

Tratamiento con ozono de disoluciones acuosas de amoxicilina

Treatment with ozone of amoxyciline water dissolutions

Mabel Bonet, Mayra Bataller*, Eliet Veliz, Janet Piloto^A, Lidia A. Fernández, O. Ledea

^ALaboratorio de Toxicología, Centro de Investigación Desarrollo de Medicamentos, CIDEM

*Dirección de Investigación, Desarrollo e Innovación, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, CNIC

Apartado Postal 6414, Playa, La Habana, Cuba. *mayra.bataller@cnic.edu.cu

Recibido: 10 de junio de 2019;

Aceptado: 18 de noviembre de 2019;

RESUMEN

Compuestos farmacéuticos han sido detectados en efluentes de plantas de tratamiento, en cuerpos de agua y ecosistemas. Debido a esta situación y al riesgo potencial, por sus efectos negativos al medio ambiente, ellos han sido considerados contaminantes emergentes. Los antibióticos reciben una atención destacada por la ocurrencia de la resistencia bacteriana. La efectividad del ozono como tratamiento para la degradación de la amoxicilina ha sido reconocida por varios estudios. Sin embargo, se debate la toxicidad de los subproductos de reacción, lo cual puede ser una limitante para su aplicación. En este sentido, el objetivo de este estudio fue establecer las condiciones de ozonización para el tratamiento de disoluciones modelo de amoxicilina, evaluar su actividad genotóxica y proponer una alternativa para el tratamiento de las aguas residuales industriales. Para la evaluación de la degradación de la amoxicilina se realizaron experimentos a pH=7 durante 10 minutos de reacción con una concentración de ozono en el gas de 70 mg/L. Se obtuvo más del 99% de reducción de la amoxicilina en cinco minutos. Además, fue aplicado un diseño experimental ²² para tiempos de contacto de 30 y 60 minutos a pH= 7 y 12. Se observó la presencia de dos grupos de subproductos de reacción (S-1 y S-2). El grupo S-2 es degradado a los 10 minutos, mientras que el S-1 permanece bajo todas las condiciones de tratamiento. Los resultados del ensayo de Ames indicaron que no son mutagénicas las muestras ozonizadas. Se propone como alternativa para el tratamiento de las aguas residuales industriales las condiciones de operación de pH entre 7 y 8, un tiempo de contacto de 30 minutos y una concentración de ozono en el gas de 70 mg/L. Los resultados demuestran la efectividad del empleo del ozono bajo las condiciones experimentales evaluadas.

Palabras claves: Contaminantes emergentes, antibióticos, amoxicilina, ozonización.

ABSTRACT

Pharmaceutical compounds have been detected in effluents from treatment plants, in water bodies and ecosystems. Due to this situation and the potential hazard caused by the negative effects on the environment, they have been considered emerging pollutants. Antibiotics receive outstanding attention attributable to the occurrence of bacterial resistance. The ozone treatment efficient for the amoxicillin degradation has been recognized by several studies. However, it is debated the reaction byproducts toxicity, which may be a limitation for the ozone application. In this sense, the objective of this study was to establish the ozonation conditions for the treatment of model amoxicillin solutions, to evaluate the genotoxic activity and to propose an alternative treatment for the industrial wastewater. To evaluate the amoxicillin degradation, experiments were carried out at pH=7 during 10 minutes of reaction with a gaseous ozone concentration of 70 mg / L. More than 99% of the amoxicillin reduction was obtained in five minutes. In addition, an experimental design ²² was applied for contact times of 30 and 60 minutes at pH= 7 and 12. The presence of two reaction byproducts groups (S-1 and S-2) was observed. The degradation of the group S-2 was at 10 minutes, while S-1 remained under all treatment conditions. The results of the Ames test indicated that ozonized samples were not mutagenic. It is proposed as a treatment alternative for the industrial wastewater the operating conditions of pH between 7 and 8, a contact time of 30 minutes and a gaseous ozone concentration of 70 mg /L. The results showed the effective of ozone application under the experimental conditions evaluated.

Keywords: Emerging contaminants, antibiotics, amoxicillin, ozonation.

INTRODUCCION

Los contaminantes emergentes (CE) en la mayoría de los casos son sustancias no reguladas a nivel internacional, que han sido detectadas en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y en fuentes de abasto. No obstante, están sujetos a futuras regulaciones debido a sus efectos potencialmente negativos a la salud humana y a los ecosistemas (Fent *et al.*, 2006; Schriks *et al.*, 2010; Hernando *et al.*, 2011; Fatta-Kassinos *et al.*, 2011; Stuart *et al.*, 2012; Rubio y Delgado, 2015).

Por lo tanto, es necesario aplicar tratamientos seguros y avanzados para la disposición de las aguas residuales de diferentes procedencias, dado que estas constituyen una de las fuentes de origen de la presencia de los CE en los ecosistemas y fuentes hídricas (García-Gómez *et al.*, 2011; Gracia-Lor *et al.*, 2012; Rivera-Utrilla *et al.*, 2013; Michael *et al.*, 2013). Entre los tratamientos sugeridos está la ozonización y los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs) que permiten una oxidación fuerte de compuestos recalcitrantes presentes en las aguas residuales convirtiéndolos en más oxigenados y biodegradables (Stasinakis *et al.*, 2008; Homem y Santos, 2011; Benitez *et al.*, 2013; Gadipelly *et al.*, 2014, von Gunten 2018).

De todos los CE los que probablemente han suscitado mayor preocupación y estudios en los últimos años son los fármacos y en particular los antibióticos (Kümmerer, 2009; Fatta-Kassinos *et al.*, 2011; Rivera-Utrilla *et al.*, 2013). Una de las causas se corresponde con la detección de la toxicidad de varios antibióticos para determinadas especies acuáticas (Andreozzi *et al.*, 2004; Sanderson *et al.*, 2004;). Además, la presencia de los mismos en fuentes de aguas y sedimentos ha incrementado el fenómeno de la resistencia bacteriana con consecuencias desfavorables, en particular para la salud humana (Kristiansson *et al.*, 2011; Varol Saraçoğlu *et al.*, 2014; Gothwal, R. & Shashidhar, 2015; OMS, 2018).

En Cuba, se desarrolla la Industria Biofarmacéutica y las empresas involucradas generan aguas residuales que requieren de un tratamiento seguro antes del vertimiento. Este aspecto está identificado en la estrategia ambiental del sector. En este sentido, la Empresa Farmacéutica que produce antibióticos del grupo betalactámicos lleva a cabo un proceso inversionista. Dentro del grupo referido está la amoxicilina, que es objeto de estudio del presente trabajo. Este antibiótico tiene una reconocida aplicación terapéutica dado su amplio espectro de actividad bactericida contra microorganismos Gram-positivo y Gram-negativo. Su estructura se muestra en la Figura 1 (Kidak y Doğan, 2018).

Para la eliminación de antibióticos, en matrices acuosas, tanto la ozonización como los POAs han sido reconocidos como tratamientos eficientes (Belghadr *et al.*, 2014; Marcelino *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2017; Giraldo *et al.*, 2018; Norte *et al.*, 2018). El ozono en soluciones acuosas puede reaccionar directamente por la vía molecular (predomina en condiciones ácidas a $\text{pH} < 4$) con sustancias orgánicas e inorgánicas disueltas. También, puede reaccionar indirectamente (predomina en medio alcalino a $\text{pH} > 10$) debido a su descomposición en radicales OH^\bullet , que reaccionan inmediatamente con los solutos. Esta segunda vía de reacción es la que se encuentra presente en los POAs.

Consecuentemente, se reporta la efectividad de la oxidación con ozono de varios antibióticos betalactámicos y entre ellos la amoxicilina, pero se debate respecto a la toxicidad de los productos intermedios y subproductos de reacción. Esto puede ser una limitante para su aplicación si no se define adecuadamente las condiciones de operación y su implementación.

Para determinar la eficiencia de degradación de ampicilina con ozono Jung *et al.* (2012) realizaron un estudio a diferentes valores de pH. Como resultado a pH altos obtuvieron valores mayores de constantes cinéticas y la degradación del fármaco en 20 minutos de ozonización, mientras que a pH=5,0 y 7,2 se formaron subproductos tóxicos que se mantuvieron hasta después de 100 minutos de tratamiento. Por otra parte, Andreozzi *et al.* (2005) alcanzaron a pH=5,5 inicial y no controlado más del 90% de degradación de la amoxicilina en cuatro minutos de ozonización, pero una baja mineralización durante tiempos prolongados. Los resultados indicaron la presencia de productos intermedios y subproductos por lo que se sugirió la evaluación toxicológica de las muestras tratadas. Se evidenció que la constante cinética aumentó con el incremento del pH.

La toxicidad de los productos intermedios de la ozonización de la amoxicilina también fue evaluada por Kidak y Doğan (2018). Estos autores, bajo sus condiciones experimentales, obtuvieron un 32% de mineralización y compuestos intermedios con una alta toxicidad en la disolución final. Sin embargo, con la aplicación de ultrasonido junto a la ozonización se alcanzó una mineralización de 45% y se logró reducir la toxicidad. Para este estudio se empleó pH=10 controlado, pues en condiciones ácidas a los 30 minutos no fue posible degradar el antibiótico.

Lefebvre *et al.* (2013) aplicaron el ozono como pretratamiento de la amoxicilina antes de un biorreactor y detectaron la disminución de su eficiencia dada la toxicidad de los subproductos generados de la ozonización. Marcelino *et al.* (2017) estudiaron la ozonización en un intervalo de pH=5 a 12 y lograron una eliminación del 99% del fármaco. Además, obtuvieron un óptimo a pH=9,6 con una remoción del carbono orgánico total (COT) del 46% y una disminución del 62% de la toxicidad en las muestras.

Recientemente, Norte *et al.* (2018) reportaron resultados de la ozonización de antibióticos betalactámicos en disoluciones modelos. Respecto a la amoxicilina a pH= 7 con 30 minutos de reacción obtuvieron una degradación del 95%, así como un 10% de disminución del COT y del 60% de la toxicidad. Para el tratamiento de un agua residual industrial, bajo las mismas condiciones, se alcanzó un 90% de eliminación del fármaco y la máxima reducción (99%) a pH=12.

Por otra parte, Souza *et al.* (2017) realizaron un estudio de comparación entre POAs que involucran la ozonización como: la alcalina, con radiación (O_3/UV), la catalítica homogénea (O_3/Fe^{2+}) y la fotocatalítica homogénea ($O_3/Fe^{2+}/UV$). Estos autores seleccionaron la aplicación del ozono a pH=10 como la mejor alternativa logrando la degradación de la amoxicilina entre 5 y 10 minutos junto a la eliminación de la ecotoxicidad.

Teniendo en cuenta estas premisas el presente trabajo tiene como objetivos establecer las condiciones de ozonización para el tratamiento de disoluciones modelo de amoxicilina, evaluar la genotoxicidad de las mismas y proponer una alternativa del tratamiento para las aguas residuales procedentes de la industria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Instalación experimental de laboratorio

La Figura 2 presenta un esquema de la instalación experimental del laboratorio (CNIC). Las ozonizaciones de las disoluciones de amoxicilina se llevaron a cabo en operación semicontinua con el empleo de una columna de burbujeo de 100 mL (5) equipada con un difusor de vidrio poroso, toma muestra (11), entrada (8) y salida de gas (9). La columna se acopló a un baño termostático (10) (FrigomixU-2, Alemania) para el control de la temperatura durante las ozonizaciones a $25 \pm 0,1$ °C.

La mezcla oxígeno-ozono se obtuvo con el empleo de un equipo generador de ozono (AQOZO, Cuba) (2) que se alimentó con oxígeno comprimido en un cilindro (1). El ozono residual en el gas, que no reaccionó, fue destruido catalíticamente a la salida de la columna (12). Se empleó un flujo de gas de 5 L/h (3) y una concentración de ozono en el gas a la entrada de la columna de 70 mg/L. La concentración de ozono en el gas fue determinada a 256 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Farmacia LKB, Reino Unido) (4). Las muestras ozonizadas se tomaron a diferentes tiempos de tratamiento para su evaluación. En el frasco donde estas se tomaron se burbujó un flujo de nitrógeno durante un minuto para purgar el ozono disuelto y detener la reacción.

Evaluación de la degradación de la amoxicilina en las disoluciones ozonizadas

Para evaluar el tiempo de degradación de la amoxicilina sin la posible interferencia de subproductos generados se realizaron dos experimentos a pH= 7 durante 10 minutos de reacción. Uno a pH= 7 inicial ajustado y no controlado (ajustado solo al inicio del experimento y sin empleo de solución tampón) y otro a pH= 7 controlado (con empleo de solución tampón).

Evaluación de la degradación de los subproductos

Para evaluar la degradación de los subproductos generados en las disoluciones ozonizadas fue realizado un diseño experimental ²². Se analizó el efecto en la degradación debido a los factores: tiempo de contacto (30 y 60 minutos) y del pH (7 y 12 inicial ajustado y no controlado).

Preparación de las disoluciones modelo de amoxicilina

Para la preparación de las disoluciones modelo se empleó amoxicilina con un 99,99 % de pureza, proporcionada por la Empresa Farmacéutica y agua ultrapura, partiendo de concentraciones iniciales de 36,5 mg/L (1×10^{-4} mol/L) y de 148,2 mg/L (4×10^{-4} mol/L). Estos valores están dentro del intervalo de 20 a 150 mg/L empleado por otros autores (Andreozzi *et al.*, 2005; Kidak y Doğan, 2017; Norte *et al.*, 2018).

La disolución de amoxicilina presentó un valor de pH= $6,15 \pm 0,30$ y para el ajuste a pH= 7 y 12 se añadió hidróxido de sodio. En los experimentos a pH=7 controlado se prepararon las disoluciones empleando una solución tampón de fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4) y dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4).

Determinaciones para el seguimiento de la degradación de amoxicilina y subproductos

La determinación de las concentraciones de amoxicilina y el seguimiento de la presencia de subproductos se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). En la Tabla 1 se presentan las condiciones cromatográficas. Se emplearon los sistemas de CLAR-1 y CLAR-2 que están conformados en cada caso, entre otros elementos, por un detector UV K-2501 e interfase (Knauer, Alemania) y sus respectivos programas Claritychrom y Eurochrom 2000 (Knauer).

Las mediciones de los experimentos a pH=7 inicial ajustado y no controlado con una concentración inicial de amoxicilina de 36,5 mg/L fueron realizadas en el sistema de CLAR de la Empresa Farmacéutica (CLAR-1). Por otra parte, las mediciones de los experimentos a pH=7 controlado fueron realizadas en el sistema de CLAR del CNIC (CLAR-2) empleando concentraciones mayores del fármaco (148,2 mg/L) para poder detectar su concentración durante el tiempo de tratamiento debido a que el límite de cuantificación es más alto (5 mg/L).

La presencia de una coloración en las disoluciones ozonizadas fue seguida con la determinación de la absorbancia a 450 nm (Abs_{450}) en un espectrofotómetro UV-VIS (Pharmacia LKB, Reino Unido).

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. Para el procesamiento estadístico de los resultados se empleó el programa de computación Microsoft® Excel 2010 y el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.

Evaluación de la actividad genotóxica de las muestras ozonizadas de disoluciones de amoxicilina

El estudio del potencial genotóxico de las muestras ozonizadas fue realizado mediante el Ensayo de Reversión Bacteriana en *Salmonella typhimurium* (Salmonella / Microsoma) o Test de Ames en el

Laboratorio de Genética Toxicológica del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos CIDEM. Las cepas TA 98 y TA 100 de *Salmonella thyphimurium* fueron donadas por la Universidad Autónoma de México. Como control negativo se empleó agua destilada estéril y como controles positivos se utilizaron los mutágenos directos e indirectos, reconocidos para este ensayo (Tabla 2). La fracción postmicrosomal S9 (sistema exógeno de activación metabólica) se preparó a partir de hígado de ratas Wistar machos de 200 g de peso tratadas con fenobarbital y benzonaftoflavona (Sigma, EE.UU.) (Gatehouse *et al.*, 1994; OECD Test No. 471, 1997; Mortelmans y Zeiger, 2000). La fracción S9 es uno de los componentes de la mezcla S9, que se explica más adelante.

Se evaluaron cuatro muestras de disoluciones ozonizadas de amoxicilina procedentes del diseño experimental 2² que se denominaron M1: pH 7 (60 min), M2: pH 7 (30 min), M3: pH: 12 (60 min), M4: pH 12 (30 min). El ensayo de Ames se realizó dos veces y cada muestra ozonizada por triplicado. Por ejemplo, con la cepa TA 98 se utilizaron tres réplicas por cada muestra con y sin la mezcla S9 y en otro momento se repitió el ensayo con estas mismas condiciones. De igual manera se procedió con la cepa TA 100.

Se empleó el método de incorporación en placa (Gatehouse *et al.*, 1994; OECD Test No. 471, 1997; Mortelmans y Zeiger, 2000). En cada placa de medio mínimo Vogel Bonner E (VBE) se vertieron 2 mL de agar suave a los que se le incorporó previamente 0,1 mL del cultivo bacteriano, 0,1 mL de la muestra ozonizada y según el caso 0,5 mL de la mezcla S9. En el momento del ensayo se preparó la mezcla S9 que contenía KCl 33 mM, MgCl₂ 2,8 mM, NADP 4 mM, Glucosa 6-fosfato 5 mM, un 4% de fracción S9 y tampón-fosfato de sodio 200 mM a pH 7,4. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h y al cabo de ese tiempo se contó el número de colonias revertantes por placa (Maron y Ames, 1983; Gatehouse *et al.*, 1994; OECD Test No. 471, 1997; Mortelmans y Zeiger).

Se aplicó el programa estadístico SALANAL versión 1.0 diseñado para el análisis de los resultados en el ensayo de Ames (Agencia de Protección del Medio Ambiente de los EE.UU). Permite calcular la significación estadística de las diferencias observadas entre las frecuencias promedios del control negativo y los tratamientos con ozono. Asimismo, valorar si los efectos observados mantienen una relación proporcional a dichos tratamientos.

Un resultado positivo se define como un aumento en el número de colonias revertantes que supere por más de dos veces al obtenido en el control negativo (solvente), así como que muestre un incremento en el número de colonias revertantes en función de las muestras ozonizadas bajo diferentes tratamientos (valores de pH y tiempos de contacto) (Maron y Ames, 1983; Gatehouse *et al.*, 1994; OECD Test No. 471, 1997; Mortelmans y Zeiger, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSION

Ozonización de amoxicilina a pH=7 inicial ajustado y no controlado durante 10 minutos

Los resultados de la degradación de la amoxicilina (Tabla 3) indicaron que se detectó el fármaco a los dos minutos con un 91% de reducción bajo estas condiciones de tratamiento y concentración inicial de amoxicilina de 36,50 mg/L. Así como, que se logró una reducción del 99% (para el límite de cuantificación del sistema CLAR-1) a partir de los cuatro minutos de ozonización.

La eliminación de la amoxicilina en corto tiempo coincide con lo reportado por otros autores bajo diferentes condiciones experimentales. Andreozzi *et al.* (2005) obtuvieron a los cuatro minutos una degradación mayor del 90%, mientras Souza *et al.* (2017) lograron una completa degradación entre cinco a 10 minutos de contacto.

Ozonización de amoxicilina a pH=7 controlado durante 10 minutos

Por otra parte, para pH=7 controlado también se aplicó un tiempo de contacto de 10 minutos, pero con una concentración inicial de amoxicilina de 148,20 mg/L (Tabla 4). En este caso, debido a que la concentración es más elevada, el tiempo en que la amoxicilina se degradó completamente (según el límite de cuantificación CLAR-2) se extendió después de los cinco minutos, aunque en ese tiempo se logró una eliminación del $96,6\% \pm 1,4$ (Figura 3). El resultado indicó que, bajo estas condiciones de ozonización, también se alcanzaron altos porcentos de reducción en los primeros cinco minutos de reacción partiendo de una concentración más elevada del fármaco.

En este experimento se apreció un cambio de coloración de la disolución y para evaluar este efecto se determinó el valor de la absorbancia a 450 nm (Abs_{450}) por espectrofotometría UV-VIS (Figura 3). La coloración comenzó a adquirir intensidad aproximadamente a los 1,5 minutos de reacción con un valor de $Abs_{450} = 0,014 \pm 0,001$ incrementando hasta los cuatro minutos con un registro máximo de $0,045 \pm 0,001$, donde comenzó a disminuir hasta llegar a $Abs_{450} = 0$ a los 10 minutos de tratamiento. Este efecto no fue visible en el experimento anterior, dado el empleo de un valor más bajo de concentración inicial de amoxicilina, que puede influir en una ocurrencia de menor magnitud. Esta coloración está asociada a la aparición de subproductos o productos intermedios.

Evaluación de la degradación de subproductos en las disoluciones ozonizadas

Ozonización a pH= 7 y 12 inicial ajustado y no controlado para 30 y 60 minutos

Los resultados anteriores indicaron que bajo las condiciones de ozonización aplicadas la amoxicilina se degradó en los primeros cinco minutos. Sin embargo, la presencia y degradación de subproductos generados en las disoluciones ozonizadas deben ser evaluadas. Consecuentemente, se realizó un diseño experimental 2^2 : pH= 7 y 12 inicial ajustado y no controlado para 30 y 60 minutos. Se empleó el sistema CLAR-1 partiendo de disoluciones con concentración inicial de amoxicilina de 36,5 mg/L.

En Figura 4.1 a) se muestra el cromatograma inicial de la amoxicilina con un tiempo de retención de 2,20 minutos a pH=7. La Figura 4.2 a) presenta el cromatograma inicial a pH=12 con dos picos representando a la amoxicilina, esto pudiera ser por la protonación del compuesto. En las Figuras 4.1 b) y 4.1 c) así como en las 4.2 b) y 4.2 c) no se observa la presencia del fármaco en los cromatogramas correspondientes a los 30 y 60 minutos de reacción para ambos pH.

Los resultados indicaron el registro de un subproducto o grupo de subproductos (grupo S-1) con tiempos de retención de 0,83 y 0,90 minutos para pH= 7 y 12, respectivamente. Así como, la posible formación de compuestos más polares ya que son más solubles en la fase móvil (polar) y menos retenidos en la columna cromatográfica (apolar). Esto se puede inferir por los tiempos menores de retención obtenidos respecto a la amoxicilina. Los picos registrados se corresponden con subproductos de la ozonización dada su intensidad y como estos no son simétricos se sugiere la existencia de una mezcla de compuestos.

Como se desconoce la identidad del grupo S-1 obtenido en las muestras ozonizadas, bajo las condiciones experimentales aplicadas, no es posible determinar la concentración del mismo y solo pueden ser procesados los valores de las áreas de los picos de los cromatogramas. De esta manera, el efecto de las variables aplicadas, pH y tiempo de contacto, en la degradación del grupo S-1 fue comprobado estadísticamente con los resultados del diseño experimental 2^2 . Se obtuvo una diferencia significativa del efecto del incremento del pH en la eliminación del grupo S-1, mientras que el tiempo de contacto y la interacción entre ambas variables (AB) resultaron no significativos (Figura 5).

A partir de la simplificación de los términos no significativos del modelo más general se obtuvo el resultado siguiente:

$$\text{Area grupo S-1} = 256,10 - 9,333 \cdot \text{pH} \quad R^2: 93,2 \%$$

El coeficiente negativo del término lineal indica físicamente la disminución del área del grupo S-1 con respecto al aumento del pH, única variable significativa según el diseño experimental.

Ozonización a pH= 7 y 12 inicial ajustado y no controlado para diferentes tiempos

Se realizaron otras mediciones por CLAR-1 para tiempos de 2, 4, 6 y 10 minutos, fuera del diseño experimental, para evaluar el seguimiento de la formación y degradación del grupo de subproductos S-1. En la Figura 6 se muestra que, para ambos pH, a los dos minutos de reacción se obtuvo para el grupo S-1 un valor máximo del área del pico registrado en el cromatograma.

Se alcanzaron valores de $285,62 \pm 7,24$ a pH= 7 y de $204,06 \pm 4,96$ a pH= 12 seguidos de una tendencia a disminuir de manera apreciable hasta los 10 minutos de reacción con áreas de $211,13 \pm 3,72$ y de $54,86 \pm 0,42$ para cada pH respectivamente. Sin embargo, para el pH= 7 se obtuvo poca diferencia a partir de los 10 minutos respecto a los tiempos de 30 y 60 con valores de $190,90 \pm 5,44$ y $190,64 \pm 3,24$. El mismo comportamiento se observa para pH= 12 pero con una diferencia mucho menor en el intervalo de tiempo referido (con áreas de $49,99 \pm 5,19$ y de $47,07 \pm 6,65$).

La Tabla 5 muestra la eficiencia de reducción del área del grupo S-1, para ambos pH, con respecto al valor máximo que alcanzó en los dos primeros minutos. En términos de porcentaje de reducción se obtuvo de 10 a 60 minutos de ozonización una diferencia solo de un 7,05 % para pH=7 y de un 3,75 % para pH=12. Esto corrobora que en ese intervalo de tiempo no hubo un efecto apreciable en la degradación del grupo S-1 bajo las condiciones experimentales aplicadas. También, que una vez formado el grupo S-1 se observó un efecto mayor en la reducción al incrementar el pH. Esto está dado por la formación de los radicales OH^\cdot que presentan un poder oxidante mayor que el ozono. Un incremento de la degradación de subproductos a pH básico ha sido reportado por otros autores (Andreozzi *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2017).

Ozonización a pH= 7 controlado durante 10 minutos. Subproductos

Consecuentemente, se ejecutó para la evaluación de los subproductos un segundo experimento bajo las condiciones referidas. En la Figura 7 se muestran los cromatogramas correspondientes a los tres minutos de reacción. Los resultados indicaron la presencia de amoxicilina con un tiempo de retención de 4,22 minutos y el registro de dos subproductos o grupos de subproductos (grupo S-1 y S-2) con tiempos de retención de 2,23 y 3,15 minutos, respectivamente. Así como, que estos compuestos son más polares que la amoxicilina bajo las condiciones de estudio.

Como ya se ha planteado el empleo de una concentración mayor para el sistema CLAR-2 posibilitó la detección del grupo S-2 y el cambio de coloración en la disolución durante la ozonización, el cual no se apreció por el CLAR-1. En la Figura 8 se muestra un incremento de esta coloración junto a la formación del grupo S-2 desde el primero hasta el cuarto minuto, donde se registró un valor de $\text{Abs}_{450} = 0,062 \pm 0,001$ y un valor del área del pico del cromatograma de $6,51 \pm 1,2$. A partir de ese tiempo de tratamiento ambos valores comenzaron a disminuir de manera apreciable, obteniendo a los 10 minutos un valor de $\text{Abs}_{450} = 0$ y del área de $1,60 \pm 0,28$.

Respecto al grupo S-1 en el sistema CLAR-2 los valores fueron cuantificados hasta 10 minutos de reacción teniendo en cuenta los resultados de los acápites anteriores. En la Figura 8 se observó que el valor del área del pico del cromatograma incrementó hasta un máximo de $38,46 \pm 0,75$ a los cinco minutos y después decreció, registrándose a los 10 minutos un valor de $32,22 \pm 0,60$. Por lo tanto, se observó para el grupo S-1 una tendencia similar a los resultados obtenidos por CLAR-1 de mantenerse sin degradar bajo las condiciones de ozonización aplicadas.

La presencia de estos subproductos se corresponde con lo reportado por otros autores, y es la causa de la no mineralización completa del fármaco incluso aplicando diferentes POAs (Andreozzi *et al.*, 2005; Lefbrve *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2017; Kidak y Doğan, 2018; Norte *et al.*, 2018). Por otra parte, se han propuesto diferentes mecanismos o vías de formación de los productos intermedios y subproductos generados, que dependen del proceso de oxidación de la amoxicilina y las condiciones experimentales.

Por ejemplo, Andreozzi *et al.* (2005) sugieren que el ozono ataca principalmente el anillo fenólico y el átomo de azufre en los pasos iniciales de la oxidación, destruyendo la molécula del antibiótico. Kidak *et al.* (2017) resumen como posibles mecanismos de oxidación de este antibiótico: la hidroxilación (adición del OH al compuesto original), la apertura del anillo β -lactámico y la decarboxilación (pérdida del COOH) y reorganización del anillo tiazole. Además, se han identificado posibles subproductos según las vías de degradación: ácido 2-amino-2-(p-hidroxifenil) acético (Andreozzi *et al.*, 2005), ácidos carboxílicos con valores bajos de masa molar y refractarios a la oxidación química (Lefbrve *et al.*, 2013, Souza *et al.*, 2017).

Evaluación de la actividad genotóxica de las muestras ozonizadas de disoluciones de amoxicilina

Para la evaluación de cuatro muestras ozonizadas, bajo las condiciones del diseño experimental 2², denominadas M1: pH 7 (60 min), M2: pH 7 (30 min), M3: pH: 12 (60 min), M4: pH 12 (30 min) se emplearon las cepas TA 98 y TA 100. Estas cepas detectan mutaciones por adiciones o deleciones de bases y mutaciones por sustitución de pares bases respectivamente. Como se ha explicado el ensayo de Ames se realizó dos veces y cada muestra ozonizada por triplicado. Los resultados se muestran en las Figuras 9 y 10 indicando los valores promedio del número de colonias revertantes por placa con la desviación estándar para las muestras ozonizadas y los controles.

Se consideró como resultado de mutagenicidad positivo el aumento en el número de colonias revertantes que supere por más de dos veces la frecuencia de reversión del control negativo y que muestre un incremento en función de las muestras ozonizadas. Los resultados obtenidos en este estudio evidenciaron que no hubo incrementos significativos de la frecuencia de revertantes para las cepas evaluadas (Figuras 9 y 10).

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedios del número de colonias revertantes por placa de las muestras ozonizadas y el control negativo. Tampoco, fue evidente una respuesta positiva dependiente de las muestras ozonizadas bajo diferentes valores de pH y los tiempos de contacto aplicados, que definen las dosis de ozono. Por lo que se considera que las muestras evaluadas no tienen actividad genética en las cepas

estudiadas según las normativas internacionales que establecen estos parámetros como definatorios para los ensayos de reversión bacteriana.

Se puede concluir que las muestras ozonizadas de disoluciones de amoxicilina no son mutagénicas en las condiciones evaluadas. Este resultado es muy favorable para la propuesta de la ozonización como tratamiento, ya que en el presente trabajo se logró la degradación de la amoxicilina en tiempos cortos, pero se mantiene la presencia de subproductos en las disoluciones tratadas. Como se ha analizado bajo las condiciones experimentales aplicadas no se alcanzó la degradación de estos subproductos en su totalidad, por lo tanto la evaluación de la actividad genotóxica realizada es un complemento importante del estudio.

La alerta de toxicidad de subproductos de la ozonización de amoxicilina ha sido reportada por varios autores (Lefebvre *et al.*, 2013; Kidad and Doğan, 2018). No obstante, Souza *et al.* (2017) han reportado toxicidad negativa o su disminución bajo determinados procesos incluyendo la ozonización. Marcelino *et al.*, (2017) y Norte *et al.* (2018) reportan una disminución de la toxicidad de subproductos del 60% y 62% respectivamente para muestras ozonizadas. Por lo que se recomienda realizar una evaluación de la actividad genotóxica de las muestras tratadas durante los estudios previos a la propuesta de un tratamiento con ozono para aguas residuales industriales, así como a las aguas tratadas antes de su disposición final.

Propuesta de la alternativa de tratamiento con ozono para aguas residuales

Como se ha podido constatar la ozonización de disoluciones modelos de amoxicilina indicó que en los primeros 10 minutos de reacción se logra una eliminación total del fármaco y el grupo S-2 prácticamente desaparece. Respecto al grupo de subproductos S-1 se alcanzó durante ese tiempo un 27,38 % de reducción a pH=7 y un 73,57 % a pH=12. Sin embargo, al extender la ozonización hasta 60 minutos no se incrementó su degradación a pH constante, aunque sí con el aumento del mismo.

Al ser demostrada la no mutagenicidad de las muestras ozonizadas se propone emplear 30 minutos para el tratamiento de las aguas residuales reales. Este tiempo resulta tres veces superior al tiempo en que se puede concentraciones del antibiótico. Además, como aspecto importante se tiene en cuenta el aumento de la demanda de ozono al tratar aguas residuales reales, que poseen otros compuestos procedentes del proceso productivo. En este sentido, se recomienda que estas aguas sean debidamente segregadas para una mejor caracterización y control del tratamiento propuesto. También, dada la no toxicidad se propone ozonizar al pH de las aguas residuales de la Empresa Farmacéutica con valores entre 7 y 8.

Esto garantizará un menor costo de operación al no emplear reactivos químicos y sistemas de dosificación. En cuanto a la concentración de ozono en el gas se propone mantener 70 mg/L. No obstante, las condiciones de ozonización deben ser ajustadas en la práctica durante la implementación.

Tabla 1. Condiciones cromatográfica empleadas por CLAR.

Sistema	Fase Móvil	Columna	Límite de cuantificación	Longitud de onda	Flujo
CLAR-1	KH ₂ PO ₄ (0,05 mol/L) / acetonitrilo (960:40 v/v)	RP C18 de 150 x 4 mm	0,25 mg/L	230 nm	1,5 mL/min
CLAR-2		RP C18 de 250 x 4 mm	5,00 mg/L		

CLAR-1: Empresa Farmacéutica, CLAR-2: Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC).

Tabla 2. Cepas de *Salmonella typhimurium* y controles positivos empleados en el ensayo de Ames.

Cepas	Controles positivos	
	+S9	-S9
TA 98	2-amino-fluoreno (10 µg/placa)	ácido picrolónico (100 µg/placa)
TA 100	Benzo (a) pireno (2 µg/placa)	9-amino-acridina (10 µg/ placa)

+S9: con mezcla S9 (con activación metabólica); -S9: sin mezcla S9 (sin activación metabólica).

Tabla 3. Variación de la concentración de amoxicilina (10 minutos, pH= 7 inicial ajustado y no controlado).

Tiempo (min)	Concentración de amoxicilina (mg/L)
0	36,90 ± 2,3
2	3,28 ± 0,61
4	< 0,25 ¹
6	< 0,25
10	< 0,25

¹Límite de cuantificación de sistema CLAR-1.

Tabla 4. Variación de la concentración de amoxicilina (10 minutos, pH= 7 controlado)

Tiempo (min)	Concentración de amoxicilina (mg/L)
0,0	148,39 ± 2,31
0,5	145,65 ± 4,25
1,0	134,10 ± 7,42
1,5	109,93 ± 5,26
2,0	81,43 ± 5,38
3,0	34,42 ± 2,15
4,0	10,78 ± 0,54
5,0	< 5,00 ¹
10,0	< 5,00

¹Límite de cuantificación de sistema CLAR-2.**Tabla 5.** Eficiencia de reducción de grupo S-1 (pH inicial ajustado y no controlado).

Tiempo (min)	% de reducción de grupo S-1	
	pH=7	pH=12
4	16,75 ± 0,74	43,64 ± 2,42
6	22,46 ± 1,44	64,20 ± 0,90
10	27,38 ± 1,28	73, 57 ± 0,22
30	34,35 ± 2,50	75,91 ± 2,50
60	34,43 ± 1,11	77,32 ± 3,20

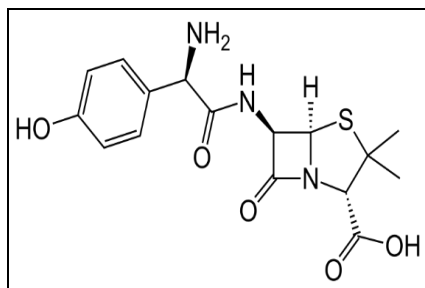


Figura 1. Estructura de la amoxicilina.

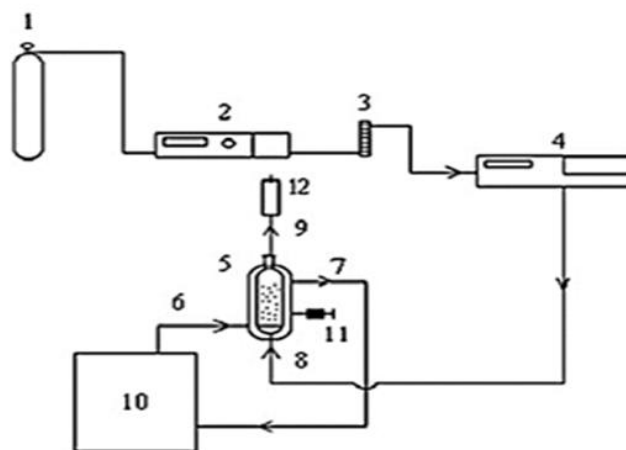


Figura 2. Esquema de la instalación experimental de ozonización. 1. Cilindro de oxígeno. 2. Equipo generador de ozono. 3. Flujómetro. 4. Espectrofotómetro UV-Vis. 5. Columna de burbujeo. 6. Entrada del agua de enfriamiento. 7. Salida del agua de enfriamiento. 8. Entrada de la mezcla gaseosa oxígeno-ozono. 9. Salida de la mezcla gaseosa oxígeno-ozono. 10. Baño termostestado. 11. Toma muestras. 12. Destructor catalítico de ozono gaseoso.

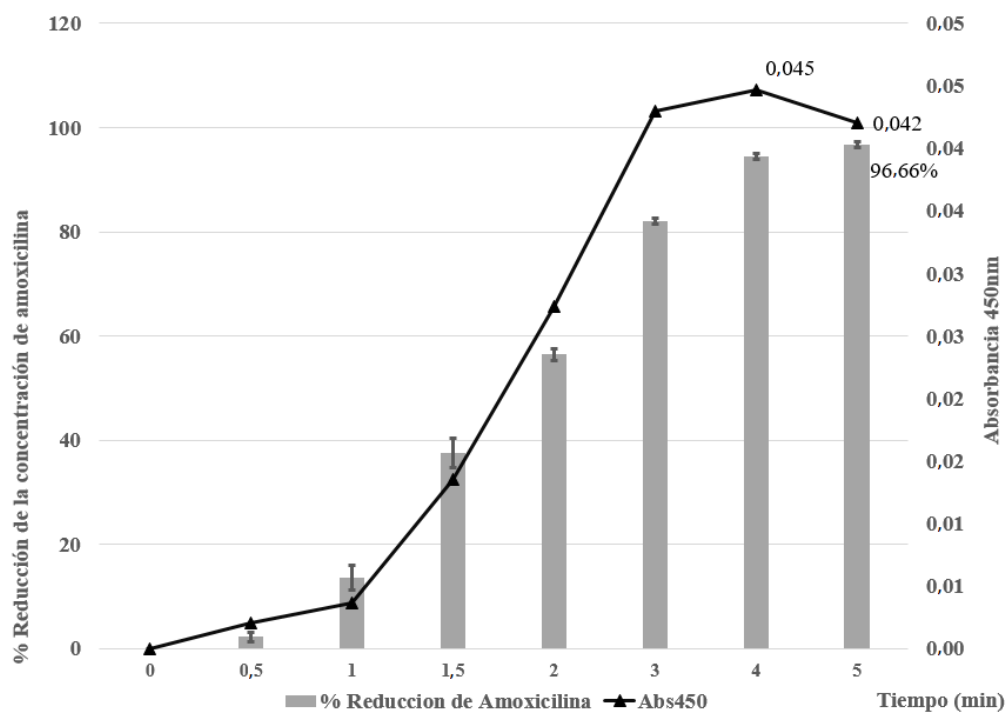


Figura 3. Variación del porcentaje de reducción de la concentración de amoxicilina y valores de absorbancia a 450 nm (pH=7 controlado y concentración inicial de amoxicilina de 148,20 mg/L). CLAR-2.

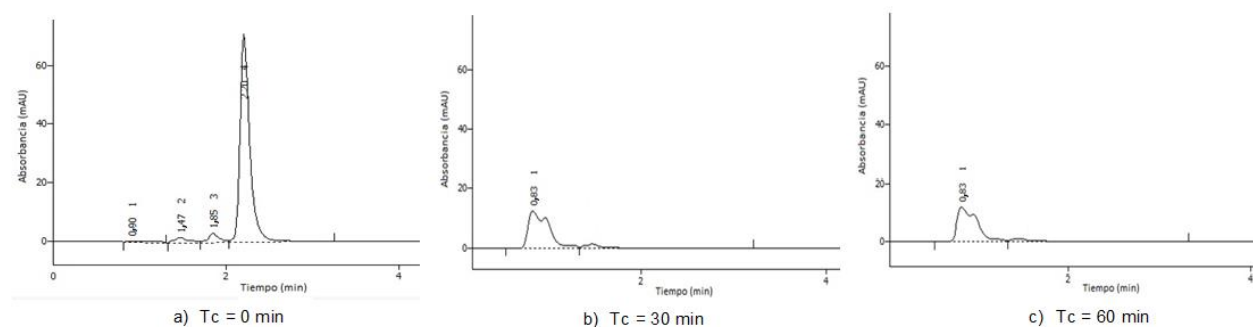


Figura 4.1. Cromatogramas de ozonización de la disolución de amoxicilina (pH = 7 inicial ajustado y no controlado para 30 y 60 minutos tiempo de contacto). CLAR-1.

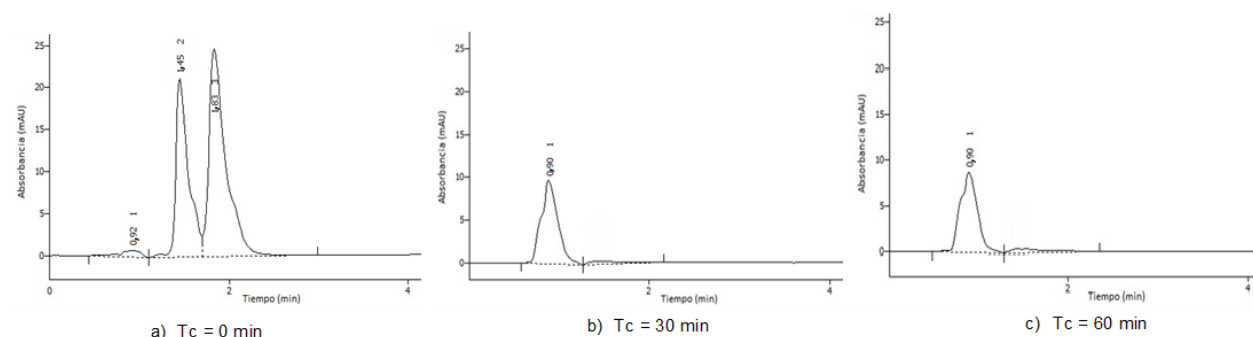


Figura.4.2. Cromatogramas de ozonización de la disolución de amoxicilina (pH=12 inicial ajustado y no controlado para 30 y 60 minutos de tiempo de contacto). CLAR-1.

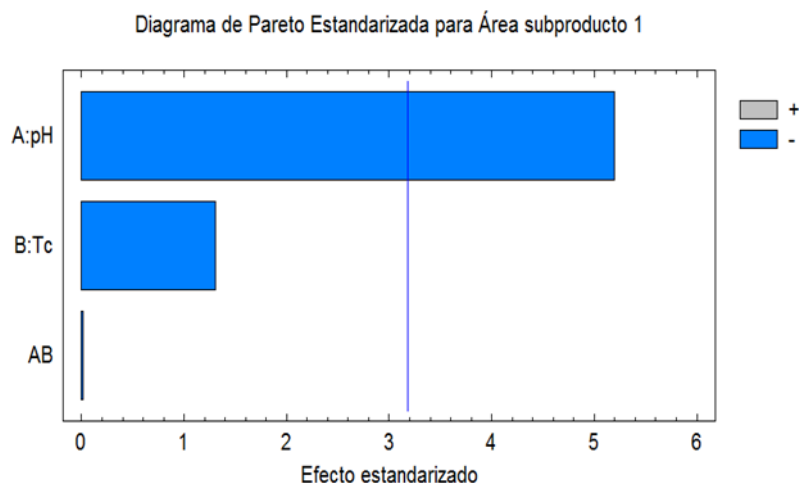


Figura.5. Diagrama de Pareto. Evaluación del efecto en la reducción del área del grupo S-1 debido a los parámetros pH (A): 7 y 12 ajustado y no controlado, tiempo de contacto (B): 30 y 60 minutos e interacción (AB).

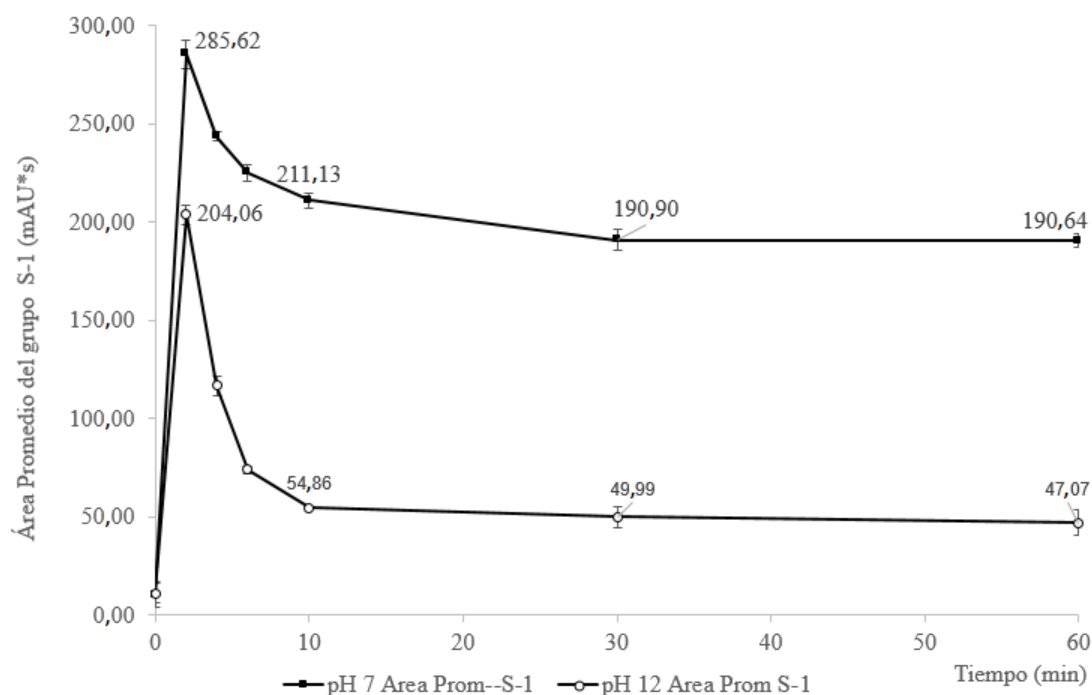


Figura. 6. Formación y degradación del grupo de subproductos S-1 (pH=7 y pH=12 inicial ajustado y no controlado, para diferentes tiempos de contacto). CLAR-1

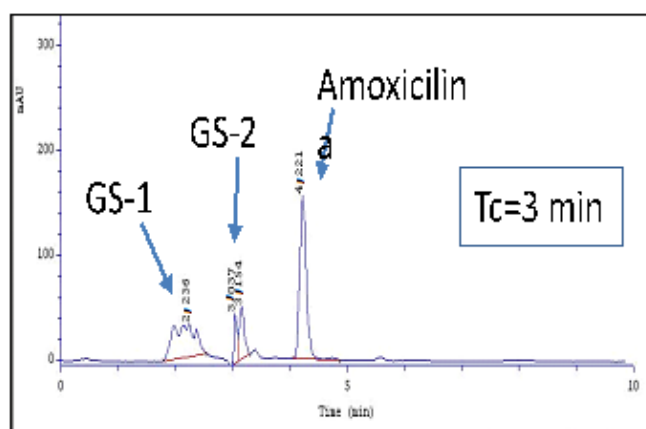


Figura. 7. Cromatograma de la ozonización de la disolución de amoxicilina (pH=7 controlado y 3 minutos de tiempo de contacto). Seguimiento del grupo S-1 (GS-1) y grupo S-2 (GS-2). CLAR-2.

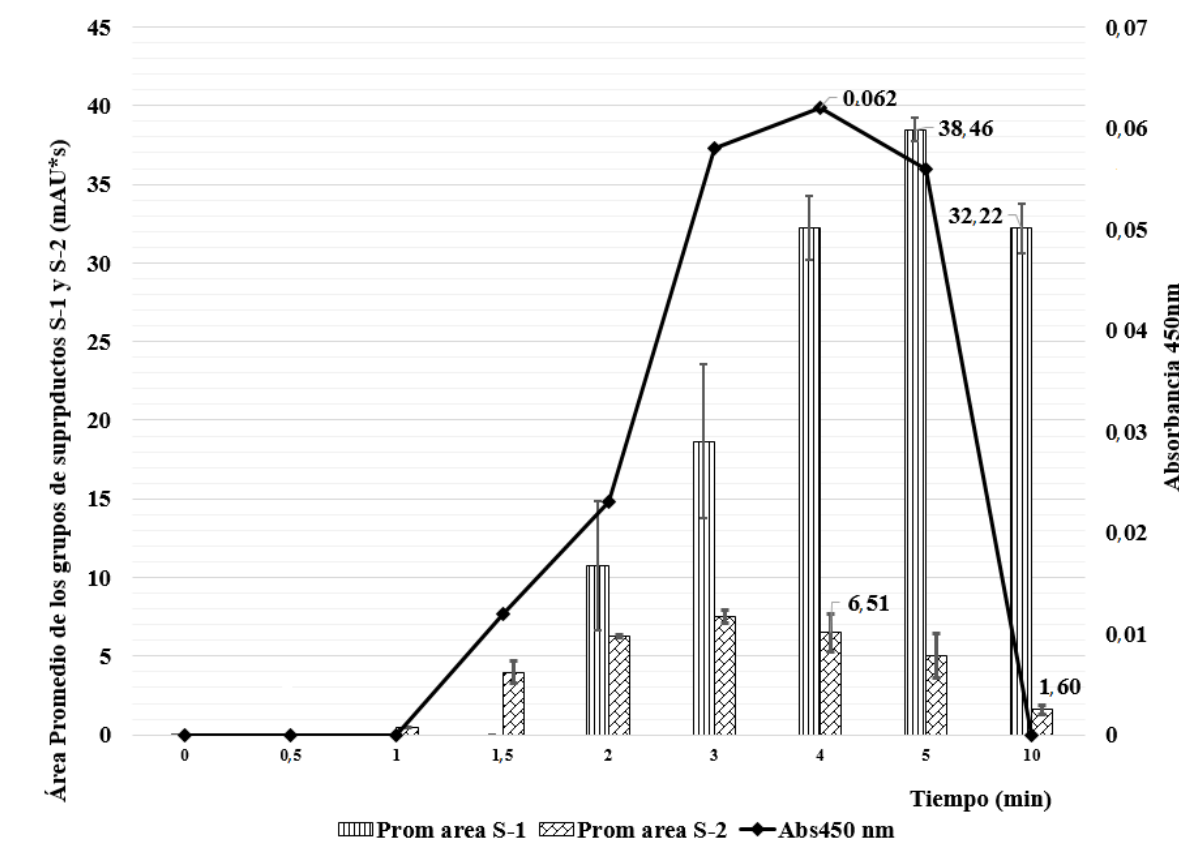


Figura.8. Variación de la coloración y degradación de los grupos de subproductos S-1 y S-2

(pH= 7 controlado y concentración inicial de amoxicilina 148,5 mg/L). CLAR-2.

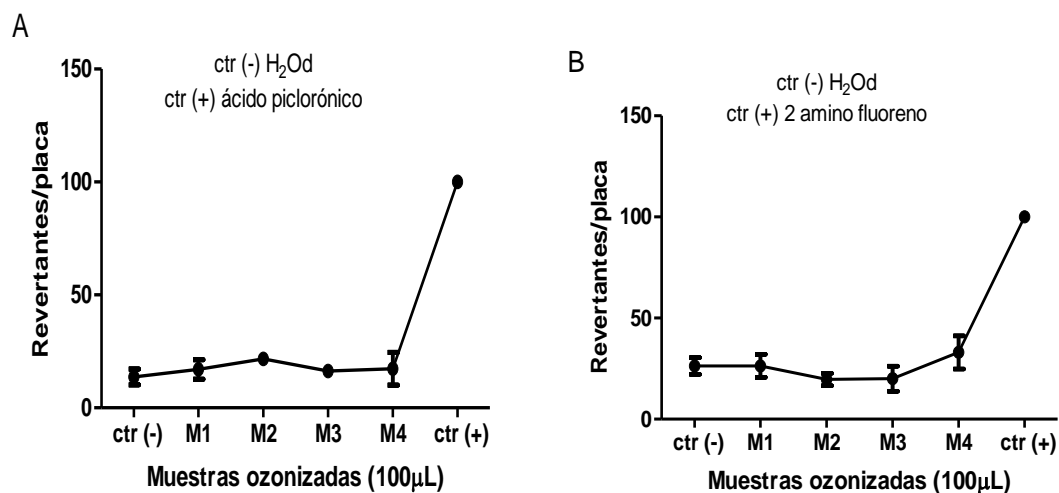


Figura. 9. Resultado de la exposición de las muestras ozonizadas de disoluciones de amoxicilina (M1-M4 100µL) frente a la cepa TA98 A) con S9 y B) sin S9.

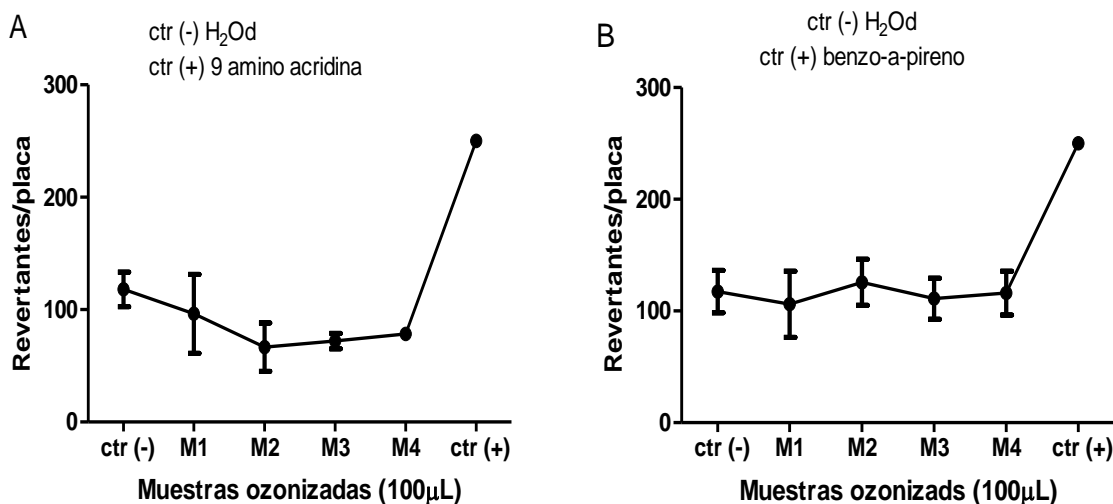


Figura. 10. Resultado de la exposición de las muestras ozonizadas de disoluciones de amoxicilina (M1-M4 100µL) frente a la cepa TA 100. A) con S9 y B) sin S9.

CONCLUSIONES

Con la ozonización se obtuvo más del 99% de reducción de amoxicilina a los cinco minutos de reacción aplicando 70 mg/L de concentración de ozono en el gas y pH= 7 inicial ajustado no controlado. Se apreció la formación de dos grupos de subproductos. El grupo S-2 se degradó durante los primeros 10 minutos de reacción, no así el grupo S-1 que resultó recalcitrante incluso bajo la ozonización alcalina y 60 minutos de tratamiento. Las disoluciones de amoxicilina ozonizadas resultaron no mutagénicas, aspecto favorable para la propuesta de la oxidación con ozono. Se propone como alternativa de tratamiento para las aguas residuales industriales el empleo de una concentración de ozono en el gas de 70 mg/L, pH entre 7 y 8 con 30 minutos de tiempo de contacto.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a la Empresa Farmacéutica por su colaboración en proporcionar la amoxicilina y por el empleo del CLAR-1.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Andreozzi R., Caprio, V., Ciniglia, C., de Champdor'e, M, Lo Giudicem, R., Marotta, R., & Zuccato, E. (2004). Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environmental Science and Technology*, 38(24), 6832–6838.
- Andreozzi, R., Canterino, M., Marotta, R., & Paxeus, N. (2005). Antibiotic removal from wastewaters. The ozonation of amoxicillin. *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), 243-250.
- Belghadr, I., Khorramabadi, G.S., Godini, H., & Almasian, M. (2014). The removal of the cefixime antibiotic from aqueous solution using an advanced oxidation process (UV/H₂O₂). *Desalination and Water Treatment*, 55(4), 1-8.
- Benitez, F.J., Acero, J.L., Real, F.J., & Roldán, G. (2013). The Effectiveness of Single Oxidants and AOPs in the Degradation of Emerging Contaminants in Waters: A Comparison Study. *Ozone: Science & Engineering*, 35(4), 263-272.

- Fatta-Kassinos, D., Meric, S., & Nikolaou, A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: Current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(2), 251–270.
- Fent, K., Weston, A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 122–159.
- Gadipelly, C., Pérez-González, A., Yadav, G.D., Ortiz, I., Ibáñez, R., Rathod, V.K., & Marathe, K.V. (2014). Pharmaceutical Industry Wastewater: Review of the Technologies for Water Treatment and Reuse. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(29), 11571–11592.
- García-Gómez, C., Gortáres-Moroyoqui, P., & Drogui, P. (2011). Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción. *Química Viva*, 10(2), 96-105.
- Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., & *et al.* (1994). Report from the working group on bacterial mutation assays: International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Research*, 312(3), 217-233.
- Giraldo-Aguirre, A.L., Serna-Galvis, E.A., Erazo-Erazo, E.D., Silva-Agredo, J., Giraldo-Ospina, H., Flórez-Acosta, O.A., & Torres-Palma, R.A. (2018). Removal of β -lactam antibiotics from pharmaceutical wastewaters using photo-Fenton process at near-neutral pH. *Environmental Science Pollution Research*, 25 (21), 20293–20303.
- Gothwal, R. & Shashidhar, T. (2015). Antibiotic pollution in the environment: a review. *Clean – Soil, Air, Water*, 43(4), 479-489.
- Gracia-Lor, E., Sancho, J.V., Serrano, R., & Hernández, F. (2012). Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*, 87(5), 453-462.
- Hernando, M. D., Rodríguez, A., Vaquero, J. J., Fernández-Alba, A. R., & García, E. (2011). Environmental risk assessment of emerging pollutants in water: Approaches under horizontal and vertical EU legislation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(7), 699-731.
- Homem, V., & Santos, L. (2011). Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. *Journal of Environmental Management*, 92 (10), 2304-2347.
- Jung, Y.J., Kim, W.G., Yoon, Y., Hwang, T.M., & Kang, J.W. pH effect on ozonation of ampicillin: kinetic study and toxicity assessment. (2012). *Ozone: Science & Engineering*, 34(3), 156-162.
- Kıdak, R., & Doğan S. (2018). Medium-high frequency ultrasound and ozone based advanced oxidation for amoxicillin removal in water. *Ultrasonics sonochemistry*, 40, 131-139.
- Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., & Weijdegard, B. (2011). Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PLoS One*, 6(2), 1-7.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment - A review. Part I. *Chemosphere*, 75(4), 417-434.
- Lefebvre, O., X. Shi, X., Tein, J.G., & Nug, H.Y. (2013). Suitability of ozone pre-treatment for amoxicillin wastewater. *Water Science & Technology*, 68(11), 2492-2496.
- Marcelino, R.B., Leao, M.M., Lago, R.M., & Amorim, C.C. (2017). Multistage ozone and biological treatment system for real wastewater containing antibiotics. *Journal of Environmental Management*, 195, 110–116.

- Maron, D.M., & Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research / Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3-4), 173-215.
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C.S. Manaia, C., Merlin, Schwartz, T., Dagot, C., & Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research*, 47(3), 957–995.
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research / Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 455(1-2), 29-60.
- Norte, T.H.O., Marcelino, R.B.P., Medeiros, F.H.A., Moreira, R.P.L, Amorim, C.C., & Lago, R.M. (2018). Ozone oxidation of β -lactam antibiotic molecules and toxicity decrease in aqueous solution and industrial wastewaters heavily contaminated. *Ozone: Science & Engineering*, 40(5), 1-7.
- OECD. (1997). Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects.
- OMS (2018). Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>. Abril 2018.
- Rivera-Utrilla, J, Sánchez-Polo, M, Ferro-García, M.Á, Prados-Joya, G, & Ocampo-Pérez, R. (2013). Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere*, 93(7), 1268-1287.
- Rubio, D.I., & Delgado D.R. (2015). Regulación ambiental sobre los productos farmacéuticos residuales en ambientes acuáticos. *Entornos*, 28(1), 76-80.
- Sanderson, H., Brain, R. A., Johnson, D. J., Wilson, C. J., & Solomon, K. R. (2004). Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: Antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones. *Toxicology*, 203(1-3), 27–40.
- Schriks, M., Heringa, M. B., van der Kooi, M. M., de Voogt, P., & van Wezel, A. P. (2010). Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. *Water Research*, 44(2), 461–476.
- Souza, F.S., da Silva, V.V., & Rosin, C.K., Hainzenreder, L., Arenzon, A., Féris, L.A. (2017). Comparison of different advanced oxidation processes for the removal of amoxicillin in aqueous solution. *Environmental Technology*, 39(5), 549–557.
- Stasinakis, A.S. (2008). Use of Selected Advanced Oxidation Processes (AOPs) for Wastewater Treatment - A Mini Review. *Global NEST Journal*, 10(3), 376-385.
- Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., & Hart, A. (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, 416, 1-21.
- Varol Saraçoğlu G. Varol Saraçoğlu, S., Göçmez, C.B., Özkal, F., Ekmekyapar, P., & Meric, S. (2014). Occurrence of antibiotics in urban wastewater: A risk assessment study in Tekirdag city related to antibiotic resistant bacteria and infection disease control, *Global Journal of Advance in Pure & Applied Science*, 4, 235–244.
- von Gunten, U. (2018). Oxidation Processes in Water Treatment: Are We on Track? *Environmental Science & Technology*, 52(9), 5062–5075.

