

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



DESARROLLO DE UN SISTEMA DE INYECCIÓN EN FLUJO MULTIJERINGA
(MSFIA) PARA LA DETERMINACIÓN DE AGENTES ANTITUBERCULOSOS
EN AGUA Y SU DEGRADACIÓN POR FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA

Por

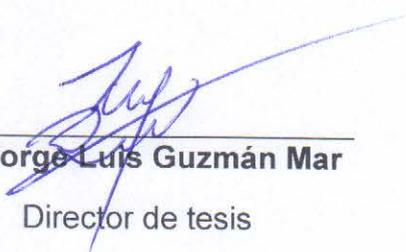
Q.F.B. Erick Oswaldo Guevara Almaraz

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en
Química Analítica Ambiental

Febrero de 2013

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE INYECCIÓN EN FLUJO MULTIJERINGA
(MSFIA) PARA LA DETERMINACIÓN DE AGENTES ANTITUBERCULOSOS
EN AGUA Y SU DEGRADACIÓN POR FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA

Aprobación de la tesis:



Dr. Jorge Luis Guzmán Mar

Director de tesis

Dra. Aracely Hernández Ramírez

Co-directora de tesis

Dra. Ma. Teresa Garza González
Subdirectora de Estudios de Posgrado

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE INYECCIÓN EN FLUJO MULTIJERINGA
(MSFIA) PARA LA DETERMINACIÓN DE AGENTES ANTITUBERCULOSOS EN
AGUA Y SU DEGRADACIÓN POR FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA

Comité Tutorial:

M.C. Isabel del Carmen Sáenz Tavera

M.C. Nancy Adriana Pérez Rodríguez

Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

□ FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS □ ESCUELA DE GRADUADOS EN CIENCIAS □

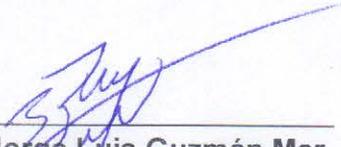
Monterrey, N.L., Febrero de 2013.

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente, nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título "DESARROLLO DE UN SISTEMA DE INYECCIÓN EN FLUJO MULTIJERINGA (MSFIA) PARA LA DETERMINACIÓN DE AGENTES ANTITUBERCULOSOS EN AGUA Y SU DEGRADACIÓN POR FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA" y que fue realizado por el Q.F.B. Erick Oswaldo Guevara Almaraz. El trabajo de tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Fotocatálisis y Electroquímica Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, para obtener el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Química Analítica Ambiental dentro del Posgrado en Ciencias de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de los Drs. Ma. Araceli Hernández Ramírez y Jorge Luis Guzmán Mar.

Durante la realización del trabajo el alumno recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 386602) y el trabajo de investigación fue financiado por los proyectos SEP-PROMEP/103.5/10/6643, y UANL-PAICYT CN413-10, concedidos al Dr. Jorge Luis Guzmán Mar.

Atentamente



Dr. Jorge Luis Guzmán Mar
Director de tesis

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Co-directora de tesis

RESUMEN

Erick Oswaldo Guevara Almaraz

Fecha de Graduación: Febrero de 2013.

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: DESARROLLO DE UN SISTEMA DE INYECCIÓN EN FLUJO MULTIJERINGA (MSFIA) PARA LA DETERMINACIÓN DE AGENTES ANTITUBERCULOSOS EN AGUA Y SU DEGRADACIÓN POR FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA.

Número de páginas: 99

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Química Analítica Ambiental.

Área de Estudio: Química Analítica Ambiental

Propósito y Método del Estudio: Desarrollar una metodología analítica para la separación y determinación en flujo de isoniazida y pirazinamida en muestras acuosas, mediante la técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa que permita además el seguimiento de la degradación en un reactor fotocatalítico. El presente proyecto describe la utilización del sistema cromatográfico multijeringa, empleando una columna monolítica de tipo C18 que permite la separación de los analitos y un detector de acoplamiento de carga (CCD) para la cuantificación, se propone el uso de dicho sistema multijeringa para el seguimiento de la degradación en línea de los fármacos isoniazida y pirazinamida en matrices reales provenientes de la presa La Boca y Río Pablillo mediante el acoplamiento de un reactor fotocatalítico al sistema.

Contribuciones y Conclusiones: Se estableció una metodología automatizada para el seguimiento de la degradación de los fármacos isoniazida y pirazinamida a través del sistema de análisis multijeringa, el cual permite realizar un monitoreo en flujo continuo de su degradación en un reactor fotocatalítico, logrando así reducir costos y tiempo de análisis. Los porcentajes de error fueron igual o menor al 5%, lo que indica que se trata de un método preciso. La degradación fotocatalítica simultánea de los fármacos antituberculosos se vio favorecida empleando TiO_2 Degussa P25, longitud de onda de radiación a 365 nm ($5,500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), masa de catalizador 1 g/L y pH de la disolución de 7, consiguiendo porcentajes de degradación del 100% y mineralización del 71% en 270 min. En las muestras de agua del Río Pablillo y de la presa La Boca los porcentajes de mineralización fueron de 46 y 60%, respectivamente.


Erick Oswaldo Guevara Almaraz (estudiante)

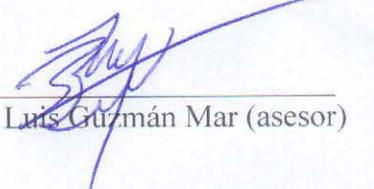

Dr. Jorge Luis Guzmán Mar (asesor)

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
NOMENCLATURA	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS	3
1.1.1 <i>La tuberculosis en México</i>	3
1.1.2 <i>Antibióticos empleados en el tratamiento de la tuberculosis</i>	5
1.1.3 <i>Propiedades de los agentes antituberculosos de estudio</i>	7
1.2 TÉCNICAS EN FLUJO	9
1.2.1 <i>Análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA)</i>	10
1.2.1.1 Características	10
1.2.1.2 Ventajas del sistema MSFIA	12
1.2.1.3 Acoplamiento con otras técnicas analíticas	13
1.2.1.4 Aplicación de la Separación Cromatográfica en los sistemas MSFIA	14
1.2.1.5 Versatilidad de los sistemas MSFIA	15
1.3 PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN	17
1.3.1 <i>Fotocatálisis Heterogénea</i>	17
1.4 ANTECEDENTES	19
1.4.1 <i>Determinación de fármacos antituberculosos por HPLC</i>	20
1.4.2 <i>Técnicas en flujo para la separación y determinación de fármacos</i>	22
1.4.3 <i>Aplicación de la Fotocatálisis Heterogénea en la degradación de antibióticos y otros fármacos</i>	24
1.5 HIPÓTESIS	26
1.6 OBJETIVOS	26
1.6.1 <i>Objetivo General</i>	26
1.6.2 <i>Objetivos Específicos</i>	27
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
2.1 MATERIALES	28
2.1.1 <i>Reactivos</i>	28
2.1.2 <i>Instrumentación</i>	29
2.2 MÉTODOS	31
2.2.1 <i>Estudio de las propiedades espectrofotométricas de Isoniazida y Pirazinamida</i>	31
2.2.1.1 Selección de la longitud de onda de máxima absorción	32
2.2.1.2 Pruebas de pH	32
2.2.1.3 Pruebas de volumen de disolución amortiguadora	33
2.2.1.4 Pruebas de estabilidad en función del tiempo	33
2.2.1.5 Curvas de calibración por espectrofotometría UV-Vis (sistema Batch)	33
2.2.2 <i>Ensamblaje del sistema MSFIA-Separación cromatográfica</i>	34
2.2.2.1 Curvas de Calibración	36
2.2.2.2 Estudio de Repetibilidad	37
2.2.3 <i>Degradación de los fármacos</i>	37
2.2.3.1 Diseño de experimentos para la degradación de fármacos	38
2.2.3.2 Efecto del pH en el proceso de degradación y mineralización	39
2.2.3.3 Efecto de la intensidad de irradiación en el proceso de degradación y mineralización	40
2.2.3.4 Pruebas Control	41
2.2.3.5 Experimentos de degradación en matrices reales	42
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
3.1 TÉCNICAS MSFIA PARA LA DETECCIÓN DE LOS FÁRMACOS	43
3.1.1 <i>Pruebas fisicoquímicas realizadas en batch</i>	43

3.1.1.1	Efecto de pH.....	43
3.1.1.2	Efecto del volumen de disolución amortiguadora.....	46
3.1.1.3	Pruebas de estabilidad en función del tiempo.....	47
3.1.1.4	Curvas de calibración.....	48
3.1.2.	<i>Ensamblaje del sistema MSFIA</i>	50
3.1.3.	<i>MSFIA-Separación Cromatográfica</i>	52
3.1.4.	<i>Estudios univariantes</i>	53
3.1.4.1	Concentración de ácido 1-heptanosulfónico.....	53
3.1.4.2	Selección del modificador orgánico en la fase móvil.....	55
3.1.4.3	Efecto del pH en la separación cromatográfica.....	57
3.1.4.4	Caudal de Elución.....	58
3.1.4.5	Resumen de las condiciones para el método MSFIA-separación cromatográfica.....	59
3.1.4.6	Parámetros analíticos del método propuesto.....	60
3.2	DEGRADACIÓN FOTOCATALÍTICA DE LOS FÁRMACOS ISO Y PIRA.....	64
3.2.1.	<i>Acoplamiento del reactor fotocatalítico</i>	64
3.2.2.	<i>Diseño de experimentos para la degradación fotocatalítica de los fármacos de estudio</i>	65
3.2.2.1	Porcentajes de degradación obtenidos aplicando el diseño de experimentos factorial 2 ³	65
3.2.2.2	Evaluación del comportamiento de los catalizadores utilizados en la degradación de ISO y PIRA.....	66
3.2.2.3	Análisis estadístico del diseño de experimentos.....	71
3.2.2.4	Efecto del pH en degradación fotocatalítica empleando TiO ₂ Degussa P25.....	73
3.2.2.5	Comparación de la intensidad de radiación en la degradación fotocatalítica.....	75
3.2.2.6	Pruebas control.....	77
3.2.3.	<i>Degradación en muestras de agua reales</i>	79
4.	CONCLUSIONES	82

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Concentraciones de fármacos y metabolitos en agua potable en varias partes del mundo [2].	2
Tabla 2. Tratamiento antituberculoso primario.	6
Tabla 3. Reactivos utilizados durante el estudio espectrofotométrico en batch y el proceso de separación cromatográfica.	28
Tabla 4. Reactivos utilizados durante el estudio de degradación fotocatalítica	28
Tabla 5. Materiales y equipos utilizados para realizar el proceso de separación cromatográfica.	29
Tabla 6. Materiales y equipos utilizados para el proceso de la degradación fotocatalítica	30
Tabla 7. Disoluciones amortiguadoras	32
Tabla 8. Soluciones para las curvas de calibración de cada fármaco	34
Tabla 9. Evaluación mediante estudios univariantes de las condiciones de separación cromatográfica	35
Tabla 10. Estándares en mezcla para la curva de calibración	37
Tabla 11. Diseño de experimentos factorial para la degradación fotocatalítica de los fármacos	39
Tabla 12. Parámetros analíticos para la determinación de los fármacos antituberculosos por espectrofotometría UV.	50
Tabla 13. Método MSFIA separación cromatográfica.	51
Tabla 14. Resumen de las condiciones cromatográficas para la determinación de los fármacos antituberculosos por el método MSFIA-separación cromatográfica.	60
Tabla 15. Parámetros analíticos en la determinación de ISO y PIRA en el sistema MSFIA-separación cromatográfica.	63
Tabla 16. Método MSFIA-separación cromatográfica-degradación fotocatalítica	65
Tabla 17. Porcentajes de degradación del diseño de experimentos factorial aplicado a los fármacos de estudio.	66
Tabla 18. Condiciones para la degradación en la mezcla de los fármacos en estudio.	72
Tabla 19. Comparación del porcentaje de degradación entre las pruebas control y el proceso fotocatalítico.	79
Tabla 20. Parámetros fisicoquímicos del agua de Río Pablillo y la presa La Boca.	81

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Número de casos de tuberculosis resistente a fármacos por Entidad Federativa en México (número total de casos reportados, 225).	4
Figura 2. Estructura química de la Isoniazida.	7
Figura 3. Estructura química de la Pirazinamida.	8
Figura 4. Dispositivo multijeringa.	11
Figura 5. Estructura porosa bimodal de una columna monolítica.	15
Figura 6. Preconcentrador en flujo que consta de dos cilindros de polimetilmetacrilato (PMMA).	16
Figura 7. Diagrama del proceso fotocatalítico para una partícula de TiO ₂ .	18
Figura 8. Reactor fotocatalítico utilizado en la degradación de ISO y PIRA.	38
Figura 9. Efecto del pH en Isoniazida [20 mg/L] a $\lambda_{\text{máx}}$ 266 nm y Pirazinamida [10 mg/L] a $\lambda_{\text{máx}}$ 269 nm.	44
Figura 10. Diagrama de zonas de predominio para Isoniazida [66].	45
Figura 11. Diagrama de zonas de predominio para Pirazinamida [66].	45
Figura 12. Efecto del volumen de solución amortiguadora a pH 4 para las disoluciones de ISO y PIRA [10 mg/L].	47
Figura 13. Estabilidad de los fármacos antituberculosos, 1.5 mL de la disolución amortiguadora a pH 4, ISO y PIRA [10 mg/L].	48
Figura 14. Curvas de calibración en el rango de concentración de 1.0 a 22.0 y 0.5 a 12.0 mg/L para A) ISO y B) PIRA, respectivamente.	49
Figura 15. Sistema MSFIA-Separación cromatográfica.	50
Figura 16. Espectros de absorción UV de Isoniazida [20 mg/L] $\lambda_{\text{máx}}$ 266 nm y Pirazinamida [10 mg/L] $\lambda_{\text{máx}}$ 269 nm.	52
Figura 17. Cromatogramas de la mezcla de Pirazinamida (1) e Isoniazida (2) [10 mg/L], variando la concentración de ácido 1-heptanosulfónico empleado como par iónico y un caudal de 0.8 mL/min.	54
Figura 18. Efecto del porcentaje de metanol en la separación cromatográfica de la mezcla de Isoniazida y Pirazinamida [10 mg/L] a un caudal de 0.8 mL/min.	56
Figura 19. Efecto del porcentaje de acetonitrilo en la separación cromatográfica de la mezcla de Pirazinamida (1) e Isoniazida (2) [10 mg/L] y un caudal de 0.8 mL/min.	57
Figura 20. Efecto del pH en la separación cromatográfica de la mezcla de Pirazinamida (1) e Isoniazida (2) [10 mg/L] y a un caudal de 0.8 mL/min.	58
Figura 21. Cromatogramas obtenidos a cuatro diferentes caudales de elución en la separación de la mezcla de ISO y PIRA [10 mg/L].	59
Figura 22. Cromatograma de la mezcla de pirazinamida [5 mg/L] e Isoniazida [10 mg/L] en el sistema MSFIA-Separación cromatográfica empleando las condiciones seleccionadas y resumidas en la Tabla 14.	60
Figura 23. Curvas de calibración para A) Pirazinamida y B) Isoniazida en el sistema MSFIA-separación cromatográfica, en el rango de 0.5 a 12 y 1 a 22 mg/L, respectivamente. Las curvas de calibración se realizaron por triplicado y la longitud de onda de detección fue 267 nm.	62
Figura 24. Sistema MSFIA-Separación cromatográfica acoplado a un reactor fotocatalítico para el seguimiento en línea de la degradación de los fármacos de estudio.	64
Figura 25. Degradación de Pirazinamida con TiO ₂ Degussa P25 a las condiciones dadas por el diseño de experimentos, A) a 254 nm y B) a 365 nm.	67
Figura 26. Degradación de Isoniazida con TiO ₂ Degussa P25 a las condiciones dadas para el diseño de experimentos, A) a 254 nm y B) a 365 nm.	68
Figura 27. Degradación de Pirazinamida con ZnO comercial a las condiciones dadas para el diseño de experimentos, A) a 254 nm y B) a 365 nm.	69
Figura 28. Degradación de Isoniazida con ZnO comercial y las condiciones dadas para el diseño de experimentos, A) a 254 nm y B) a 365 nm.	70
Figura 29. Gráfica de función de deseabilidad compuesta con los factores que influyen significativamente en la degradación de Isoniazida y Pirazinamida.	72
Figura 30. Efecto del pH de la disolución de la mezcla en la degradación de Pirazinamida utilizando TiO ₂ Degussa P25, a una concentración de 5 mg/L y masa de catalizador de 1 g/L.	74

Figura 31. Efecto del pH de la disolución de la mezcla en la degradación de Isoniazida utilizando TiO ₂ Degussa P25, a una concentración de de 10 mg/L y masa de catalizador de 1 g/L. _____	74
Figura 32. Evaluación de la intensidad de radiación en la degradación de Pirazinamida (5 mg/L) en mezcla empleando TiO ₂ . _____	76
Figura 33. Evaluación de la intensidad de radiación en la degradación de Isoniazida (10 mg/L) en mezcla empleando TiO ₂ . _____	76
Figura 34. Degradación de Pirazinamida (5 mg/L) en mezcla con TiO ₂ Degussa P25 mediante fotocátalisis; adsorción y fotólisis a pH 7. _____	78
Figura 35. Degradación de Isoniazida (10 mg/L) en mezcla con TiO ₂ Degussa P25 mediante fotocátalisis; adsorción y fotólisis a pH 7. _____	78
Figura 36. Degradación de Pirazinamida (5 mg/L) en mezcla adicionada en matrices reales de agua provenientes del Río Pablillo en Linares y la Presa La Boca del estado de Nuevo León. _____	80
Figura 37. Degradación de Isoniazida (10 mg/L) en mezcla en matrices reales de agua provenientes del Río Pablillo de Linares y de la Presa La Boca del estado de Nuevo León. _____	80
Figura 38. Porcentaje de mineralización de la mezcla de fármacos en matriz real y agua nanopura. _____	81

Nomenclatura

ISO	Isoniazida.
PIRA	Pirazinamida.
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Adquirido.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
FIA	Análisis por Inyección en Flujo.
SIA	Análisis por Inyección Secuencial.
MCFIA	Análisis en Flujo Multiconmutado.
MSFIA	Sistema de Inyección en Flujo Multijeringa.
TAOs, PAOs	Tecnologías o Procesos Avanzados de Oxidación.
PMMA	Polimetilmetacrilato.
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
TiO ₂	Dióxido de Titanio.
ZnO	Óxido de Zinc.
CCD	Dispositivo de acoplamiento de carga.
TOC	Carbono Orgánico Total.
RSD	Desviación Estándar Relativa.
LOQ	Límite de cuantificación.
LOD	Límite de detección.

1. INTRODUCCIÓN

Los productos farmacéuticos son sustancias químicas sintéticas o naturales que se pueden encontrar en medicamentos recetados de venta libre para uso humano y/o veterinario. Estos productos contienen ingredientes activos diseñados para provocar efectos farmacológicos benéficos a la sociedad.

Sin embargo, los fármacos se pueden introducir en las fuentes de agua potable a través de aguas residuales industriales (industrias farmacéuticas), domésticas (vía excreciones humanas o directamente por el vertido de medicamentos sin usar o caducados), aguas de hospitales y aguas de vertidos procedentes de explotaciones ganaderas. Aunque de momento aparecen en concentraciones muy bajas (normalmente del orden de ng/L), de no tomarse medidas al respecto, es previsible un incremento de las concentraciones de fármacos en los próximos años dado el crecimiento continuo en el consumo de medicamentos. Además, la estabilidad y polaridad de algunos fármacos les permiten tener una gran movilidad en el medio acuático, por lo que pueden llegar a las fuentes de agua potable a través de su infiltración en aguas subterráneas. Este tipo de contaminantes representan un riesgo muy serio para los seres humanos y por su naturaleza podrían traer consecuencias toxicológicas importantes, puesto que son sustancias biológicamente activas, y poseen una biodegradabilidad limitada [1-4]. En la Tabla 1 se presentan las concentraciones de diversos fármacos encontrados en agua potable de varios países.

En lo que respecta a México, en un estudio reportado por J. Siemens y colaboradores, realizado del año 2005 al 2007, se evaluó la concentración y la movilidad que presentan los fármacos de uso humano en el sistema de aguas residuales de la Ciudad

de México-Valle del Mezquital. En este estudio se encontró que la concentración en aguas residuales de fármacos como trimetoprim, eritromicina, naproxeno, ibuprofeno y diclofenaco estaban por encima de 1 mg/L [5].

Tabla 1. Concentraciones de fármacos y metabolitos en agua potable en varias partes del mundo [2].

Uso terapéutico	Compuesto	Máxima concentración detectada (ng/L)	País
Antibióticos	Triclosan	734.0	Estados Unidos
Anticonvulsivos	Carbamazepina	24.0	Canadá
		140-258	Estados Unidos
		43.2	Francia
		60.0	Alemania
	Dilantin	1.3	Estados Unidos
	Primidona	40.0	Alemania
Antidepresivos, ansiolíticos	Amitriptilina	1.4	Francia
	Diazepam	10.0	Ucrania
		23.5	Italia
	Meprobamato	5.9	Estados Unidos
Antineoplásicos	Bleomicina	13.0	Ucrania
Reguladores de lípidos	Bezafibrato	27.0	Alemania
	Ácido clofibrico	50-270	Alemania
		5.3	Italia
Antiinflamatorios no esteroideos y analgésicos	Gemfibrozil	70.0	Canadá
	Acetaminofen	210.1	Francia
	Diclofenaco	6-35	Alemania
		2.5	Francia
	Ibuprofeno	3.0	Alemania
		0.6	Francia
		8.5	Finlandia
	Ketoprofeno	1350.0	Estados Unidos
		8.0	Finlandia
		3.0	Francia
3.0		Francia	
Fenazona	250-400	Alemania	
	80-240	Alemania	
Analgesicos opioides	Codeína	30.0	Estados Unidos
Psicoestimulantes	Cafeína	60-119	Estados Unidos
		22.9	Francia

De todos los contaminantes emergentes pertenecientes al grupo de los fármacos, los antibióticos son de mayor preocupación por ser disruptores de la ecología acuática, además de que su presencia en el medio ambiente podría ocasionar el incremento de aparición de bacterias farmacorresistentes, generando efectos genotóxicos y representando un riesgo para la salud humana [4].

Las plantas tratadoras de aguas residuales no están diseñadas para remover este tipo de contaminantes; además, la legislación que se tiene actualmente sobre el control de los contaminantes en aguas residuales en México, no incluye la monitorización de fármacos [5]. Dentro de los antibióticos destacan los agentes antituberculosos, debido a su amplio uso en los últimos años originado por la reincidencia de la tuberculosis en nuestro país.

1.1 Fármacos antituberculosos

1.1.1. La tuberculosis en México

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que ha emergido como un enorme problema de salud pública en las últimas décadas. A nivel mundial es la segunda causa infecciosa de muerte después de la infección por Virus de Inmunodeficiencia Adquirido (VIH), de manera que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que cada año aparecen 8 millones de nuevos casos y más de 2 millones mueren por esta enfermedad [6]. En México, la tuberculosis es un problema de salud pública a pesar de haber un Programa de Prevención y Control. Cada año se notifican en promedio 30,000 casos, de los cuales el 80% son de tipo pulmonar [7]. 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 [8]. En la Figura 1 se muestra un mapa de la República Mexicana que representa los casos de tuberculosis resistente a fármacos registrados en 2010 por Entidad Federativa [9].

La predisposición a la enfermedad se puede dar por causas genéticas y no por las condiciones de pobreza y de insalubridad en la que vive un porcentaje importante de la población en el país [10].

Entre los principales factores relacionados con el incremento en la incidencia de la tuberculosis se encuentran: la práctica médica incorrecta en el manejo de la enfermedad y la más importante, es el incumplimiento del tratamiento por parte del enfermo, que ha mostrado ser el problema más grave para el control de la tuberculosis y el máximo obstáculo para la total erradicación de la enfermedad, ocasionando multirresistencia ante los fármacos utilizados contra la tuberculosis [11,12].

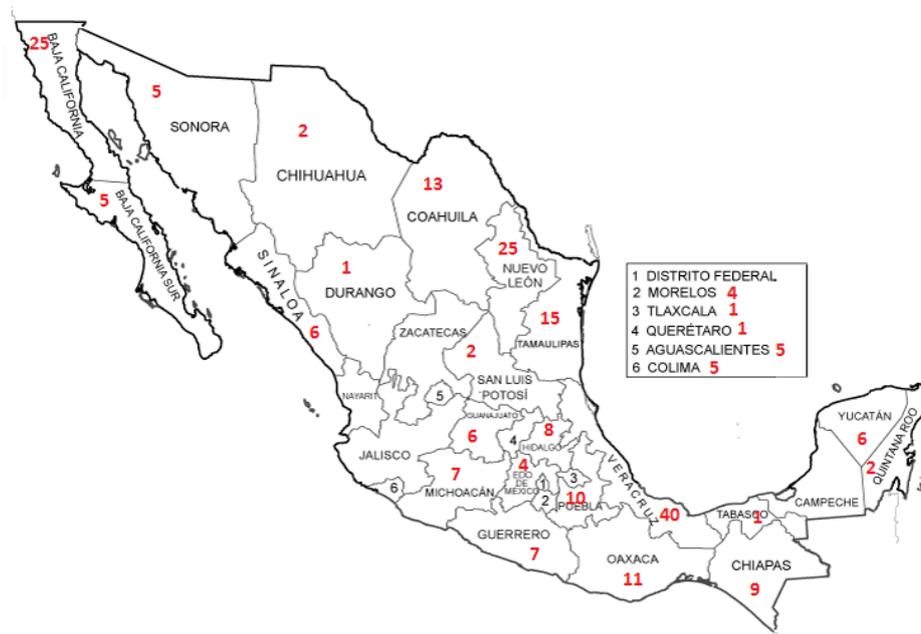


Figura 1. Número de casos de tuberculosis resistente a fármacos por Entidad Federativa en México (número total de casos reportados, 225).

El tratamiento de pacientes tuberculosos plantea diversas dificultades ya que existen poblaciones de bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* diferentes en función de su ubicación y actividad metabólica [10]. Los bacilos que se alojan en las cavidades pulmonares tienen la capacidad de multiplicarse de forma activa en un ambiente aerobio. Aquellos bacilos que se encuentran en el interior de los macrófagos, lo hacen en un ambiente microaerofílico que inducen la latencia, y existen otros bacilos que se encuentran en el interior del caseum que tienen sólo ocasionalmente un ciclo replicativo (crecimiento intermitente). Por otra parte, estos bacilos pueden multiplicarse en los tejidos, donde los antibióticos penetran fácilmente o encontrarse en cavidades pulmonares, donde la penetración es más difícil [13]. Así mismo esta micobacteria que posee una compleja pared celular constituida por lípidos, proteína y polisacáridos le confieren una resistencia natural a numerosos antibacterianos por ser hidrófoba con escasa permeabilidad [14,15]. Por todo esto es necesaria la combinación medicamentosa, pues la monoterapia engendra poblaciones bacterianas resistentes que llevan al fracaso de los tratamientos [16].

1.1.2. Antibióticos empleados en el tratamiento de la tuberculosis

El tratamiento de la tuberculosis está basado en un esquema terapéutico que está constituido por cinco antibióticos de primera línea, que siguen los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). El éxito de este tratamiento se basa en la asociación de estos fármacos y en su larga duración, para que actúen en las dos poblaciones bacilares diferentes que se presentan en esta enfermedad [15].

Dentro de los fármacos de primera línea están isoniazida (ISO), rifampicina (RIFA), y pirazinamida (PIRA), que son drogas con actividad bactericida de diferente intensidad y

son considerados de primera línea de acuerdo a su eficacia y tolerabilidad [17]. También se usa el etambutol (ETA) dentro de los fármacos de primera línea, el cual tiene un efecto bacteriostático [18]. En la Tabla 2 se incluyen los fármacos primarios y la clave del sector salud, la presentación farmacéutica, la dosis o toma diaria y/o intermitente (tres veces por semana) y, las reacciones adversas más frecuentes. Este esquema se administra durante 25 semanas, poco más de seis meses, hasta completar 105 tomas en total. Se acostumbra dividir el tratamiento en dos fases: A) *Intensiva*, busca reducir la carga bacteriana al aplicarse 60 tomas, de lunes a sábado, conjuntando cuatro fármacos: isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol, B) *Fase de sostén*, se administran sólo dos fármacos bactericidas, tres veces por semana, 45 tomas en total [19].

Tabla 2. Tratamiento antituberculoso primario.

Fármacos	Presentación	Dosis diaria			Dosis intermitentes*		Reacciones adversas
		Niños mg/kg peso	Adultos mg/kg peso	Dosis máxima/día	Niños mg/kg	Adultos dosis total máxima	
Isoniazida (ISO)	Comprimidos 100 mg	10-15 mg	5-10 mg	300 mg	15-20 mg	600-800 mg	Neuropatía periférica Hepatitis
Rifampicina (RIFA)	Cápsulas 300 mg Jarabe 100 mg/5mL	15 mg	10 mg	600 mg	15-20 mg	600 mg	Hepatitis Hipersensibilidad Interacciones medicamentosas
Pirazinamida (PIRA)	Comprimidos 500 mg	25-30 mg	20-30 mg	1.5-2.0 g	50 mg	2.5 g	Gota Hepatitis
Estreptomina (STR)	Frasco Ampolleta 1g.	20-30 mg	15 mg	1 g	18 mg	1 g	Vértigo Hipoacusia Dermatitis
Etambutol (ETA)	Comprimidos 400 mg	20-30 mg	15-25 mg	1200 mg	50 mg	2400 mg	Alteración de la visión

En este contexto, los fármacos de estudio en el presente proyecto serán isoniazida (ISO) y pirazinamida (PIRA) debido a su eficacia, tolerabilidad y uso conjunto para el tratamiento de la tuberculosis en nuestro país [10]. En la siguiente sección se describe las propiedades de los fármacos de estudio.

1.1.3. Propiedades de los agentes antituberculosos de estudio

ISONIAZIDA (ISO):

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 hidrazina del ácido isonicotínico fue descubierta en 1945, la cual fue introducida al mercado en 1952 por los laboratorios "Squibb y Roche". La ISO (MM = 137 g/mol) es una molécula totalmente sintética, de masa molecular baja e hidrosoluble [20-22].

La ISO es bactericida contra los microorganismos en crecimiento y bacteriostático contra las cepas en reposo. Se utiliza en combinación con otros fármacos en el tratamiento de la tuberculosis pulmonar, tanto primaria como crónica, tuberculosis miliar, meningitis tuberculosa, tuberculosis renal y tuberculosis osteoarticular. En la Figura 2 se presenta su estructura química [20-22].

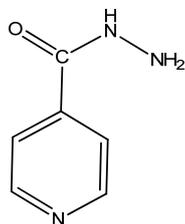


Figura 2. Estructura química de la Isoniazida.

La ISO es absorbida en forma rápida y fácil por vía oral o por vía intramuscular. El fármaco tiene un gran volumen de distribución en el sistema nervioso central, incluido el líquido cefalorraquídeo, aún en ausencia de inflamación de las meninges. La ISO es metabolizada en el hígado por acetilación e hidroxilación. Una pequeña fracción del fármaco sin modificar también es depurada por los riñones. La ISO es excretada principalmente en la orina por una parte como fármaco inalterado y por último como otros compuestos conjugados [20-22].

PIRAZINAMIDA (PIRA):

La pirazinamida es uno de los fármacos antimicobacterianos más antiguos, originalmente considerado demasiado tóxico para uso de rutina. Se sintetizó a partir de la nicotinamida en 1952. La PIRA (PM = 123 g/mol) es una molécula sintética, no es hidrosoluble y es de bajo costo. En la Figura 3 se presenta su estructura química [20- 22].

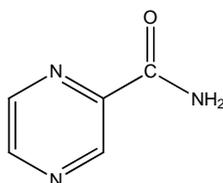


Figura 3. Estructura química de la Pirazinamida.

La PIRA es bactericida, pero su mecanismo de acción no se conoce. Los microorganismos deben estar creciendo en una forma activa para que el fármaco ejerza su efecto. En general, la PIRA sólo se utiliza en regímenes combinados de medicamentos contra micobacterias resistentes a los fármacos de primera línea pero en ocasiones se da como fármaco de primera línea en el tratamiento con otros fármacos. Se utiliza para el tratamiento de la tuberculosis avanzada de forma previa a la cirugía [20-22].

La PIRA es absorbida por vía oral y llega a la concentración sérica pico en 2 h. Debido a su liposolubilidad se distribuye ampliamente en todo el organismo, incluyendo el sistema nervioso central. Atraviesa la membrana leucocitaria y es capaz de destruir microorganismos intracelulares. Es metabolizada en el hígado a productos hidrolizados e hidroxilados. Se han encontrado altas concentraciones del fármaco en el hígado, los pulmones y los riñones, pero concentraciones más bajas en otros órganos [20-22]. Este fármaco sólo se usa para el tratamiento de las infecciones micobacterianas. Por lo general se prescribe PIRA en combinación con ISO y ETA hasta disponer de los estudios de susceptibilidad. También es un componente frecuente de la fase temprana (2 meses) de la quimioterapia breve (6 meses) de la tuberculosis pulmonar [20-22].

El amplio uso de estos medicamentos antituberculosos pone en riesgo la calidad de los cuerpos de agua y la salud de los seres vivos que entran en contacto con los mismos. Por lo tanto, es necesario contar, tanto con metodologías analíticas que permitan llevar a cabo su determinación, como con tecnologías de remediación (o degradación, según lo que se busque) lo cual permitirá reducir la movilidad y toxicidad en el medio ambiente.

1.2 Técnicas en flujo

Uno de los retos que enfrentan los químicos analíticos hoy en día es el desarrollo de métodos analíticos que presentan las siguientes características: alta sensibilidad, bajo consumo de muestra y reactivos, elevada frecuencia de análisis, bajo costo por parámetro analizado, simplicidad y respeto ambiental [23].

En los laboratorios donde se realizan diariamente gran cantidad de análisis, es una gran ventaja contar con instrumentos automáticos, ya que representan ahorro de tiempo y

dinero, esto se observa mediante la elevada frecuencia de análisis, que los dispositivos manuales no presentan [23].

Otra ventaja consiste en que los equipos automatizados pueden proporcionar resultados más precisos, que los que obtendría una persona utilizando un instrumento manual. Los resultados más precisos se deben a la reproducibilidad de las secuencias de tiempo de los instrumentos automáticos que raramente las operaciones manuales pueden igualar. Esto asegura que las muestras y los patrones se traten de la misma forma y durante el mismo tiempo [23].

Dentro de las técnicas en flujo se pueden destacar los sistemas en flujo multijeringa (MSFIA, por sus siglas en inglés), de los cuales se describen a continuación las principales características que presentan.

1.2.1. Análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA)

1.2.1.1 Características

El análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) es una técnica en flujo relativamente reciente, descrita por primera vez en el trabajo de Cerdà y col., en el año de 1999 [24]. Los primeros prototipos fueron construidos adaptando una bomba de pistón bidireccional análoga a la utilizada en SIA (análisis por inyección secuencial) para que pudiera desplazar simultáneamente cuatro émbolos de jeringa. Estas jeringas pueden ser de diferentes capacidades y así conseguir impulsar los reactivos y muestra a diferentes caudales. De esta forma la técnica en flujo MSFIA dispone de la robustez típica de la técnica SIA, basada en el uso de jeringas, lo que permite la utilización, tanto de reactivos agresivos, como de disolventes orgánicos sin medidas adicionales, pero con una filosofía

similar al FIA (análisis por inyección en flujo) ya que permite el flujo simultáneo de varias disoluciones. A la multijeringa (Figura 4) se le pueden incorporar un mínimo de ocho válvulas solenoides de conmutación análogas a las utilizadas en la técnica MCFIA (análisis en flujo multiconmutado). Cuatro de ellas están situadas en las cabezas de las jeringas, permitiendo controlar la dirección del flujo (hacia el propio depósito o hacia el sistema), mientras que las restantes cuatro, se conectan en la parte posterior de la multijeringa y dependiendo de las necesidades del sistema desarrollado, actúan como válvulas de conmutación de tres vías, independientes del movimiento de la multijeringa. Con estas válvulas se eliminan los inconvenientes derivados del uso de las válvulas rotatorias de posición multicanal, utilizadas en SIA, como son el ajuste y detección de las posiciones así como su lentitud en la selección de los canales [23].



Figura 4. Dispositivo multijeringa.

Otra de las características diferenciales de esta técnica es la creación de los flujos por impulsión de los líquidos y no por aspiración con lo cual se minimiza la posibilidad de formación de burbujas en caso de usar disolventes orgánicos. Por otra parte, es posible usar las válvulas adicionales de forma que actúen en sustitución de la válvula de posición

multicanal, simplificando y abaratando aún más el sistema o bien ser utilizadas para inyecciones multiconmutadas.

En MSFIA, los tubos son del orden de 0.8 mm de diámetro interno, por donde el flujo es del tipo laminar. El volumen de muestra inyectada es del orden de 50-150 μL , el tiempo de respuesta es de 3 a 60 s, la frecuencia puede ser fácilmente de 120 muestras/h, alcanzándose una precisión del 1-2%, el consumo de reactivos es muy bajo, el ciclo de lavado no existe y es posible la aplicación de métodos cinéticos, por lo cual, en las condiciones de la detección no es necesario el equilibrio [24].

1.2.1.2 Ventajas del sistema MSFIA.

Con este sistema, se logran reunir varias de las ventajas de las técnicas de flujo precedentes, como son:

- ✓ Elevada frecuencia de muestreo del FIA debido a que la adición de muestra y reactivos se hace en paralelo, lo que conduce además a una mejor mezcla de los mismos, inconveniente que se presenta en SIA.
- ✓ Robustez, ya que los distintos líquidos están sólo en contacto con vidrio (jeringas) y teflón, porque no se utilizan los tubos de las bombas peristálticas, lo que es un gran inconveniente en el caso de FIA.
- ✓ Empleo de bajos volúmenes de muestra y reactivos, ya que estos son solamente inyectados al sistema justo en el momento en que se desea hacer una determinación.

- ✓ Versatilidad, ya que los tiempos no vienen fijados por la longitud de los tubos, sino por las instrucciones dadas desde la computadora que controla todo el sistema (se fijan tiempos y caudales).
- ✓ El uso de las válvulas solenoides de conmutación que permiten el cambio de su posición sin necesidad de parar el movimiento del pistón de la multijeringa, su conmutación es tan rápida que no se produce ninguna sobrepresión al cambiar la posición de las mismas [23].

1.2.1.3 Acoplamiento con otras técnicas analíticas

El acoplamiento de otros módulos complementarios a la multijeringa ha permitido incrementar aún más la versatilidad de la técnica en flujo MSFIA. Una combinación que permite realizar varias etapas del proceso analítico consiste en el acoplamiento de uno o varios módulos multijeringa que contengan diversos reactivos o muestras según sea el caso, con esto se logra conseguir duplicar la frecuencia de muestreo de hasta 180 inyecciones por hora, algo que resultaría difícil para otras técnicas en flujo.

Existen reportadas muchas aplicaciones de los sistemas MSFIA en la literatura para la determinación de compuestos orgánicos e inorgánicos, la mayoría de ellas son aplicaciones a determinaciones directas, siendo la espectrofotometría UV-Vis [25-33], la quimioluminiscencia [34-36], y la espectrometría de fluorescencia atómica [37-39], las técnicas de detección más utilizadas.

La espectrofotometría UV-Vis, dada sus características de sensibilidad, bajo costo y facilidad de automatización, puede beneficiar considerablemente al análisis de compuestos orgánicos e inorgánicos en muestras ambientales.

Otra ventaja que ofrecen los sistemas MSFIA, es el poder acoplar un procedimiento de separación cromatográfica [32]. La combinación de técnicas de análisis en flujo, de separación, y detección ha abierto nuevas alternativas en la química analítica que permitan el desarrollo de sistemas totalmente automatizados adaptables al monitoreo en tiempo real.

1.2.1.4 Aplicación de la Separación Cromatográfica en los sistemas MSFIA

En los métodos analíticos las técnicas de separación juegan un papel crítico, cuyos principales objetivos son la separación del analito y la eliminación de compuestos interferentes. En este sentido, el empleo de columnas cromatográficas de tipo monolítico [39,40], es una excelente alternativa a las columnas convencionales con sorbentes en forma de partículas para el análisis rutinario, debido a sus propiedades de separación asociada con la notable permeabilidad de estas columnas que permite usarlas a flujos elevados (> 10 mL/min) y bajas presiones (< 400 bar) [41] obteniendo buenas separaciones cromatográficas y acortando los tiempos de análisis, de tal manera que se hace idónea para su empleo en sistemas MSFIA.

Las columnas de tipo monolítico (Figura 5) tienen como fase estacionaria, en lugar de un sólido particulado, un material dispuesto en una sola pieza o bloque, con una estructura tridimensional compuesta por un esqueleto con poros de diferentes tamaños (macroporos y mesoporos).

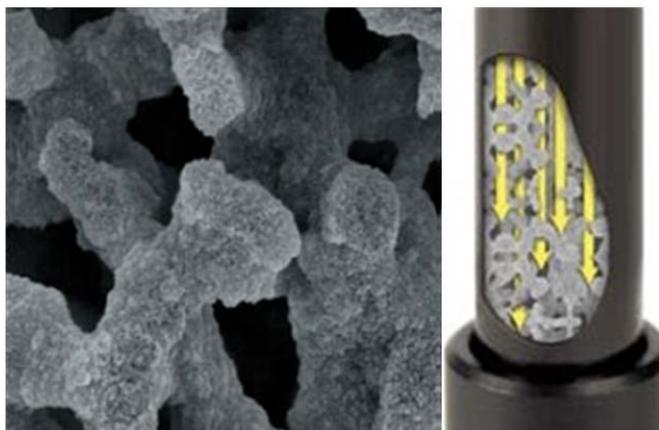


Figura 5. Estructura porosa bimodal de una columna monolítica.
(<http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Onyx/Monolithic C18>).

1.2.1.5 Versatilidad de los sistemas MSFIA

Otra de las ventajas que ofrecen estos sistemas MSFIA, es el poder acoplar otros módulos al sistema lo cual le brinda al sistema mayor versatilidad, tal es el caso de los procedimientos de preconcentración en línea sobre una membrana de fase sólida, la cual alcanza un mayor factor de enriquecimiento que con la extracción tradicional. El preconcentrador en flujo (Figura 6) combina la preconcentración de los analitos y la eliminación de la matriz de la muestra sobre una membrana sólida, para posteriormente eluir los analitos con un volumen pequeño de solvente [43]. La membrana sólida consiste en un filtro modificado que contiene la fase extractante como parte del material del propio filtro (por ej. filtros de la marca registrada Empore™). Las fases extractantes más comunes son las de sílices enlazadas, polímeros de tipo estireno-divinilbenceno y carbón grafitizado. Con estas membranas no se presentan sobrepresiones, se pueden utilizar repetidamente, son muy fáciles de cambiar y se comportan de una forma muy reproducible [44].



Figura 6. Preconcentrador en flujo que consta de dos cilindros de polimetilmetacrilato (PMMA).

El sistema MSFIA ofrece además la posibilidad de incorporar en un reactor en línea un proceso de remoción como la fotocatalisis heterogénea, permitiendo llevar a cabo la monitorización en tiempo real [45].

Los procesos y tecnologías existentes en la actualidad para el tratamiento de aguas residuales son diversos y se clasifican frecuentemente en tratamientos primarios, secundarios y terciarios. Los tratamientos primarios son aquellos destinados a la eliminación de sólidos suspendidos y grasas del agua residual. Los secundarios por su parte son procesos biológicos cuyo objetivo es la remoción de la materia orgánica biodegradable y los terciarios tienen como fin la eliminación de compuestos recalcitrantes y microorganismos peligrosos presentes en el agua residual (cloración, ultravioleta).

La incapacidad de los sistemas biológicos convencionales para remover sustancias tóxicas y/o recalcitrantes, por un lado, y la existencia de una legislación más rigurosa respecto al control de la contaminación, por el otro, evidencian la necesidad de desarrollar nuevos procesos para el tratamiento de aguas residuales. En los últimos años se ha prestado una atención especial a los procesos avanzados de oxidación (PAO's). Estos procesos son complementos útiles a las técnicas ya existentes como la floculación, precipitación, adsorción, ósmosis inversa, combustión y los procesos biológicos [46].

1.3 Procesos Avanzados de Oxidación

Las Tecnologías o Procesos Avanzados de Oxidación (TAOs o PAOs) [47-51] se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios en la estructura química de los contaminantes. El concepto fue inicialmente establecido por Glaze y col. [42,50, 51], quienes definieron los PAOs como procesos que involucran la generación y uso de especies oxidantes transitorias poderosas, principalmente el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Este radical puede ser generado por medios fotoquímicos (incluida la luz solar) o por otras formas de energía; además, posee alta efectividad para la oxidación de materia orgánica. Si bien la aplicación de estos procesos en la oxidación de contaminantes orgánicos ha sido reportada desde 1994, en el caso particular de los contaminantes farmacéuticos existen muy pocas publicaciones relacionadas con la descomposición de estas sustancias mediante PAOs. Dentro de los PAOs más utilizados se encuentra la Fotocatálisis Heterogénea.

1.3.1. Fotocatálisis Heterogénea

La fotocatalisis heterogénea es un proceso que consiste en la absorción directa o indirecta de energía radiante por un sólido; este último generalmente es un óxido metálico semiconductor de banda ancha [52]. Al iluminar al semiconductor (Figura 7), un electrón de la banda de valencia es promovido a la banda de conducción y entonces se dice que se genera una vacante electrónica en la banda de valencia. En la literatura, dicha vacante electrónica suele denominarse “hueco” (h^+). Los huecos pueden reaccionar con el agua o grupos hidroxilo, formando así radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$) adsorbidos en la superficie del fotocatalizador; posteriormente los radicales hidroxilos son capaces de atacar consecutivamente a la materia orgánica adsorbida en el catalizador o en solución hasta

transformarla en CO_2 y H_2O . La fotocatalisis heterogénea es usada para la descontaminación o desinfección, durante los tratamientos de purificación de aire y agua.

La única diferencia con la catálisis convencional es el modo de activación del catalizador, ya que la activación térmica es reemplazada por una activación fotónica [52]. Cuando un catalizador semiconductor de tipo calcogenuro (óxidos o sulfuros) es iluminado con fotones cuya energía es igual o superior a la de su energía de banda prohibida (*bandgap*) E_G ($h\nu = E_G$), ocurre una absorción de estos fotones y una creación dentro del conjunto de pares electrón-hueco, que se disocian en fotoelectrones libres en la banda de conducción y en foto huecos en la banda de valencia (Figura 7). Simultáneamente, en presencia de una fase fluida (gas o líquido), ocurre una adsorción espontánea y, dependiendo del potencial redox (o nivel de energía) de cada adsorbato, se verifica una transferencia de electrones hacia las moléculas aceptoras, mientras que un foto hueco positivo es transferido a una molécula donadora (en realidad la transferencia del hueco corresponde a la cesión de un electrón por parte del donador al sólido) [52].

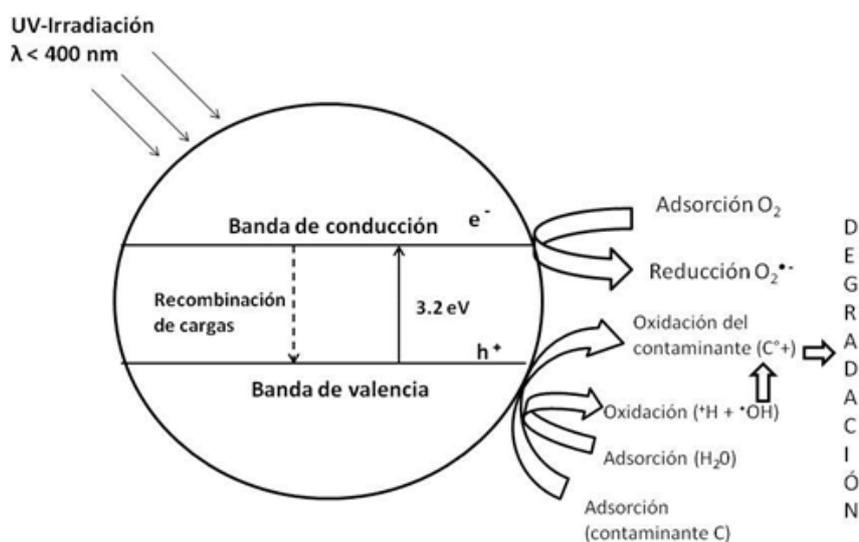


Figura 7. Diagrama del proceso fotocatalítico para una partícula de TiO_2 .

Semiconductores

En el caso de la fotocatalisis heterogénea, se emplean diversos semiconductores tales como: ZnO, Fe₂O₃ y TiO₂, entre otros. Los criterios para seleccionar un buen fotocatalizador son: resistencia a la corrosión, baja toxicidad, elevada área superficial y un adecuado potencial redox de la banda de valencia, de modo que sea suficientemente positivo como para hacer factible la oxidación de la materia orgánica y la reducción de algunas especies inorgánicas. Además, es deseable que su foto-activación se lleve a cabo dentro del intervalo luz visible- UV cercano, necesariamente menor a 4.1 eV para poder aprovechar la luz solar [49]. Los semiconductores más prometedores hasta el momento son el dióxido de titanio (TiO₂), y el óxido de zinc (ZnO), debido a su banda de energía prohibida (E_g) 3.2 eV ya que es termodinámicamente adecuada como para oxidar cualquier molécula orgánica [52].

1.4 Antecedentes

A continuación se describen algunos antecedentes sobre la separación y determinación de fármacos antituberculosos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), sobre el uso de técnicas de análisis en flujo para la separación y detección de fármacos, así como de la aplicación de procesos de degradación fotocatalítica de antibióticos.

1.4.1. Determinación de fármacos antituberculosos por HPLC.

Gong y Col. (2009) [53] llevaron a cabo la determinación simultánea de etambutol y pirazinamida en plasma humano utilizando HPLC acoplado a espectrometría de masas, empleando las siguientes condiciones cromatográficas: columna C18, fase móvil de 0.1% ácido trifluoroacético en agua y 0.1% ácido trifluoroacético en metanol, empleando un flujo de 1 mL/min con una elución por gradiente. Para el tratamiento de la muestra se empleó la precipitación de proteínas con 1.25% (v/v) ácido fórmico en acetonitrilo. Los porcentajes de recuperación fueron mayores del 95% para etambutol y entre 46-50% para pirazinamida. Se reporta un tiempo de análisis de 8 min por muestra.

Por otra parte Zhou y Col. (2010) [54] llevaron a cabo la determinación simultánea de pirazinamida, el metabolito acetil isoniazida, isoniazida, y rifampicina en plasma humano utilizando HPLC de fase reversa (columna C12) con detección UV con arreglo de diodos. Las longitudes de onda de detección fueron 268, 265, 264 y 341 nm. Para la separación cromatográfica se utilizó como fase móvil metanol:acetonitrilo: ácido 1-heptanosulfónico 20 mM, pH 2.5 con una relación de 10:8:82 utilizando un caudal de 0.8 mL/min, a los 6 minutos la fase móvil cambia de composición a 0:65:35 y el caudal aumentó a los 14 minutos a 1.5 mL/min y se mantuvo hasta los 19 minutos, a los 19.5 minutos la fase móvil cambia a la composición inicial (10:8:82) y el caudal cambia a 1.2 mL/min, esas condiciones fueron mantenidas hasta los 24.5 minutos, después el caudal retrocedió hasta los 0.8 min a los 25 minutos y se mantuvo durante 1 minuto hasta la siguiente inyección. La recuperación de los fármacos en las muestras de estudio fue en el intervalo de 84 a 91%. Los límites de detección fueron 0.014, 0.009, 0.023 y 0.054 µg/mL para pirazinamida, el metabolito acetil isoniazida, isoniazida, y rifampicina,

respectivamente. Los límites de cuantificación fueron 0.1, 0.05, 0.1 y 0.2 $\mu\text{g/mL}$ para pirazinamida, el metabolito acetil isoniazida, isoniazida, y rifampicina, respectivamente.

Adaway y Col. (2012) [55] resaltan la importancia de la técnica de cromatografía de líquidos acoplada a masas-masas (LC-MS/MS) como una técnica sensible capaz de cuantificar antibióticos antituberculosos en baja concentración, en sangre utilizando una columna de fase reversa C18, la fase móvil consiste en: A) 0.1 % de ácido trifluoroacético en agua y B) 0.1 % de ácido trifluoroacético en metanol. El límite de cuantificación (LOQ), fue 0.05 mg/L tanto para pirazinamida como isoniazida,

De acuerdo a las antecedentes sobre métodos cromatográficos, se puede concluir que es factible la separación de isoniazida y pirazinamida empleando la cromatografía de fase reversa con el empleo de pares iónicos como ácido trifluoroacético o ácido heptanosulfónico. Además se pudo observar adecuados límites de detección y cuantificación mediante la cromatografía de líquidos, utilizando una columna C18, con detección ultravioleta (UV), que es una instrumentación más económica comparada con LC/MS. Se pudo notar que se requiere el uso de modificador orgánico (pares iónicos) como ácido trifluoroacético, ácido fórmico o ácido heptanosulfónico para reducir la polaridad de la fase móvil.

Por lo que la cromatografía de líquidos de fase reversa parece ser una buena alternativa para el análisis de rutina de los fármacos antituberculosos presentes en muestras de agua.

1.4.2. Técnicas en flujo para la separación y determinación de fármacos

En esta sección se describen metodologías de separación cromatográfica implementadas mediante el uso de un sistema de baja presión acoplada al análisis de inyección en flujo multijeringa para la determinación de fármacos.

Obando y Col. (2008) [56] llevaron a cabo la determinación simultánea de hidroclorotiazida y losartan potásico, fármacos antihipertensivos, en tabletas, mediante la cromatografía multijeringa utilizando para la separación cromatográfica una columna monolítica C18 de fase reversa y detección UV (226 nm) con un detector de arreglo de diodos, la fase móvil consistió en una mezcla de 10 mmol/L buffer pH 3.1 de KH_2PO_4 : metanol:acetonitrilo (65:33:2 v/v/v). Los límites de detección para hidroclorotiazida y losartan fueron de 0.21 y 0.42 mg/L, respectivamente, utilizando el sistema MSFIA propuesto con una frecuencia de inyección de 9 muestras/h. Por otro lado, en este mismo trabajo utilizaron HPLC para la validación del método propuesto, reportando límites de detección de 0.34 y 0.62 mg/L para hidroclorotiazida y losartan, respectivamente con una frecuencia de inyección de 10 muestras/h. Esto demuestra que la técnica MSFIA puede ser una alternativa viable a la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la separación de los fármacos. El sistema propuesto en este trabajo ofrece la posibilidad de separación de analitos sin la instrumentación costosa del HPLC empleando además un bajo consumo de solventes orgánicos.

Otro trabajo realizado posteriormente por Obando y Col. (2008) [57], acoplaron un preconcentrador en línea y una columna monolítica C18 (columna RP-18e) al sistema MSFIA con detección UV (226 nm) para la determinación de los antihipertensivos hidroclorotiazida y losartan en agua superficial, agua subterránea y agua residual. Para la

implementación del sistema de preconcentración, el acondicionamiento de la membrana fue crucial para la adsorción de las especies de interés, la membrana se sumergió de forma sucesiva en acetona, metanol, ácido nítrico al 50%, y agua destilada, posteriormente la membrana fue regenerada en mezcla de metanol-HCl (80% v/v: 0.02 mol/L). Con respecto al anterior trabajo reportado por estos mismos autores, se observó una mejora en los límites de detección y estos fueron 0.07 y 0.09 mg/L para hidroclorotiazida y losartan, respectivamente; con una frecuencia de inyección de 9 muestras/h; la técnica permitió porcentajes de recuperación en las muestras de estudio del 95 al 99%.

Maya y col. (2010) [58] utilizaron la técnica propuesta para este proyecto para llevar a cabo la determinación de furosemida, hidroflumetiazida y bendroflumetiazida, en muestras de agua y orina humana mediante MSFIA-separación cromatográfica acoplado a un sistema de preconcentración en línea, y detección por quimioluminiscencia. Para la separación cromatográfica se utilizó una columna monolítica C18 y fase móvil KH_2PO_4 10 mmol/L pH 3 y acetonitrilo (60:40). El caudal fue 1.3 mL/min, y se alcanzaron límites de detección de 3, 60 y 40 $\mu\text{g/L}$ para hidroflumetiazida, furosemida y bendroflumetiazida, respectivamente.

En el trabajo realizado por Zhuang y col. (2012) [59] utilizaron la técnica de FIA con detección de quimioluminiscencia para llevar a cabo la determinación de ketoprofeno en productos farmacéuticos, basada en la reacción con luminol en medio alcalino y NaIO_4 , se utilizó detección UV a 425 nm, se trabajó con un rango lineal de 2.0×10^{-7} a 1.0×10^{-5} mol/L, se obtuvo límite de detección de 8.0×10^{-9} mol/L.

Con base en los antecedentes sobre las técnicas en flujo de tipo MSFIA y FIA acoplada a la separación cromatográfica empleando columnas de tipo monolítica, las técnicas en flujo consideran un ahorro importante en tiempo de análisis y un menor costo

de operación por el bajo consumo de reactivos, lo cual convierte al sistema propuesto como una alternativa viable a las técnicas cromatográficas de alta resolución para llevar a cabo el análisis. Otra característica de los sistemas de análisis en flujo es que permite acoplarse a otros sistemas para monitorizar en tiempo real alguna reacción o degradación de interés, siendo factible acoplar el sistema de análisis de inyección en flujo multijeringa a un reactor fotocatalítico para la monitorización de la degradación en línea de los fármacos isoniazida y pirazinamida.

1.4.3. Aplicación de la Fotocatálisis Heterogénea en la degradación de antibióticos y otros fármacos.

En esta sección se describen algunos trabajos sobre la aplicación de la fotocatalisis heterogénea para la degradación de antibióticos.

Giraldo y col. (2010) [60] realizaron la degradación de 20 mg/L de ácido oxolínico, que es una quinolona que posee actividad bactericida contra bacterias gramnegativas de localización urogenital. Se llevó a cabo la degradación con TiO_2 en una suspensión y evaluaron los parámetros que afectan la degradación mediante un diseño de experimentos, utilizando como factores el pH (7.5-11) y la cantidad de catalizador (0.2 -1.5 g/L) irradiando a 365 nm, encontrando las condiciones óptimas en 1 g/L y pH 7.5, con las condiciones óptimas se alcanzó un 100% de degradación en 60 min. La degradación del fármaco se monitoreó mediante HPLC, utilizaron una columna C18, detector de fluorescencia con longitudes de onda a 232 y 410 nm de excitación y emisión respectivamente.

En otro trabajo llevado a cabo por Yang y Col. (2010) [61] realizaron la degradación de atenolol, metoprolol, y propranolol con una concentración inicial de 100 μM a pH 7 para la mezcla de los 3 fármacos, irradiando por 4 h (365 nm) en una suspensión de TiO_2 2 g/L. El abatimiento de concentración de los contaminantes se siguió por HPLC acoplado a Espectrometría de Masas. Se logró la mineralización completa de los fármacos de estudio.

Elmolla y Chaud (2011) [62], trataron agua residual que contenía antibióticos (amoxicilina y cloxacilina) mediante el proceso UV/ H_2O_2 / TiO_2 . Las concentraciones iniciales de los antibióticos en agua fueron 138 mg/L para amoxicilina y 84 mg/L para cloxacilina que fueron determinadas por HPLC con detección UV a 204 nm. Las condiciones para la remoción fueron pH 5 y la mezcla se irradió por 5 h con una lámpara UV (365 nm). El porcentaje de degradación de la mezcla fue del 57%.

En el trabajo realizado por Van Doorslaer y col. (2012) [63] realizaron la degradación de moxifloxacina, evaluando la concentración inicial del contaminante de 12.5 a 124.6 μM , cantidad de catalizador utilizado (TiO_2) de 0.25 a 8.0 g/L, temperatura de 5 a 60 °C. La suspensión se mantuvo a pH 7, irradiando a 365 nm; encontraron que la cantidad de catalizador que más favorece a la degradación del fármaco es 5 g/L, y la temperatura de 25 °C. Se alcanzó un porcentaje de degradación del 100% en tiempo de reacción de 14 minutos. La cuantificación de la degradación se llevó a cabo por HPLC con detector de arreglo de diodos (296 nm).

Como se puede observar en los trabajos descritos, el uso de la fotocatalisis heterogénea empleando como catalizador TiO_2 es un proceso alternativo para el tratamiento de efluentes contaminados con compuestos recalcitrantes como los fármacos, alcanzando

en algunos casos porcentajes de remoción del 100%. Inclusive se reporta en algunos de los trabajos descritos, que se obtiene la mineralización completa.

Así en el presente proyecto se planteó el uso de la fotocatalisis heterogénea mediante un reactor acoplado al sistema MSFIA para la degradación de los fármacos de estudio. Aunque se ha aplicado la fotocatalisis heterogénea para la degradación de algunos fármacos alcanzando altos porcentajes de degradación y mineralización, sin embargo no hay estudios reportados sobre la degradación fotocatalítica de ISO y PIRA y tampoco se ha reportado el seguimiento de la degradación de éstos fármacos de estudios por el sistema de análisis en flujo MSFIA.

1.5 Hipótesis

El sistema de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) permite evaluar la concentración de los agentes antituberculosos isoniazida y pirazinamida presentes en muestras de agua y su degradación mediante el acoplamiento en línea de un reactor fotocatalítico.

1.6 Objetivos

1.6.1. Objetivo General

Desarrollar una metodología analítica para la determinación en flujo de los fármacos antituberculosos isoniazida y pirazinamida en muestras de agua mediante un sistema de análisis por inyección en flujo multijeringa y acoplar un reactor fotocatalítico al sistema para la degradación de estos agentes contaminantes.

1.6.2. Objetivos Específicos

1.- Determinar las siguientes propiedades fisicoquímicas de los fármacos: solubilidad en medio acuoso, estabilidad en función del pH del medio y estabilidad en disolución en función del tiempo; el seguimiento se realizará mediante espectrofotometría UV-Vis.

2.-Instalar el sistema MSFIA para realizar la separación cromatográfica y las determinaciones del punto anterior.

3.- Separar cromatográficamente en el sistema MSFIA a los analitos de estudio en una columna C18 de tipo monolítica.

4.- Degradar los fármacos de estudio en el reactor fotocatalítico acoplado al sistema MSFIA.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron grado analítico. Para todos los experimentos se empleó Agua grado nanopura ($18.0 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). En la Tabla 3 se presenta un listado de los reactivos utilizados en los estudios espectrofotométricos en batch y de separación cromatográfica, mientras que en la Tabla 4 se presentan los reactivos utilizados en la degradación fotocatalítica.

Tabla 3. Reactivos utilizados durante el estudio espectrofotométrico en batch y el proceso de separación cromatográfica.

Reactivo	Marca	Pureza
Na_2HPO_4	Sigma-Aldrich	99.5%
NaH_2PO_4	Sigma-Aldrich	99%
Na_2CO_3	Sigma-Aldrich	99%
NaHCO_3	Sigma-Aldrich	99.5%
CH_3COONa	Sigma-Aldrich	99%
CH_3COOH	Sigma-Aldrich	99%
Isoniazida	Sigma-Aldrich	99%
Pirazinamida	Sigma-Aldrich	99%
Agua	Tedia	Grado HPLC
CH_3OH	Fermont	Grado HPLC
Acetonitrilo	J.T. Baker	Grado HPLC
CHOOH	Fermont	89%
Ácido 1-heptanosulfónico	Fisher Scientific	Grado HPLC

Tabla 4. Reactivos utilizados durante el estudio de degradación fotocatalítica

Reactivo	Marca	Pureza
Isoniazida	Sigma-Aldrich	99%
Pirazinamida	Sigma-Aldrich	99%
CH_3OH	Fermont	Grado HPLC
Acetonitrilo	J.T. Baker	Grado HPLC

TiO ₂	Degussa P25	≥ 97%
ZnO	J.T.Baker	99.6%
HNO ₃	J.T. Baker	99%

2.1.2. Instrumentación

En la Tabla 5 se describen los materiales y equipos que se utilizaron para el desarrollo del estudio en batch de los fármacos antituberculosos y de la metodología propuesta para la separación cromatográfica y en la Tabla 6 se presentan los instrumentos utilizados en la degradación fotocatalítica respectivamente.

Tabla 5. Materiales y equipos utilizados para realizar el proceso de separación cromatográfica.

Componente	Descripción	Marca
Módulo Multijeringa	Multi-Burette 4S	CRISON
Jeringas	5000 µL #1005 GASTIGHT	Hamilton, Suiza
Tubería	PTFE Tubing 0.02 m OD x 1.5mm ID 7.6 m y 0.8mm ID x 1.58mm OD 3.0 m	SUPELCO Analytical
Tornillos	Tube end fittings para 0.32 cm y 0.16 cm Tubings	SUPELCO Analytical
Columna Monolítica	Onyx™ Monolithic C18, Column 25 x 4.6 mm i.d	ONYX Phenomenex
Guarda-columna	Onyx™ Monolithic (5 mm×4.6 mm)	ONYX Phenomenex
Celda de Flujo	QS 1.000	Starna Cells Inc
Fuente de luz UV-Vis	Modelo DT 1000 CE	Analytical Instrumen Systems, Inc
Espectrofotómetro	USB 2000	Ocean Optics

Tabla 6. Materiales y equipos utilizados para el proceso de la degradación fotocatalítica

Componente	Descripción	Marca
Módulo Multijeringa	Multi-Burette 16A	CRISON
Módulo Válvula de Selección Múltiple y Válvula de Inyección.	Multi-Burette 4S Módulo VA 1+1	CRISON
Jeringas	5000 μ L #1005 GASTIGHT	Hamilton, Suiza
Tubería	TFE Tubing 0.02 m OD x 1.5mm ID 7.6 m y 0.8mm ID x 1.58mm OD 3.0 m	SUPELCO Analytical
Tornillos	Tube end fittings para 0.32 cm y 0.16 cm Tubings	SUPELCO Analytical
Celda de Flujo	QS 1.000	Starna Cells Inc
Espectrofotómetro	USB 2000	Oceant Optics
Lámpara de luz UV	Hg (A) $\lambda = 254$ nm	Spectroline
Lámpara de luz UV	Hg (A) $\lambda = 365$ nm	Spectroline
Lámpara de luz UV	Hg (A) $\lambda = 365$ nm	UVP
Vaso de Precipitado	50 mL	Pyrex
Agitador Magnético	Modelo A-01	SBS
Filtro para HPLC	Acero inoxidable, 1-5 μ m	Perkin Elmer

2.2 Métodos

La parte experimental se divide en 3 etapas:

- 1 Estudio de las propiedades fisicoquímicas de ISO y PIRA mediante espectrofotometría ultravioleta-visible.
- 2 Establecimiento de la metodología basada en la técnica MSFIA para la separación cromatográfica de ISO y PIRA
- 3 Evaluación del proceso de degradación fotocatalítica y acoplamiento al sistema MSFIA para el seguimiento de la degradación de estos fármacos.

2.2.1. Estudio de las propiedades espectrofotométricas de Isoniazida y Pirazinamida.

El establecimiento del estudio, se llevó a cabo en varias etapas: selección de longitud de onda máxima, pruebas de pH, volumen de solución amortiguadora, pruebas de estabilidad en función del tiempo y curvas de calibración. Las siguientes pruebas se realizaron en batch para conocer el comportamiento de los analitos, y saber si era factible realizar el análisis mediante la técnica en flujo MSFIA empleando un detector espectrofotométrico UV-Vis. Se realizó una investigación bibliográfica para conocer las propiedades físicas de los fármacos, específicamente la solubilidad en medio acuoso. Se prepararon disoluciones stock en agua nanopura para cada fármaco: 100 mg/L tanto para ISO como para PIRA. Se procedió a la realización de pruebas de pH, volumen de solución amortiguadora, y estabilidad en función del tiempo.

2.2.1.1 Selección de la longitud de onda de máxima absorción

Para obtener la longitud de onda de máxima absorción de los fármacos de estudio se registró un espectro de absorción en un espectrofotómetro UV-Vis. A partir de las disoluciones stock de los fármacos en agua grado nanopura se prepararon disoluciones de 20 mg/L para ISO y 10 mg/L para PIRA utilizando matraces de 10 mL aforando con agua grado nano-pura. Posteriormente fueron analizadas por espectrofotometría UV-Vis.

2.2.1.2 Pruebas de pH

Para estudiar el efecto del pH, se prepararon varias disoluciones amortiguadoras (Tabla 7).

El estudio del efecto del pH consistió en trabajar con las diferentes disoluciones amortiguadoras de la Tabla 7. A partir de las disoluciones stock de cada fármaco, se prepararon sus respectivas disoluciones, para ISO 20 mg/L y PIRA 10 mg/L utilizando matraces de 10 mL y aforando con cada una de las disoluciones amortiguadoras. Posteriormente fueron analizadas por espectrofotometría UV-Vis.

Tabla 7. Disoluciones amortiguadoras

pH	Ácido	Base	Concentración de amortiguador
2	H ₃ PO ₄	KH ₂ PO ₄	0.2 M
4	CH ₃ COOH glacial	CH ₃ COONa	0.2 M
7	NaH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	0.2 M
8	NaH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	0.2 M
10	NaHCO ₃	Na ₂ CO ₃	0.1 M

2.2.1.3 Pruebas de volumen de disolución amortiguadora

Se prepararon disoluciones de cada fármaco, a 10 mg/L para ISO y PIRA en matraces de 10 mL, variando el volumen de disolución amortiguadora pH 4 y aforando con agua. Los volúmenes utilizados de disolución amortiguadora fueron: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mL. Cada solución fue analizada por espectroscopia UV-Vis.

2.2.1.4 Pruebas de estabilidad en función del tiempo

A partir de las condiciones establecidas de pH y volumen de disolución amortiguadora, se prepararon disoluciones para cada fármaco, a la concentración de 10 mg/L para ISO y PIRA en matraces de 10 mL, con 1.5 mL de buffer acético pH 4 y se aforaron con agua. Cada solución fue analizada por espectrofotometría UV-Vis, registrando las lecturas cada 10 minutos durante 1 hora.

2.2.1.5 Curvas de calibración por espectrofotometría UV-Vis (sistema Batch)

Para realizar la curva de calibración en batch para cada fármaco, se partió de la disolución stock de cada uno de ellos (100 mg/L); y se hicieron las siguientes diluciones, aforando en matraces de 10 mL (Tabla 8).

Tabla 8. Soluciones para las curvas de calibración de cada fármaco

Estándar	[ISO] mg/L	[PIRA] mg/L
1	1	0.5
2	4.5	2
3	8.5	4
4	12.5	6
5	16.5	8
6	20.5	10
7	22	12

Se realizó el análisis de cada fármaco, midiendo la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción para cada fármaco: 266 y 269 nm para ISO y PIRA, respectivamente.

2.2.2. Ensamblaje del sistema MSFIA-Separación cromatográfica

Para realizar el ensamblaje del sistema MSFIA para la separación cromatográfica implicó el cálculo de volumen para cada segmento de la tubería utilizada, ya que conociendo la longitud y el diámetro de la misma, es posible saber el volumen empleado mediante la siguiente ecuación:

$$V = \frac{1}{4} \pi D^2 l \quad \text{Ec. (1)}$$

Dónde:

V = volumen del segmento de tubería

D = Diámetro de la tubería, el cual para la tubería de carga de reactivos y bucle de carga de muestra es de 1.5 mm d.i. (diámetro interno) y para el resto del sistema es de 0.8 mm.

l = longitud del segmento de tubería.

Una vez montado el sistema, se verificó que no existieran fugas y en caso de haberlas, se repararon para evitar la pérdida de muestra y reactivos; así como también evitar la entrada de aire al sistema. Posteriormente, se revisó que los volúmenes de carga y dispensado por parte de la multijeringa fueran los correctos. Para el manejo de la multijeringa y la adquisición de datos se utilizó el software AutoAnalysis Station v5.0. El procesamiento de los datos generados se realizó mediante los paquetes Origin versión 6.1 y Microsoft Excel versión 2007.

Estudio de los parámetros MSFIA-Separación Cromatográfica

Para establecer las condiciones de operación adecuadas para el proceso de separación cromatográfica se realizaron estudios univariantes. De esta forma se evaluaron los siguientes parámetros: concentración del ácido 1-heptanosulfónico empleado como par iónico, porcentaje de acetonitrilo, porcentaje de metanol, caudal de la fase móvil. Así mismo, se inyectó previamente cada fármaco de manera individual para obtener los tiempos de retención e identificarlos, posteriormente se inyectaron en mezcla.

Tabla 9. Evaluación mediante estudios univariantes de las condiciones de separación cromatográfica

Parámetro	Condiciones Estudiadas
Concentración de ácido 1-heptano sulfónico (mM)	5, 10, 15 y 20
Relación Metanol: Ácido 1-heptanosulfónico (%)	5 y 10
Porcentaje de Acetonitrilo (%)	0, 2, 4 y 6
pH	2.5, 3.0, 3.5 y 4.5
Caudal (mL/min)	0.5, 0.8, 1.0 y 1.5

Para los estudios se mantuvieron constantes las siguientes condiciones:

Concentración de isoniazida y pirazinamida 10 mg/L (la mezcla de fármacos se preparó en la fase móvil).

Volumen de inyección de muestra: 0.4 mL.

Longitud de onda de detección: 267 nm.

Longitud de onda de corrección: 550 nm.

Una vez establecidas las condiciones para el proceso de separación, y antes de analizar los fármacos en mezcla, se realizó el análisis de cada fármaco de manera individual, para identificar sus tiempos de retención dentro del sistemas MSFIA-separación cromatográfica.

2.2.2.1 Curvas de Calibración

Para la curva de calibración, se prepararon 100 mL de cada una de las disoluciones de los analitos con la concentración de 100 mg/L para ISO y PIRA. A partir de estas disoluciones se prepararon estándares en mezcla, con las siguientes diluciones, aforando en matraces de 10 mL (Tabla 10).

Tabla 10. Estándares en mezcla para la curva de calibración

Estándar	Alícuota (mL) Isoniazida	[Isoniazida] mg/L	Alícuota (mL) Pirazinamida	[Pirazinamida] mg/L
1	0.10	1	0.05	0.5
2	0.45	4.5	0.20	2.0
3	0.85	8.5	0.40	4.0
4	1.25	12.5	0.60	6.0
5	1.65	16.5	0.80	8.0
6	2.05	20.5	1.00	10.0
7	2.20	22.0	1.20	12.0

Se realizó el análisis espectrofotométrico UV-Vis de cada estándar, midiendo a la longitud de onda de 267 nm. Se realizaron tres réplicas de la calibración.

2.2.2.2 Estudio de Repetibilidad

Para esta prueba se evaluaron dos niveles de concentración de la curva de calibración, las concentraciones seleccionadas para este estudio fueron: 1.0 y 0.5 mg/L, para ISO y PIRA respectivamente, para el primer nivel; 22.0 y 12.0 mg/L, para ISO y PIRA respectivamente, para el segundo nivel, los niveles de concentración fueron el promedio de tres réplicas.

2.2.3. Degradación de los fármacos

Para la degradación de los fármacos de estudio se acopló el reactor fotocatalítico al sistema MSFIA-separación cromatográfica, fue necesario realizar un ajuste al sistema, principalmente para la toma de muestra, esto se realizó al dar de alta un puerto de la válvula de selección multicanal para re-direccionar los flujos, adicionalmente fue necesario acoplar un filtro que se utiliza en HPLC a la entrada de los solventes, colocado entre la solución de

reacción y el bucle de carga que se conecta con el puerto que se dio de alta en la válvula de selección multicanal, esto con el objetivo de evitar el paso del catalizador que se esté utilizando para la degradación hacia el sistema MSFIA. El sistema MSFIA-separación cromatográfica se mantuvo igual a lo ya establecido para la separación y detección de los fármacos ISO y PIRA. El reactor (Figura 8) consistió en un vaso de precipitado de 50 mL, en el cual se colocó la solución en mezcla de los fármacos y el catalizador. Dicha disolución se mantuvo en agitación constante durante cada degradación. Se utilizaron tres lámparas de radiación UV dos de inmersión sujetada por la tapa del reactor y una lámpara externa que se coloca encima del vaso reactor; todo el sistema fotocatalítico fue colocado dentro de una caja de madera forrada en el interior con aluminio.



Figura 8. Reactor fotocatalítico utilizado en la degradación de ISO y PIRA.

2.2.3.1 Diseño de experimentos para la degradación de fármacos

Se aplicó un diseño de experimentos factorial 2^3 para evaluar la etapa de degradación fotocatalítica, los estudios se monitorizaron mediante el método MSFIA-separación cromatográfica acoplado al reactor fotocatalítico. Para realizar el diseño de

experimentos se trabajó con dos niveles (alto y bajo) y se tomaron en cuenta los factores: masa de catalizador (0.5 y 1 g/L), tipo de catalizador (TiO_2 y ZnO) y longitud de onda de irradiación (254 y 365 nm). La degradación se realizó en la mezcla de los fármacos de 5 y 10 mg/L de PIRA e ISO, a pH 5 durante 300 min. El porcentaje de degradación de los fármacos se usó como respuesta. Cada experimento se realizó por duplicado. El tratamiento de los datos del diseño de experimentos se realizó mediante el software Minitab versión 16. En la Tabla 11 se indican las condiciones para los experimentos realizados de acuerdo al diseño de experimentos planteado.

Tabla 11. Diseño de experimentos factorial para la degradación fotocatalítica de los fármacos

Experimento	Masa de catalizador (g/L)	λ (nm)	Catalizador
1	0.5	254	TiO_2
2	1.0	365	ZnO
3	0.5	254	ZnO
4	0.5	365	TiO_2
5	1.0	254	TiO_2
6	1.0	365	TiO_2
7	0.5	365	ZnO
8	1.0	254	ZnO

2.2.3.2 Efecto del pH en el proceso de degradación y mineralización.

De acuerdo a los resultados preliminares de optimización del porcentaje de degradación de la mezcla de los fármacos a partir del diseño de experimentos, se evaluó el efecto del pH con la finalidad de mejorar los porcentajes de degradación y mineralización

durante la degradación. Los valores de pH estudiados fueron: 3, 5 y 7. El pH de la solución se ajustó con HNO_3 0.1% y/o NH_4OH 0.1%. Las condiciones empleadas fueron TiO_2 como catalizador, cantidad de catalizador de 1 g/L, longitud de onda de irradiación 365 nm. La degradación se realizó en la mezcla conteniendo 5 y 10 mg/L de PIRA e ISO, respectivamente. En estas muestras se determinó además el contenido de carbono orgánico total (TOC) para evaluar el grado de mineralización de los fármacos.

2.2.3.3 Efecto de la intensidad de irradiación en el proceso de degradación y mineralización.

Se evaluó el efecto de la intensidad de radiación sobre el porcentaje de mineralización de los fármacos empleando una lámpara de 365 nm con intensidades de 5,500 y 304 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Las condiciones empleadas fueron TiO_2 como catalizador, cantidad de catalizador de 1 g/L, longitud de onda de irradiación 365 nm. La degradación se realizó en la mezcla conteniendo 5 y 10 mg/L de PIRA e ISO respectivamente, pH de la disolución ajustado a 7 con 0.1% NH_4OH . Se determinó el contenido de carbono orgánico total (TOC) para evaluar el grado de mineralización de los fármacos.

En el vaso de precipitado de 50 mL se pesaron 0.05 g de TiO_2 para mantener la relación de 1 g/L, y se adicionaron los 50 mL de disolución de la mezcla. El reactor fue colocado dentro de una caja. La disolución se mantuvo en agitación constante. Antes de comenzar los ensayos, se llenaron las tuberías del sistema MSFIA, luego se procedió a realizar una medición (tres réplicas) con la lámpara apagada para establecer el valor inicial a tiempo cero. Posteriormente se encendió la lámpara y se esperó 10 minutos antes de

correr el método MSFIA-separación cromatográfica. La frecuencia de muestreo fue de 30 min durante 300 min de reacción. El estudio se realizó por duplicado.

2.2.3.4 Pruebas Control

Con la finalidad de evaluar el efecto del catalizador y de la luz UV en el proceso de remoción del contaminante se hicieron las pruebas control de adsorción en el catalizador (TiO_2) y fotólisis (luz UV).

a) Adsorción en el catalizador (TiO_2):

En este estudio solo se empleó el catalizador en ausencia de irradiación de luz UV para conocer la influencia de la adsorción de los fármacos sobre el TiO_2 en la degradación fotocatalítica.

Se pesaron 0.05 g de TiO_2 , y se adicionaron a los 50 mL de solución de mezcla de fármacos al pH seleccionado. El reactor fue colocado con la tapa sin la lámpara de irradiación UV. El sistema se mantuvo en agitación constante durante 300 min.

b) Fotólisis (luz UV)

Este estudio consistió en conocer la influencia de la irradiación UV en la degradación de los fármacos (sin la presencia del catalizador). Para cada degradación se preparó la misma disolución de la mezcla de los fármacos que en los estudios anteriores.

En el vaso de precipitado se adicionaron 50 mL de la disolución de los fármacos, se colocó la tapa con la lámpara de irradiación UV. El sistema se mantuvo en agitación constante durante 300 min.

2.2.3.5 Experimentos de degradación en matrices reales

La degradación de los fármacos se llevó a cabo también en matrices reales: agua de presa y agua de río. Las muestras de agua se filtraron con papel Whatman 42, una vez hecho esto se procedió a medir el pH, la conductividad y el carbono orgánico total. La mezcla de los fármacos ISO y PIRA a una concentración de 10 y 5 mg/L, respectivamente, fueron adicionadas a las matrices reales. El volumen preparado para cada disolución de muestra fue de 100 mL con el pH ajustado a 7. De la solución preparada se tomó una alícuota de 13 mL para la medición del COT inicial y 50 mL para realizar la degradación fotocatalítica, que es monitorizada mediante el sistema MSFIA-separación cromatográfica. Para la realización de la fotocatalisis se utilizó la lámpara UV de 365 nm ($5,500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ de intensidad).

3. Resultados y discusión

3.1 Técnicas MSFIA para la detección de los fármacos

3.1.1. Pruebas fisicoquímicas realizadas en batch.

Con la finalidad de evaluar el comportamiento de la absorptividad molar de los fármacos de estudio por espectrofotometría UV, se realizaron pruebas en batch. Para este estudio, se evaluó el efecto del pH, el volumen de solución amortiguadora, la estabilidad y finalmente se construyeron las curvas de calibración del espectrofotómetro. En la revisión bibliográfica se encontró que la solubilidad de los fármacos en agua era de 12.5×10^4 mg/L para ISO y de 1.49×10^4 mg/L para PIRA [64].

3.1.1.1 Efecto de pH.

Se muestra en la Figura 9 el estudio del efecto del pH para PIRA e ISO, donde se observa que la absorbancia de los fármacos en el rango de pH de 2 a 10 tiene variación mínima para el caso de PIRA, para el caso de ISO, la absorbancia del compuesto es mayor a pH 2.

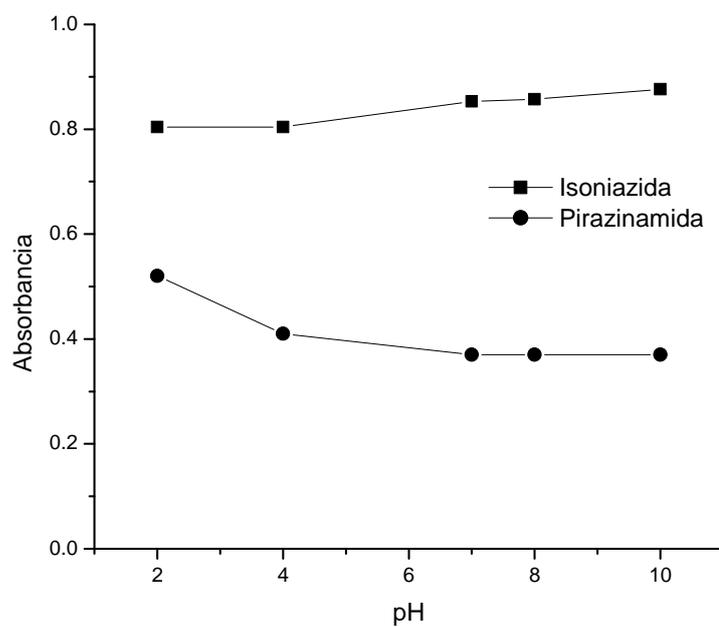


Figura 9. Efecto del pH en Isoniazida [20 mg/L] a $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ 266 nm y Pirazinamida [10 mg/L] a $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ 269 nm.

Los valores de pKa, para PIRA 0.5 y e ISO 1.8, 3.5 y 10.8 juegan un papel importante, como se ilustra en los diagramas de zonas de predominio mostrados en las figuras 10 y 11 [65];

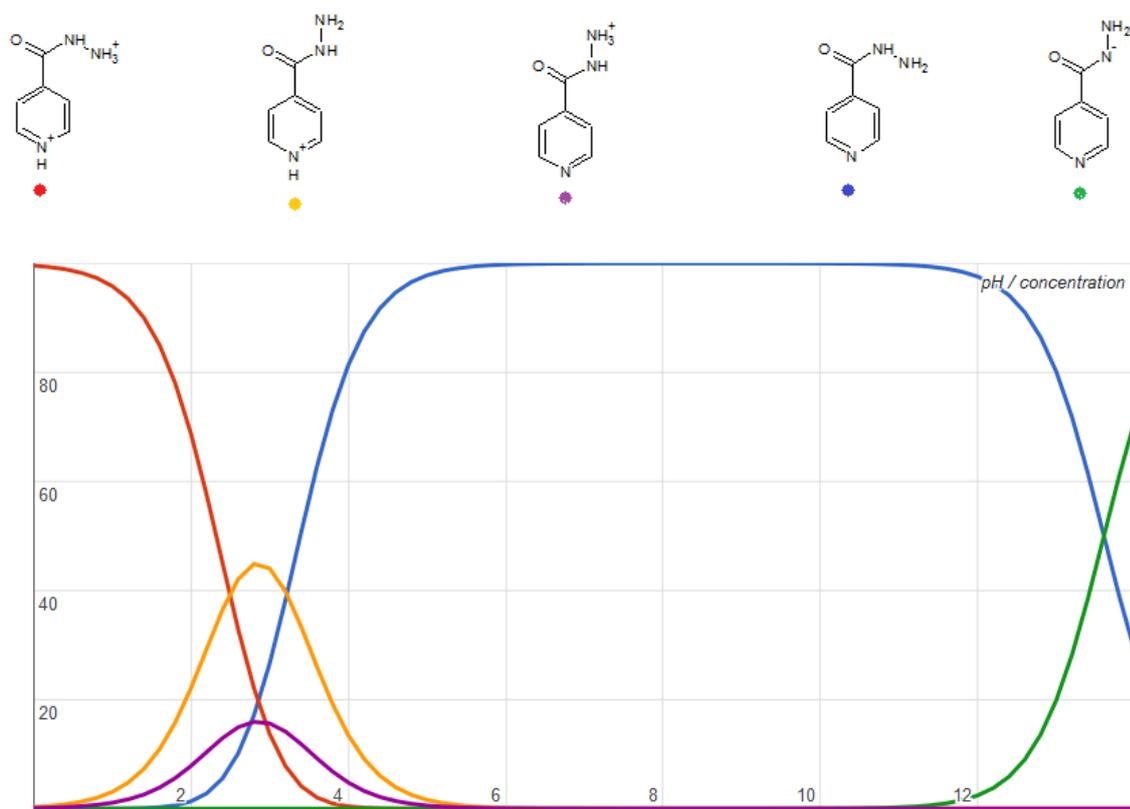


Figura 10. Diagrama de zonas de predominio para Isoniazida [66].

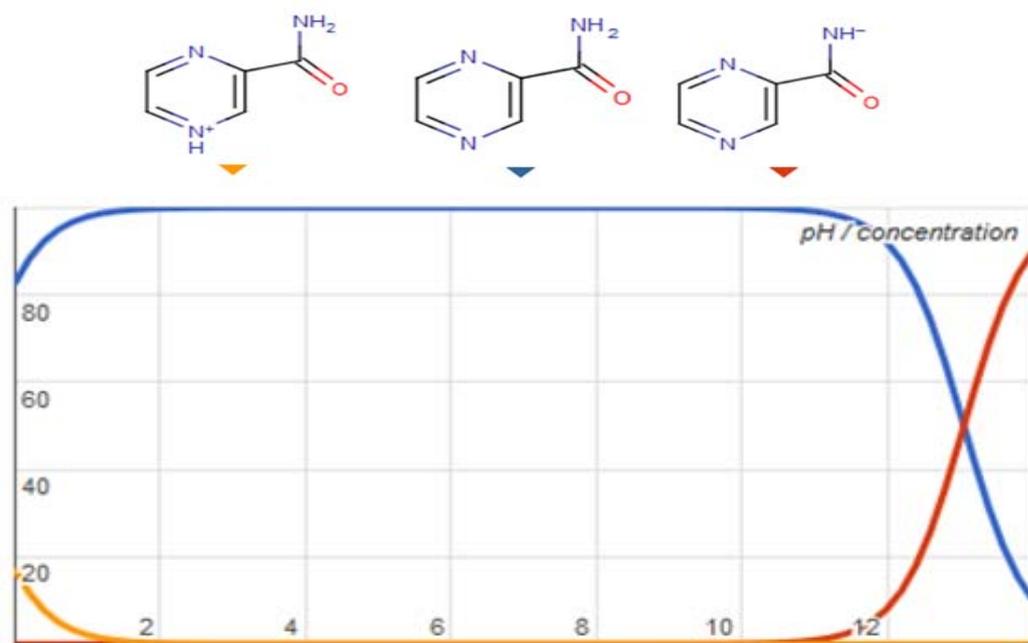


Figura 11. Diagrama de zonas de predominio para Pirazinamida [66].

De acuerdo a los diagramas de zonas de predominio (Figuras 10 y 11) [66], en el caso de PIRA la variación de la absorción en función del cambio de pH es mínima debido a que la molécula queda sin carga a un pH por encima de 0.5 (pKa), y los valores estudiados fueron entre 2 y 10 siendo la señal de absorbancia casi constante, con un ligero incremento cuando se trabaja con valores de pH básicos. Para el caso de ISO, la molécula se va desprotonando con el incremento del valor de pH manteniendo el valor de absorbancia en el rango de pH con que se trabajó. Con los resultados obtenidos se decidió trabajar a pH 4 para la determinación de los dos fármacos a través del empleo de una columna monolítica C18, la cual presenta un rango de pH de trabajo recomendado por el fabricante entre 2 y 7.5, lo que permite incrementar el tiempo de vida media de la columna cromatográfica.

3.1.1.2 Efecto del volumen de disolución amortiguadora

En la Figura 12 se observa el resultado del efecto del volumen de la disolución amortiguadora utilizada (0.5-2.5 mL), donde se aprecia que no hay variación en la absorbancia por efecto del volumen, se decidió utilizar 1.5 mL para garantizar la estabilidad del medio a pH 4 y utilizar un volumen bajo de disolución amortiguadora.

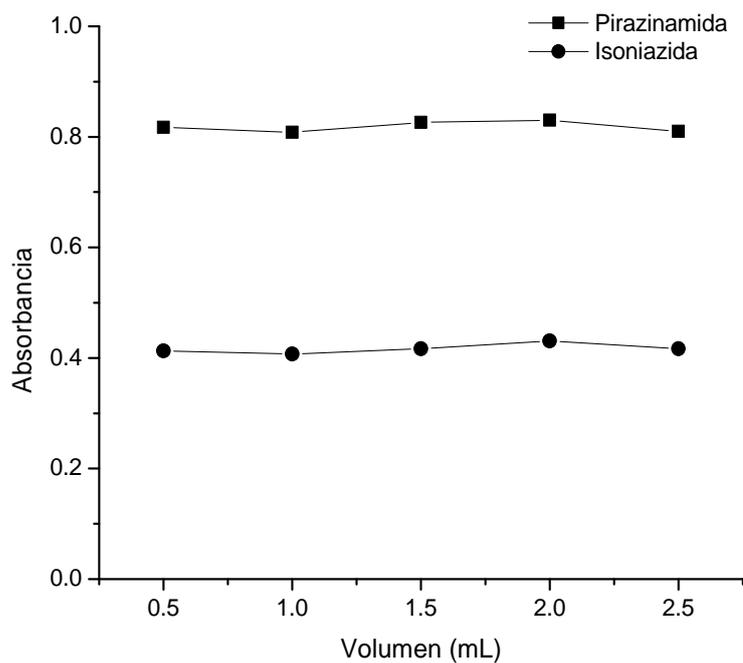


Figura 12. Efecto del volumen de solución amortiguadora a pH 4 para las disoluciones de ISO y PIRA [10 mg/L].

3.1.1.3 Pruebas de estabilidad en función del tiempo

La Figura 13 muestra los resultados de las pruebas de estabilidad en función del tiempo, donde se observa que el valor de absorbancia es constante para todo el intervalo de tiempo estudiado donde se registran las lecturas de los fármacos. Indicando que son muy estables y adecuados para ser analizados en sistemas en flujo por espectrofotometría UV, ya que su respuesta permanece constante con el tiempo.

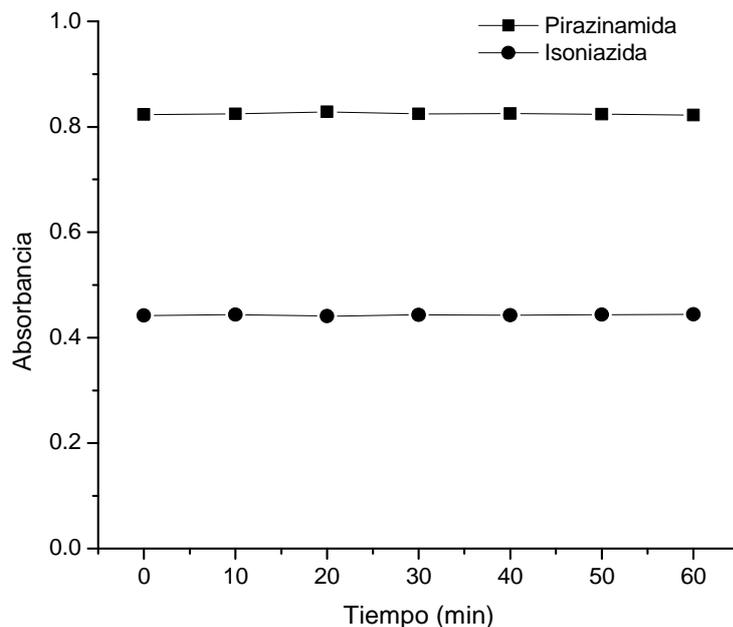


Figura 13. Estabilidad de los fármacos antituberculosos, 1.5 mL de la disolución amortiguadora a pH 4, ISO y PIRA [10 mg/L].

3.1.1.4 Curvas de calibración

La Figura 14 muestra las curvas de calibración para cada fármaco, donde se puede observar que en el intervalo de concentración de trabajo empleado se cumple con la Ley de Lambert-Beer, los coeficientes de correlación lineal obtenidos fueron entre 0.9996 y 0.9997 para ISO y PIRA, respectivamente (Tabla 12). Los límites de detección fueron de 0.09 y 0.03 mg/L para ISO y PIRA, respectivamente. Estas curvas se realizaron en batch, con el objetivo de comprobar la factibilidad del análisis de los dos fármacos por el sistema MSFIA propuesto empleando detección UV.

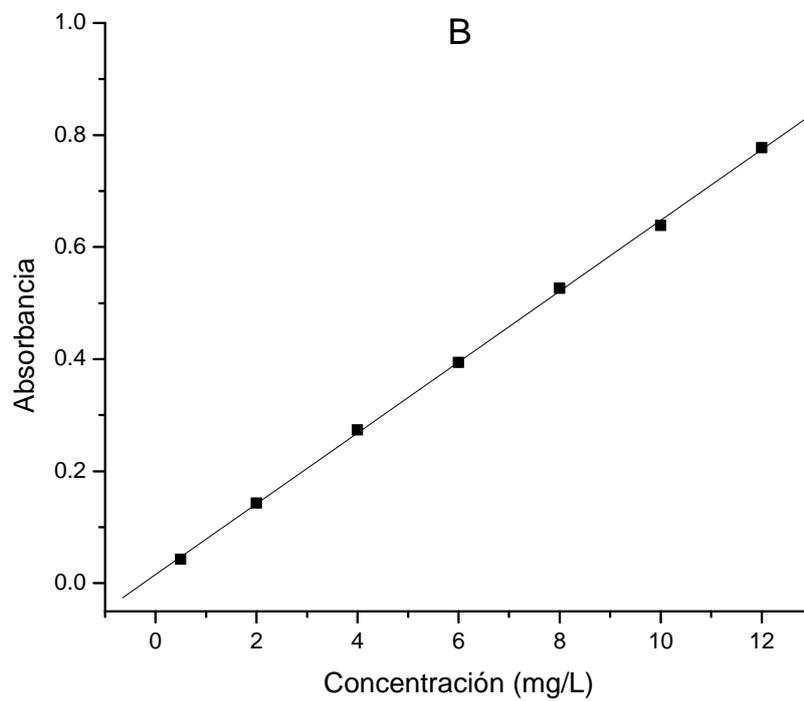
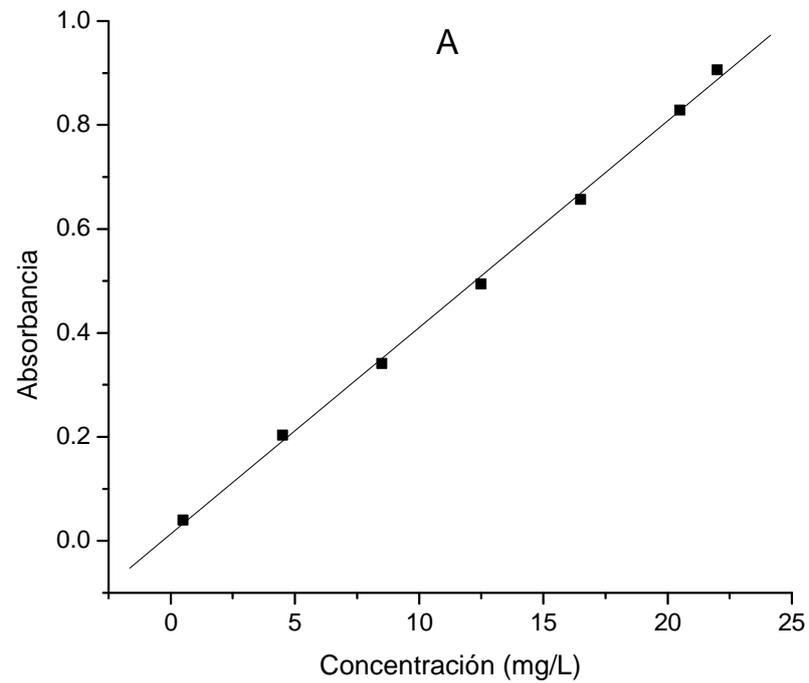


Figura 14. Curvas de calibración en el rango de concentración de 1.0 a 22.0 y 0.5 a 12.0 mg/L para A) ISO y B) PIRA, respectivamente.

Tabla 12. Parámetros analíticos para la determinación de los fármacos antituberculosos por espectrofotometría UV.

Parámetro	ISO	PIRA
Curva de calibración	$A = 0.0397 (\pm 0.0007)$ $[ISO] + 0.0130 (\pm 0.0350)$	$A = 0.0632 (\pm 0.0031)$ $[PIRA] + 0.0154 (\pm 0.0086)$
Coefficiente de correlación (r)	0.9997	0.9996
LOD (mg/L)	0.09	0.03
LOQ (mg/L)	0.32	0.11
% DSR	1 mg/L = 61.1	0.5 mg/L = 11.0
	22 mg/L = 2.3	12 mg/L = 1.3

3.1.2. Ensamblaje del sistema MSFIA

La Figura 15 muestra el esquema del sistema MSFIA correspondiente a la etapa de Separación Cromatográfica

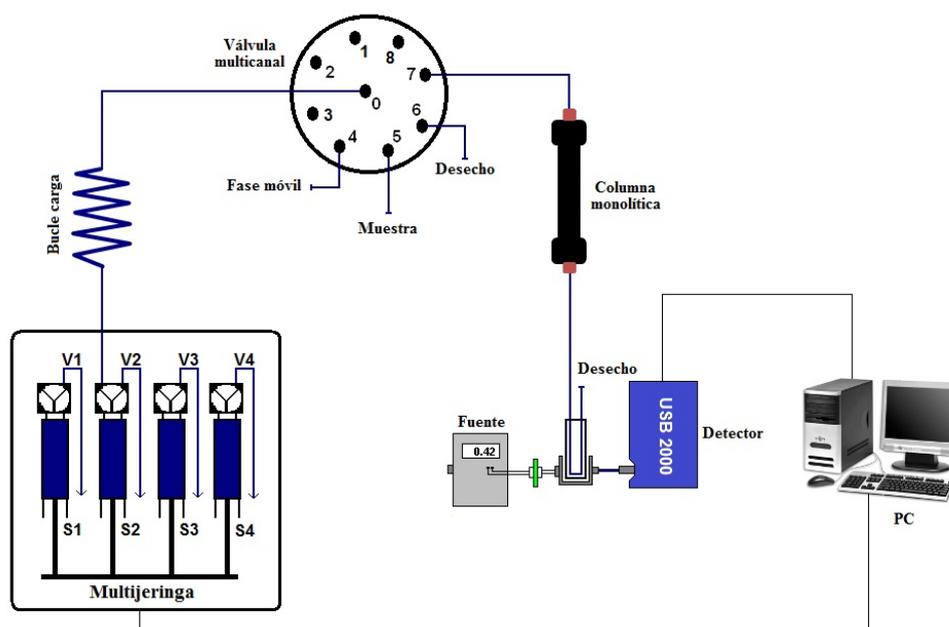


Figura 15. Sistema MSFIA-Separación cromatográfica.

El sistema MSFIA-Separación Cromatográfica (Figura 15) consistió en un módulo multijeringa y módulo de válvula multicanal; del módulo multijeringa se utilizó la jeringa S2 que se emplea para la toma de la fase móvil y de la muestra. En el módulo de válvula multicanal se utilizó la parte de válvula de selección múltiple y ésta tuvo la función de direccionar los flujos de la fase móvil y la muestra hacia la columna cromatográfica. Se dieron de alta en la configuración del sistema los puertos 4, 5, 6 y 7. En el puerto 4 entra la fase móvil, en el puerto 5 entra la muestra, tanto la muestra como la fase móvil una vez que son cargadas son dirigidas hacia el canal común que a su vez está conectado con el módulo multijeringa en la jeringa S2, el puerto 7 tiene la función de dirigir los flujos hacia la columna cromatográfica donde ocurre la separación de los analitos, el puerto 6 fue utilizado como desecho para los cambios de las diversas muestras analizadas.

Tabla 13. Método MSFIA separación cromatográfica.

Pasos	Operación	Caudal (mL/min)	Posición de las válvulas de selección		
			4	5	7
1. Cargar muestra	Dispensa 0.2 mL	10.0	Off	Off	Off
	Carga 0.2 mL	5.0	Off	On	Off
2. Dispensar muestra	Dispensa 0.2 mL	1.0	Off	Off	On
3. Lectura espectrofotométrica					
4. Dispensar fase móvil	Dispensa 2.5 mL	1.0	Off	Off	On
	Carga 2.7 mL	10.0	On	Off	Off
	Dispensa 2.5 mL	1.0	Off	Off	On
	Carga 2.5 mL	10.0	On	Off	Off
5. Detener lectura espectrofotométrica					
6. Apagar válvulas	Carga 0 mL	0.0	Off	Off	Off

Una vez realizada la separación, cada fármaco es conducido a la celda de flujo para ser detectado espectrofotómetro CCD (Charge Coupled Device, por sus siglas en inglés) utilizando una fuente de luz UV. El control del sistema se realizó por medio del software AutoAnalysis Station v5.0. En la Tabla 13 se resumen los pasos del método, movimientos de las jeringas, velocidades y las posiciones de las válvulas en el método desarrollado para la separación cromatográfica.

3.1.3. MSFIA-Separación Cromatográfica

En las secciones posteriores se describen detalladamente los resultados de los estudios univariantes y la selección de las condiciones más favorables para la separación y detección de los fármacos mediante el método MSFIA-Separación cromatográfica.

Selección de la longitud de onda de análisis.

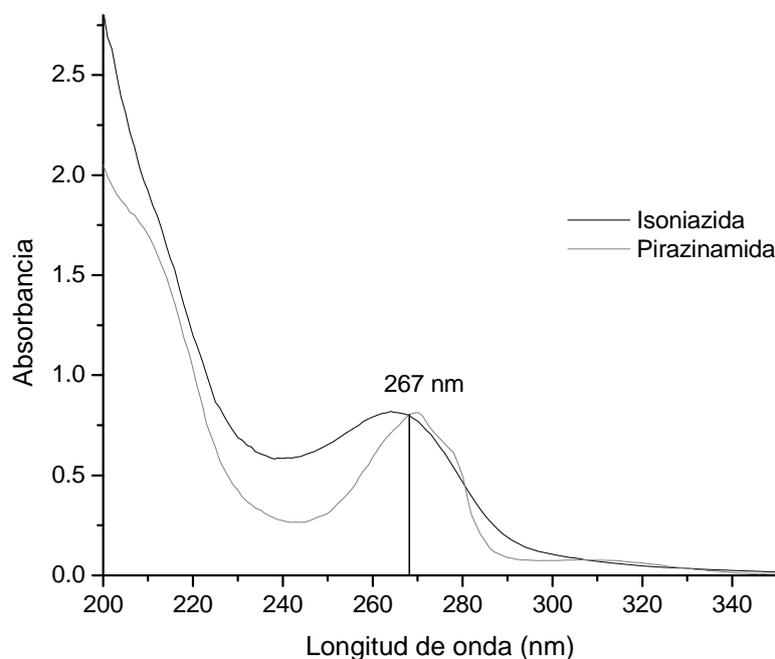


Figura 16. Espectros de absorción UV de Isoniazida [20 mg/L] $\lambda_{\text{máx}}$ 266 nm y Pirazinamida [10 mg/L] $\lambda_{\text{máx}}$ 269 nm.

Como se observa en los espectros de absorción de la Figura 16, ISO presenta un máximo de absorción a 266 nm y 269 nm para el caso de PIRA. Para la selección de la longitud de onda de detección de los dos fármacos en mezcla en la separación cromatográfica, se tomó como base el punto isobéstico de los espectros de absorción obtenidos en batch. Como se observa en la Figura 15 los máximos de absorción de los analitos son cercanos entre sí, por lo cual al elegir la longitud de onda (267 nm) garantiza que la respuesta para ambos fármacos sea semejante y con la mayor sensibilidad en el sistema MSFIA-separación cromatográfica; sin embargo, la sensibilidad que se tiene para PIRA (10 mg/L) corresponde al doble de la sensibilidad para ISO (20 mg/L), por lo cual para estudios posteriores se decidió trabajar siempre con el doble de concentración de ISO con respecto a PIRA.

3.1.4. Estudios univariantes

3.1.4.1 Concentración de ácido 1-heptanosulfónico

Para estudiar el efecto de la concentración del ácido 1-heptanosulfónico en la separación cromatográfica se evaluaron las concentraciones 5, 10, 15, y 20 mM,. La fase móvil que se utilizó fue acetonitrilo:ácido 1-heptanosulfónico (98:2) a un flujo de 0.8 mL/min. Se utilizó el ácido 1-heptanosulfónico como par iónico, el cual es un compuesto que consta de una parte hidrofóbica (cadena alifática) y una parte hidrofílica (sulfonato); este tipo de compuestos se utiliza para disminuir la polaridad de los analitos, para que puedan interactuar con la fase estacionaria de la columna cromatográfica de fase reversa [67], que en este caso es del tipo monolítica C18. Como se observa en la Figura 17, a concentraciones de 10 mM se obtiene una adecuada separación de PIRA e ISO, sin

embargo, la resolución cromatográfica se ve disminuida con el empleo de las concentraciones de 15 y 20 mM, esto es debido a una competencia entre la cadena hidrocarbonada del par iónico que queda en exceso y los analitos que ahora son menos polares por los sitios activos de la fase estacionaria de la columna C18. Con respecto al trabajo descrito por Zhou y col. [54], en el presente trabajo se disminuyó la concentración del par iónico a 10 mM y la relación del modificador orgánico, lo que se debe a la columna monolítica C18 empleada para la separación cromatográfica, la cual es de menor longitud (2.5 cm) que una columna convencional (25 cm) y no requiere el uso de concentraciones altas para asegurar una buena resolución en la separación de los analitos.

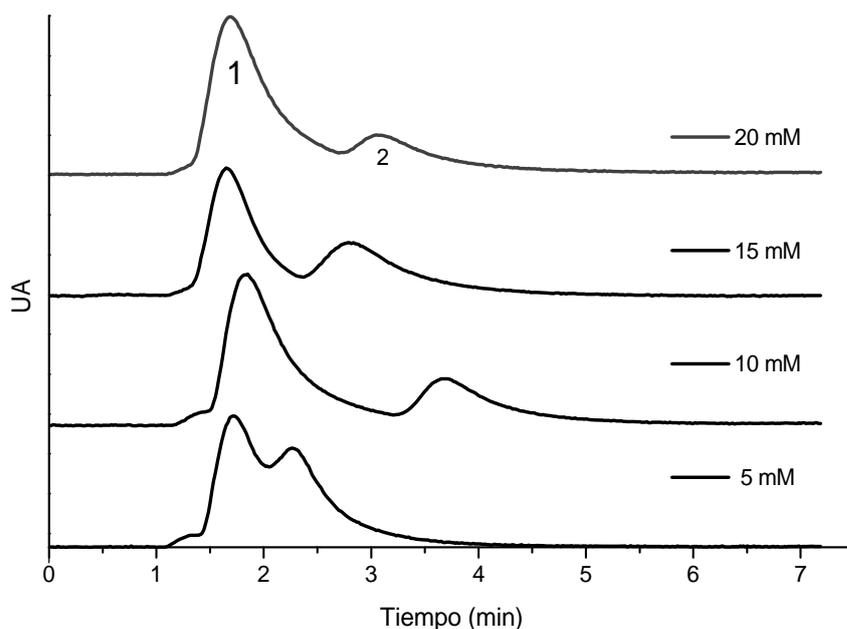


Figura 17. Cromatogramas de la mezcla de Pirazinamida (1) e Isoniazida (2) [10 mg/L], variando la concentración de ácido 1-heptanosulfónico empleado como par iónico y un caudal de 0.8 mL/min.

3.1.4.2 Selección del modificador orgánico en la fase móvil.

Como modificador orgánico para la separación de los de los fármacos en la columna monolítica C18, preliminarmente se evaluó el uso de metanol, que estaba descrito en el trabajo de Zhou y col. [54]. Se trabajó con dos relaciones de metanol: 10 mM ácido 1-heptanosulfónico: 5-95 y 10-90. El caudal que se utilizó fue de 0.8 mL/min. Como se observa en la Figura 18, bajo estas condiciones cromatográficas se presenta coelución de ISO y PIRA, esta diferencia con respecto al trabajo Zhou y col. se atribuye al tipo de columna empleada, mientras que la columna C18 empacada presenta una mayor longitud y resolución, el uso del metanol que es un disolvente ligeramente polar no afecta en la separación cromatográfica a diferencia, del empleo de una columna monolítica que presenta una menor longitud y por ende con una resolución cromatográfica más limitada. Por lo que para la separación de los fármacos se evaluó el uso de acetonitrilo como alternativa al empleo de metanol, que al ser menos polar que el metanol se espera que en combinación con el par iónico permita que ISO incremente su tiempo de retención en la columna cromatográfica. Se trabajó con las relaciones de acetonitrilo: 10 mM ácido 1-heptanosulfónico: 0-100%, 2-98%, 4-96%, 6-94%. En la Figura 19 se presentan los cromatogramas y se puede observar que la mejor resolución cromatográfica de los analitos se tiene cuando disminuye el porcentaje de acetonitrilo (2%). Si no se emplea acetonitrilo o modificador orgánico, el tiempo de análisis se incrementa ligeramente, además no es conveniente trabajar la columna cromatográfica bajo esta condición, ya que reduce su tiempo de vida por el empleo de un gran porcentaje de agua. Empleando porcentajes de acetonitrilo mayores al 2% se observa una disminución en los tiempos de retención de los fármacos debido a la disminución de la polaridad de la fase móvil, lo que origina que los

analitos no interaccionen con la fase estacionaria, al existir una competencia entre la fase móvil y los analitos por los sitios activos de la columna C18.

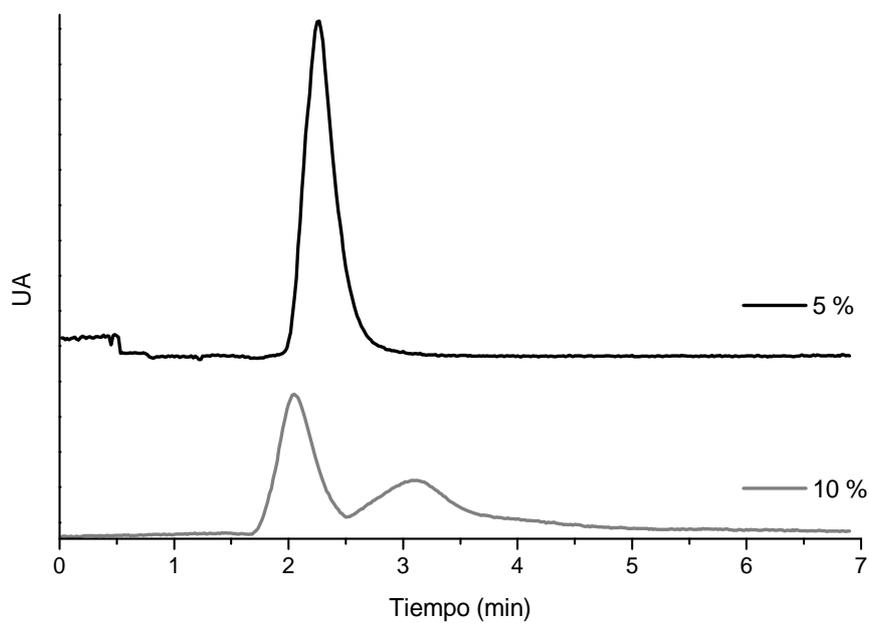


Figura 18. Efecto del porcentaje de metanol en la separación cromatográfica de la mezcla de Isoniazida y Pirazinamida [10 mg/L] a un caudal de 0.8 mL/min.

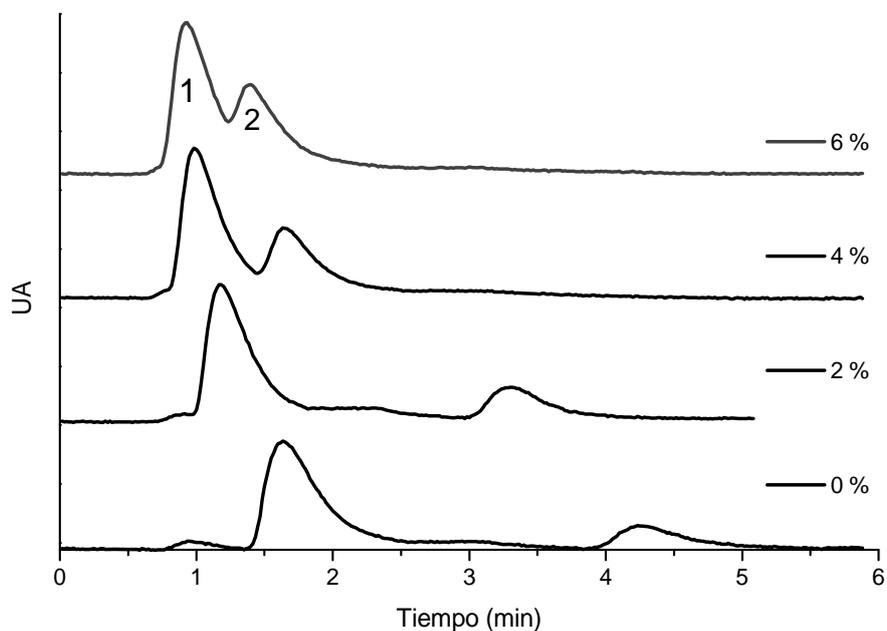


Figura 19. Efecto del porcentaje de acetonitrilo en la separación cromatográfica de la mezcla de Pirazinamida (1) e Isoniazida (2) [10 mg/L] y un caudal de 0.8 mL/min.

3.1.4.3 Efecto del pH en la separación cromatográfica

Se evaluó el efecto del pH en la separación cromatográfica empleando como fase móvil acetonitrilo: 10 mM ácido 1-heptanosulfónico (2:98). El caudal usado fue 0.8 mL/min. Los valores de pH que se evaluaron fueron 2.5, 3.0, 3.5 y 4.5. Como se observa en la Figura 20, a los valores de pH de 2.5 y 3.0 es donde se obtiene una resolución cromatográfica (R) mayor a 1.6 para los fármacos en estudio, la cual fue ligeramente mayor a pH 3, atribuible a una menor concentración de iones hidrógeno, ya que al pH 2.5 en una mayor concentraciones de iones hidrógeno, estos pueden competir con la amina protonada de la isoniazida para unirse con el oxígeno del grupo sulfonato del ácido 1-heptanosulfónico y de esta manera interferir en la formación de un puente de hidrógeno. Sin embargo, la separación cromatográfica se ve afectada a pH 3.5 y 4.5, este fenómeno se atribuye al pKa de isoniazida ($pK_a 1 = 1.8$ y $pK_a 2 = 3.5$), al estar en un $pH > 3.5$ la

molécula se encuentra neutra, no habrá formación de puente de hidrógeno y no podrá interactuar con el ácido 1-heptanosulfónico, por lo cual se decidió trabajar a pH 3 (en la Figura 10 se muestra el diagrama de zonas de predominio para ISO).

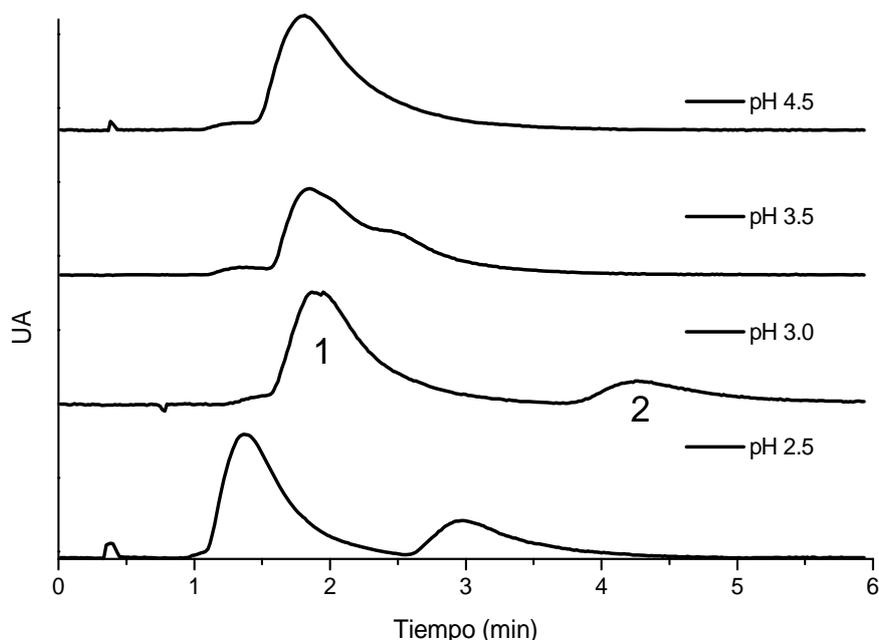


Figura 20. Efecto del pH en la separación cromatográfica de la mezcla de Pirazinamida (1) e Isoniazida (2) [10 mg/L] y a un caudal de 0.8 mL/min.

3.1.4.4 Caudal de Elución

Se evaluó el efecto del caudal de elución en la separación cromatográfica empleando como fase móvil acetonitrilo:10 mM ácido 1-heptanosulfónico (2:98). Los caudales que se estudiaron fueron 0.5, 0.8, 1.0 y 1.5 mL/min. Como se observa en la Figura 21, al aumentar el caudal de elución se reduce el tiempo de análisis manteniendo la resolución ($R = 1.2$), si bien 1.5 mL/min sería la condición más apropiada para disminuir los tiempo de análisis, el sistema MSFIA trabaja a baja presión (presión menor a los 70 psi, comparados con HPLC que son mayores de 1,500 psi), no es recomendable trabajar a caudales elevados por tiempos prolongados ya que generaría sobrepresión en el sistema de

flujo, para evitar este contratiempo en el sistema se decidió trabajar a un caudal de 1 mL/min para el proceso de la separación cromatográfica.

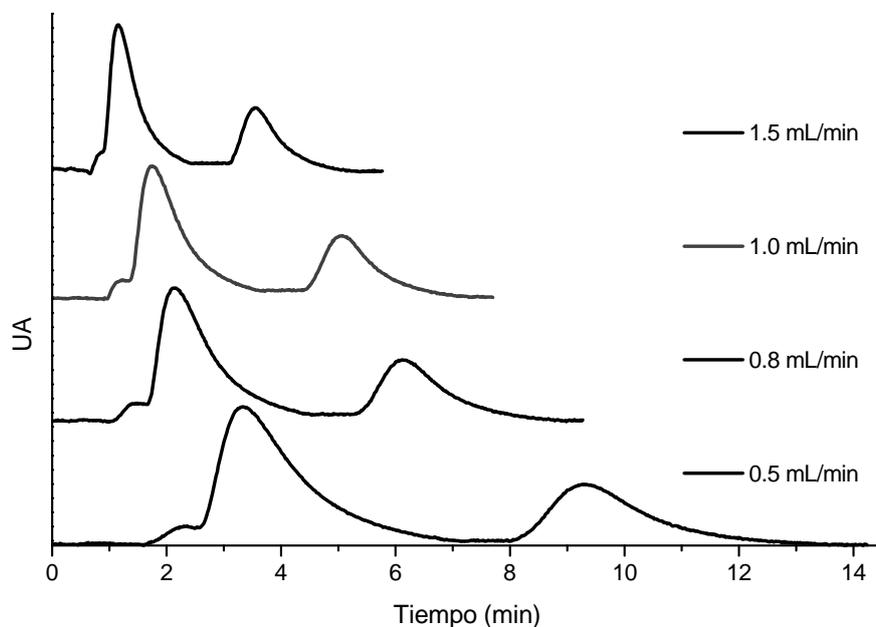


Figura 21. Cromatogramas obtenidos a cuatro diferentes caudales de elución en la separación de la mezcla de ISO y PIRA [10 mg/L].

3.1.4.5 Resumen de las condiciones para el método MSFIA-separación cromatográfica

La Tabla 14 muestra las condiciones establecidas para el análisis de los fármacos por el método MSFIA-Separación Cromatográfica y en la Figura 22 se muestra el cromatograma correspondiente. El tiempo de análisis fue de 7 minutos. Cada muestra se analizó por triplicado.

Tabla 14. Resumen de las condiciones cromatográficas para la determinación de los fármacos antituberculosos por el método MSFIA-separación cromatográfica.

Columna cromatográfica	Fase móvil	Caudal	Volumen de inyección	Detección
C18 tipo monolítica 25 x 4.6 mm	10 mM Ácido 1-heptanosulfónico : acetonitrilo (98:2), pH 3.0	1.0 mL/min	200 µL	UV (267 nm)

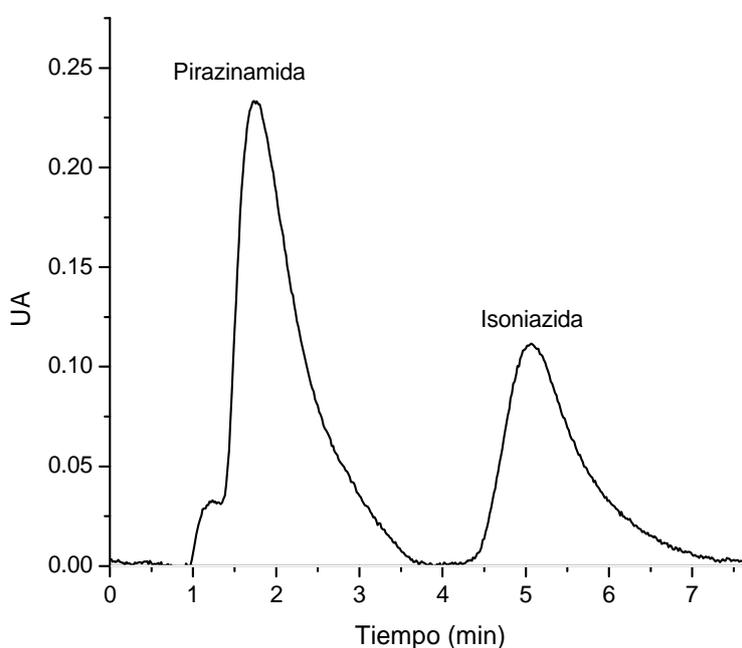


Figura 22. Cromatograma de la mezcla de pirazinamida [5 mg/L] e Isoniazida [10 mg/L] en el sistema MSFIA-Separación cromatográfica empleando las condiciones seleccionadas y resumidas en la Tabla 14.

3.1.4.6 Parámetros analíticos del método propuesto

Una vez seleccionadas las condiciones para la separación cromatográfica se procedió a realizar las curvas de calibración para cada uno de los fármacos de estudio dentro del intervalo de concentraciones que obedecieran la ley de Lambert-Beer, dicho

rango estuvo comprendido de 0.5 a 12 mg/L para PIRA y de 1 a 22 mg/L para ISO (Figura 23). La Tabla 15 muestra los parámetros analíticos obtenidos para la determinación de los fármacos. El porcentaje de la desviación estándar relativa (%DSR) se determinó para dos niveles de concentración, (0.5 y 1 mg/L, para la concentración baja y 12 y 22.0 mg/L, para la concentración alta de PIRA e ISO, respectivamente). Como se observa, el porcentaje de la desviación estándar relativa ningún valor sobrepasó el 5%, tal como lo recomienda la IUPAC para un método analítico. Además se determinaron los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) mediante el método de la IUPAC (Ecuaciones 2 y 3) [68], que indican que el método es más sensible para PIRA que para ISO, comparado con el método establecido por Zhou y Col. dónde utilizan HPLC el tiempo de análisis es de 25 minutos, con MSFIA el tiempo de análisis es de 7 minutos, y en cuanto a los límites de detección es comparable para el caso de Pirazinamida, en el trabajo de Zhou y Col. se obtiene 0.014 mg/L, y en este trabajo se obtuvo 0.02 mg/L.

$$\text{LOD} = 3 \text{ Sb}/m \quad \text{Ec. (2)}$$

$$\text{LOQ} = 10 \text{ Sb}/m \quad \text{Ec. (3)}$$

Dónde:

Sb = Desviación estándar de la lectura de 10 blancos reactivos a la longitud de onda de análisis.

m = Pendiente obtenida de la ecuación de la recta calculada a partir de la curva de calibración.

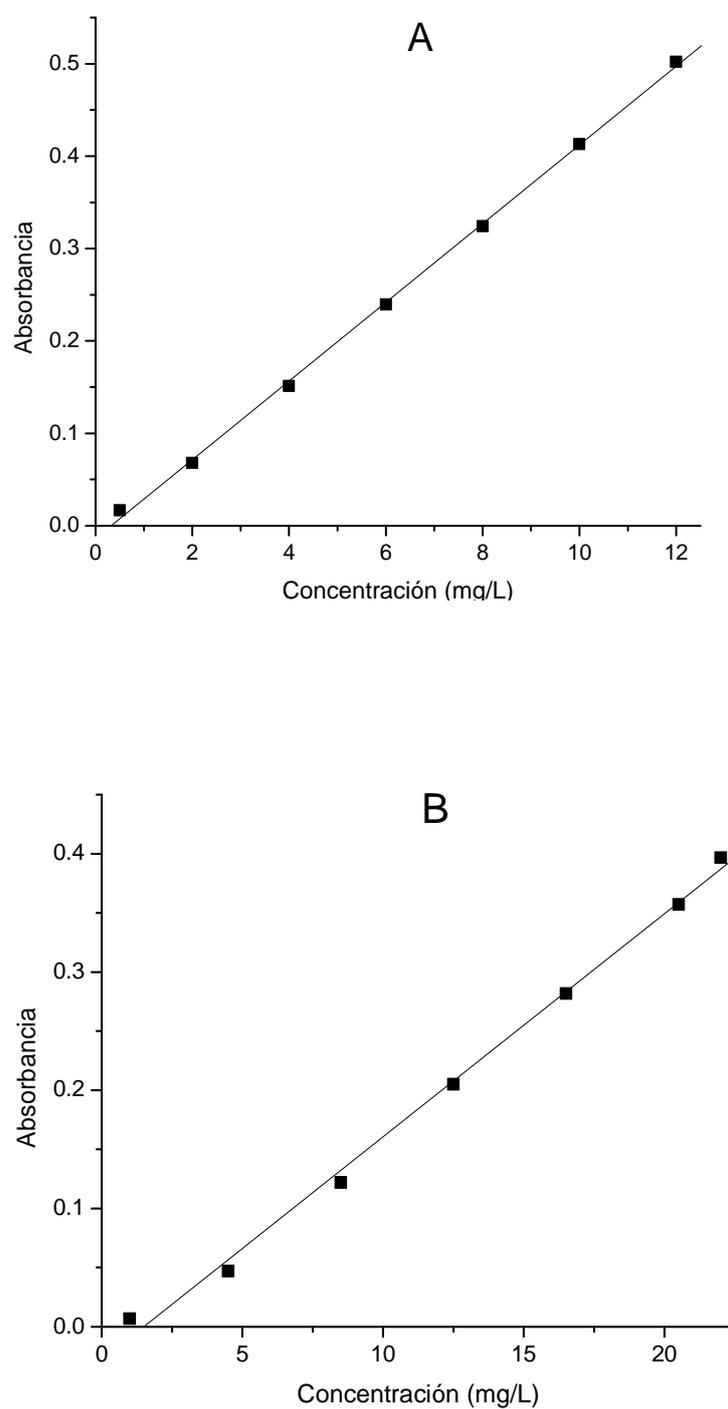


Figura 23. Curvas de calibración para A) Pirazinamida y B) Isoniazida en el sistema MSFIA-separación cromatográfica, en el rango de 0.5 a 12 y 1 a 22 mg/L, respectivamente. Las curvas de calibración se realizaron por triplicado y la longitud de onda de detección fue 267 nm.

Tabla 15. Parámetros analíticos en la determinación de ISO y PIRA en el sistema MSFIA-separación cromatográfica.

Parámetro	Isoniazida	Pirazinamida
Rango Lineal (mg/L)	1.0 – 22	0.5 – 12
LOD (mg/L)	0.24	0.02
LOQ (mg/L)	0.81	0.07
%DSR	1 mg/L = 2.3	0.5 mg/L = 1.7
	22 mg/L = 4.5	12 mg/L = 3.3

3.2 Degradación fotocatalítica de los fármacos ISO y PIRA

3.2.1. Acoplamiento del reactor fotocatalítico

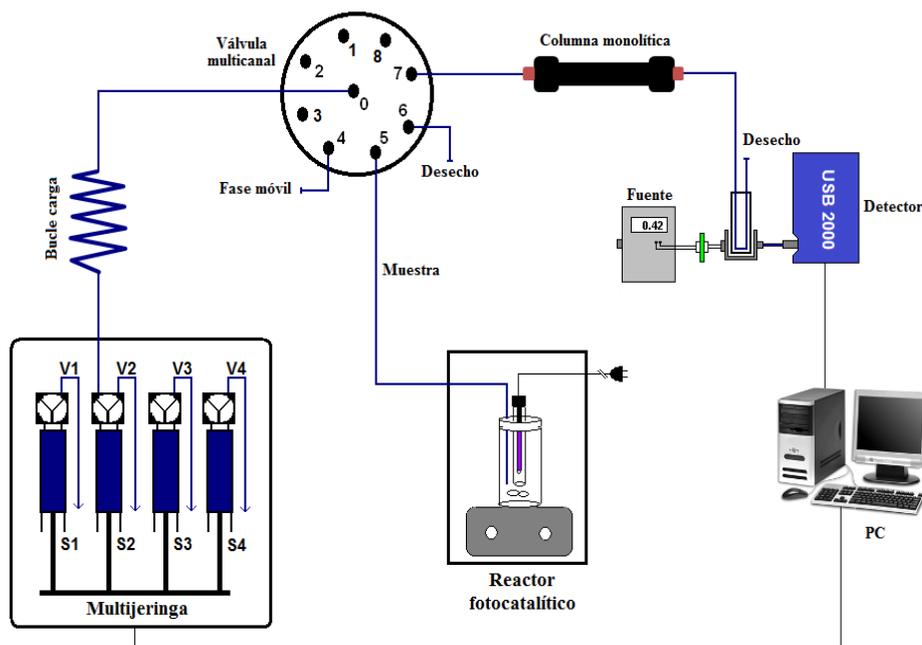


Figura 24. Sistema MSFIA-Separación cromatográfica acoplado a un reactor fotocatalítico para el seguimiento en línea de la degradación de los fármacos de estudio.

En la Figura 24 se muestra el acoplamiento del reactor fotocatalítico al sistema de separación cromatográfica. A través del software AutoAnalysis Station v5.0 se dio de alta el puerto 5 de la válvula de selección múlticanal para la toma de muestra del reactor fotocatalítico, y el puerto 6 para salida de desecho. Sólo con los cambios antes mencionados en la configuración en el sistema se siguió la misma metodología que en la separación cromatográfica. La Tabla 16 muestra los pasos para llevar a cabo la degradación

fotocatalítica con el sistema acoplado MSFIA-separación cromatográfica-reactor fotocatalítico.

Tabla 16. Método MSFIA-separación cromatográfica-degradación fotocatalítica

Pasos	Operación	Caudal (mL/min)	Posición de la válvula multicanal				
			0	4	5	6	7
1. Cargar muestra	Dispensa 0.320 mL	10.0	On	Off	Off	On	Off
	Carga 0.320 mL	3.0	On	Off	On	Off	Off
2. Dispensar muestra	Dispensa 0.32 mL	1.0	On	Off	Off	Off	On
3. Inicio de lectura espectrofotométrica							
4. Dispensar fase móvil y muestra a columna monolítica	Dispensa 1.9 mL	1.0	On	Off	Off	Off	On
	Carga 2.3 mL	10.0	On	On	Off	Off	Off
	Dispensa 2.5 mL	1.0	On	Off	Off	Off	On
	Carga 2.5 mL	10.0	On	On	Off	Off	Off
5. Final de la lectura Espectrofotométrica							
6. Apagar válvulas			Off	Off	Off	Off	Off

3.2.2. Diseño de experimentos para la degradación fotocatalítica de los fármacos de estudio.

3.2.2.1 Porcentajes de degradación obtenidos aplicando el diseño de experimentos factorial 2³.

En la Tabla 17 se presentan los resultados de los experimentos degradaciones señalados en la sección 2.2.3.1.

Tabla 17. Porcentajes de degradación del diseño de experimentos factorial aplicado a los fármacos de estudio.

Número de exp.	Degradación %	
	ISO	PIRA
1	63 ± 2	87 ± 5
2	69 ± 6	32 ± 3
3	72 ± 5	90 ± 4
4	63 ± 3	67 ± 3
5	72 ± 6	87 ± 1
6	70 ± 1	78 ± 7
7	64 ± 1	35 ± 4
8	73 ± 6	88 ± 6

De acuerdo a lo observado en la Tabla 17, para el caso de la degradación de ISO, la variación del porcentaje de degradación entre los 8 experimentos fue menor del 10 %, mientras que para el caso de PIRA, para la serie de 8 experimentos se observa una mayor variación. En las siguientes gráficas se comparan la actividad del ZnO y TiO₂ durante la degradación de los fármacos.

3.2.2.2 Evaluación del comportamiento de los catalizadores utilizados en la degradación de ISO y PIRA.

En las Figuras 25 y 26 se presenta el porcentaje de degradación de los fármacos con el catalizador TiO₂ Degussa P25 a las longitudes de onda de irradiación de 254 y 365 nm; posteriormente en las Figuras 27 y 28 se observa el mismo efecto cuando se utilizó ZnO comercial.

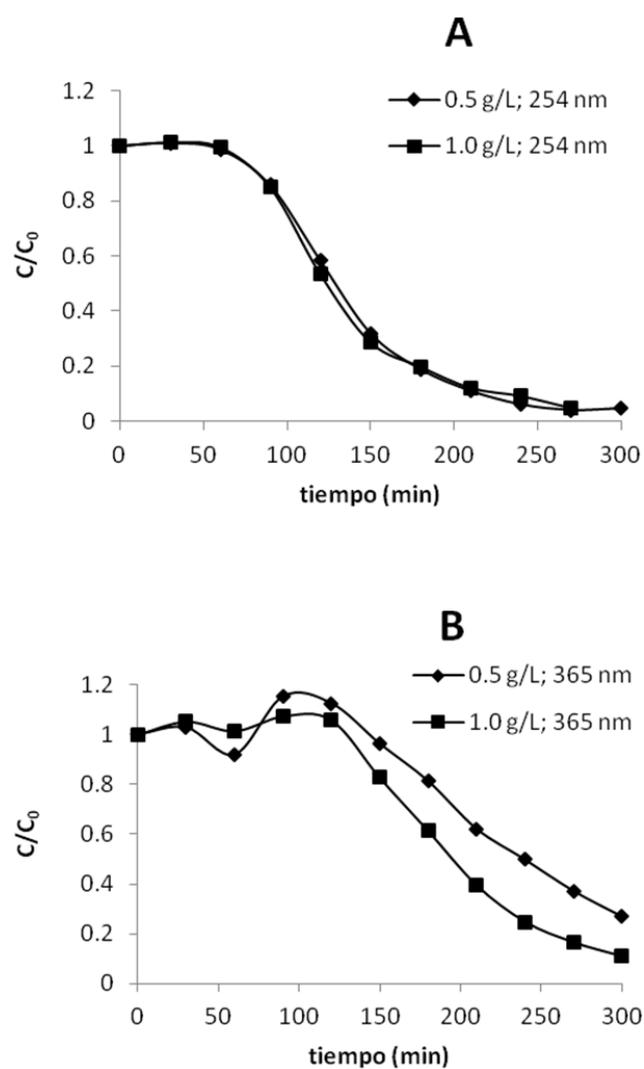


Figura 25. Degradación de Pirazinamida con TiO₂ Degussa P25 a las condiciones dadas por el diseño de experimentos, A) a 254 nm y B) a 365 nm.

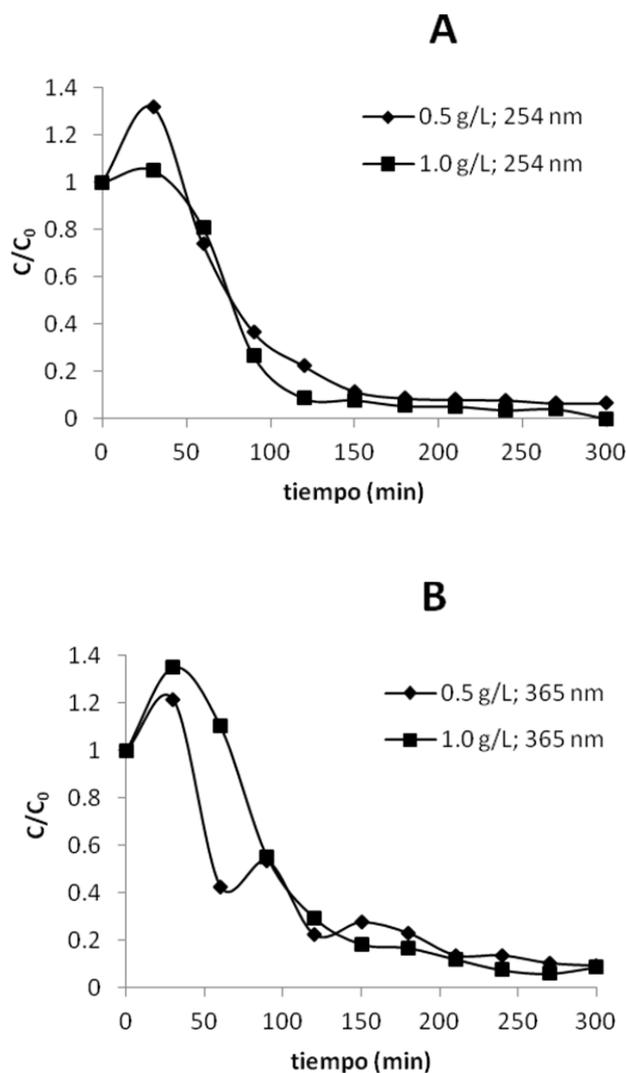


Figura 26. Degradación de Isoniazida con TiO_2 Degussa P25 a las condiciones dadas para el diseño de experimentos, A) a 254 nm y B) a 365 nm.

De acuerdo a los resultados en las Figuras 25 y 26, y los porcentajes de degradación mostrados en la Tabla 17, se observa que en la degradación de PIRA, la longitud de onda de radiación parece ser el factor que más influencia tiene sobre el proceso de degradación, ya que de acuerdo al trabajo de Horikoshi y col. Los compuestos con anillos aromáticos que contienen 2 nitrógenos, son estables a la degradación, y dependiendo de la posición (*orto*,

meta o *para*) de los nitrógenos dentro del anillo la estabilidad a la degradación cambiará, siendo mas estable la molécula cuando los nitrógenos se encuentran en posición *para* [69] mientras que para ISO la mayor influencia en el porcentaje de degradación se presenta con la variación en la masa de catalizador utilizada, ya que la degradación ocurre independientemente de la longitud de onda con la que se irradia, debido a que el anillo isonicotínico de ISO no es tan estable como el anillo de la pirazina de PIRA.

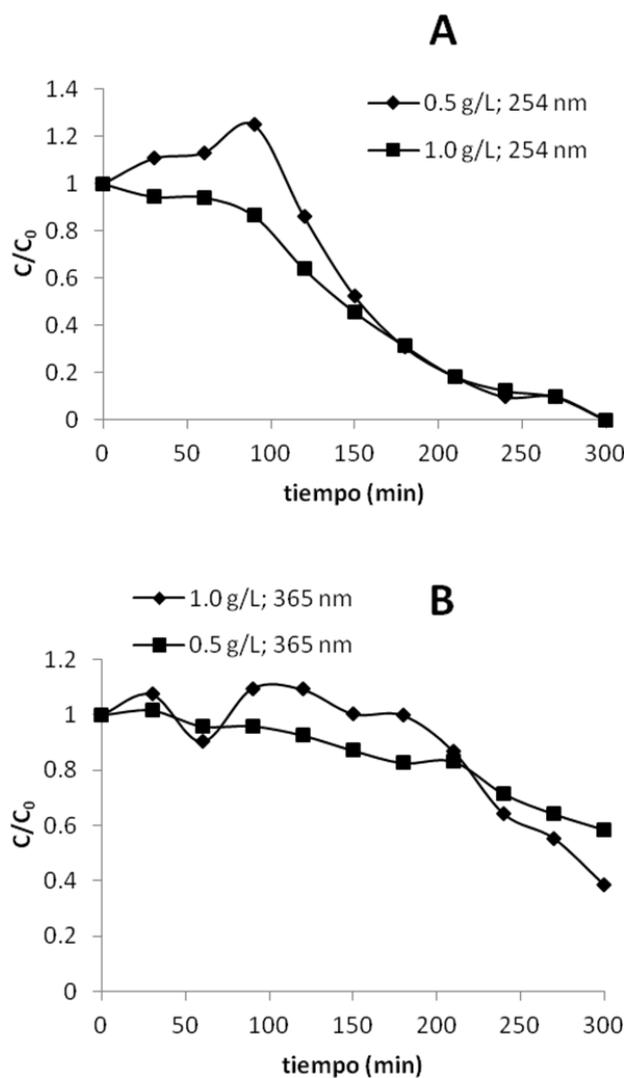


Figura 27. Degradación de Pirazinamida con ZnO comercial a las condiciones dadas para el diseño de experimentos, A) a 254 nm y B) a 365 nm.

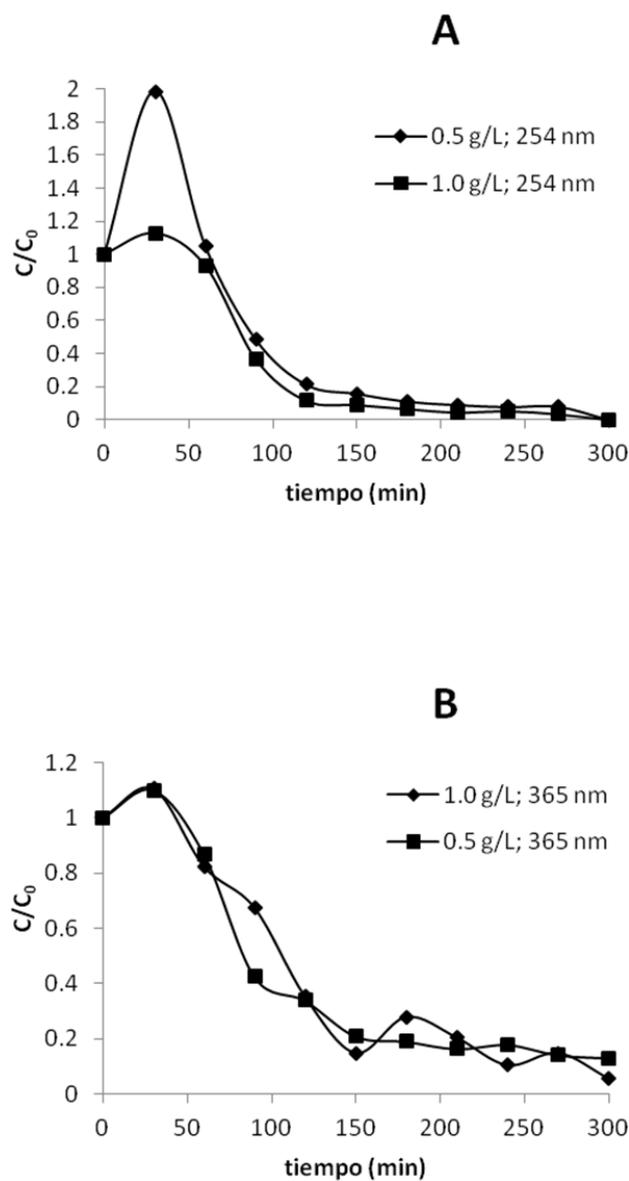


Figura 28. Degradación de Isoniazida con ZnO comercial y las condiciones dadas para el diseño de experimentos, A) a 254 nm y B) a 365 nm

Como se observa en las Figuras 27 y 28, la degradación con ZnO comercial presenta un comportamiento similar que con el TiO₂ Degussa P25, ya que para PIRA la variable que parece influir más es la longitud de onda de radiación, obteniendo un mayor

porcentaje de degradación a 254 nm. Para la degradación de ISO, se ve favorecida con la masa más alta de catalizador y la longitud de onda de radiación de mayor energía.

De acuerdo a las Figuras anteriores se observa que se obtiene mayor porcentaje de degradación a 270 minutos con el catalizador TiO_2 que con el ZnO , esto se atribuye a la mayor área superficial del TiO_2 Degussa P25 que es de $50.5 \text{ m}^2/\text{g}$, mientras que para ZnO comercial es de $3.2 \text{ m}^2/\text{g}$ [70].

3.2.2.3 Análisis estadístico del diseño de experimentos

Las condiciones óptimas para la degradación de la mezcla de fármacos fueron determinadas aplicando la metodología de deseabilidad conjunta (D, desirability function) [71]. El valor denominado deseabilidad conjunta D representó la media geométrica de los valores de las deseabilidades individuales (d_i) (Ecuación 4). La Figura 29 indica cuales son los valores deseables para obtener un alto porcentaje de degradación de la mezcla de los fármacos de estudio.

$$D = (d_1 \times d_2)^{1/2} \quad \text{Ec. (4)}$$

En la Figura 29 se muestran los resultados del análisis estadístico que nos indican cuales fueron los factores que influyeron significativamente en la degradación de PIRA e ISO durante la aplicación del diseño de experimentos. La Tabla 18 muestra un resumen de las condiciones más adecuadas para la degradación fotocatalítica en base al análisis estadístico.

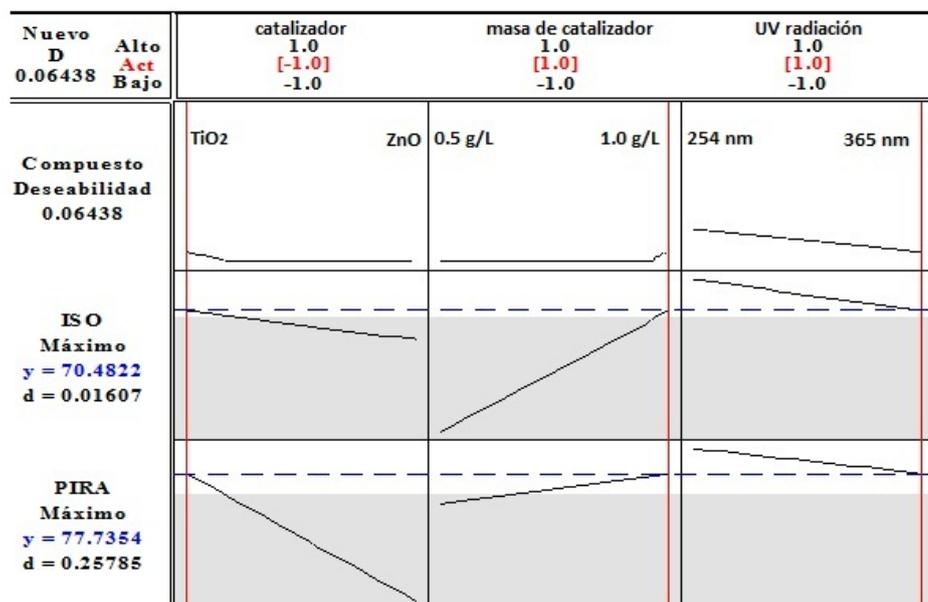


Figura 29. Gráfica de función de deseabilidad compuesta con los factores que influyen significativamente en la degradación de Isoniazida y Pirazinamida.

Tabla 18. Condiciones para la degradación en la mezcla de los fármacos en estudio.

Catalizador	TiO ₂ Degussa P25
Masa de catalizador	1 g/L
Longitud de onda de irradiación	365 nm

Tal como se observa en la Figura 29 las pendientes indican que entre más pronunciadas sean, será más significativa esa respuesta, siendo la parte superior de la pendiente donde se obtiene la mejor respuesta. Para PIRA el tipo de catalizador influye significativamente en la respuesta, mientras que para ISO la masa de catalizador es más significativa. En cuanto a la longitud de onda de radiación la respuesta fue mayor a 254 nm

para ambos casos, sin embargo, se observó que los porcentajes de degradación que se obtenían con esta longitud de onda de radiación, sólo aumenta 3 unidades para ISO y 9 para PIRA, en comparación con la longitud de onda de 365 nm, por lo cual se decidió trabajar a 365 nm, que conlleva un menor gasto energético durante el proceso. De acuerdo a este análisis estadístico se eligieron las condiciones más adecuadas para la degradación de la mezcla de fármacos y en la Tabla 18 se resumen dichas condiciones. Las condiciones óptimas de proceso encontradas fueron las siguientes: tipo de catalizador, TiO_2 ; 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 %.

3.2.2.4 Efecto del pH en degradación fotocatalítica empleando TiO_2 Degussa P25.

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_2 es un semiconductor que presenta una alta estabilidad química [50,72], 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 las Figuras 30 y 31 para PIRA e ISO, respectivamente.

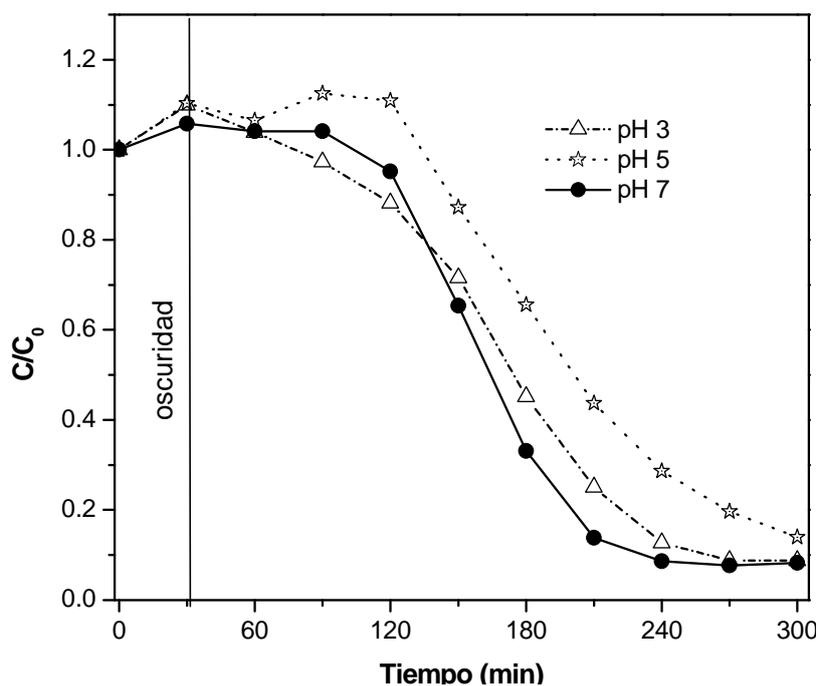


Figura 30. Efecto del pH de la disolución de la mezcla en la degradación de Pirazinamida utilizando TiO_2 Degussa P25, a una concentración de 5 mg/L y masa de catalizador de 1 g/L.

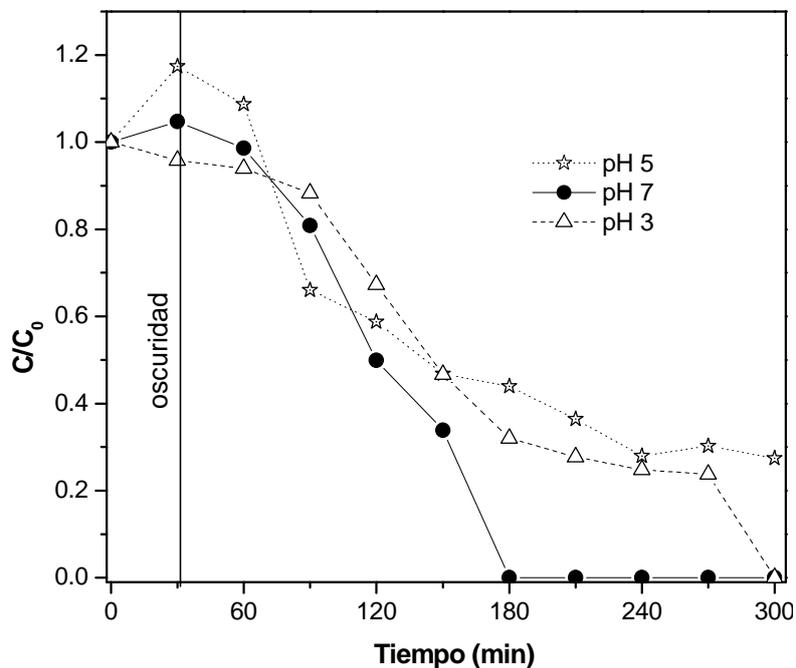


Figura 31. Efecto del pH de la disolución de la mezcla en la degradación de Isoniazida utilizando TiO_2 Degussa P25, a una concentración de 10 mg/L y masa de catalizador de 1 g/L.

Como se observa en las figuras anteriores, para el caso de PIRA a pH 3 y 7, se logra la degradación en un menor tiempo, siendo ligeramente más rápida a pH 7. Para el caso de ISO la degradación se favorece a pH 7. De acuerdo a estos resultados se observa que pH neutro favorece la degradación de ambos fármacos, 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 $\text{TiO}_2 = 6.3$) [73], la superficie se carga negativamente; 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) [65]. La degradación se favorece a pH 7 con relación a pH 3 debido a la mayor concentración de iones HO^- , lo que favorece una mayor fotogeneración de radicales $\bullet\text{OH}$ para la oxidación de los contaminantes.

3.2.2.5 Comparación de la intensidad de radiación en la degradación fotocatalítica.

Una vez que se seleccionó un valor de pH 7 de la disolución para la degradación, se trabajó con dos lámparas de radiación de longitud de onda de 365 nm, con diferentes intensidades, una con intensidad de $5,500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ y la otra con $304 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ para evaluar el efecto de este parámetro en la degradación de los fármacos. En las Figuras 32 y 33 se presenta la comparación de la degradación de PIRA e ISO a las dos diferentes intensidades de radiación.

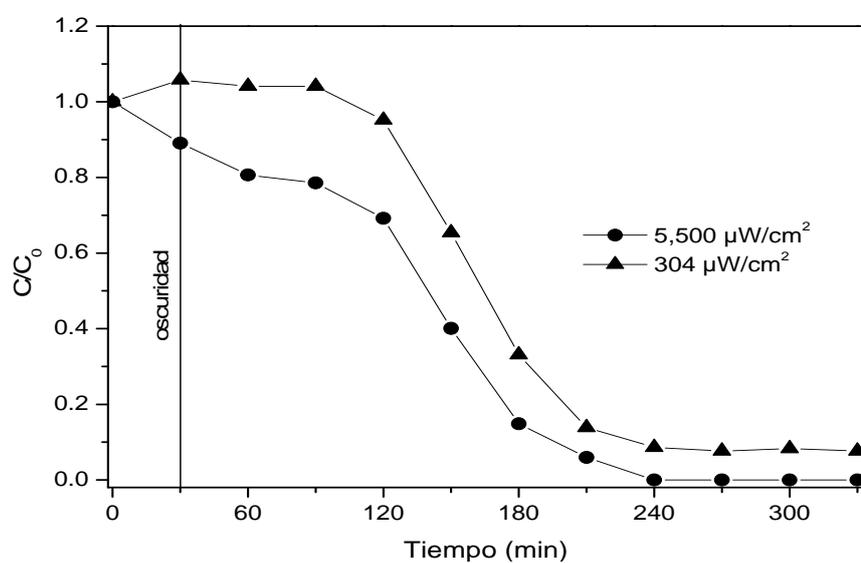


Figura 32. Evaluación de la intensidad de radiación en la degradación de Pirazinamida (5 mg/L) en mezcla empleando TiO₂.

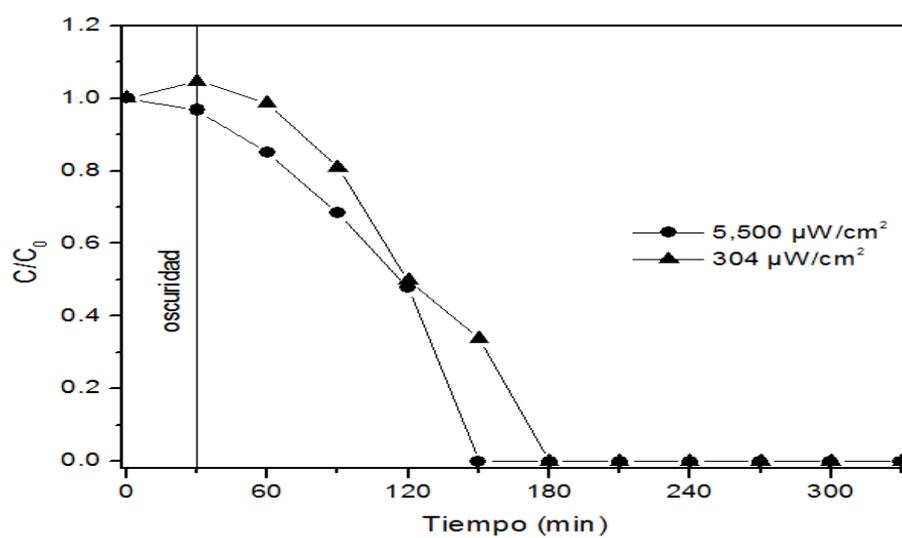


Figura 33. Evaluación de la intensidad de radiación en la degradación de Isoniazida (10 mg/L) en mezcla empleando TiO₂.

Como se observa en las Figuras 32 y 33 la degradación de ISO y PIRA ocurre a una mayor velocidad con la radiación de mayor intensidad a 5,500 μW/cm², siendo más lenta la

degradación de PIRA, atribuible al anillo de la pirazina el cual le da estabilidad a la molécula contra la degradación fotocatalítica. Los porcentajes de degradación para ISO y PIRA fueron 100% desde 240 minutos con un porcentaje de mineralización para la mezcla de los fármacos del 71%. Estos resultados se encuentran de acuerdo con la mayor parte de los estudios que relacionan el incremento en el porcentaje de degradación en fotocátalisis con el aumento de la intensidad de luz irradiada.

3.2.2.6 Pruebas control

Se realizaron pruebas control una vez que se obtuvieron los resultados del estudio del efecto del pH y de la intensidad de la radiación, por lo cual se eligió el pH de 7 y la lámpara con una intensidad de radiación de $5,500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Las pruebas control consistieron en evaluar la influencia de la adsorción al catalizador por parte de los analitos y la contribución que tiene únicamente la longitud de onda de radiación sobre los fármacos de estudio. En las Figuras 34 y 35 se presentan los resultados de las pruebas control tanto para PIRA como para ISO, en la Tabla 19 se presenta una comparación entre las pruebas control y la fotocátalisis en función del porcentaje de degradación.

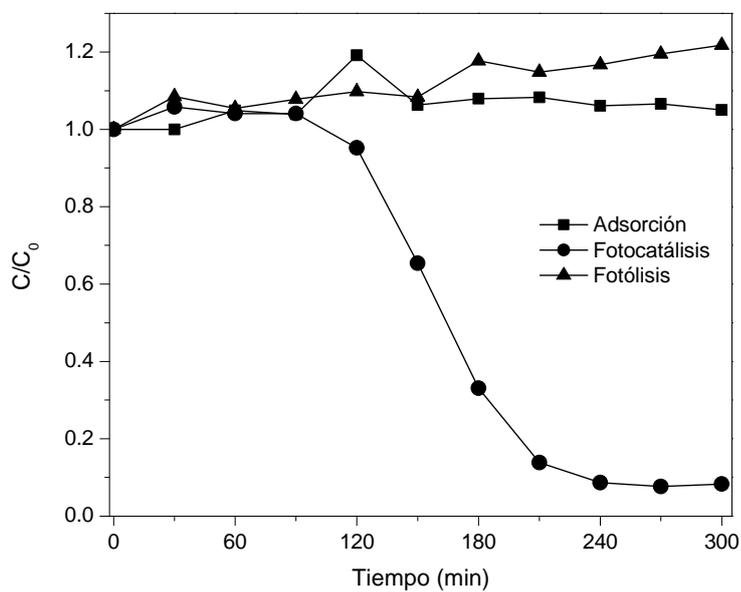


Figura 34. Degradación de Pirazinamida (5 mg/L) en mezcla con TiO_2 Degussa P25 mediante fotocatalisis; adsorción y fotólisis a pH 7.

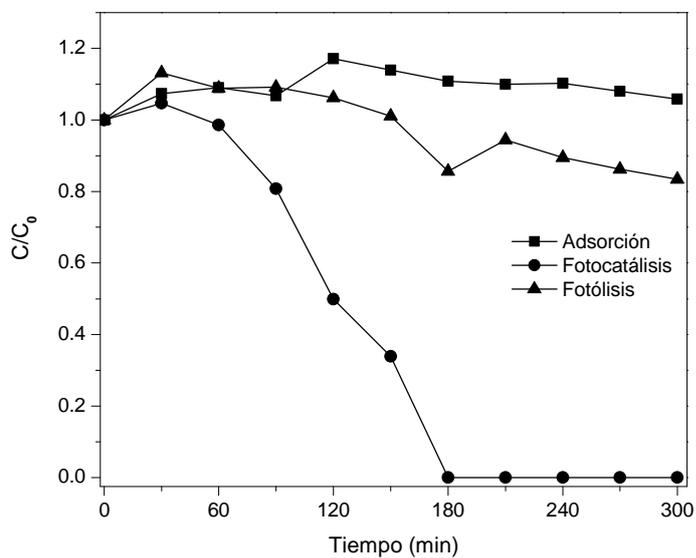


Figura 35. Degradación de Isoniazida (10 mg/L) en mezcla con TiO_2 Degussa P25 mediante fotocatalisis; adsorción y fotólisis a pH 7.

Tabla 19. Comparación del porcentaje de degradación entre las pruebas control y el proceso fotocatalítico.

Prueba	% Degradación	
	Isoniazida	Pirazinamida
Adsorción	0	0
Fotólisis	14	0
Fotocatálisis	97	92

Como se observa en las Figuras de las pruebas control, para el caso de PIRA tanto el proceso de adsorción como el de fotólisis por sí solos no presentan efecto en la degradación de PIRA. Para el caso de ISO la adsorción con el catalizador no tiene efecto en la degradación, sin embargo, con el proceso de fotólisis se degrada aproximadamente un 14% de este fármaco. De los resultados anteriores se resalta la importancia del proceso fotocatalítico, ya que por sí solos, los procesos de adsorción y fotólisis no son capaces de degradar a los analitos de estudio.

3.2.3. Degradación en muestras de agua reales

En las Figuras 36 y 37 se presenta el comportamiento de la degradación de los fármacos cuando se adicionan a una matriz de agua de río y agua de presa, en la Tabla 20 se muestran los parámetros físicoquímicos que se obtuvieron en las muestras reales, y en la Figura 38 se presentan los resultados de los porcentajes de mineralización (COT) en la degradación de los fármacos en las tres matrices de estudio.

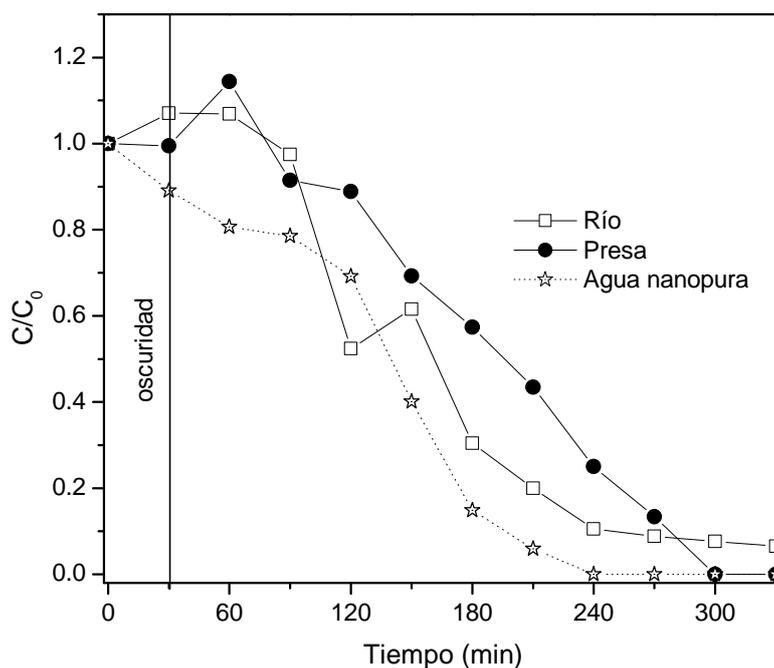


Figura 36. Degradación de Pirazinamida (5 mg/L) en mezcla adicionada en matrices reales de agua provenientes del Río Pablillo en Linares y la Presa La Boca del estado de Nuevo León.

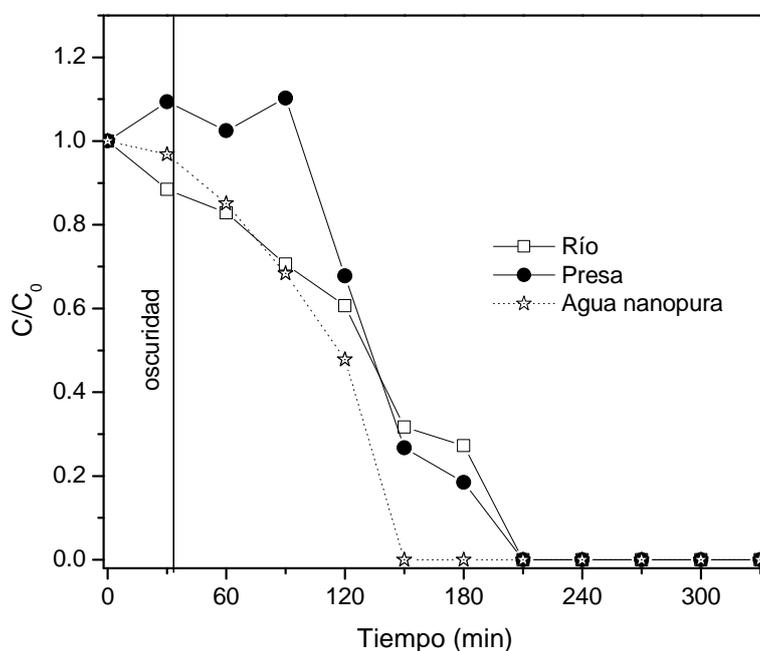
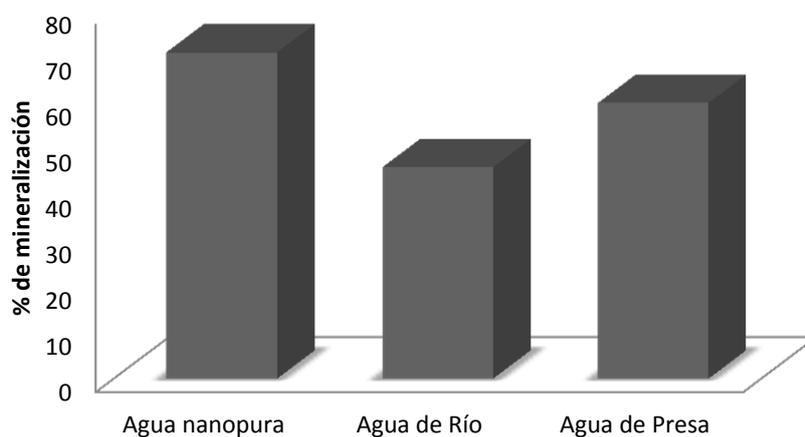


Figura 37. Degradación de Isoniazida (10 mg/L) en mezcla en matrices reales de agua provenientes del Río Pablillo de Linares y de la Presa La Boca del estado de Nuevo León.

Tabla 20. Parámetros fisicoquímicos del agua de Río Pablillo y la presa La Boca.

Muestra	pH	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	COT (mg/L)
Presa	7.9	416	4.1
Río	8.1	921	6.3

**Figura 38.** Porcentaje de mineralización de la mezcla de fármacos en matriz real y agua nanopura.

El porcentaje de degradación para ISO y PIRA fue menor en las muestras reales (93.4%) para el caso de PIRA a los 270 minutos comparado con el resultado obtenido en la disolución sintética (agua nanopura) que contenían la mezcla de 5 y 10 mg/L de PIRA e ISO, respectivamente. Este efecto se debe al contenido de COT (4.1 y 6.3 mg/L) así como de la conductividad (416 y 921 $\mu\text{S}/\text{cm}$) que inhiben el proceso de degradación fotocatalítico, ya que compiten por los sitios activos del catalizador. Este efecto no se

observó en el caso de ISO, ya que el porcentaje de degradación fue del 100% en 270 min. Comparados con los resultados de mineralización en las muestras de agua nanopura, se observó una disminución en el porcentaje de mineralización en las muestras reales (Figura 38), 46% en el Río Pablillo y 60% en la presa La Boca. El menor porcentaje de mineralización observado en la muestra de agua de río se debió al mayor contenido de COT y al alto valor de conductividad que presentó, lo cual interfiere durante el proceso de oxidación de los contaminantes orgánicos mediante el proceso de fotocatalisis heterogénea.

4. CONCLUSIONES

Se desarrolló una metodología analítica para la separación y determinación en flujo de isoniazida y pirazinamida mediante la técnica MSFIA.

Para el sistema MSFIA-Separación cromatográfica, los límites de detección fueron de 0.24 y 0.02 mg/L para isoniazida y pirazinamida, respectivamente. La desviación estándar relativa fue menor al 5%

Empleando el sistema MSFIA se logró monitorizar la degradación simultánea de los fármacos de estudio, a través del acoplamiento de un reactor fotocatalítico al sistema.

La degradación fotocatalítica se vio favorecida empleando TiO_2 Degussa P25, longitud de onda de radiación de 365 nm ($5,500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), cantidad de catalizador 1 g/L y pH de la disolución 7, alcanzando porcentajes de degradación del 100% y mineralización del 71% en un tiempo de 270 min.

La rapidez de degradación fotocatalítica de pirazinamida fue menor que la de isoniazida bajo las condiciones establecidas, lo que se atribuye principalmente a la estabilidad del anillo aromático de la pirazina.

En las muestras enriquecidas con ISO [10 mg/L] y PIRA [5 mg/L] en agua de río y presa, presentan porcentajes de mineralización del 46 y 60%, respectivamente lo que indica que la presencia de otros componentes de la matriz compiten por los sitios activos del catalizador.

Las ventajas del sistema MSFIA propuesto fueron el seguimiento y el análisis de la degradación de isoniazida y pirazinamida, la reducción de costos, disminución en el gasto de reactivos por los bajos volúmenes empleados durante el proceso en comparación al realizarlos en batch y la automatización del proceso analítico.

Referencias

1. Nikolau A., Meric S., Fatta D. (2007) Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1225-1234.
2. Mompelat S., Le Bot B., Thomas O. (2009) Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment International*, 35, 803-814.
3. Tambosi J., Yamanaka L., Moreira R. (2010) Recent research data on the removal of pharmaceutical from sewage treatment plants (STP). *Quimica Nova*, 33 No. 2, 411-420.
4. Lam M.W., Mabury S.A. (2005) Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquatic Science* 67, 177-188.
5. Siemens J., Huscheka G., Siebe C., Kaupenjohann M. (2008) Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley, *Water Research*, 42, 2124 - 2134.
6. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2005. Geneva, World Health Organization, p 1-4.
7. García M.L., Valdespino J.L., García. M.C., Salcedo R.A. (1995) Epidemiología de la tuberculosis y del VIH/SIDA. *Temas de medicina interna de la Asociación de Medicina Interna de México*; 3:809-819
8. Tuberculosis: Situación epidemiológica...Retos y desafíos en México. XIV Curso de Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis en el niño y el adulto. CENAVECE <http://www.cenavece.salud.gob.mx/>. 2010. Fecha: 20/Feb/11 13:00 h.
9. Estrategia Nacional para la Atención de Pacientes con Tuberculosis Resistente a Fármacos en México. CENAVECE <http://www.cenavece.salud.gob.mx/>. 2010
10. Red de Enfermería de América Latina, Día Mundial de la Tuberculosis, UANL. Acceso Diciembre de 2010. <http://real.enfermeria.uanl.mx/cirhe-inaugura-un-nuevo-centro-especializado.html>
11. García R, Lado F, Túniz V, Pérez M, Cabarcos A. (2003) Tratamiento actual de la tuberculosis. *An Med Interna (Madrid)*; 20, 91-100
12. Programa Nacional de Control de Enfermedades transmisibles-Control de la tuberculosis. Lima. Ministerio de Salud del Perú. 2000.
13. Coll P. (2003) Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*; 21(6), 299- 308.
14. Halter V, Nikaido H. (1994) *Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics*. *FEMS Microbiology Letters*; 123, 11-8
15. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. *Microbiología Médica*. Doceava edición. Editorial El manual moderno. México. 1987. p 291- 296
16. Roa Buitrago J, Bermúdez M, Acero R. *Neumonología*. Edición única. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Bogotá, Colombia. 2000. p 200- 210.
17. González A, García J, Lobo O. *Tuberculosis*. Segunda edición. Caracas, Venezuela. Editorial DISINLIMED. 2002. p 149- 172.

-
18. Arráiz N, Bermúdez V, Urdaneta B. Resistencia a drogas en M. Tuberculosis: Bases moleculares. AVFT v.24 n.1 Caracas 2005.
 19. Carrada T. Perspectivas en tuberculosis: Sugerencias para su eliminación en la República Mexicana. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias 2002; 15: 102-125.
 20. FEUM. Novena edición; 2008; Volumen I.
 21. Katzung G.B. (1999) Farmacología Básica y Clínica, 7ª Edición, Editorial El Manual Moderno.
 22. Hardman G.J., Gilman G.A., Limbird E.L. (2007) Goodman and Gilman's Las bases farmacológicas de la terapéutica, Onceava edición, McGraw Hill.
 23. Cerdà V. (2006) Introducción a los métodos de análisis en flujo. Ed. Sciware, S. L. Palma de Mallorca, España.
 24. Cerdà V., Forteza R., Estela J.M. (2007) Potential of multisyringe flow-based multicommutated systems. *Analytica Chimica Acta*, 600, 35-45.
 25. Guzmán Mar J.L., Martínez L.L., de Alba P.L.L., Duran, J.E.C. and Cerdà V. (2006) Multisyringe flow injection analysis for determination of 1-naphthylamine in water samples. *Microchimica Acta* 153, 139-144.
 26. Guzmán Mar J.L., Martínez L.L., de Alba P.L.L., Duran J.E.C., Cerdà V. (2006) Optical fiber reflectance sensor coupled to a multisyringe flow injection system for preconcentration and determination of 1-naphthylamine in water samples. *Analytica Chimica Acta* 573, 406-412.
 27. Guzman Mar J.L., Martínez L.L., de Alba P.L.L., Ornelas Soto N., Cerdà V. (2009) Multisyringe flow injection spectrophotometric determination of uranium in water samples. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 281, 433-439.
 28. Almeida M., Segundo M.A., Lima J., Rangel A. (2005) Multi-syringe flow injection system for the determination of available phosphorus in soil samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 85, 51-62.
 29. Ferrer L., de Armas G., Miro M., Estela J.M., Cerdà V. (2005) Flow-through optical fiber sensor for automatic sulfide determination in waters by multisyringe flow injection analysis using solid-phase reflectometry. *Analyst* 130, 644-651.
 30. Horstkotte B., Elsholz O., Martin V.C. (2008) Multisyringe flow injection analysis coupled to capillary electrophoresis (MSFIA-CE) as a novel analytical tool applied to the pre-concentration, separation and determination of nitrophenols. *Talanta* 76, 72-79.
 31. Oliveira H.M., Segundo M.A., Lima J., Cerdà V. (2009) Multisyringe flow injection system for solid-phase extraction coupled to liquid chromatography using monolithic column for screening of phenolic pollutants. *Talanta* 77, 1466-1472.
 32. Maya F., Estela J.M., Cerdà V. (2008) Spectrophotometric determination of chloride in waters using a multisyringe flow injection system. *Talanta* 74, 1534-1538.
 33. Miro M., Estela J.M., Cerdà V. (2005): Potentials of multisyringe flow injection analysis for chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta* 541, 57-68.
 34. Maya F., Estela J.M., Cerdà V. (2007) Improving the chemiluminescence-based determination of sulphide in complex environmental samples by using a new, automated multi-syringe flow injection analysis system coupled to a gas diffusion unit. *Analytica Chimica Acta* 601, 87-94.
 35. Serra A.M., Estela J.M., Cerdà V. (2008) MSFIA system for mercury determination by cold vapour technique with atomic fluorescence detection. *Talanta* 77, 556-560.

-
36. Leal L.O., Elsholz O., Forteza R., Cerdà V. (2006) Determination of mercury by multisyringe flow injection system with cold-vapor atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 573, 399-405.
 37. Leal L.O., Forteza R., Cerdà V. (2006) Speciation analysis of inorganic arsenic by a multisyringe flow injection system with hydride generation-atomic fluorescence spectrometric detection. *Talanta* 69, 500-508.
 38. Almeida M., Segundo M.A., Lima J., Rangel A. (2009) Interfacing multisyringe flow injection analysis to flame atomic emission spectrometry: an intelligent system for automatic sample dilution and determination of potassium. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24, 340-346.
 39. Wu N., Dempsey J., Yehl P.M., Doveloglou A., Ellison D., Wyvratt J. (2004) Practical aspects of fast HPLC separations for pharmaceutical process development using monolithic columns. *Analytica Chimica Acta* 523, 149-156.
 40. Legrini O., Oliveros E. y Braun A.M. (1993) Photochemical processes for water treatment. *Chemical Reviews*, 93, 671-698.
 41. Guzmán Mar J.L., Hinojosa L., Serra A.M., Hernández A., Cerdà V. (2011) Applicability of multisyringe chromatography coupled to cold-vapor atomic fluorescence spectrometry for mercury speciation analysis. *Analytica Chimica Acta* 708, 11-18.
 42. Vanloot P., Branger C., Margailan A., Brach-Papa C., Boudenne, J.L., Coulomb B. (2007) On-line solid-phase extraction and multisyringe flow injection analysis of Al(III) and Fe(III) in drinking water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 1595-1602.
 43. Carmín Chavez M. (2011) Determinación y Degradación Fotocatalítica de 2,4-D, Atrazina y Dicamba en solución acuosa mediante un sistema de análisis por inyección en flujo multijernga (MSFIA). Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Química Analítica Ambiental. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
 44. Sarría Muñoz, V. (2003) Coupled Advanced Oxidation and Biological Processes for Wastewater Treatment. Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias. École Polytechnique Fédérale de Lausanne. Francia, 175 p.
 45. Huang C.P., Dong Ch. y Tang Z. (1993) Advanced chemical oxidation: its present role and potential. Future in hazardous waste treatment. *Waste Management*, 13, 361-377.
 46. US/EPA Handbook of Advanced Photochemical Oxidation Processes, EPA/625/R-98/004 (1998).
 47. The AOT Handbook, Calgon Carbon Oxidation Technologies, Ontario (1996).
 48. Bolton J.R. y Cater S.R. (1994) Aquatic and Surface Photochemistry, 467-490. G.R. Helz, R.G. Zepp y D.G Crosby Editors. Lewis, Boca Raton, FL, EEUU.
 49. Libro del curso "Posibilidades para la Provisión de Agua Segura Usando Nuevas Tecnologías". Capítulo 10 "Destrucción de contaminantes orgánicos por fotocátalisis heterogénea" Herrmann J.M. Puerto Iguazú (Misiones, Argentina) 14-15 de octubre de 2005.

-
50. Domenech X., Jardim W., Litter M. (2001) Eliminación de contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea, Ed Miguel A. Blesa (para CYTED), Cap 6 La Plata, Argentina.
 51. Huang C.P., Dong Ch., Tang Z. (1993) Advanced chemical oxidation: Its present role and potential future in hazardous waste treatment. *Waste Management*; 13: 361-377.
 52. Candal R., Bilmes S., Blesa M. (2001) Eliminación de contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea, Ed Miguel A. Blesa (para CYTED), Cap 4 La Plata, Argentina.
 53. Gong Z., Basir Y., Chu D., McCort-Tipton M. (2009) A rapid and robust liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of anti-tuberculosis drugs-Ethambutol and pyrazinamide in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 877, 1698-1704.
 54. Zhou Z., Chen L., Liu P., Shen M., Zou F. (2010) Simultaneous Determination of Isoniazid, Pyrazinamide, Rifampicin and Acetylisoniazide in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Sciences*, 26, 1133-1138.
 55. Adaway J., Keevil B. (2012) Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 833-834, 33-49.
 56. Obando M.A, Estela J.M., Cerdá V. (2008). Simultaneous Determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in tablets by high-performance low-pressure chromatography using a multi-syringe burette coupled to monolithic column. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 2349-2356.
 57. Obando M.A, Estela J.M., Cerdá V. (2008) Multi-syringe chromatography (MSC) system for the on-line solid-phase extraction and Determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in superficial water, groundwater and wastewater outlet samples. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 212-217.
 58. Maya F., Estela J., Cerdá V. (2010) Interfacing on-line solid phase extraction with monolithic column multisyringe chromatography and chemiluminescence detection: A effective tool for fast, sensitive and selective, determination of thiazide diuretics. *Talanta* 80, 1333-1340.
 59. Zhuang Y., Cao G., Ge Ch. (2012) Flow injection analysis of ketoprofen based on the order transform second chemiluminescence reaction. *Spectrochimica Acta Part A* 85, 139-144.
 60. Giraldo A., Peñuela G., Torres-Palma R., Pino N., Palominos R., Mansilla H. (2010) Degradation of the antibiotic oxolinic acid by photocatalysis with TiO₂ in suspension. *Water Research* 44, 5158-5167.
 61. Yang H., An T., Li G., Song W., Cooper W., Luo H., Guo X (2010). Photocatalytic degradation kinetics and mechanism of environmental pharmaceuticals in aqueous suspension of TiO₂: A case of β -blockers. *Journal of Hazardous Materials*. 179: 834-839.
 62. Elmolla E., Chaud H. (2011). The feasibility of using combined TiO₂ photocatalysis-SBR process for antibiotic wastewater treatment. *Desalination*. 272, 218-224.
 63. Van Doorslaer X., Heynderickx P., Demeestere K., Debevere K., Van Langenhove H., Dewulf J. (2012) TiO₂ mediated heterogeneous photocatalytic degradation of moxifloxacin: Operational variables and scavenger study. *Applied Catalysis B: Environmental*. 111, 150-156.

-
64. Remington: La Ciencia y Práctica de Farmacia;2000, tomo 2, 20^a edición. Editorial Médica Panamericana.
 65. Wheate N., Vora V., Anthony N., McInnes F. (2010). Host–guest complexes of the antituberculosis drugs pyrazinamide and isoniazid with cucurbit[7]uril. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 68:359–367.
 66. <http://www.chemicalize.org/>. Autor: ChemAxon Fecha 2/Oct/12 16:00 h.
 67. Rouessac F., Rouessac A. (2003) *Análisis Químico Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*, 1^a edición, McGraw Hill.
 68. Mocak J., Bond A., Mitchell S., Scollary G. (1997). A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques. *International Union of pure and applied chemistry*, 69, No. 2, 297-328.
 69. Horikoshi S., Hidaka H. (2001) Photodegradation mechanism of heterocyclic two-nitrogen containing compounds in aqueous TiO₂ dispersions by computer simulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 141, 201-207.
 70. Rivera N., Hinojosa L., Guzmán J., Cai Y., O'Shea K., Hernández A. (2013) Photocatalytical removal of inorganic and organic arsenic species from aqueous solution using zinc oxide semiconductor. *Photochemical and Photobiological Sciences*, DOI: 10.1039/C2PP25231G.
 71. Castillo E., Montgomery D., McCarville D. (1996) Modified Desirability Functions for Multiple Response Optimization. *Journal of Quality Technology*, Vol. 28, No.3.
 72. Kabra K., Chaudhary R., Sawhney C., Rameshwar L. (2004) Treatment of Hazardous Organic and Inorganic Compounds through Aqueous-Phase Photocatalysis: A Review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43, 7683-7696.
 73. Chou J., Liao L. (2005) Study on pH at the point of zero charge of TiO₂ pH ion-sensitive field effect transistor made by the sputtering method. *Thin Solid Films*, 476, 157-161.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Erick Oswaldo Guevara Almaraz

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Química Analítica Ambiental

Tesis: DESARROLLO DE UN SISTEMA DE INYECCIÓN EN FLUJO MULTIJERINGA (MSFIA) PARA LA DETERMINACIÓN DE AGENTES ANTITUBERCULOSOS EN AGUA Y SU DEGRADACIÓN POR FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA

Campo de estudio: Ciencias Químicas

Biografía:

Datos personales: Nacido en el Estado de Nuevo León el 9 de octubre de 1987, hijo de José Refugio Guevara Uribe y Sandra Luz Almaraz Chávez.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: Químico Farmacéutico Biólogo en 2010.

Experiencia Profesional:

2010-2011 Centros Comerciales Soriana S.A de C.V

Auditor de Calidad. Evaluación y elaboración de reportes acerca de la desviación en calidad y del surtimiento de alimentos perecederos a los centros comerciales Soriana.