9].

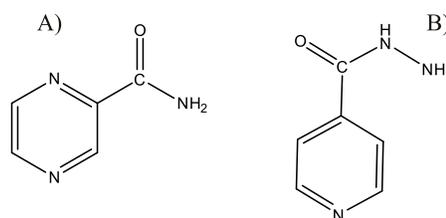


Figura 1. Estructura química de: A) pirazinamida (pirazina-2-carboxamida) y B) isoniazida (piridina-4-carbohidrazida).

La fotocatalisis heterogénea se basa en la utilización de un material semiconductor, al cual se le hace incidir radiación de igual o mayor energía a su banda prohibida (Eg). La luz activa al catalizador y en la superficie de éste se generan pares electrón- hueco que, a su vez, oxidan el agua del medio produciendo radicales libres OH, especie altamente oxidantes (2.80 V). Estos radicales son una de las principales especies responsables de la oxidación de compuestos orgánicos a una forma química menos tóxica. Cuando se genera una concentración suficiente del radical libre hidroxilo, las reacciones de oxidación de los compuestos orgánicos pueden llegar hasta una total mineralización [10]. Entre los materiales semiconductores más evaluados en procesos de degradación de contaminantes orgánicos se encuentran el TiO<sub>2</sub> y el ZnO [11]. En el presente trabajo se propone el empleo de un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) acoplado a un sistema de separación cromatográfica con detección UV, para llevar a cabo la monitorización de ISO y PIRA durante el proceso de degradación fotocatalítico; por lo que el sistema cuenta además con un reactor en línea para realizar la degradación de estos compuestos evaluando los semiconductores TiO<sub>2</sub> y ZnO. Las ventajas del sistema propuesto son: la posibilidad de automatizar el proceso de monitorización de la degradación por el empleo del sistema MSFIA, la medición en tiempo real de los fármacos, el incremento en la frecuencia de análisis y la reducción del costo por análisis por el bajo consumo de muestras y reactivos empleados.

## 2. Parte experimental

### 2.1 Materiales y reactivos

Los reactivos utilizados fueron: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85.2%, Fermont), isoniazida (99%, Sigma-Aldrich), pirazinamida (99%, Sigma-Aldrich), agua grado MilliQ (18.0 MΩ cm<sup>-1</sup>), acetonitrilo (grado HPLC, J. T. Baker), TiO<sub>2</sub> (80% anatasa y 20% rutilo, Degussa P25) y ZnO comercial (99.6%, J. T. Baker).

### 2.2 Condiciones experimentales

El sistema MSFIA (Figura 2) para la separación y monitorización de la degradación fotocatalítica consistió en un módulo multijeringa (Multi-Burette 4S, CRISON), en donde se utilizó una jeringa: S2 (5000 µL #1005 GASTIGHT, Hamilton, Suiza), que contenía la fase móvil (10 mM ácido 1-heptanosulfónico pH 3: acetonitrilo (98:2, v/v), una válvula multicanal VMC (Multi-Burette 4S Modulo VA 1+1, CRISON) con 8 posiciones y un puerto común. Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18 (Onyx™ Monolithic, 25 x 4.6 mm d.i.) y un guarda columna C18 (Onyx™ Monolithic) (5 mm x 4.6 mm d.i.). La operación del sistema MSFIA consistió en la toma de la muestra (S2) y

almacenamiento en el bucle de carga, posteriormente la muestra es transportada por la fase móvil hacia columna cromatográfica (monolítica C18) en donde los analitos fueron separados y llevados a la celda de flujo (QS 1.000) para su detección utilizando una fuente de luz UV (Modelo DT 1000 CE, Analytical Instrumen Systems, Inc.) y un espectrofotómetro CCD (Charge Coupled Device, Modelo USB 2000, Ocean Optics). Al sistema MSFIA-separación se acopló un reactor fotocatalítico, con un filtro (acero inoxidable para HPLC, 1-5 µm) a través de una válvula multicanal (Figura 2) para la toma de muestra. El reactor fotocatalítico consistió en un reactor con capacidad de 50 mL, en el cual se colocó la disolución de la mezcla de fármacos (preparada en agua grado MilliQ) con el catalizador. La disolución se mantuvo en agitación constante durante la degradación. Se utilizaron lámparas de inmersión de 254 nm y 365 nm, como fuente de radiación UV (5500 y 304 µW/cm<sup>2</sup> de intensidad, respectivamente, marca Spectroline). El reactor fotocatalítico, fue colocado a oscuridad dentro de una caja. Los catalizadores evaluados fueron ZnO (3.2 m<sup>2</sup>/g) y TiO<sub>2</sub> Degussa P25 (50.5 m<sup>2</sup>/g). El control del sistema se realizó por medio del software AutoAnalysis Station v5.0.

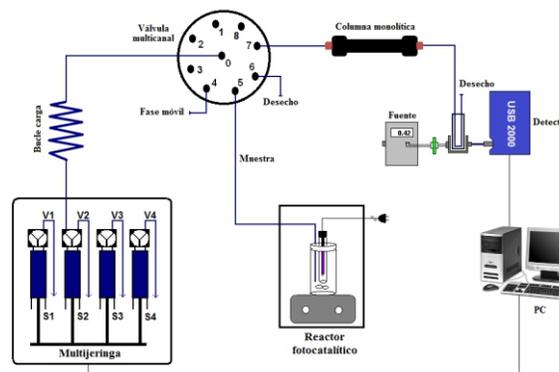


Figura 2. Esquema del sistema MSFIA acoplado con el reactor fotocatalítico.

### 2.3 Degradación fotocatalítica de isoniazida y pirazinamida

Preliminarmente, se realizó un diseño de experimentos factorial 2<sup>3</sup>, con la finalidad de seleccionar las condiciones más favorables para la degradación fotocatalítica de la mezcla de los fármacos. Para realizar el diseño de experimentos se tomaron en cuenta las variables: masa de catalizador (0.5 y 1 g/L), tipo de catalizador (TiO<sub>2</sub> Degussa P25 y ZnO) y longitud de onda de radiación (254 y 365 nm). La degradación de los fármacos se realizó a pH 5, la concentración de PIRA e ISO fue de 5 y 10 mg/L, respectivamente. En la Tabla 1 se indican las condiciones de los experimentos realizados. La monitorización del contenido de los fármacos durante

la degradación se llevó a cabo en línea con el sistema MSFIA cada 30 min durante 300 min. Se aplicó la metodología de deseabilidad compuesta (desirability function) empleando el programa Minitab v16, para encontrar las condiciones óptimas de la degradación de la mezcla de fármacos. El proceso de degradación se mejoró evaluando el incremento de la intensidad de la radiación UV y el pH de la disolución. En las condiciones establecidas del proceso se realizaron pruebas control de fotólisis (luz UV) y adsorción (catalizador).

Adicionalmente, se llevó a cabo la degradación de la mezcla de ISO y PIRA en muestras reales (agua de presa y agua de río) con la finalidad de evaluar el efecto de la matriz en la degradación. En las muestras de agua de presa y de río se determinaron los parámetros fisicoquímicos pH, conductividad y contenido de Carbón Orgánico Total (COT) (TOC analyser TOC-V CSH, Shimadzu).

**Tabla 1.** Diseño de experimentos factorial aplicado a la degradación fotocatalítica de los fármacos y porcentajes de degradación obtenidos a 240 minutos de reacción (n = 2).

Exp.	Masa de catalizador (g/L)	$\lambda$ (nm)	Catalizador	Degradación (%)	
				ISO	PIRA
1	0.5	254	TiO <sub>2</sub>	...	87 ± 5
2	1.0	365	ZnO	69 ± 6	32 ± 3
3	0.5	254	ZnO	72 ± 5	90 ± 4
4	0.5	365	TiO <sub>2</sub>	63 ± 3	67 ± 3
5	1.0	254	TiO <sub>2</sub>	72 ± 6	87 ± 1
6	1.0	365	TiO <sub>2</sub>	70 ± 1	78 ± 7
7	0.5	365	ZnO	64 ± 1	35 ± 4
8	1.0	254	ZnO	73 ± 6	88 ± 6

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Selección de condiciones de degradación de la mezcla de ISO y PIRA

Los estudios de degradación fotocatalítica fueron monitorizados en el sistema MSFIA-separación cromatográfica empleando las condiciones descritas en la parte experimental. El esquema del sistema de monitorización y degradación en línea se muestra en la Figura 2. Las condiciones cromatográficas para la separación de los fármacos fueron implementadas en el sistema MSFIA y optimizadas a partir de las condiciones descritas por Zhou y col. [12]. En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de degradación obtenidos para cada fármaco en 240 min de reacción realizados en disoluciones sintéticas (agua MilliQ), donde se observa que PIRA mostró mayor resistencia a la degradación (porcentaje de remoción aproximado 70%) independientemente de las condiciones empleadas, mientras que el proceso fue más eficiente para ISO (porcentaje de degradación del 90%) bajo las mejores condiciones experimentales obtenidas (ver Figura 3).

Las condiciones óptimas para la degradación de la mezcla de fármacos fueron determinadas aplicando la metodología de deseabilidad conjunta (D, desirability function) [13] para obtener un porcentaje máximo de degradación para ISO y PIRA, donde se eligió como tratamiento óptimo aquella combinación de niveles de las variables que tuvieron el valor D más elevado. El valor denominado deseabilidad conjunta D representó la media geométrica de los valores de las deseabilidades individuales (di); es decir:

$$D = (d_1 \times d_2)^{1/2} \quad (1)$$

Las condiciones óptimas de proceso encontradas fueron las siguientes (Figura 3): tipo de catalizador, TiO<sub>2</sub>; cantidad de catalizador, 1 g/L; y radiación UV, 365 nm con los cuales se estimaron los porcentajes de degradación para ISO y PIRA del 70.5 y 77.7%, respectivamente.

Sin embargo, bajo estas condiciones experimentales el porcentaje de mineralización para la mezcla de fármacos fue 5 %. Con el objetivo de mejorar la eficiencia de degradación y mineralización de estos compuestos, se evaluó el efecto del pH de la disolución en la degradación de la mezcla de fármacos. El TiO<sub>2</sub> es un semiconductor que presenta una alta estabilidad química [10,11], por lo que el pH estudiado fue 3, 5 y 7. Los resultados del porcentaje de degradación para ISO y PIRA en función del pH se muestran en la Figura 4. Como se puede observar, el proceso de degradación fue más eficiente para ambos fármacos a pH 7. El porcentaje de degradación fue del 91% para ISO y PIRA a los 240 min de reacción. Así el pH seleccionado para realizar la degradación de la mezcla fue 7, además de ser el pH natural al que se encuentran las muestras reales. Para valores de pH más altos que el punto isoeléctrico (pzc) del dióxido de titanio (pzc TiO<sub>2</sub> = 6.3) [14], la superficie se carga negativa-mente; por tanto los fármacos poseen una baja adsorción sobre el catalizador a este pH, debido a que se presentan con carga negativa (valores de pKa de 0.5 para PIRA, y de 1.8, 3.5 y 10.8 para ISO, respectivamente) [15]. Cuando el pH de la disolución es mayor que el punto isoeléctrico, los grupos hidroxilos en la superficie del TiO<sub>2</sub> aumentan, teniendo como consecuencia una generación más rápida de grupos OH que aceleran la oxidación de la mezcla de fármacos.

Nuevo D	Alto Act Bajo	Catalizador		Masa de catalizador (g/L)		Radiación UV (nm)	
		TiO <sub>2</sub>	ZnO	0.5	1.0	254	365
0.06438		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		[-1.0]	[1.0]	[-1.0]	[1.0]	[-1.0]	[-1.0]
<b>Compuesto</b> <b>Deseabilidad</b> 0.06438							
ISO 240 Máximo $y = 70.4822$ $d = 0.01607$							
PIRA 240 Máximo $y = 77.7254$ $d = 0.25785$							

Figura 3. Gráfica de función de deseabilidad compuesta (D) para la optimización del porcentaje de degradación de la mezcla de fármacos.

Por otro lado, se evaluó el efecto de la intensidad de la radiación (365 nm) en la degradación de la mezcla de ISO y PIRA. Las intensidades evaluadas en el proceso fotocatalítico fue 300 y 5500  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Se encontró que el porcentaje de remoción de PIRA aumentó con el incremento en la intensidad de la luz, dado que los porcentajes fueron 92% para 300  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  y 100% para 5500  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Sin embargo, para el caso de ISO, el porcentaje de degradación no se vio afectado por el aumento en la intensidad de radiación (100%). Sin embargo, el principal efecto de la intensidad se presentó en el porcentaje de mineralización. El porcentaje de mineralización fue evaluado mediante el seguimiento de la variación del COT, el cual disminuyó hasta un 71% después de 300 min cuando se aplicó la intensidad de 5500  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Estos resultados se encuentran de acuerdo con la mayor parte de los estudios que relacionan el incremento en el porcentaje de degradación en fotocatalisis con el aumento de la intensidad de luz irradiada [11,16].

Adicionalmente se realizaron pruebas control como la degradación de la mezcla de ISO y PIRA bajo luz UV (fotólisis, sin catalizador) y adsorción con TiO<sub>2</sub> Degussa P25 en oscuridad. Los resultados se muestran en la Figura 5. Para el caso de PIRA (Figura 5A) tanto el proceso de adsorción como en el de fotólisis, por sí solos no tienen efecto en la degradación del contaminante. Para el caso de ISO (Figura 5B) la adsorción con el catalizador tampoco tiene efecto en la remoción, sin embargo, por fotólisis disminuye la concentración en un 14%. Los resultados anteriores resaltan la importancia del proceso fotocatalítico para alcanzar la remoción completa de estos fármacos.

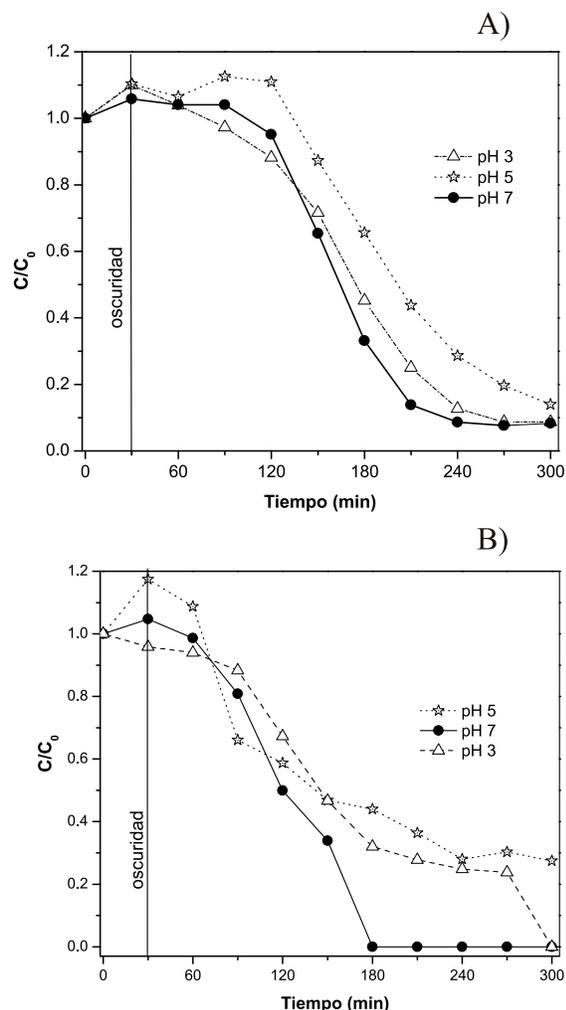


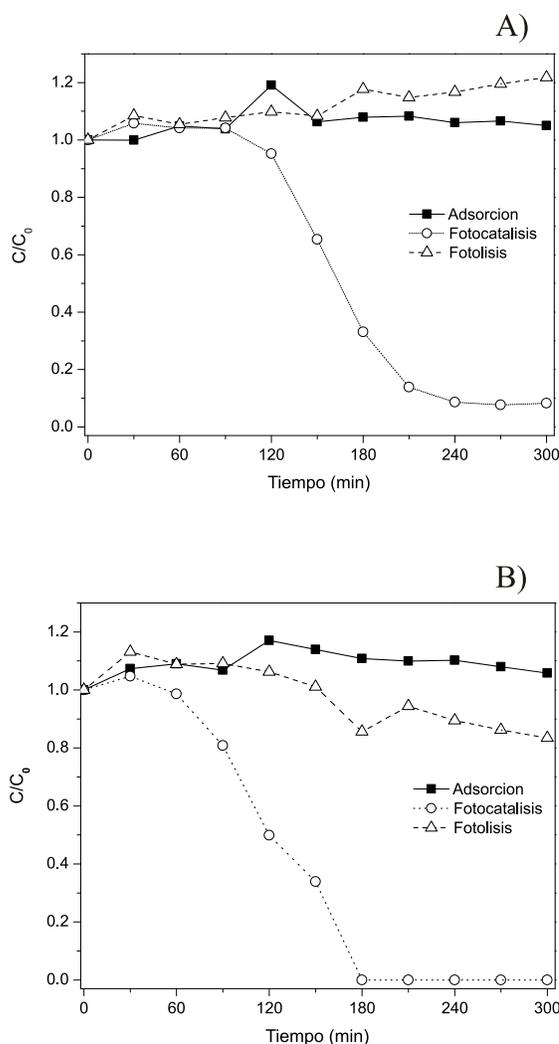
Figura 4. Efecto del pH en la degradación fotocatalítica con TiO<sub>2</sub> Degussa P25 de la mezcla de A) PIRA y B) ISO. Cantidad de catalizador 1 g/L.

Las condiciones finales en el proceso de degradación que fueron empleadas para el tratamiento de las muestras enriquecidas con los fármacos fueron: pH 7, 1 g/L de catalizador TiO<sub>2</sub> y radiación UV de 365 nm con una intensidad de 4000  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

### 3.2 Degradación de isoniazida y pirazinamida en matrices reales de agua

Dos muestras de agua (agua de presa y agua de río) a las que fueron adicionados los fármacos de PIRA e ISO en concentraciones 5 mg/L y 10 mg/L, respectivamente (Tabla 3) fueron tratadas empleando las condiciones de degradación propuestas en este trabajo, con la finalidad de evaluar el efecto de los componentes de la matriz en la degradación.

El porcentaje de degradación para ISO y PIRA fue ligeramente menor en éstas muestras (93.4%) a los 240 min comparado con el resultado obtenido en la disolución modelo que contenían la mezcla de 5 y 10 mg/L de PIRA e ISO, respectivamente (Figura 6).



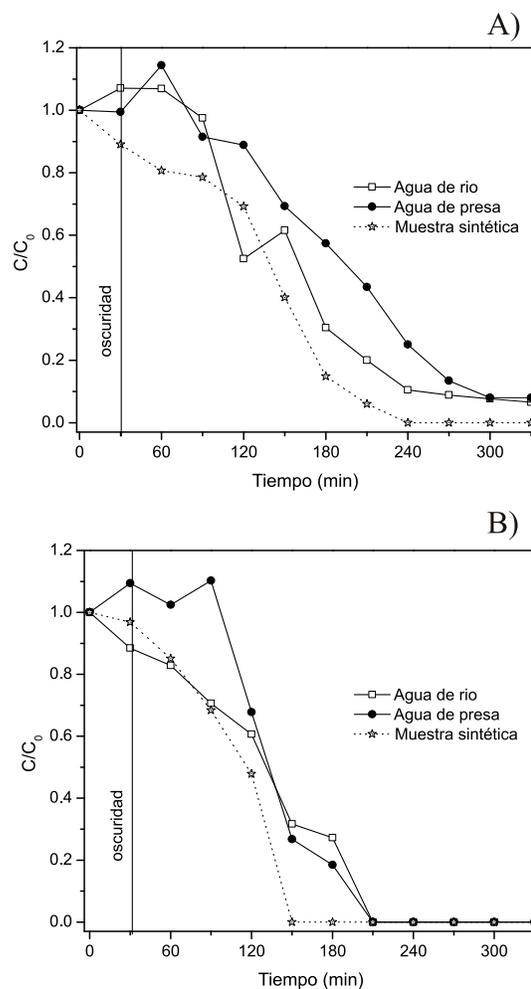
**Figura 5.** Degradación de la mezcla de (A) PIRA y (B) ISO con TiO<sub>2</sub> Degussa P25: fotocatalísis; control de adsorción y control de fotólisis a pH 7.

**Tabla 3.** Parámetros fisicoquímicos de muestras de agua tratadas por fotocatalísis usando TiO<sub>2</sub> Degussa P25.

Muestra	pH	Conductividad (μS/cm)	COT (mg/L)
Agua de presa	7.9	416	4.1
Agua de río	8.1	921	6.3

Este efecto puede deberse al contenido de materia orgánica (COT 4.1 y 6.3 mg/L) así como a las sales presentes (conductividad 416 y 921 S/cm). Sin embargo, éste efecto no fue notable en el caso del fármaco ISO, ya que la remoción fue del 100% en 240 min. En cuanto a la mineralización, el porcentaje de remoción de COT fue menor respecto al obtenido en la muestra sintética (45.6% y 59.9 % en agua de río y de presa respectivamente). La presencia de los componentes de naturaleza orgánica e inorgánica del agua inhiben el proceso fotocatalítico de degradación

de los fármacos, ya que compiten por los sitios activos del catalizador.



**Figura 7.** Degradación de los fármacos (A) PIRA y (B) ISO en matrices reales de agua. Las condiciones experimentales fueron 1 g/L de TiO<sub>2</sub> y pH 7 de la disolución.

#### 4. Conclusiones

Mediante el sistema MSFIA-separación cromatográfica se llevó a cabo la monitorización de la degradación de los fármacos de estudio, a través del acoplamiento de un reactor fotocatalítico al sistema. La degradación fotocatalítica simultánea de ISO y PIRA se vio favorecida empleando TiO<sub>2</sub> Degussa P25, longitud de onda de irradiación 365 nm (5500 μW/cm<sup>2</sup>), masa de catalizador 1 g/L y pH de la disolución 7, alcanzando porcentajes de degradación del 100% para PIRA e ISO en 240 min. El fármaco más resistente a la degradación fotocatalítica bajo las condiciones establecidas fue PIRA, lo que se atribuye principalmente a la estabilidad del anillo de la pirazina. Se realizó el estudio de degradación en muestras de agua de río y agua de presa. En el agua de río se obtuvo menor porcentaje de mineralización, debido a la presencia de otros componentes de naturaleza orgánica e inorgánica que compiten por los sitios activos del catalizador, reduciendo así el

## 5. Agradecimientos

Los autores agradecen a SEP-PROMEP/103.5/11/4330 y PAICYT-UANL 2011 por el apoyo económico para la realización de este trabajo. Guevara-Almaraz agradece la beca para estudios de maestría otorgada por CONACyT.

## 6. Referencias

1. Petrovic, M.; Gonzalez, S.; Barcelo, D.; TrAC, Trends Anal. Chem. 2003, 22, 685-696.
2. Pal, A.; Gin, K.Y.H.; Lin, A.Y.C.; Reinhard, M.; Sci. Total Environ. 2010, 408, 6062-6069.
3. Santos, L.H.M.L.M.; Araujo, A.N.; Fachini, A.; Pena, A.; Delerue-Matos, C.; Montenegro, M.C.B.S.M.; J. Hazard. Mater. 2010, 175, 45-95.
4. Kuster, M.; Lopez de Alda, M.J.; Hernando, M.D.; Petrovic, M.; Martin-Alonso, J.; Barcelo, D.; J. Hydrol. 2008, 358, 112-123.
5. Zazueta-Beltran, J.; León-Sicairos, C.; Canizalez-Roman, A.; J. Infect. Dev. Ctries, 2009, 3, 162-168.
6. Zenteno-Cuevas, R.; Rubí, A.; Fuentes-Domínguez, J.; Lara-González, J.L.; Escobar-Mesa, A.; J. Infect. Dev. Ctries. 2010, 4, 776-778.
7. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades <http://www.cenavece.salud.gob.mx/>. (acceso el 2 de septiembre del 2011)
8. Kumar, L.; Sharma, V.; Asian J. Pharm. Res. 2012, 2, 59-62.
9. Esplugas, S.; Bila, D.M.; Krause, L.G.T.; Dezotti, M.; J. Hazard. Mater. 2007, 149, 631-642.
10. Blesa M.A.; (Ed.), Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogénea, Digital Grafic, La Plata, 2001.
11. Kabra, K.; Chaudhary, R.; Rameshwar L.; Sawhney, C; Ind. Eng. Chem. Res. 2004, 43, 7683-7696.
12. Zhifeng, Z.; Lingyun, C.; Peng, L.; Mei, S.; Fei Z.; Anal. Sci. 2010, 26, 1133-1138.
13. Derringer, G.; Suich, R.; J. Qual. Technol. 1980, 12, 214-219.
14. Chou, J.; Liao, L.; Thin Solid Films 2005, 476, 157-161.
15. Wheate, N.; Vora, V.; Anthony, N.; McInnes F.; J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem. 2010, 68, 359-367.
16. Jin-Chung, S.; Sze-Mun L.; Abdul-Rahman M.; Keat-Teong L.; Int. J. Photoenergy, 2012, Article ID 185159, 23 pages, doi:10.1155/2012/185159.