



# **BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

**Facultad de Ingeniería  
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado**

## **USO DE CLOROPEROXIDASA PARA LA OXIDACIÓN DE FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN INGENIERÍA OPCIÓN TERMINAL EN AMBIENTAL**

PRESENTA:

**I.Q. KARINA GABRIELA LEÓN AGUIRRE**

ASESOR:

**DR. EDUARDO TORRES RAMÍREZ**

CO-ASESORA:

**DRA. ALEJANDRA ALICIA PELÁEZ CID**

PUEBLA, PUE.

MAYO 2015

---

---

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioinorgánica Aplicada, perteneciente al Centro de Química del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección del Dr. Eduardo Torres Ramírez, con la colaboración del Centro del Agua para América Latina y el Caribe del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la BUAP.



**BUAP**

OFICIO SIEP No. 3406/ 2014

**ING. KARINA GABRIELA LEÓN AGUIRRE**  
**Maestría en Ingeniería, opción terminal Ambiental**  
**Presente.**

Por medio del presente, el suscrito M.I. Edgar Iram Villagrán Arroyo, Director de la Facultad de Ingeniería, de acuerdo a su solicitud de aprobación de Tema de Tesis, le autoriza desarrollar el tema intitulado: **“Uso de cloroperoxidasa para la oxidación de fármacos como contaminantes emergentes”**, para obtener el grado de Maestro en Ingeniería con opción terminal Ambiental. Asignándose como Asesor de Tesis al Dr. Eduardo Torres Ramírez y Co-Asesora a la Dra. Alejandra Alicia Peláez Cid.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

“Pensar bien, para vivir mejor”  
Puebla, Pue., a 19 de noviembre de 2014

M.I. EDGAR IRAM VILLAGRÁN ARROYO  
Director de la Facultad de Ingeniería



C.c.p. Dr. Eduardo Torres Ramírez. Asesor tema tesis.  
C.c.p. Dra. Alejandra Alicia Peláez Cid. Co-Asesora tema tesis.  
C.c.p. Archivo  
GJS/PGA/dsm.

♀

H. Puebla de Zaragoza, Pue., a 15 de abril del 2015.

**M. I. EDGAR IRAM VILLAGRÁN ARROYO**

Director Facultad de Ingeniería, BUAP

PRESENTE

Por este medio le informo que la tesis con título "*Uso de cloroperoxidasa para la oxidación de fármacos como contaminantes emergentes*" elaborada por la **Ing. Karina Gabriela León Aguirre**, egresada de la Maestría en Ingeniería opción terminal Ambiental, ha sido debidamente revisada por el abajo firmante como asesor de tesis, y las correcciones sugeridas ya se realizaron. Por lo anterior le manifiesto que no hay inconveniente para autorizar la impresión de la misma.

Agradeciendo su atención.



E. Torres R.

**Dr. Eduardo Torres Ramírez**

V° B°

**Dra. Martha Patricia González Araoz**

Coordinadora de la Maestría

H. Puebla de Zaragoza, Pue., a 15 de abril del 2015.

**M. I. EDGAR IRAM VILLAGRÁN ARROYO**

Director Facultad de Ingeniería, BUAP

PRESENTE

Por este medio le informo que la tesis con título “*Uso de cloroperoxidasa para la oxidación de fármacos como contaminantes emergentes*” elaborada por la Ing. **Karina Gabriela León Aguirre**, egresada de la Maestría en Ingeniería opción terminal Ambiental, ha sido debidamente revisada por la abajo firmante como co-asesora de tesis, y las correcciones sugeridas ya se realizaron. Por lo anterior le manifiesto que no hay inconveniente para autorizar la impresión de la misma.

Agradeciendo su atención.



**Dra. Alejandra Alicia Peláez Cid**



V° B°



**Dra. Martha Patricia González Araoz**

Coordinadora de la Maestría



**BUAP**

OFICIO: 1097/2015

C.P. José Juan Morales Rodríguez  
Director de Administración Escolar de la  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
Presente.

Por medio del presente, hago de su conocimiento que la C. Karina Gabriela León Aguirre, pasante de la Maestría en Ingeniería Ambiental, quien en fecha próxima presentará su Examen de Grado, solicita jurado y fecha de examen. Por lo que me permito sugerir a usted que el JURADO esté integrado por los siguientes Catedráticos:

- PRESIDENTE: DRA. ALEJANDRA ALICIA PELÁEZ CID  
SECRETARIO: DR. EDUARDO TORRES RAMÍREZ  
VOCAL: DRA. GABRIELA ELEONORA MOELLER CHÁVEZ  
VOCAL: DRA. CATALINA FERAT TOSCANO

La fecha y hora propuesta por esta Facultad es el día 23 de mayo de 2015, a las 11:00 a.m.

Sin otro particular de momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"  
H. Puebla de Zaragoza, abril 23 de 2015

M.I. Edgar Iram Villagrán Artoyo  
Director



Facultad  
de Ingeniería

Bld. Valsequillo y Av. San Claudio  
s/n, edif. 108 C, Col. San Manuel,  
Ciudad Universitaria,  
Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 7610

---

---

## *A G R A D E C I M I E N T O S*

Gracias a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el apoyo económico otorgado para el proyecto: “Oxidación Biocatalítica de Fármacos como Contaminantes Emergentes”.

Mi sincero agradecimiento al Dr. Eduardo Torres Ramírez por la oportunidad que me dio de participar en dicho proyecto, por su paciencia y conocimientos y a las personas en los laboratorios del CAALCA (ITESM), IBT (UNAM) y BUAP que colaboraron en el análisis de muestras para los resultados de esta tesis.

Con mucho cariño agradezco a mis padres y a mi hermano por su amor, confianza, sabiduría, consejos y apoyo incondicional a pesar de la distancia.

Extiendo mi agradecimiento a mis compañeros y amigos del laboratorio de bioinorgánica y de la maestría, por los buenos momentos y aprendizajes compartidos.

Y finalmente gracias a todos mis amigos y seres queridos que me apoyaron haciendo que la redacción de esta tesis fuese más satisfactoria y amena.



---

## ÍNDICE

<b>GLOSARIO.....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>13</b>
<b>I INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>II ANTECEDENTES.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Contaminantes emergentes.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Fármacos como contaminantes emergentes.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Fármacos y sus vías de ingreso al ambiente.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.1 Efluentes de hospitales como fuente de contaminación.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Técnicas de monitoreo para contaminantes emergentes.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Efectos de los fármacos en el ambiente y en los seres vivos.....</b>	<b>24</b>
<b>2.6 Tratamientos empleados para la remoción de fármacos y otros contaminantes         emergentes.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.1 Tratamiento biocatalítico.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6.2 Enzima Cloroperoxidasa.....</b>	<b>33</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>38</b>
<b>III METODOLOGÍA.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Reactivos.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.1 Fármacos seleccionados.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.2 Enzima Cloroperoxidasa.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1.3 Sales y disolventes.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1.4 Medio de reacción.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2 Equipos.....</b>	<b>42</b>
<b>3.3 Métodos.....</b>	<b>44</b>
<b>3.3.1 Preparación de soluciones madre de los fármacos.....</b>	<b>44</b>
<b>3.3.2 Determinación de la capacidad biocatalítica de la enzima para oxidación             (Análisis cualitativo).....</b>	<b>45</b>
<b>3.3.3 Curva de calibración.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3.4 Determinación de constantes cinéticas (Análisis cuantitativo).....</b>	<b>46</b>

---

---

3.3.5 Métodos instrumentales.....	46
3.3.6 Identificación de productos de oxidación.....	50
3.3.7 Capacidad oxidativa de la enzima usando como medio de reacción un efluente real de una planta de tratamiento.....	52
<b>IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
4.1 Monitoreo de las reacciones.....	54
4.1.1 Espectrofotometría UV-Visible.....	54
4.1.2 Espectrofotometría de fluorescencia.....	57
4.1.3 Cromatografía líquida de alta resolución.....	60
4.2 Determinación de constantes cinéticas.....	61
4.3 Identificación de productos de oxidación.....	66
4.4 Capacidad oxidativa de la enzima usando como medio de reacción un efluente real de una planta de tratamiento.....	73
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>79</b>

---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Clasificación de fármacos y su presencia en el ambiente.....	20
<b>Tabla 2:</b> Fracciones con respecto a la carga másica de fármacos seleccionados durante el tratamiento biológico secundario.....	28
<b>Tabla 3:</b> Tratamientos fisicoquímicos para contaminantes emergentes.....	29
<b>Tabla 4:</b> Tratamientos biológicos para contaminantes emergentes.....	30
<b>Tabla 5:</b> Empleo de enzimas para catalizar la oxidación de fármacos.....	31
<b>Tabla 6:</b> Fármacos seleccionados para los ensayos de oxidación enzimática con la cloroperoxidasa.....	39
<b>Tabla 7:</b> Disolventes y concentraciones para las soluciones madre de los fármacos.....	44
<b>Tabla 8:</b> Concentraciones de CPO usadas para la oxidación de cada fármaco.....	45
<b>Tabla 9:</b> Condiciones para analizar los fármacos utilizando HPLC.....	50
<b>Tabla 10:</b> Métodos y equipos empleados para la medición de parámetros del agua residual..	52
<b>Tabla 11:</b> Longitud de onda máxima de los fármacos analizados.....	54
<b>Tabla 12:</b> Longitudes de onda de excitación y emisión para los fármacos seleccionados.....	58
<b>Tabla 13:</b> Tiempos de retención para los fármacos analizados por HPLC.....	60
<b>Tabla 14:</b> Análisis por HPLC de los cambios de área para el diclofenaco.....	60
<b>Tabla 15:</b> Constantes cinéticas para la de oxidación de los fármacos catalizada por la cloroperoxidasa.....	65
<b>Tabla 16:</b> Productos de reacción de mayor abundancia en la oxidación de algunos fármacos seleccionados.....	71
<b>Tabla 17:</b> Velocidad de oxidación del ketoconazol en el agua residual pH 3 y en el amortiguador de acetatos a diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	75
<b>Tabla 18:</b> Parámetros fisicoquímicos medidos a) agua residual sin oxidar b) agua residual pH modificado y c) agua residual luego de la reacción 1h.....	76

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1:</b> Estructura tridimensional de la cloroperoxidasa de <i>Caldariomyces fumago</i> .....	34
<b>Fig. 2:</b> Ciclo catalítico de las peroxidases.....	35
<b>Fig. 3:</b> Equipo Varian Cary 50 utilizado para espectrofotometría UV-Visible.....	47
<b>Fig. 4:</b> Equipo Varian Cary Eclipse para espectrofotometría de fluorescencia.....	48
<b>Fig. 5:</b> Equipo Perkin-Elmer para cromatografía líquida de alta resolución.....	49
<b>Fig. 6:</b> Método para la extracción de productos de la oxidación de fármacos catalizada con cloroperoxidasa.....	51
<b>Fig. 7:</b> Equipos utilizados para la medición de parámetros fisicoquímicos en el agua residual	53
<b>Fig. 8:</b> Espectros de absorción antes (control) y después de 1 y 5 minutos de reacción.....	55
<b>Fig. 9:</b> Espectros de fluorescencia antes (control) y después de 1 y 5 minutos de reacción.....	59
<b>Fig. 10:</b> Cinética de oxidación de a) ketorolaco monitoreado por espectrofotometría UV-Vis y b) ketoconazol monitoreado por espectrofotometría de fluorescencia.....	61
<b>Fig. 11:</b> Curvas de Michaelis-Menten para la oxidación de fármacos.....	62
<b>Fig. 12:</b> Cromatograma que muestra los posibles productos de la oxidación.....	67
<b>Fig. 13:</b> Espectro de absorbancia antes (control) y después de 1 y 5 minutos de reacción para la muestra de agua residual con pH modificado a 3.....	73
<b>Fig. 14:</b> Espectro de fluorescencia antes (control) y después de 1 y 5 minutos de reacción para la muestra de agua residual con pH 3.....	74
<b>Fig. 15:</b> Espectro de absorbancia antes (control) y después de 1 y 5 minutos de reacción para la muestra de agua residual/ketoconazol con pH 3.....	75
<b>Fig. 16:</b> Variación de color y turbiedad de las tres diferentes muestras analizadas: a) agua residual original, b) agua residual pH 3 y c) agua residual luego de la reacción 1h...	77

---

## GLOSARIO

[S] - Concentración del sustrato  
ACN - Acetonitrilo  
BRM - Biorreactor con membrana  
CE - Contaminante(s) emergente(s)  
CG-EM - Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas  
CONAGUA – Comisión Nacional del Agua  
CPO - Cloroperoxidasa  
DBO<sub>5</sub> - Demanda bioquímica de oxígeno a 5 días  
DQO - Demanda química de oxígeno  
EC - *European Commission* (Comisión Europea)  
ECHA - *European Chemicals Agency* (Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas)  
EU - *European Union* (Unión Europea)  
FDA - *Food and Drug Administration* (Administración de Medicamentos y Alimentos)  
HBT - Hidroxibenzotriazol  
HPLC - *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía líquida de alta resolución)  
K<sub>M</sub> - Constante de Michaelis-Menten  
Lac - Lacasa  
LiP - Lignino Peroxidasa  
MnP - Manganeso Peroxidasa  
ND - No determinado/No detectado  
NE - No Especificado  
NF - No Fluoresce  
NMX - Norma Mexicana  
NOM - Norma Oficial Mexicana  
pH - Potencial Hidrógeno  
PV - Peroxidasa Versátil  
SDT - Sólidos disueltos totales  
SEMARNAT- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales  
EPA - Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental)  
UV-Vis - Ultravioleta-Visible  
V<sub>0</sub> - Velocidad inicial  
V<sub>max</sub> - Velocidad máxima

---

## RESUMEN

Los fármacos son considerados contaminantes emergentes debido a que su incursión en el ambiente no se encuentra regulada, ingresan continuamente y prevalecen incluso a bajas concentraciones, afectando la calidad del agua, los ecosistemas y la salud humana. Se seleccionaron 11 fármacos con estructuras aromáticas para ser utilizados como sustratos en una reacción de oxidación catalizada por la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*, la reacción se realizó a pH 3 en presencia de peróxido de hidrógeno, se obtuvieron velocidades de reacción en un rango de  $242.50 \text{ min}^{-1}$  para tenoxicam y  $10717.21 \text{ min}^{-1}$  para sulfametoxazol. Además se analizaron los productos de reacción de 8 de los fármacos por CG-EM, resultando en su mayoría en compuestos aromáticos clorados. Finalmente se llevaron a cabo pruebas en una muestra de agua residual, donde las velocidades de reacción para ketoconazol son muy similares a las obtenidas en el medio ácido y en la caracterización fisicoquímica del agua residual realizada antes y después de 1 h de reacción se halló una disminución de la  $\text{DBO}_5$  de 560 a  $40 \text{ mgL}^{-1}$  y de la DQO de 350 a  $196 \text{ mgL}^{-1}$ .

**Palabras clave:** cloroperoxidasa, oxidación, fármacos, contaminantes emergentes.

---

## I. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental ha sido una consecuencia inevitable del desarrollo de las sociedades humanas. Desde el inicio el hombre ha ocasionado cambios en la naturaleza, pero no fue sino hasta décadas recientes que aumentó la preocupación por los efectos adversos de los contaminantes sobre el ambiente y la salud humana, cuando su ingreso en los ecosistemas rebasó la capacidad de los mismos para depurar o degradar estas sustancias.

Dada su importancia para las actividades y la supervivencia humana, el agua es un recurso indispensable que se ha visto seriamente afectado por la contaminación. Todos los días las prácticas agrícolas, industriales y las actividades en el hogar utilizan agua y desechan enormes cantidades de compuestos en ella, lo cual modifica sus propiedades, altera el ciclo del agua y provoca efectos en las especies que habitan en los ecosistemas acuáticos.

Fue gracias a los avances tecnológicos, que las técnicas de detección de contaminantes en el ambiente mejoraron y permitieron descubrir su presencia incluso cuando sus concentraciones fueran muy bajas, encontrando compuestos de diferente naturaleza química y origen, que habían pasado inadvertidos, por lo que fueron nombrados como contaminantes emergentes.

Los contaminantes emergentes provienen de las diferentes actividades realizadas en las sociedades humanas e incluyen muchos compuestos químicos antropogénicos como plaguicidas, fármacos, productos de cuidado personal, aditivos industriales, entre otros. Teniendo como características en común su persistencia en el ambiente, su remoción o transformación rápida compensada por su ingreso continuo en el ecosistema y la falta de información completa sobre los efectos que pudieran ocasionar.

---

Ante el interés y preocupación que han despertado los contaminantes emergentes como los fármacos, se han diseñado y optimizado tratamientos para su remoción antes de que ingresen al ambiente, sin embargo, las plantas de tratamiento de aguas residuales se enfocan en la eliminación de materia orgánica y algunos otros tipos de contaminantes especificados en la normatividad de cada región. Aunque en algunos casos se ha demostrado la disminución de las concentraciones de fármacos con algunos de los tratamientos habituales, se requiere la incorporación de tratamientos más específicos para asegurar que los efectos en el ambiente sean los mínimos.

Como se expone en esta tesis, el uso de enzimas ha sido propuesto para catalizar la transformación de contaminantes, presentando ventajas frente a otros métodos como su fácil operación y bajo consumo de energía.

Las pruebas realizadas y presentadas en los capítulos III y IV se dividen en tres partes: en la primera se desarrollaron ensayos de 11 fármacos con estructuras aromáticas, utilizando la enzima cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* para catalizar su oxidación y medir las constantes cinéticas  $V_{\max}$  y  $K_M$  de sus reacciones correspondientes, la comparación e interpretación de los valores obtenidos para evaluar cuáles compuestos son mejores sustratos para la enzima. La segunda parte constituye el análisis de los productos de reacción, mediante la técnica de CG-EM, para obtener una perspectiva de los posibles productos generados de la oxidación de cada uno de los fármacos. Finalmente un último ensayo con una muestra de agua residual, conforma la última parte, donde se evalúa la capacidad de la enzima para catalizar la oxidación aun en un medio diferente al utilizado en los primeros ensayos, asimismo se realizan pruebas de los parámetros fisicoquímicos de la muestra antes y después de la reacción, comparando los resultados con los valores máximos permisibles de la normatividad para aguas residuales.

---

---

Con la información obtenida de las pruebas realizadas para esta tesis, se espera poder sustentar el desarrollo de un tratamiento biotecnológico para los fármacos como contaminantes emergentes.

---

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Contaminantes emergentes

Contaminantes emergentes (CE) es un término empleado para referirse a los compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente respecto de su distribución y concentración no se considera significativa, por lo cual pasan inadvertidos (Gil *et al*, 2012). Sin embargo, hoy en día están siendo ampliamente detectados y tienen el potencial de acarrear un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud de los organismos. La Agencia de Protección Ambiental define los contaminantes emergentes como nuevos químicos sin estatus de regulación y cuyo impacto en el medio ambiente y a la salud humana son escasamente entendidos (Deblonde *et al*, 2011). Por tal motivo algunos de estos contaminantes aún no están incluidos en la legislación de muchos países a nivel mundial, o no existe una norma que determine las concentraciones máximas permisibles en el ambiente (Rubio *et al*, 2013). Aunque de acuerdo con sus características, ecotoxicidad y destino en el ambiente, pueden ser candidatos para regulaciones futuras (Wu *et al*, 2010).

Una característica importante de los contaminantes emergentes es que no dependen de su permanencia para causar deterioro, ya que sus altas tasas de transformación y remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente (Gil *et al*, 2012). Los contaminantes emergentes se producen a diferentes concentraciones y distribuciones, cuyos criterios de calidad ambiental aún no se han podido especificar y las plantas de tratamiento de aguas residuales no están diseñadas para eliminarlos, y por lo mismo muchos de ellos no son removidos completamente (Deblonde *et al*, 2011).

Los contaminantes emergentes comprenden una amplia gama de compuestos químicos, tales como fármacos, productos de cuidado personal, agentes tensoactivos, plastificantes y aditivos industriales que no están incluidos en el monitoreo actual de programas de tratamiento (Gil *et al*, 2012).

---

## 2.2 Fármacos como contaminantes emergentes

Se define como fármaco a toda sustancia química que al interactuar con un organismo vivo da lugar a una respuesta, que puede ser beneficiosa o tóxica (Velázquez, 2008). Los fármacos son considerados contaminantes emergentes debido a que su incursión en los cuerpos de agua aún no se encuentra regulada. Estos compuestos ingresan continuamente en el ambiente y prevalecen incluso a bajas concentraciones (Rivera *et al*, 2013), pudiendo afectar la calidad del agua y causar un potencial impacto nocivo en las fuentes de agua potable, los ecosistemas y la salud humana (Deblonde *et al*, 2011).

Las primeras evidencias de la presencia de fármacos en agua se produjeron en los años setenta con la identificación en aguas residuales en Estados Unidos del ácido clofíbrico, que es el metabolito activo de varios reguladores de lípidos en sangre (clofibrato, etofilin clofibrato y etofibrato) (Barceló *et al*, 2008), siendo el primer reporte de la presencia de fármacos en aguas residuales tratadas y de sus efectos adversos sobre la fauna y la flora realizado en 1976 en Kansas, Estados Unidos, y que permitió a la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos y a la Unión Europea (EU) orientar muchos de sus estudios hacia la evaluación de sus impactos ambientales y al desarrollo de estrategias de tratamiento, estudio de metabolitos, toxicidad, remoción, biorremediación y técnicas instrumentales para su identificación y cuantificación (Jiménez, 2011). Sin embargo no fue hasta principios de la década de los noventa, que el tema de los fármacos en el ambiente ha cobrado importancia (Barceló *et al*, 2008). Hoy en día, aproximadamente más de 10, 000 compuestos farmacéuticos son producidos y utilizados, aunque se carece de datos suficientes sobre su destino y transporte en el ambiente, así como su toxicidad en los organismos, aunada a la falta de mediciones para determinar su concentración exacta (Dong *et al*, 2013).

La industria farmacéutica usa el término de Ingredientes Farmacológicamente Activos para describir aquellos compuestos que son resistentes a la degradación, altamente

---

persistentes en medios acuosos y que tienen un impacto negativo en la salud humana. Pero son las siguientes características de los fármacos que los diferencian de otros contaminantes químicos industriales convencionales (Rivera *et al*, 2013):

- ❖ Peso molecular menor a 500 Da.
- ❖ Están formados por moléculas grandes y químicamente complejas que varían ampliamente en peso molecular, estructura, función y forma.
- ❖ Son moléculas polares con más de un grupo ionizable, y sus propiedades dependen del pH del medio.
- ❖ Son lipofílicos y algunos de ellos moderadamente solubles en agua.
- ❖ Algunos de ellos pueden ser persistentes en el ambiente por más de un año y volverse biológicamente activos a través de la bioacumulación.
- ❖ Luego de su ingestión, las moléculas son absorbidas, distribuidas y sujetas a reacciones metabólicas que pueden modificar su estructura química.

Las moléculas de los fármacos identificadas en el ambiente pertenecen a diversos grupos como analgésicos, antibióticos, anticonvulsivos, antiinflamatorios, reguladores de lípidos, anticancerígenos, hormonas y desinfectantes (Deblonde *et al*, 2011). En la Tabla 1, se resumen los diferentes grupos de fármacos más comunes de acuerdo con su acción en el organismo y presencia en el ambiente.

**Tabla 1: Clasificación de fármacos y su presencia en el ambiente**

<b>Analgésicos</b>	Son los fármacos de mayor consumo a nivel mundial y de mayor automedicación. Se han reportado presentes en aguas residuales domésticas y hospitalarias en España (Martín <i>et al</i> , 2012), por lo tanto es importante conocer las rutas metabólicas de cada uno de los compuestos, para determinar o descartar el origen de su toxicidad (Gil <i>et al</i> , 2012).
<b>Antihipertensivos</b>	Son usados frecuentemente ya que la hipertensión arterial es la enfermedad cardiovascular más común en el mundo. Algunos de ellos han alcanzado niveles superiores a los $0.017 \mu\text{gL}^{-1}$ en efluentes de plantas de tratamiento y ríos en Alemania (Ternes, 1998).
<b>Antibióticos</b>	Su efecto contra microorganismos patógenos en animales y humanos, así como para la preservación de alimentos, han incrementado su producción y consumo, permitiendo grandes descargas sobre los cuerpos de agua con manifestaciones de resistencia microbiana en las zonas de estudio en Estados Unidos (Jiménez, 2011).
<b>Antiinflamatorios</b>	Los más comunes, los antiinflamatorios no esteroideos son frecuentemente usados para tratar síntomas comunes como fiebre, dolor e inflamación. Han sido encontrados en órganos de peces que habitan en cuerpos de agua superficiales cerca de plantas de tratamiento en Suecia (Cuklev <i>et al</i> , 2012).
<b>Disruptores endocrinos</b>	Hormonas como la estimulante de la glándula tiroides (TSH), estradiol, luteinizante (LH) y la estimulante del folículo (FSH) no se remueven con facilidad en las plantas de tratamiento de agua residuales, y terminan en aguas superficiales y aguas para el consumo humano, exponiendo de forma crónica la especie humana a sus efectos tóxicos (Gil <i>et al</i> , 2012).

---

Las sustancias de mayor uso, son los analgésicos, antiinflamatorios como el diclofenaco, ibuprofeno y otros medicamentos como la aspirina, antisépticos como el triclosán, hormonas como el estradiol y la estrona, estimulantes como la cafeína y otras drogas de uso lícito en centros hospitalarios como la morfina (Gil *et al*, 2012).

### **2.3 Fármacos y sus vías de ingreso al ambiente**

La producción y consumo de fármacos se ha incrementado con el desarrollo de la ciencia médica. Aproximadamente 3000 compuestos son utilizados en medicina, y la producción anual excede los cientos de toneladas (Sim *et al*, 2011). Los fármacos son consumidos diariamente para preservar la salud de las personas, aunque también son administrados en animales para prevenir y tratar enfermedades y su propagación a los seres humanos. Debido a este alto consumo, los fármacos, así como sus metabolitos ingresan al ambiente de diversas maneras. Las vías principales de productos farmacéuticos en el medio ambiente son a través de la excreción humana, la eliminación de los productos no utilizados y por el uso agrícola. Estos residuos farmacéuticos son transportados al ciclo del agua por diferentes rutas: las plantas de tratamiento de aguas residuales funcionan como puerta de entrada de estos productos a los cuerpos de agua ya que no son retenidos o transformados en sus procesos y además muchos fármacos de uso veterinario son descargados directamente al ecosistema (Gil *et al*, 2012), mediante la aplicación del estiércol al suelo como abono o a través de su empleo directo en acuicultura (Sándor *et al*, 2012).

Después de su ingestión, los fármacos pueden ser excretados sin sufrir transformación o ser parcialmente metabolizados a través de dos mecanismos: una primera ruta donde reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y alcalinización tienen lugar y una segunda ruta en donde conjugados de glucorónido y sulfato son formados y excretados a través de la orina o la bilis en forma de compuestos más polares e hidrofílicos, como metabolitos o mezclas de los mismos (Rivera *et al*, 2013). Las concentraciones de

---

fármacos en aguas residuales no tratadas pueden variar según la región de acuerdo al consumo y producción de agua residual (Falås *et al*, 2012).

En cuanto a su movilidad en el ambiente, según las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, sus metabolitos, productos de degradación y las características de los suelos, pueden llegar hasta las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar la cadena trófica (Gil *et al*, 2012).

Las aguas residuales han sido señaladas como la principal ruta de acceso de los fármacos al ambiente, debido a que es donde se reúnen los desechos excretados después de la ingestión, en forma de heces u orina, en los cuales se encuentran los compuestos intactos o sus metabolitos (Santos *et al*, 2013), y dado que no son completamente transformados en las diferentes etapas del proceso, su destino final es los cuerpos de agua o algunos de ellos quedan adsorbidos en los sedimentos o lodos biológicos. Por ejemplo, un total de 70 fármacos no antibióticos de uso humano han sido detectados en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales en Suecia, en un rango de concentración de 2 a 52 ngL<sup>-1</sup> (Falås *et al*, 2012), mientras que el análisis del efluente de la planta de tratamiento de Marsella en Francia, permitió la identificación y cuantificación de 63 contaminantes solubles en agua, la mayoría fármacos en concentraciones de 0.92 a 600 ngL<sup>-1</sup> (Wu *et al*, 2010). Además un estudio en el río Ravi en Pakistán encontró que los efluentes de hospitales han sido los mayores contribuidores de antibióticos como el ofloxacino, y la cantidad de dicho antibiótico encontrada en el río se debe a la inclusión de las aguas residuales municipales a dicho cuerpo de agua (Ahmad *et al*, 2012). Aunque la mayoría de los antibióticos han sido encontrados en fase acuosa, también se han detectado en muestras de lodos, como el sulfametoxazol, encontrado en concentraciones de 34, 67 y 27 µgkg<sup>-1</sup> en muestras de lodos primarios, lodos residuales y lodos secos, respectivamente, provenientes de la planta de tratamiento de East Lansing en Michigan, Estados Unidos (Gao *et al*, 2012).

---

### **2.3.1 Efluentes de hospitales como fuente de contaminación**

Además de las aguas residuales urbanas, los efluentes de los hospitales han sobresalido como una importante vía de ingreso de los fármacos al ambiente. Debido a su naturaleza específica, presentan una mezcla de compuestos, incluyendo no solo fármacos y sus metabolitos, sino también, reactivos de diagnóstico, laboratorio e investigación y principalmente excretas de medicina de los pacientes (Santos *et al*, 2013).

Estas aguas residuales son normalmente descargadas sin tratamiento previo a los sistemas de alcantarillado (Ort *et al*, 2010), siendo tratadas junto con las aguas residuales domésticas en las plantas de tratamiento municipales, con las consecuencias ya mencionadas (Igos *et al*, 2012) como la inhibición de la biomasa y reducción de la eficiencia de remoción en las plantas de tratamiento, la propagación de bacterias resistentes a múltiples antibióticos y el ingreso a los cuerpos de agua de sustancias que podrían ser genotóxicas (Santos *et al*, 2013).

### **2.4 Técnicas de monitoreo para contaminantes emergentes**

Desde la década de los setenta, el monitoreo de químicos usando técnicas analíticas ha proporcionado información para la protección de la salud humana y la biodiversidad en los ambientes acuáticos (Hutchinson *et al*, 2013). El desarrollo de nuevas técnicas analíticas ha permitido la detección de concentraciones extremadamente bajas ( $\mu\text{gL}^{-1}$  o  $\text{ngL}^{-1}$ ) de estos compuestos en matrices muy complejas en estado líquido y sólido (Rivera *et al*, 2013). Con la necesidad de estudiar la presencia, transporte y destino de los contaminantes emergentes, es necesario identificar su estructura y cantidad. La cromatografía, incluyendo la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución son las técnicas más empleadas, mientras que la espectrometría de masas proporciona información sobre la estructura molecular de los compuestos, siendo una técnica muy sensible y selectiva. La combinación de estas técnicas permite separar mezclas en sus componentes individuales y analizarlos cada uno cualitativa y

---

cuantitativamente (Wu *et al*, 2010). Gracias a los avances en estas técnicas analíticas se ha hecho posible detectar la presencia de un gran número de contaminantes emergentes como los fármacos en efluentes de plantas de tratamiento, aguas superficiales, subterráneas, agua embotellada e incluso en mares y océanos (Jean *et al*, 2012).

## **2.5 Efectos de los fármacos en el ambiente y en los seres vivos**

Existe una creciente preocupación acerca de los efectos adversos al ambiente que resultan del uso de numerosos fármacos utilizados para el beneficio humano. Estos compuestos son parcialmente metabolizados del 1% al 95% según su tipo (Dong *et al*, 2013) para luego ser excretados con propiedades fisicoquímicas idénticas o modificadas. La descarga de estos compuestos en el ambiente representa un gran impacto ecológico ya que sus estructuras complejas confieren resistencia e impiden su biodegradación en las plantas de tratamiento convencionales para aguas residuales.

Los efectos potenciales de los fármacos y sus residuos en los ambientes acuáticos en la mayoría de los casos se han referido como respuestas a corto plazo tales como mortalidad en algas, invertebrados y peces (Escher *et al*, 2011). Las interacciones en mezclas de fármacos no pueden ignorarse, en algunos casos, se ha observado que los efectos son mayores que los de los fármacos por si solos (Escher *et al*, 2011). Debido a que estas sustancias están diseñadas para inducir una respuesta biológica específica en humanos y no en otros seres vivos como los peces. Asimismo el uso de aguas residuales tratadas para la agricultura es una práctica creciente que facilita una nueva ruta de introducción de fármacos al ambiente. Dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de los fármacos y del suelo, los primeros pueden quedarse retenidos en las capas superficiales o alcanzar los cuerpos de agua subterráneos, afectando las poblaciones microbianas y siendo almacenados en los tejidos de las plantas (Grossberger *et al*, 2014).

---

Se ha reportado la toxicidad de varios fármacos y sustancias de diferentes clases terapéuticas, junto con sus metabolitos, siendo una amenaza a la salud de los organismos vivos, incluyendo los seres humanos. Por ejemplo mezclas de antibióticos, que incluyen compuestos como amoxicilina, eritromicina, levofloxacino, norfloxacino y tetraciclina han sido encontradas en microorganismos acuáticos como cianobacterias y algas verdes (González *et al*, 2013). Los antibióticos pueden contribuir a la evolución en la resistencia de las bacterias patógenas. El desarrollo de estas bacterias en los ambientes acuáticos puede influenciar en la resistencia a los antibióticos en las infecciones de la población humana. Muchos de estos compuestos son persistentes y desechados del organismo sin ser modificados, incluso algunos antibióticos han sido encontrados en vegetales como zanahoria y lechuga (Sándor *et al*, 2012). El sulfametoxazol, antibiótico perteneciente al grupo de las sulfonamidas es ampliamente usado en medicina humana y veterinaria, ha sido frecuentemente encontrado en concentraciones de 0.01 a 2  $\mu\text{gL}^{-1}$  en aguas superficiales (Bahnmüller *et al*, 2014). A estas concentraciones, el sulfametoxazol ha resultado ser mutagénico, pero no agudamente tóxico para algunos organismos acuáticos, y fitotóxico para las algas, mientras que algunas bacterias aisladas de tratamientos biológicos de aguas residuales se han encontrado genes de resistencia a las sulfonamidas (Larcher y Yargeau, 2012).

Antiinflamatorios como el ibuprofeno, diclofenaco y naproxeno en concentraciones de  $\text{ngL}^{-1}$ , presentes en los efluentes de las plantas de tratamiento fueron detectados en el tejido hepático de peces que habitan en lagos y ríos cercanos a ellas (Brozinski *et al*, 2012). Además, otras drogas antidepresivas como fluoxetina y sertralina y sus metabolitos también se hallaron en el hígado, músculo y cerebro de peces (Brozinski *et al*, 2012). Siendo investigados los efectos ecotoxicológicos de la fluoxetina en *Cerodaphia dubia* y en ranas, se encontraron efectos neurológicos en los peces como descoordinación al nadar, letargo en la respuesta a los estímulos (Henry *et al*, 2004), mientras que las ranas presentaron disminución del tamaño de sus extremidades, retraso en la retracción de la cola y ambas especies retraso en el desarrollo sexual (Black *et al*,

---

2005). Además se han presentado efectos negativos en la reproducción de los peces ocasionada por los compuestos estrogénicos, efectos adversos en la población de buitres en Pakistán y la inhibición de la fotosíntesis en algas causada por  $\beta$ -bloqueadores (Escher *et al*, 2011).

En los ambientes acuáticos, tanto estrógenos y fungicidas como el ketoconazol pueden coexistir y ejercer sus efectos en vertebrados, inhibiendo la síntesis de esteroides y afectando el metabolismo de algunas enzimas (Yan *et al*, 2013). Para el caso de drogas anticancerígenas como el metotrexato son de particular preocupación ambiental debido a su baja tasa de biodegradabilidad, potencial efecto carcinógeno, mutagénico, teratogénico y genotóxico, incluso a bajas concentraciones (Roig *et al*, 2014).

Debido a la persistencia y naturaleza química de los fármacos, no pueden ser tratados efectivamente como otros contaminantes y como resultado se acumulan dentro de los sistemas acuáticos, son potencialmente tóxicos para los organismos acuáticos, ya que están diseñados para presentar efecto biológico incluso a bajas concentraciones (Eibes *et al*, 2011).

## **2.6 Tratamientos empleados para la remoción de fármacos y otros contaminantes emergentes**

Para evitar el impacto ocasionado por los fármacos, se requiere la adopción de tratamientos más específicos de las descargas, evitando la dilución de las aguas residuales hospitalarias con las aguas residuales urbanas, impidiendo así una posible inhibición de la biomasa y reducción de la eficiencia de remoción en las plantas de tratamiento. Las plantas de tratamiento de aguas residuales han sido diseñadas para la eliminación de materia orgánica y ciertos tipos de contaminantes, especialmente los que se especifican en las normas oficiales. Sin embargo, el estudio de nuevos contaminantes como los emergentes, los cuales poseen una amplia gama de propiedades químicas,

---

requieren de tratamientos avanzados para una segura incorporación de las aguas residuales tratadas a los cuerpos de agua (García *et al*, 2011).

La mayor fuente de fármacos al ambiente son las descargas provenientes de las plantas de tratamientos de aguas residuales, donde se integran las descargas de casas, hospitales e industrias farmacéuticas (Santos *et al*, 2013). La mayoría de las plantas para aguas residuales operan usando tratamientos físicos y biológicos, debido a los altos costos que implica introducir tratamientos terciarios adicionales. La eficiencia de remoción de los compuestos varía, dependiendo del tipo de tratamiento empleado. Por ejemplo, se ha comprobado en diversos estudios la presencia de fármacos en aguas residuales crudas, sedimentos y en el efluente aún después de pasar por un sistema de lodos activados, una etapa muy utilizada en las plantas de tratamiento municipales (Verlicchi *et al*, 2012). Con base en los datos reportados, se comprueban que existe variación en la concentración de cada compuesto y en las eficiencias de remoción (Tabla 2).

**Tabla 2: Fracciones con respecto a la carga másica de fármacos seleccionados durante el tratamiento biológico secundario (Verlicchi *et al*, 2012)**

Compuesto	Edad de los lodos (d)	Transformación biológica	Sorción en los lodos	Fracción en el efluente	Referencia
<b>Diclofenaco</b>	4-60	5-45	<5	55-95	Joss <i>et al</i> , 2005 Jelic <i>et al</i> , 2011
	6	25	<5	70-75	
<b>Ketoprofeno</b>	6	70	0	30	Jelic <i>et al</i> , 2011
	16	<95	0	5-10	
<b>Naproxeno</b>	6	77	0	23	Jelic <i>et al</i> , 2011
	16	95-98	0	<5	
<b>Ciprofloxacino</b>	10-12	<10	70-80	≤ 30	Golet <i>et al</i> , 2003 Lindberg <i>et al</i> , 2006
	20	<10	77	<4	
<b>Claritromicina</b>	<20	<10	<5	75-90	Göbel <i>et al</i> , 2007
	>50	90	<5	10	
<b>Sulfametoxazol</b>	4-12	50-90	<5	10-50	Göbel <i>et al</i> , 2007 Suárez <i>et al</i> , 2010
	<20	20	0	80	
<b>Enalapril</b>	6	95-98	0	2-5	Jelic <i>et al</i> , 2011
	16	95-98	0	2-5	
<b>Pravastatina</b>	6	45	0	55	Jelic <i>et al</i> , 2011
	16	62	2	<40	
<b>Diazepam</b>	6	0	42	58	Jelic <i>et al</i> , 2011
	16	0	65	35	
<b>Fluoxetina</b>	<20	80	0	20	Suárez <i>et al</i> , 2010
	>50	90	0	10	
<b>Estradiol</b>	10-30	85-99	<5	<15	Joss <i>et al</i> , 2004

Numerosos estudios han confirmado que los métodos tradicionales no resultan efectivos para proveer una remoción completa de varios fármacos en aguas residuales (Hey, 2013), debido a sus características que dificultan la biodegradación de los compuestos o a la limitada actividad biológica que pueden provocar, como los antibióticos o antifúngicos. Se han utilizado diversos tratamientos como los que se mencionan en las Tablas 3 y 4 para la eliminación de contaminantes emergentes incluidos los fármacos.

**Tabla 3: Tratamientos fisicoquímicos para contaminantes emergentes**

<b>Tratamientos Fisicoquímicos</b>	<b>Coagulación y Floculación</b>	Son procesos tradicionales de tratamientos de aguas. Sin embargo, estos son incapaces de remover productos farmacéuticos y de cuidado personal, por sí solos (Gil <i>et al</i> , 2012).
	<b>Ultrafiltración y Nanofiltración</b>	Es el proceso de separación fisicoquímico que emplea membranas. Sin embargo, la ultrafiltración individual, algunas veces es inefectiva para la remoción de la mayoría de los emergentes, debido a la capacidad de retención limitada de las membranas como también al taponamiento de las mismas. En comparación, la nanofiltración es menos efectiva que la ósmosis inversa, ya que en esta última se puede tener una remoción casi completa de contaminantes, su alto consumo energético puede representar una desventaja (Gil <i>et al</i> , 2012).
	<b>Procesos de oxidación avanzada</b>	Los procesos de oxidación avanzada, los cuales generan radicales hidroxilo en cantidades suficientes para ser capaces de oxidar la mayoría de compuestos químicos complejos presentes en aguas residuales. Entre estos procesos la oxidación fotocatalítica (usando radiación UV o luz solar en la presencia de catalizadores semiconductores) y la química de Fenton (usando reacciones entre iones $Fe^{2+}$ y $H_2O_2$ ). Debido al alto costo de la radiación artificial a través de lámparas UV eléctricas su aplicación al tratamiento de grandes volúmenes de agua es todavía un reto a superar (Gil <i>et al</i> , 2012).
	<b>Cloración</b>	El cloro ha sido durante muchos años uno de los desinfectantes más utilizados para el agua y el tratamiento de aguas residuales, debido a sus fuertes efectos bactericidas y su bajo costo. Sin embargo se ha demostrado que puede formar subproductos clorados que resulten ser tóxicos (Hey, 2013).
	<b>Adsorción</b>	Los procesos de adsorción no generan subproductos indeseables al agua potable; pero se requieren altas tasas de consumo de adsorbente en el caso de usar carbón activado para contaminantes orgánicos polares (Gil <i>et al</i> , 2012).

**Tabla 4: Tratamientos biológicos para contaminantes emergentes**

<b>Tratamientos biológicos</b>	<b>Lodos activados y filtros percoladores</b>	Los sistemas de lodos activados y filtros percoladores, a pesar de que pueden convertir rápidamente compuestos orgánicos en biomasa, solamente son capaces de eliminar una parte de dichos contaminantes. El proceso de lodos activados ya ha sido reportado para la eliminación de fármacos como el diclofenaco y el ibuprofeno (Rubio <i>et al</i> , 2013).
	<b>Tratamiento con membranas</b>	La tecnología de biorreactores con membrana (BRM) se considera el desarrollo más prometedor en el tratamiento microbiológico de aguas residuales. Esta tecnología combina un proceso de degradación biológico usando lodos activados, con una separación sólido-líquido a través de un proceso de ultrafiltración. La baja carga de lodos en términos de DBO y la larga vida de los lodos da a las bacterias tiempo para adaptarse a sustancias resistentes al tratamiento durante el tratamiento de contaminantes emergentes por medio de biorreactores con membrana (Gil <i>et al</i> , 2012). Sin embargo cuando los compuestos son altamente hidrofílicos y poco metabolizables no serán retenidos ni degradados por un BRM (Rubio <i>et al</i> , 2013).

### 2.6.1 Tratamiento biocatalítico

Las enzimas pueden utilizarse para la transformación de la estructura y propiedades toxicológicas de los contaminantes, hasta su conversión en productos inocuos (Rao *et al*, 2010). Los métodos basados en enzimas requieren bajos consumos de energía, y son llevados a cabo en procesos de fácil operación y funcionan en un intervalo amplio de pH, temperatura y fuerzas iónicas (Torres *et al*, 2003).

El uso de enzimas purificadas ha sido propuesto para catalizar la transformación de contaminantes. Enzimas oxidativas como la polifenol oxidasa (tirosinasa, lacasa) o las peróxido de hidrógeno oxidorreductasas (lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa, peroxidasa de rábano, soya, etc.) han sido evaluadas para el tratamiento de las aguas

residuales (Eibes *et al*, 2011). Las peroxidasas son enzimas capaces de transformar una variedad de compuestos siguiendo un mecanismo de radicales libres, dando productos oxidados o polimerizados. (Torres *et al*, 2010). Los métodos basados en enzimas tienen un mínimo impacto sobre los ecosistemas. Además las enzimas son activas en presencias de altas concentraciones de solventes orgánicos donde moléculas hidrofóbicas son solubles. Sin embargo, el uso de enzimas está restringido por los requerimientos de componentes celulares como cofactores. Las peroxidasas y las lacasas son enzimas oxidativas que no necesitan ningún otro componente celular para funcionar. Tienen una amplia especificidad de sustratos y son capaces de transformar una extensa gama de compuestos tóxicos (Torres *et al*, 2003).

La oxidación de fármacos utilizando enzimas ya ha sido estudiada en ciertos compuestos, llevando a cabo las reacciones en diferentes sistemas acuosos y condiciones. En la Tabla 5 se presentan algunos ejemplos representativos:

**Tabla 5: Empleo de enzimas para catalizar la oxidación de fármacos**

Referencia	Enzima	Compuesto(s)	Método	Resultados
Eibes <i>et al</i> , 2011	Peroxidasa Versátil de <i>Bjerkandera adusta</i>	Sulfametoxazol Diclofenaco Naproxeno Citalopram Fluoxetina Carbamazepina	Sistema (50 mL): malonato de sodio, $Mn^{2+}$ , fármaco (2.5 ppm), $H_2O_2$ (agente oxidante) y enzima, pH 4.5 y 22°C	Degradación total del diclofenaco (5-25 min), 80% para sulfametoxazol y naproxeno, 18% para citalopram y <10% para carbamazepina
Lloret <i>et al</i> , 2010	Lacasa de <i>Myceliophthora thermophila</i>	Diclofenaco Naproxeno	Sistema (20 mL): lacasa-HBT o lacasa con mediador natural redox, fármaco ( $5\text{ mgL}^{-1}$ ), Lac (2000 U/L), amortiguador de acetatos, mediador (1 mM), pH de 4 a 7	En el sistema Lac-HBT remoción de 60% de naproxeno a las 8 h y en Lac-mediador natural >80% para ambos luego de 24 h

**Tabla 5. Utilización de enzimas para catalizar la oxidación de fármacos...continuación**

Referencia	Enzima	Compuesto(s)	Método	Resultados
Wen <i>et al</i> , 2009	Lignino peroxidasa de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Tetraciclina Oxitetraciclina	Sistema (8 mL): LiP, alcohol veratryl, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , fármaco (50 mM), amortiguador de tartrato. 37 °C con agitación	Degradación de tetraciclina y oxitetraciclina >95 % en 5 min
Murugesan <i>et al</i> , 2010	Lacasa de <i>Ganoderma lucidum</i>	Triclosán	Sistema (1 mL): amortiguador citrato-fosfato (pH 4), Lac (5U) y triclosán (0.2 mM), mediador redox 30 °C	Degradación de 56.5% en 24 h
Ostadhadi <i>et al</i> , 2012	Lacasa de <i>Paraconiothyrium variabile</i>	Nitrazepam Alprazolam Diazepam Oxazepam	Sistema (5 mL): amortiguador de citratos (pH 5), fármaco (10µg mL <sup>-1</sup> ), Lac (20 U/mL), mediador, 35°C en agitación	Nitrazepam (73%), alprazolam(88.1%), diazepam (61.4%) y oxazepam (71.2%)
Sathishkumar <i>et al</i> , 2012	Lacasa	Diclofenaco	Sistema (1 mL): diclofenaco (50 ppm), amortiguador de acetatos (pH 4), enzima inmovilizada en nanofibras de PGLA y siringaldehido. 30°C en agitación	Transformaciones monitoreadas en HPLC, con la desaparición del pico original (22.7 min) y la aparición del pico del producto (19.2 min)
Suzuki <i>et al</i> , 2003	Manganeso peroxidasa de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	17β-estradiol y etinilestradiol	Sistema: 10 <sup>-5</sup> M de estradiol o etinilestradiol, amortiguador de malonato pH 4.5 para MnP y HBT para Lac, MnSO <sub>4</sub> , polisorbato 80, glucosa y glucosa oxidasa (solo para MnP) y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . 30°C en agitación 150 rpm	Reducción de la actividad estrogénica en un 80% después de 1 h, remoción total luego de 8 h

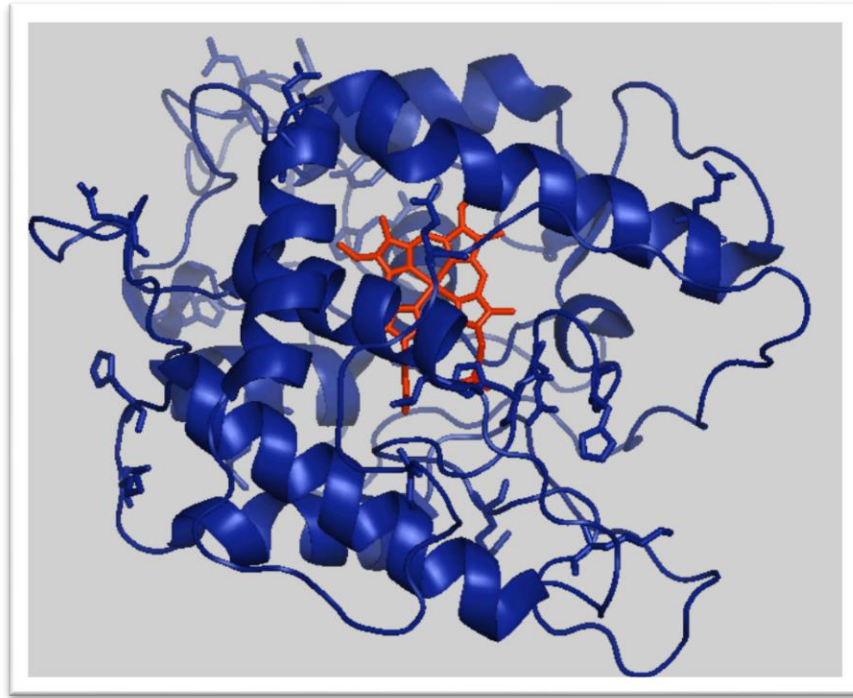
---

La degradación enzimática consiste en agregar enzimas con el fin de transformar las sustancias nocivas en otras más simples y menos nocivas. Una de las ventajas de las enzimas es que las reacciones mediadas por éstas poseen tasas de velocidad significativamente mayores que las reacciones en las cuales no se encuentran estos catalizadores. Las enzimas no son consumidas por las reacciones que ellas catalizan, por lo que a medida que ellas consumen los sustratos contaminantes pueden seguir actuando (Rao *et al*, 2010).

### **2.6.2 Enzima Cloroperoxidasa**

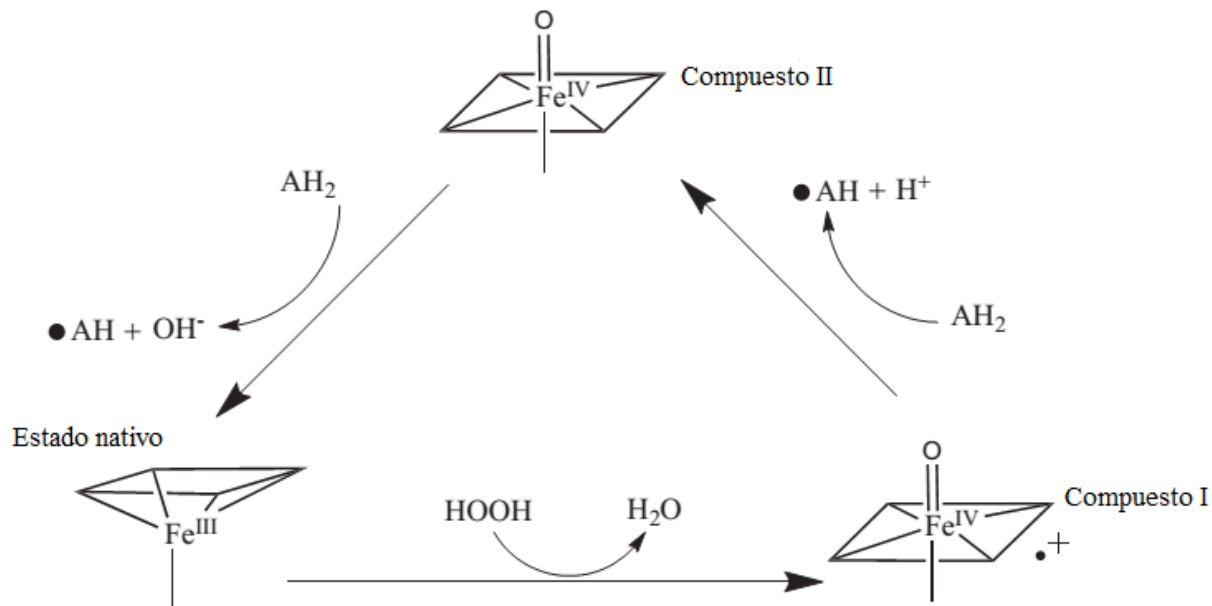
Las peroxidases que contienen un grupo hemo son llamadas hemoproteínas, utilizan peróxido de hidrógeno u otro peróxido orgánico como agente oxidante para catalizar la oxidación de un amplio rango de sustratos aromáticos (Torres *et al*, 2003).

Esta familia de enzimas es representada por la cloroperoxidasa del hongo filamentoso *Caldariomyces fumago*, con una masa molecular de 42 kDa. Esta enzima presenta tres actividades catalíticas: halogenasa, peroxidasa y peroxigenasa (transferencia de oxígeno). La actividad peroxidasa es la más importante desde un punto de vista de tratamiento ambiental (Conesa *et al*, 2001). Posee una estructura única dominada por ocho segmentos helicoidales e incluye un catión ( $Mg^{+2}$ ) estructural cerca del grupo hemo, el cual es el sitio activo en donde se lleva a cabo las reacciones catalíticas (Figura 1). Esta cloroperoxidasa ha sido descrita como una de las enzimas más versátiles de todas las hemoproteínas debido a su amplia variabilidad de sustratos aromáticos que oxida (Torres *et al*, 2010).



**Fig. 1: Estructura tridimensional de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. En color azul se muestra la estructura de aminoácidos mientras que en rojo el grupo hemo.**

Las hemoperoxidasas comparten un ciclo catalítico general que involucra dos intermediarios enzimáticos responsables de la oxidación del sustrato donador de electrones, los sustratos aromáticos en este caso. El mecanismo de reacción de las peroxidases puede describirse como se muestra en la Figura 2, donde el grupo hemo de la enzima primero reacciona con una molécula de peróxido de hidrógeno para producir el llamado compuesto I de las peroxidases. Este compuesto es un radical catiónico porfirina de oxohierro (IV) o radical catiónico proteína de oxohierro (IV), los cuales son dos equivalentes oxidantes por encima del estado férrico basal. Durante este paso en la reacción, el peróxido de hidrógeno es reducido. El compuesto I oxida el sustrato reducido ( $AH_2$ ) para liberar un radical del sustrato ( $AH\bullet$ ) y reducir a la enzima al llamado compuesto II de las peroxidases. Una segunda molécula de sustrato es entonces oxidado por el compuesto II, lo cual reduce el compuesto II al estado basal de la enzima, el estado férrico (Ortiz de Montellano, 2010).



**Fig. 2: Ciclo catalítico de las peroxidases (Ortiz de Montellano, 2010).**

Los radicales formados AH•, dos por cada mol de peróxido de hidrógeno, pueden reaccionar con el oxígeno disuelto en el agua para formar compuestos cetónicos, o pueden reaccionar entre ellos para producir compuestos de alto peso molecular como dímeros, trimeros o polímeros (Torres-Duarte *et al*, 2010). Mediante este mecanismo la cloroperoxidasa es capaz de oxidar moléculas como compuestos azufrado del petróleo, hidrocarburos policíclicos aromáticos, colorantes azo, fenoles, y plaguicidas organofosforados (Torres-Duarte *et al*, 2010).

---

## JUSTIFICACIÓN

La degradación de los compuestos farmacéuticos implica un importante desafío para los procesos de tratamiento de agua debido a las estructuras complejas que poseen y las bajas concentraciones en las que se encuentran presentes. Los tratamientos fisicoquímicos convencionales para este tipo de contaminantes como la ozonización y oxidación fotocatalítica presentan rendimientos variables de degradación, además de un elevado costo por el uso de equipos y lámparas, alto consumo de energía y resultan inconvenientes para tratar volúmenes grandes de agua.

Desde el punto de vista ambiental, el uso de enzimas en lugar de productos químicos o microorganismos, presenta algunas ventajas. Las transformaciones realizadas por las enzimas por lo general no generan productos secundarios como lodos. Las investigaciones han llevado al desarrollo de tecnologías de bajo costo, tratamientos ecológicos capaces de reducir e incluso eliminar la presencia de los contaminantes emergentes. Los métodos enzimáticos generalmente tienen bajo consumo de energía, son fáciles de controlar, puede operar en un amplio rango de condiciones y generan un mínimo impacto al ambiente. Las peroxidasas y lacasas tienen bajas especificidades por sus sustratos y pueden catalizar la oxidación de una amplia gama de compuestos orgánicos tóxicos como hidrocarburos policíclicos aromáticos, fenoles, plaguicidas organofosforados y colorantes azoicos (Torres *et al*, 2003) debido a las características hidrofóbicas y baja solubilidad acuosa de estos sustratos, las reacciones se realizan generalmente en presencia de disolventes orgánicos.

Debido a que muchos fármacos presentan estructuras aromáticas resultan candidatos idóneos para ser utilizados como sustratos en una reacción de oxidación catalizada por enzimas como la cloroperoxidasa obtenida a partir del hongo *Caldariomyces fumago*.

---

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Determinar la capacidad de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* para la oxidación biocatalítica de diversos fármacos en medio de reacción y en un efluente real de una planta de tratamiento de aguas residuales del estado de Puebla.

### **PARTICULARES**

1. Catalizar con la enzima la oxidación de fármacos de naturaleza aromática, tales como antibióticos, antiinflamatorios y analgésicos.
2. Determinar las constantes cinéticas para la enzima en la reacción de oxidación de los fármacos reconocidos como sustratos.
3. Identificar los productos que se generan durante las reacciones de oxidación biocatalítica mediante la técnica de espectrometría de masas.
4. Aplicar la metodología en un efluente real proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales del Estado de Puebla.

---

---

## **HIPOTÉISIS**

Debido a la capacidad reportada de la cloroperoxidasa para catalizar la degradación de compuestos de naturaleza aromática como es el caso de muchos contaminantes emergentes, es posible que catalice la oxidación de fármacos que posean dicha estructura.

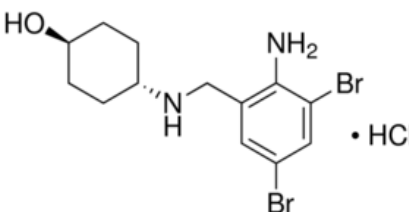
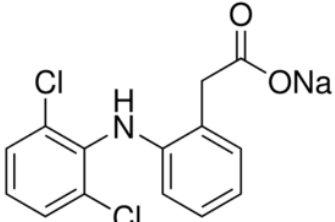
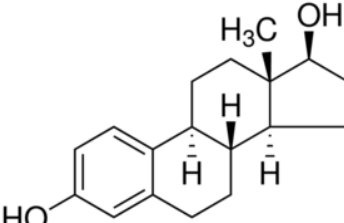
### III. METODOLOGÍA

#### 3.1 Reactivos

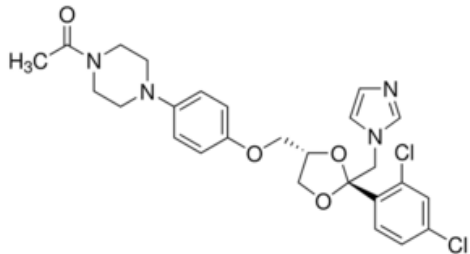
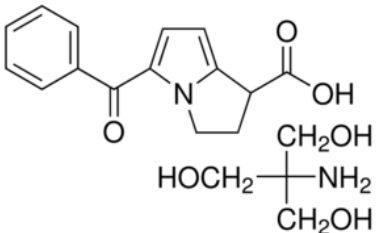
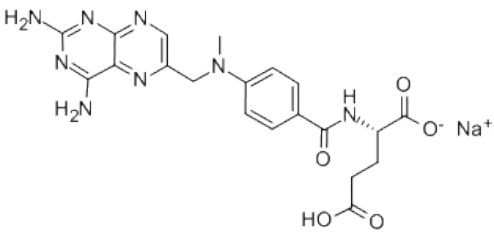
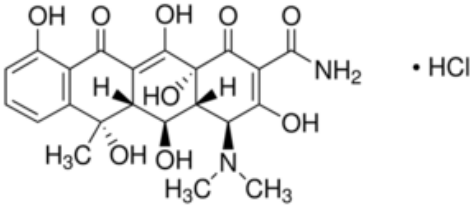
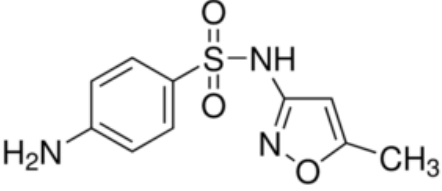
##### 3.1.1 Fármacos seleccionados

Se seleccionó una serie de fármacos con estructuras aromáticas (Tabla 6), considerando ejemplos representativos de los grupos de compuestos más consumidos y sus efectos en el ambiente.

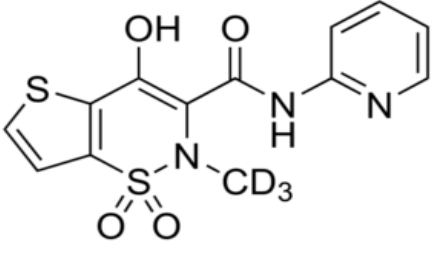
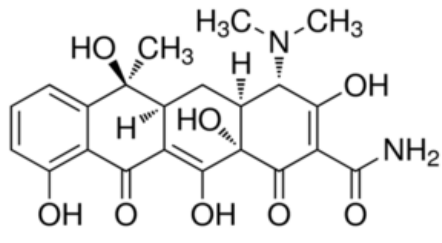
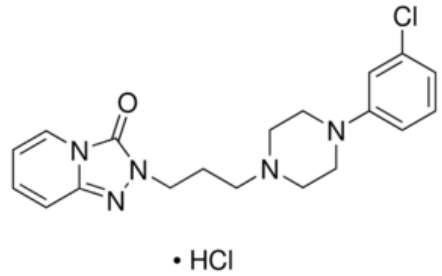
**Tabla 6: Fármacos seleccionados para los ensayos de oxidación enzimática con la cloroperoxidasa**

Compuesto	Grupo	Estructura	Descripción
<b>Ambroxol</b> (Clorhidrato de ambroxol)	Mucolítico	 <chem>OC1CCCCC1NCC2=CC=C(N)C(Br)=C2.Br</chem> • HCl	P.M.= 414.56 Da Fármaco comercial 30 mg/tableta Bioresearch de México
<b>Diclofenaco</b> (Diclofenaco sódico)	Antiinflamatorio no esteroideo	 <chem>Clc1ccc(Cl)c1Nc2ccccc2CC(=O)O[Na]</chem>	P.M.= 318.10 Da Reactivo analítico Sigma-Aldrich
<b>Estradiol</b>	Hormona esteroidea (Disruptor endocrino)	 <chem>CC12CCC3=C1C=CC(=C3)O[C@H]2O</chem>	P.M.= 272.38 Da pureza ≥ 98% Reactivo analítico Sigma-Aldrich

**Tabla 6: Fármacos seleccionados para los ensayos de oxidación enzimática con la cloroperoxidasa...continuación**

Compuesto	Grupo	Estructura	Descripción
<b>Ketoconazol</b>	Antimicótico		P.M.= 531.43 Da Reactivo analítico pureza≥98% HPLC Sigma-Aldrich
<b>Ketorolaco</b> (Ketorolaco sal tris)	Antiinflamatorio no esteroideo		P.M.= 376.40 Da Reactivo analítico pureza≥99% cristalino Sigma-Aldrich
<b>Metotrexato</b> (Metotrexato sódico)	Antineoplásico/ antirreumático		P.M.= 454.45 Da Fármaco comercial 2.5 mg/tableta PiSA
<b>Oxitetraciclina</b> (Clorhidrato de oxitetraciclina)	Antibiótico		P.M.=496.89 Da Reactivo analítico pureza≥95% HPLC Sigma-Aldrich
<b>Sulfametoxazol</b>	Antibiótico		P.M.=253.28 Da Reactivo analítico Sigma-Aldrich

**Tabla 6: Fármacos seleccionados para los ensayos de oxidación enzimática con la cloroperoxidasa...continuación**

Compuesto	Grupo	Estructura	Descripción
<b>Tenoxicam</b>	Antiinflamatorio No esteroideo		P.M.=337.37 Da Reactivo analítico Sigma-Aldrich
<b>Tetraciclina</b>	Antibiótico		P.M.=444.43 Da Reactivo analítico pureza≥98% NT Sigma-Aldrich
<b>Trazodona</b> (Clorhidrato de trazodona)	Antidepresivo	 • HCl	P.M.=408.32 Da Reactivo analítico pureza≥99% HPLC Sigma-Aldrich

### 3.1.2 Enzima Cloroperoxidasa

La enzima utilizada fue la Cloroperoxidasa extraída del hongo marino *Caldariomyces fumago*, la cual fue adquirida de la empresa Altaenzymes de Alberta, Canadá, con una pureza reflejada en un valor de Rz 1.4 (el más alto grado de pureza del mercado), peso molecular de 42 kDa y una actividad catalítica estándar de 22000 min<sup>-1</sup> utilizando como sustrato estándar a la monoclorodimedona.

---

La solución madre de la enzima se preparó con una concentración 23  $\mu\text{M}$ , de la cual se hicieron diluciones en amortiguador de acetatos pH 3 para emplear en la reacción, según el fármaco utilizado como sustrato.

### 3.1.3 Sales y disolventes

- ❖ Metanol marca J.T. Baker pureza  $\geq 99.8\%$ .
- ❖ Isopropanol marca Karal pureza  $\geq 99.5\%$  mín. grado HPLC.
- ❖ Etanol absoluto marca J.T. Baker pureza  $\geq 99\%$ .
- ❖ Solución de hidróxido de sodio 0.1 M.
- ❖ Acetonitrilo marca Fermont pureza  $\geq 99.9\%$  mín. grado HPLC.
- ❖ Acetato de etilo Marca J.T. Baker pureza  $\geq 99.6\%$ .
- ❖ Sulfato de sodio marca Karal pureza  $\geq 99\%$ .

### 3.1.4 Medio de reacción

- ❖ Amortiguador de acetatos 60 mM pH 3, formado por acetato de sodio y ácido acético disueltos en agua tridestilada.
- ❖ Solución de cloruro de potasio (KCl) 20 mM pH 3, formado por cloruro de potasio disuelto en amortiguador de acetatos pH 3.
- ❖ Solución de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) de 0.1 a 1.0 mM.

### 3.2 Equipos

- ❖ Espectrofotómetro UV-Visible marca Varian, modelo Cary 50 con software CaryWinuv.
- ❖ Espectrofotómetro de fluorescencia marca Varian, modelo Cary Eclipse con software Cary Eclipse.
- ❖ Equipo HPLC marca PERKIN ELMER Serie 200, equipado con una bomba serie 200, un detector UV-Visible modelo 785 A y un sistema de interfase Network Chromatography modelo NC1900, opera con una columna marca GRACE

- 
- ALLTIMA, fase estacionaria C18, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$  y dimensiones 150x3 mm.
- ❖ Controlador de temperatura tipo Single Cell Peltier marca VARIAN, modelo Cary.
  - ❖ Baño recirculador con enfriamiento y calentamiento marca SEV-Prendo, modelo FC 10.
  - ❖ Baño recirculador marca WITEG, modelo WiseCircu WCB-22.
  - ❖ Minirreactor cilíndrico enchaquetado marca SEV de 50 mL.
  - ❖ Parrilla de calentamiento y agitación marca THERMO SCIENTIFIC, modelo SP131325.
  - ❖ Evaporador rotativo al vacío minirrotavapor marca SEV-Prendo, modelo MR-1750.
  - ❖ Fotómetro multiparamétrico para DQO marca HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 830999.
  - ❖ Reactor para DQO marca HANNA INSTRUMENTS HI 839800.
  - ❖ Medidor manométrico para  $\text{DBO}_5$  marca WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, modelo OxiTop® IS 12.
  - ❖ Espectrofotómetro marca HACH, modelo DR/2500.
  - ❖ Fotómetro marca MERCK, modelo SQ 118.
  - ❖ Medidor portátil de pH/SDT/temperatura marca CONDUCTRONIC, modelo PD16.
  - ❖ Medidor de pH/mV/conductividad/resistividad/temperatura marca CONDUCTRONIC, modelo PC45.
  - ❖ Medidor de pH/mV/temperatura marca OAKTON, modelo pH 700.
  - ❖ Cromatógrafo de gases modelo GC-system 7890B acoplado a espectrómetro de masas modelo MSD MS-5977, marca Agilent Technologies.
  - ❖ Cromatógrafo de gases modelo GC-system 6890 acoplado a espectrómetro de masas modelo MSD MS-5973, marca Agilent Technologies.

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Preparación de soluciones madre de los fármacos

Para cada fármaco se prepararon 4 mL de solución madre, en el disolvente más adecuado para cada compuesto, con una concentración de 20 mM para los reactivos de grado analítico y de concentración determinada experimentalmente para los fármacos comerciales. Posteriormente cada una de las soluciones se volvió a diluir en isopropanol hasta llegar a la concentración más adecuada para las reacciones posteriores, como se indica en la Tabla 7.

**Tabla 7: Disolventes y concentraciones para las soluciones madre de los fármacos**

Compuesto	Disolvente	Concentración de la solución madre	Concentración empleada en la reacción
Ambroxol	Etanol	3.6 mM	36 $\mu$ M
Diclofenaco	Metanol	20 mM	200 $\mu$ M
Estradiol	Isopropanol	20 mM	8 $\mu$ M
Ketoconazol	Isopropanol	20 mM	20 $\mu$ M
Ketorolaco	Isopropanol	20 mM	20 $\mu$ M
Metotrexato	Solución NaOH 0.1 M	7.5 mM	75 $\mu$ M
Oxitetraciclina	Etanol	20 mM	100 $\mu$ M
Sulfametoxazol	Isopropanol	20 mM	8 $\mu$ M
Tenoxicam	Isopropanol	20 mM	4 $\mu$ M
Tetraciclina	Agua	20 mM	100 $\mu$ M
Trazodona	Isopropanol	20 mM	10 $\mu$ M

### 3.3.2 Determinación de la capacidad biocatalítica de la enzima para oxidación (Análisis cualitativo)

Para comprobar la capacidad de la enzima para catalizar se llevaron a cabo las reacciones de oxidación en una celda de 1 mL, conteniendo el amortiguador de acetatos pH 3 (60 mM), la concentración del fármaco mencionada en la Tabla 7, 20 mM de KCl, 1.0 mM de peróxido de hidrógeno y la concentración de enzima, según se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8: Concentraciones de CPO usadas para la oxidación de cada fármaco**

Compuesto	Concentración solución madre de CPO ( $\mu\text{M}$ )	Concentración en el medio de reacción de CPO (nM)
Ambroxol	2.3	11.5
Diclofenaco	2.3	11.5
Estradiol	0.23	1.53
Ketoconazol	0.23	1.15
Ketorolaco	2.3	11.5
Metotrexato	1.15	5.75
Oxitetraciclina	2.3	11.5
Sulfametoxazol	0.23	0.76
Tenoxicam	2.3	46.0
Tetraciclina	2.3	11.5
Trazodona	2.3	7.67

Las diferentes concentraciones para cada fármaco fueron seleccionadas según el método instrumental más adecuado para monitorear la reacción, abajo descrito, dependiendo de la solubilidad, señal de detección y velocidad de reacción para cada compuesto. Cada una de las pruebas se realizó por triplicado para comprobar la reproducibilidad de los datos.

---

### 3.3.3 Curva de calibración

Los datos experimentales obtenidos se convirtieron a valores de concentración utilizando una curva de calibración para cada fármaco. Se construyeron gráficas con los datos de absorbancia, intensidad o área, según la técnica correspondiente contra la concentración. Estos datos se ajustaron utilizando regresión por mínimos cuadrados con intercepción en cero. La pendiente de la recta representa el factor de conversión entre la señal experimental (absorbancia, intensidad o área) y la concentración.

### 3.3.4 Determinación de constantes cinéticas (Análisis cuantitativo)

Para obtener las constantes cinéticas se determinó la velocidad de reacción al variar la concentración de peróxido de hidrógeno de 0.1 a 1.0 mM en el sistema de reacción antes mencionado, donde se observaron los cambios de absorbancia, intensidad o área con respecto al tiempo. La temperatura se mantuvo a 25°C durante la reacción. Se utilizó el modelo de Michaelis-Menten, presentado en la Ecuación 1, para ajustar los datos utilizando el software Origin 8.0 y obtener los valores de las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_M$ .

$$V_0 = \frac{V_{max} * [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ecuación 1}$$

La ecuación de Michaelis-Menten describe como varía la velocidad de reacción con la concentración de sustrato, donde  $V_0$  es la velocidad inicial de la reacción,  $V_{max}$  es la velocidad máxima,  $K_M$  es la constante de Michaelis-Menten y  $[S]$  es la concentración de sustrato.

### 3.3.5 Métodos instrumentales

Los métodos instrumentales que se presentan a continuación fueron seleccionados con base en la disponibilidad y el nivel de sensibilidad requerido para cada una de las

---

pruebas realizadas, siendo de las técnicas más comunes empleadas en los ensayos con enzimas.

**a) Espectrofotometría UV-Visible**

El monitoreo de la oxidación de los fármacos se realizó en el espectrofotómetro UV-Visible Varian Cary 50 mostrado en la Figura 3. Se evaluaron los controles conformados por el fármaco y el medio de reacción en ausencia de la enzima en una celda de 1 mL; una vez agregada la CPO se da inicio a la reacción, para cuya cuantificación se monitorean los cambios de absorbancia durante 2 minutos como una medida de la velocidad de reacción.

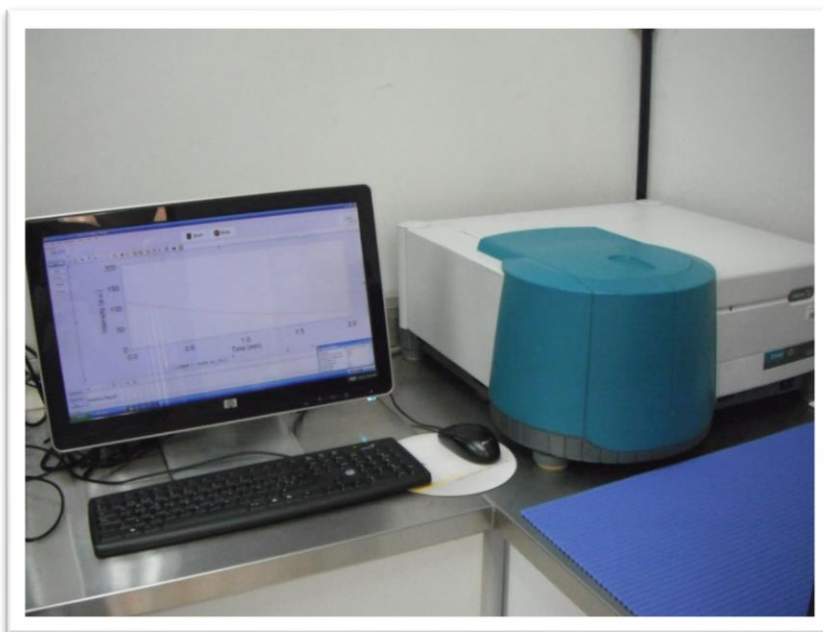
Para mantener controlada la temperatura a 25°C se utilizó un equipo Single Cell Peltier Varian.



**Fig. 3: Equipo Varian Cary 50 utilizado para espectrofotometría UV-Visible.**

## b) Espectrofotometría de Fluorescencia

Las mediciones fueron realizadas en el espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse, como se muestra en la Figura 4. De igual manera se evaluaron controles conformados por el fármaco y el medio de reacción en ausencia de la enzima en una celda de 3 mL al iniciar la reacción agregando la CPO, se registraron los cambios de intensidad ocurridos durante los primeros 5 min en un análisis cualitativo; y se cuantificaron por regresión lineal los cambios de intensidad con respecto al tiempo como medida de la velocidad de reacción durante 2 min.



**Fig. 4: Equipo Varian Cary Eclipse para espectrofotometría de fluorescencia.**

## c) Cromatografía líquida de alta resolución

Observando los cambios en los picos cromatográficos representativos de cada fármaco, sus tiempos de retención y aparición de nuevos picos, se comprobó mediante este método la oxidación del sustrato catalizada por la enzima. La reacción se llevó a cabo en un vial de 1 mL, para después inyectar 20  $\mu$ L de muestra en el equipo (Figura 5). Primero se analizaron los controles, conformados únicamente por el medio de reacción y

---

el fármaco, una vez agregada la enzima se inyectó y tomó la lectura al minuto de reacción. A las muestras tanto de los controles como de las reacciones se les agregó 1 mL de acetonitrilo para detener la reacción. La velocidad de reacción se calcula como el cambio de concentración, en este caso representada por el cambio de área por unidad de tiempo.



**Fig. 5: Equipo Perkin-Elmer para cromatografía líquida de alta resolución.**

Las condiciones en las cuales se analizaron los compuestos en el equipo para HPLC Perkin-Elmer, utilizando la longitud de onda más adecuada para su detección, se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9: Condiciones para analizar los fármacos utilizando HPLC**

Compuesto	$\lambda$ (nm)	Velocidad de flujo (mLmin <sup>-1</sup> )	Fases móviles utilizadas
Ambroxol	245	0.3	50% ACN* 50% H <sub>2</sub> O
Diclofenaco	280	0.5	50% ACN* 50% H <sub>2</sub> O
Estradiol	225	0.5	60% ACN* 40% H <sub>2</sub> O
Ketoconazol	240	0.8	80% ACN* 20% H <sub>2</sub> O
Ketorolaco	315	0.5	50% ACN* 50% H <sub>2</sub> O
Metotrexato	302	0.3	50% ACN* 50% H <sub>2</sub> O
Oxitetraciclina	354	0.5	50% ACN* 50% H <sub>2</sub> O
Sulfametoxazol	270	0.5	50% ACN* 50% H <sub>2</sub> O
Tenoxicam	ND*	ND*	ND*
Tetraciclina	357	0.5	50% ACN* 50% H <sub>2</sub> O
Trazodona	280	0.35	50% ACN* 50% H <sub>2</sub> O

\*ND=No determinado, \*ACN=Acetonitrilo

### 3.3.6 Identificación de productos

Para la identificación de productos se llevó a cabo la reacción en un volumen de 50 mL, utilizando las mismas concentraciones que el sistema a pequeña escala con volúmenes proporcionales de cada componente, empleando para ello un reactor conectado a un baño recirculador para mantener la temperatura a 25 °C sobre una parrilla de agitación (Figura 6-a). Una vez completada la reacción, la extracción de los productos se realizó en un embudo de separación, agregando 50 mL de acetato de etilo junto con la mezcla de reacción, agitando vigorosamente, separando la fase orgánica a través de sulfato de sodio para eliminar residuos de agua. Este procedimiento fue repetido 3 veces para asegurar que se extrajera todo el producto formado (Figura 6-b).

Luego de ser recuperada la fase de acetato de etilo esta se evaporó empleando un mini rotavapor a 77.1 °C (punto de ebullición del acetato de etilo) (Figura 6-c). Antes de evaporarse completamente, el resto se termina usando una corriente de nitrógeno gaseoso. El producto seco que queda en el matraz es redissuelto en isopropanol para su posterior análisis por CG-EM. Este estudio fue realizado para la mayoría de los fármacos en el Centro del Agua Para América Latina y el Caribe, perteneciente al Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, campus Monterrey, Nuevo León y para el caso del estradiol en el Instituto de Biotecnología, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México en Cuernavaca, Morelos.



**Fig. 6: Método para la extracción de productos de la oxidación de fármacos catalizada con cloroperoxidasa: a) reacción en 50 mL, b) extracción con acetato de etilo, c) evaporación del disolvente.**

### 3.3.7 Capacidad oxidativa de la enzima usando como medio de reacción un efluente real de una planta de tratamiento

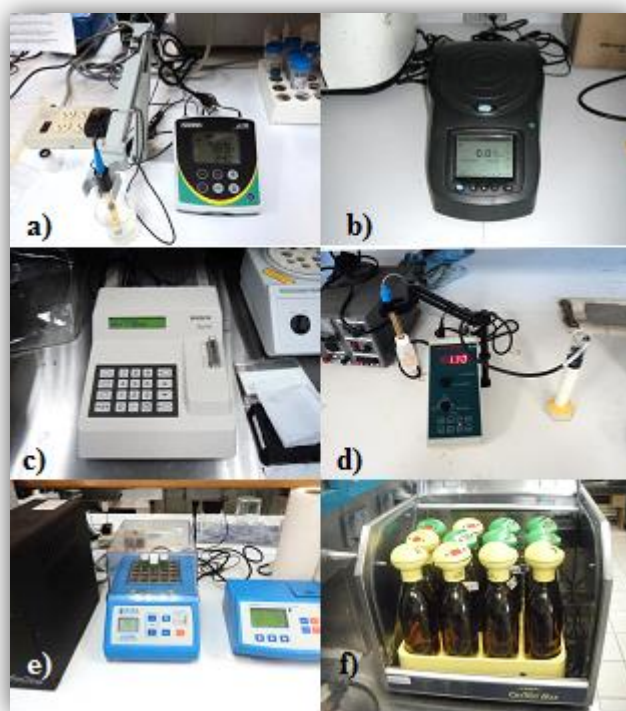
Este análisis se realizó con una muestra de agua residual proveniente de la planta de tratamiento del municipio de Izúcar de Matamoros, Puebla, con el objetivo de evaluar la capacidad de la enzima para catalizar la oxidación en un medio diferente al amortiguador de acetatos utilizado en ensayos anteriores. La muestra fue tomada justo después del tratamiento secundario en la planta y antes de la cloración.

La reacción con agua residual se realizó hasta colectar un volumen total de 500 mL, necesario para todas las pruebas, manteniendo la temperatura constante de 25°C, antes y después de la reacción fueron medidos los parámetros fisicoquímicos mostrados en la Tabla 10, según el método indicado.

**Tabla 10: Métodos y equipos empleados para la medición de parámetros del agua residual**

Parámetro	Método	Equipo (Figura 7)
pH	NMX-AA-008-SCFI-2011	a) OAKTON, modelo pH 700
Color	Especificado en el equipo	b) HACH, modelo DR/2500
Turbiedad	Especificado en el equipo	c) MERCK, modelo SQ 118
Conductividad	Especificado en el equipo	d) CONDUCTRONIC, modelo PC45
Sólidos totales	NMX-AA-034-SCFI-2001	
Sólidos suspendidos totales	NMX-AA-034-SCFI-2001	
Sólidos disueltos totales	NMX-AA-034-SCFI-2001	
Demanda química de oxígeno	Especificado en el equipo	e) HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 830999 y HI 839800
Demanda bioquímica de oxígeno	Especificado en el equipo	f) WTW, modelo OxiTop® IS 12

El pH fue inicialmente ajustado a 3, añadiendo solución de ácido clorhídrico al 30%. Mediante espectrofotometría UV y espectrofotometría de fluorescencia se observaron los cambio de absorbancia e intensidad respectivamente una vez añadiendo solución 11.50 nM de enzima al medio de reacción conformado por 89% de agua residual, solución 20 mM de KCl y solución 1.0 mM de peróxido de hidrógeno. Posteriormente el efluente fue dopado con solución aproximadamente 60  $\mu$ M de ketoconazol para confirmar la capacidad de la enzima de llevar a cabo la oxidación de un fármaco en la matriz real. Para la prueba de DBO<sub>5</sub> el pH fue ajustado a 5 (mínimo requerido especificado en el equipo) y para la prueba de DQO de la muestra luego de la reacción durante 1 h, se hizo una dilución al 50% para disminuir la interferencia por cloruros causada por la adición de KCl.



**Fig. 7: Equipos utilizados para la medición de parámetros fisicoquímicos en el agua residual: a) pH, b) color, c) turbiedad, d) conductividad e) demanda química de oxígeno y f) Demanda bioquímica de oxígeno.**

---

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Monitoreo de las reacciones

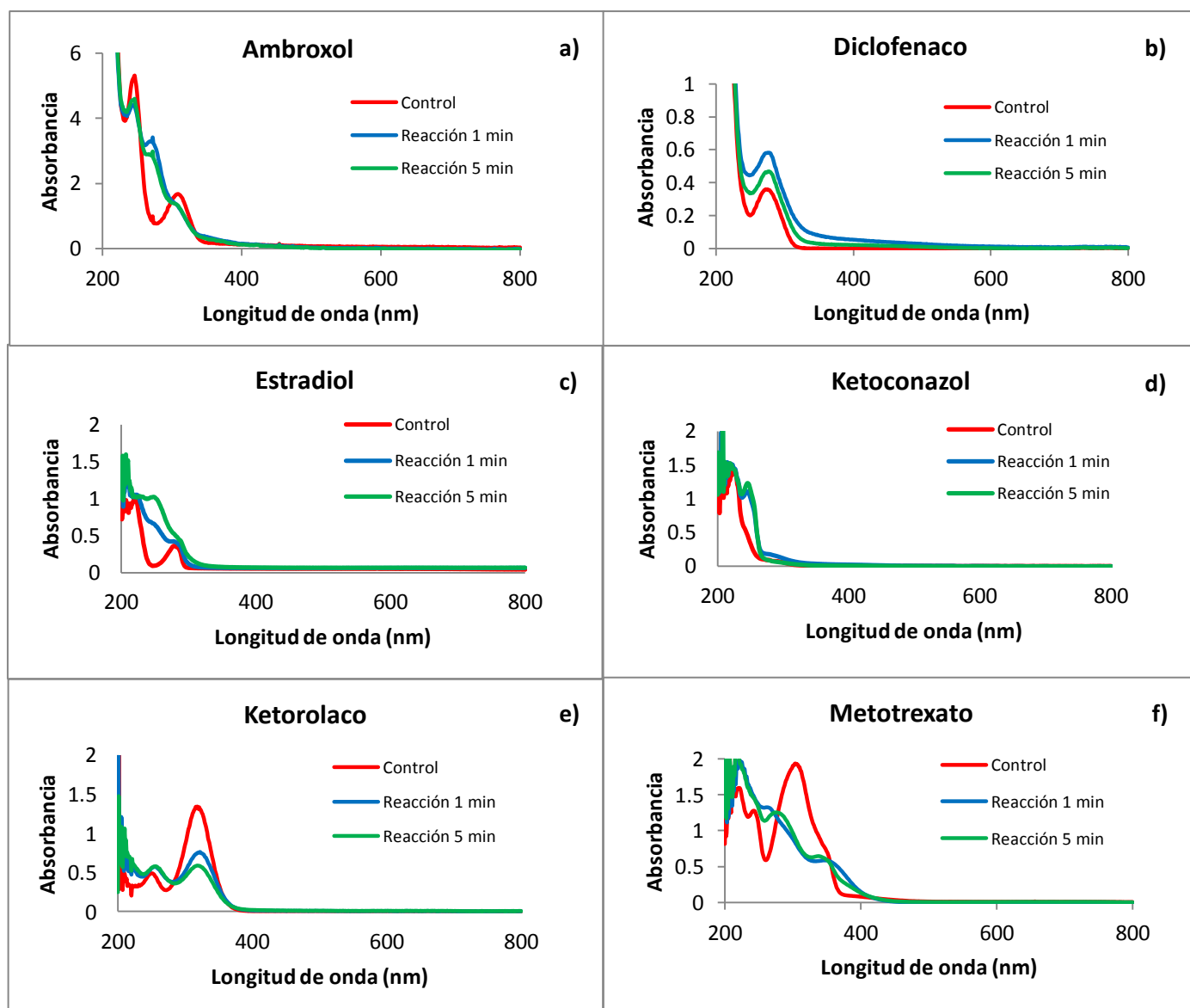
#### 4.1.1 Espectrofotometría UV-Visible

Se obtuvieron los espectros electrónicos de absorción de cada fármaco, con los cuales se determinaron las longitudes de onda de máxima absorbancia para cada uno, mostradas en la Tabla 11, cuyos valores de 225 a 375 nm, se encuentran dentro del rango de longitudes de onda de 150 a 400 nm, donde comúnmente los compuestos aromáticos absorben luz en la región ultravioleta (Arenas *et al*, 2004).

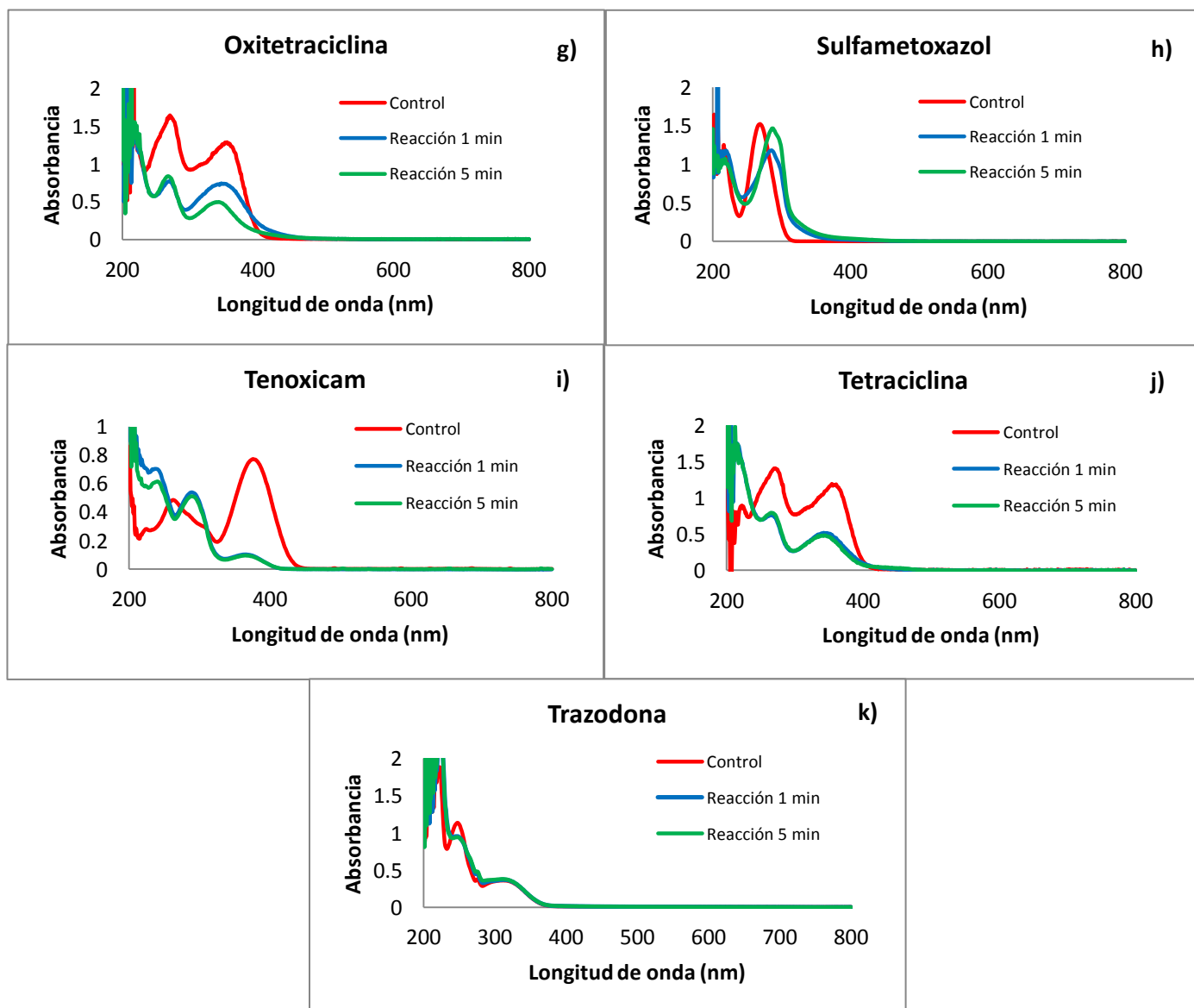
**Tabla 11: Longitud de onda máxima de los fármacos analizados**

Compuesto	$\lambda$ (nm)
Ambroxol	308
Diclofenaco	280
Estradiol	225
Ketoconazol	295
Ketorolaco	315
Metotrexato	302
Oxitetraciclina	354
Sulfametoxazol	270
Tenoxicam	375
Tetraciclina	357
Trazodona	310

De manera cualitativa se determinaron los cambios de absorbancia del espectro de absorción para todos los fármacos en el rango de 200 a 800 nm, tanto de la muestra correspondiente al control como de la reacción ocurrida durante los primeros 5 min, donde se observó un decremento para algunos compuestos en la absorbancia tal y como se muestra en la Figura 8.



**Fig. 8: Espectros de absorción en las regiones UV-Vis antes (control) y después de 1 y 5 minutos de reacción para: a) ambroxol, b) diclofenaco, c) estradiol, d) ketoconazol, e) ketorolaco y f) metotrexato.**



**Fig. 8: Espectros de absorción en las regiones UV-Vis antes (control) y después de 1 y 5 minutos de reacción...continuación para: g) oxitetraciclina, h) sulfametoxazol, i) tenoxicam, j) tetraciclina y k) trazodona.**

Es posible observar estos cambios debido a que el sustrato y el producto absorben energía a diferentes longitudes de onda, determinada por la estructura de la molécula y la concentración, conforme avanza la reacción, la absorbancia puede cambiar por el pH, la polaridad del solvente o moléculas vecinas y la orientación de las mismas (Arenas *et al*, 2004).

---

Para la gran mayoría de los fármacos mostrados anteriormente, analizados por espectrofotometría UV-Visible se detectaron cambios de absorbancia mayores a 0.2, pero en los casos del sulfametoxazol, donde la absorbancia primero disminuye y a los 5 minutos se vuelve a incrementar y del estradiol, ketoconazol, trazodona, donde los cambios apenas son perceptibles, posiblemente porque los sustratos o productos no absorben luz, se procedió a su análisis por fluorescencia, debido a la mayor sensibilidad que ofrece esta técnica (Bisswanger, 2004).

#### **4.1.2 Espectrofotometría de fluorescencia**

El resultado del análisis por espectrofotometría de fluorescencia demostró 4 de los 11 fármacos seleccionados no emiten luz al ser excitados (Tabla 12).

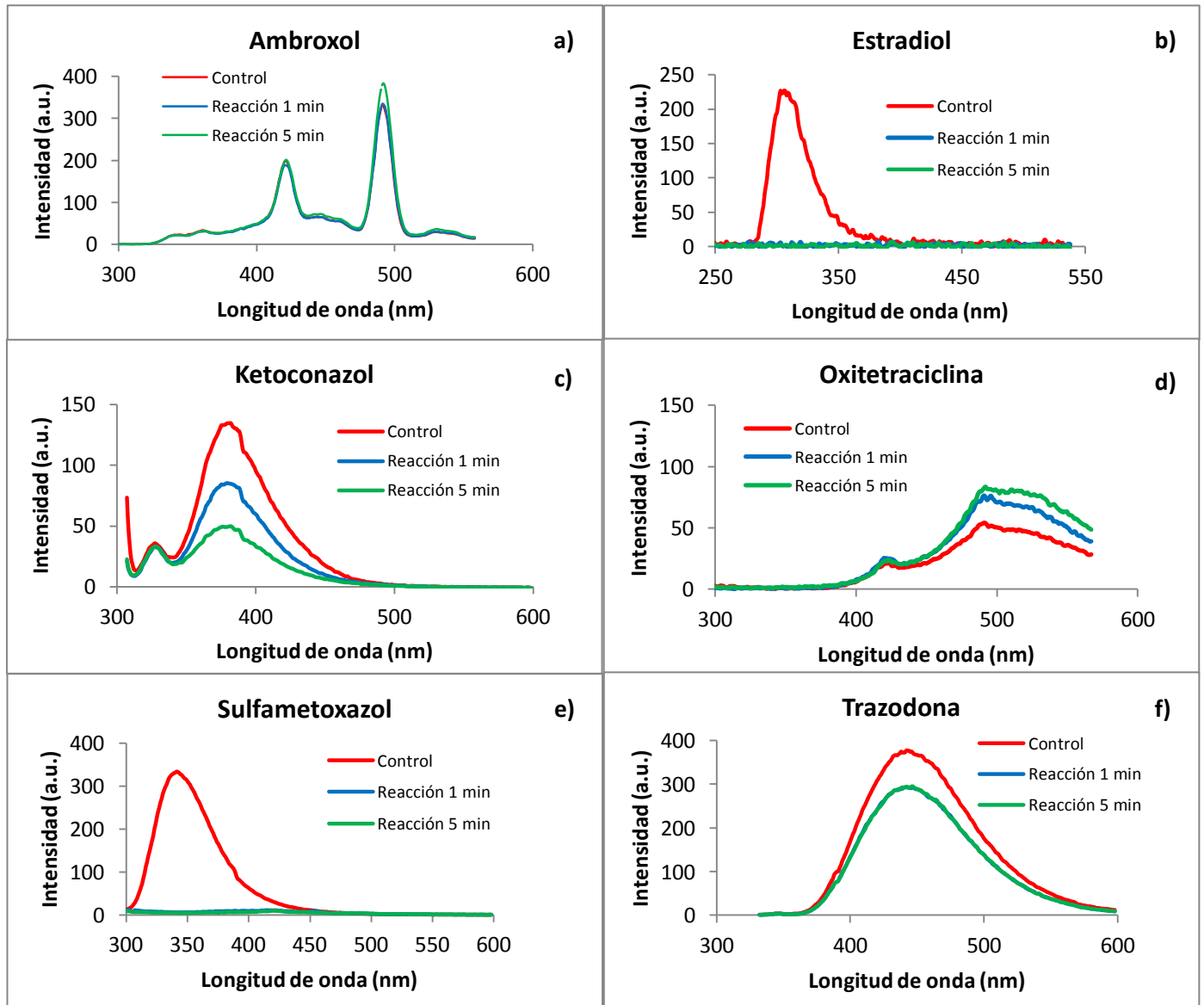
La diferencia entre los compuestos que fluorescen y los que no está determinada por lo que pasa cuando las moléculas pasan del estado excitado al basal, mientras los compuestos que no fluorescen liberan la energía en forma de calor, los compuestos que sí fluorescen emiten parte de la energía como luz (John, 2002). Esta propiedad solo se presenta en unos cuantos compuestos con sustituyentes aromáticos, aunque al ocurrir la reacción el estado excitado es desactivado por los procesos simultáneos, entonces los compuestos ya no fluorescen (Bisswanger, 2004).

**Tabla 12: Longitudes de onda de excitación y emisión para los fármacos seleccionados**

<b>Compuesto</b>	<b><math>\lambda</math> (nm) Excitación</b>	<b><math>\lambda</math> (nm) Emisión</b>
<b>Ambroxol</b>	245	491
<b>Diclofenaco</b>	280	NF*
<b>Estradiol</b>	225	307
<b>Ketoconazol</b>	295	381
<b>Ketorolaco</b>	315	NF*
<b>Metotrexato</b>	302	NF*
<b>Oxitetraciclina</b>	254	494
<b>Sulfametoxazol</b>	270	342
<b>Tenoxicam</b>	345	422
<b>Tetraciclina</b>	357	NF*
<b>Trazodona</b>	310	443

\*NF=No fluoresce

Además, de manera cualitativa, para comprobar la oxidación, se realizó un análisis con este método, efectuando la lectura de la intensidad de los fármacos mostrados en la Figura 9, correspondiente al control y a la reacción ocurrida durante los primeros 5 min, para el caso del estradiol, ketoconazol, sulfametoxazol y trazodona se observa como disminuye la intensidad notablemente, por el contrario para el ambroxol y la oxitetraciclina apenas es perceptible.



**Fig. 9:** Espectro de fluorescencia antes (control) y después de 1 y 5 minutos de reacción para: a) ambroxol, b) estradiol, c) ketoconazol, d) oxitetraciclina, e) sulfametoxazol y f) trazodona.

### 4.1.3 Cromatografía líquida de alta resolución

De acuerdo con el procedimiento y condiciones descritos en la sección 3.3.5 se determinó el tiempo de retención para cada uno de los fármacos (Tabla 13).

**Tabla 13: Tiempos de retención para los fármacos analizados por HPLC**

Compuesto	Tiempo de retención(min)
Ambroxol	3.672
Diclofenaco	4.567
Estradiol	3.570
Ketoconazol	3.806
Ketorolaco	2.169
Metotrexato	2.561
Oxitetraciclina	2.580
Sulfametoxazol	4.788
Tenoxicam	ND*
Tetraciclina	2.568
Trazodona	2.843

\*ND=No detectado

En la Tabla 14 se muestran las áreas de los picos antes y después de la reacción durante 1 min para el diclofenaco. Fue el único fármaco cuya cinética fue monitoreada en HPLC debido a que en el espectro electrónico de absorción no presentó cambios para su cuantificación, y al no presentar fluorescencia tampoco pudo ser analizado mediante esta técnica.

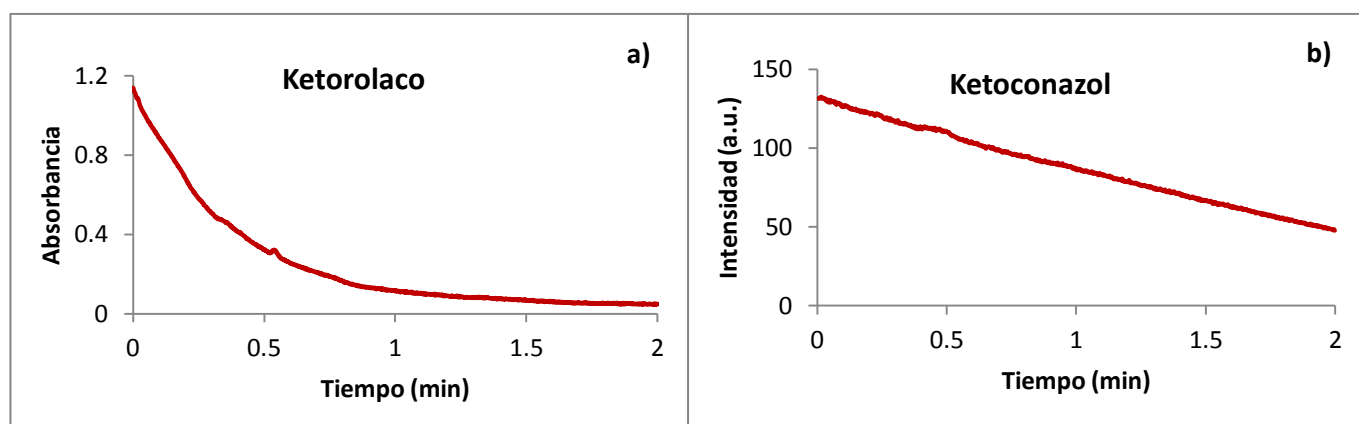
**Tabla 14: Análisis por HPLC de los cambios de área para el diclofenaco**

Compuesto	$\lambda$ (nm)	Área de control ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Tiempo de retención control (min)	Áreas de reacción ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )	Tiempo de retención reacción (min)	$\Delta$ Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )
Diclofenaco	280	4,512,906	4.56	2,632,156	4.54	1,880,750

Con base en los resultados mostrados en esta sección, se observó que la enzima cloroperoxidasa es capaz de catalizar la oxidación de todos los fármacos seleccionados, por lo que a continuación se cuantificó la velocidad de reacción para cada uno de ellos.

#### 4.2 Determinación de constantes cinéticas

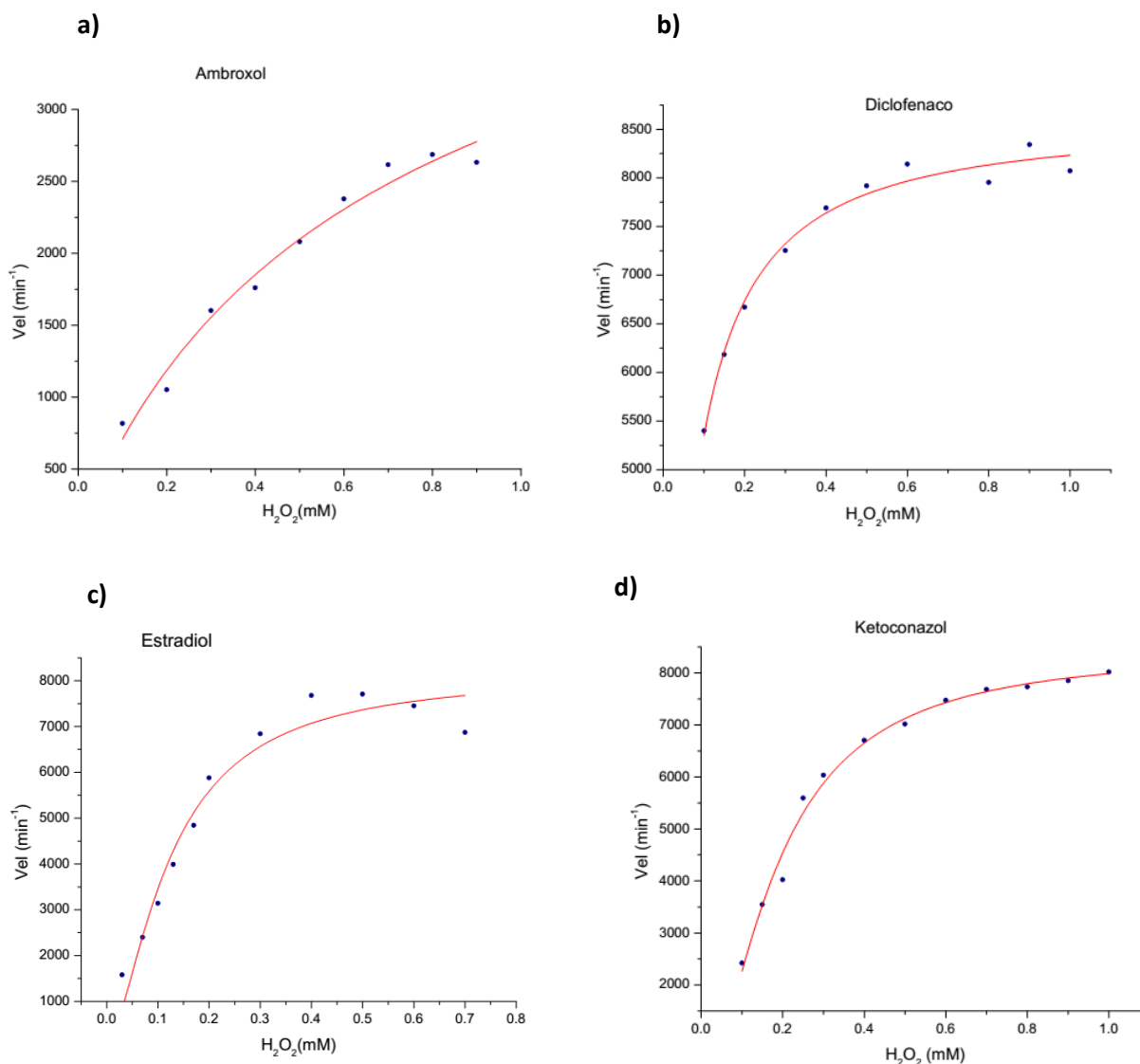
La Figura 10 ilustra dos ejemplos de cómo se determina la velocidad de oxidación de los fármacos mediante los cambios de absorbancia con respecto al tiempo; esta reacción se realiza para diferentes concentraciones del oxidante. El cálculo de la velocidad de reacción se determina durante los primeros segundos de la misma, para evitar que el producto generado interfiera con la enzima, causando su inhibición.



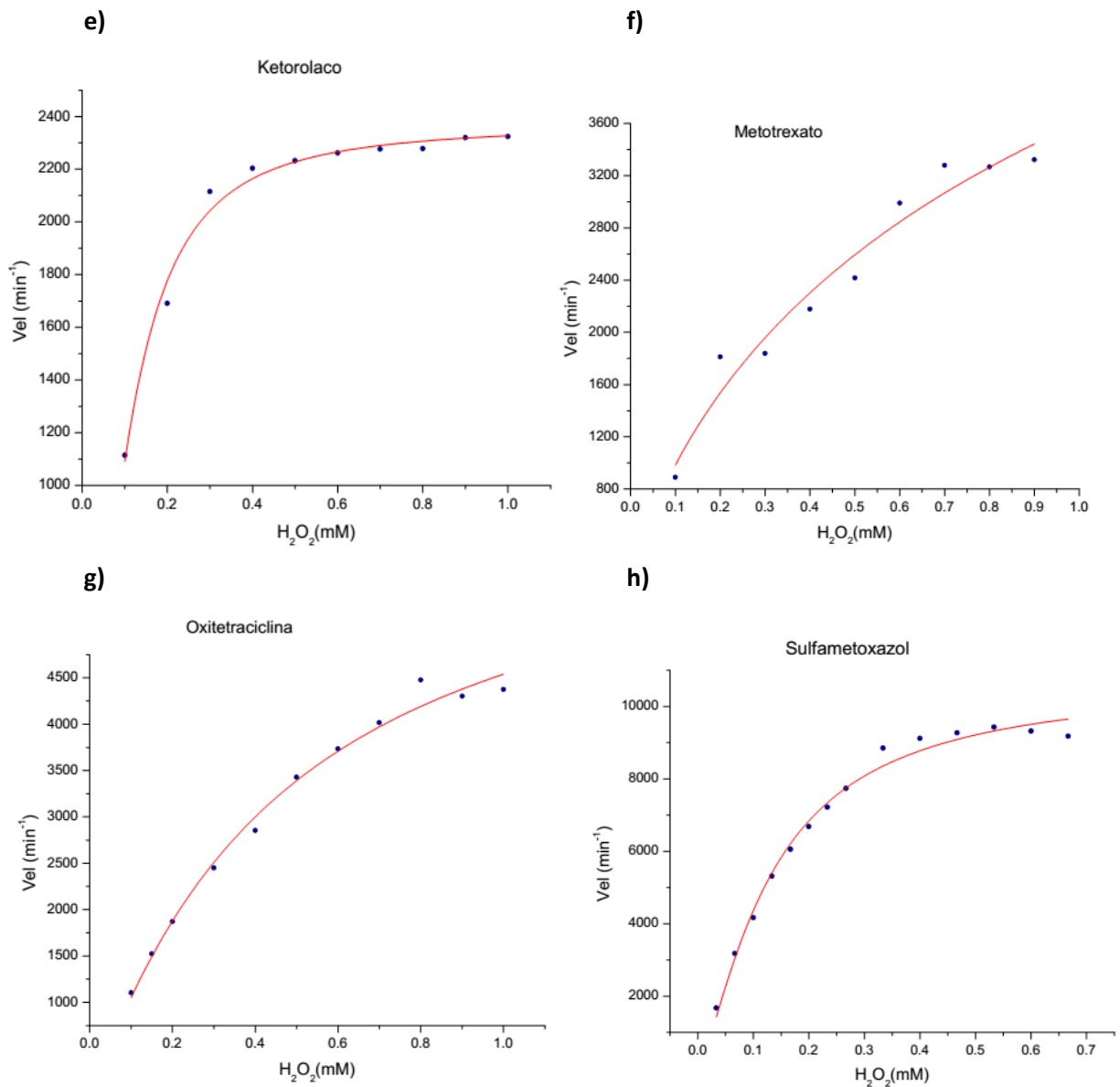
**Fig. 10: Cinética de oxidación de a) ketorolaco monitoreado por espectrofotometría UV-Vis y b) ketoconazol monitoreado por espectrofotometría de fluorescencia.**

Así que cada pendiente de las curvas mostradas en la Figura 10, en unidades de  $\Delta$ señal/tiempo, se divide entre el factor de conversión de cada fármaco para transformarla a unidades de concentración entre minutos; posteriormente se divide entre la concentración de enzima usada, para finalmente obtener el valor de la velocidad de reacción en  $\text{min}^{-1}$ .

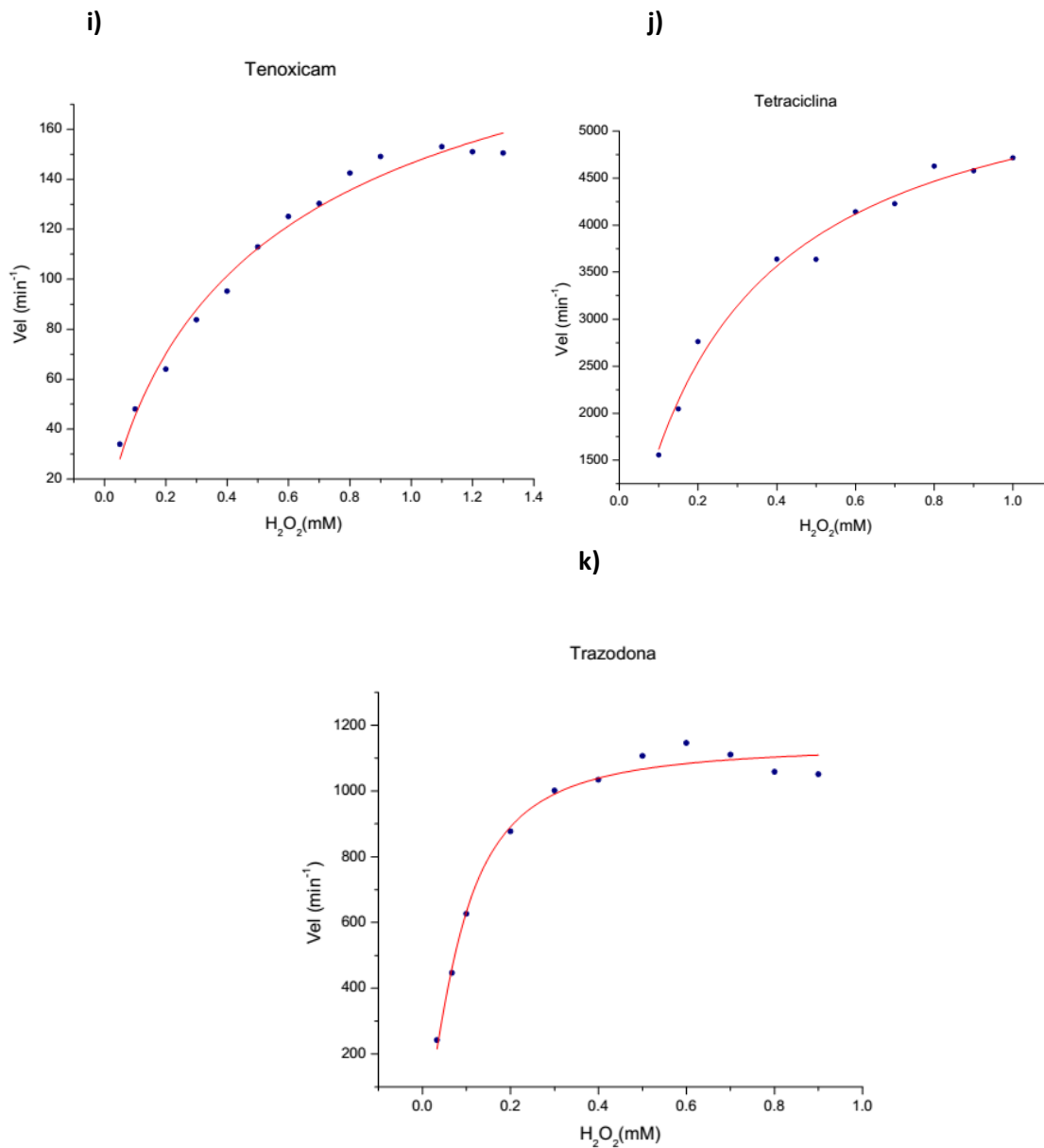
A partir de cada cinética de reacción a diferentes concentraciones del agente oxidante, peróxido de hidrógeno, se obtuvieron las curvas de Michaelis-Menten graficando las velocidades obtenidas y ajustando los datos obtenidos de la Ecuación 1. Para ello, se utilizó el software Origin 8.0 usando un ajuste no-lineal de mínimos cuadrados, mediante el algoritmo de Marquardt–Levenberg. Cada una de las curvas muestra la variación de la velocidad con respecto al aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno (Fig. 11).



**Fig. 11: Curvas de Michaelis-Menten para la oxidación de a) ambroxol, b) diclofenaco, c) estradiol y d) ketoconazol.**



**Fig. 11: Curvas de Michaelis-Menten para la oxidación...continuación de e) ketorolaco, f) metotrexato, g) oxitetraciclina y h) sulfametoxazol.**



**Fig. 11: Curvas de Michaelis-Menten para la oxidación...continuación de i) tenoxicam, j) tetraciclina y k) trazodona**

Los coeficientes de correlación fueron mayores a 0.9 y a partir de las mismas se obtuvieron los valores de las constantes cinéticas presentadas en la Tabla 15.

**Tabla 15: Constantes cinéticas para la de oxidación de los fármacos catalizada por la cloroperoxidasa**

Fármaco	$V_{\max}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_M$ (mM)	$V_{\max}/K_M$	$r^2$	Técnica
<b>Ambroxol</b>	5123.12	0.74766	6852.20	0.97906	UV-Visible
<b>Diclofenaco</b>	8598.32	0.06450	133307.28	0.97966	HPLC
<b>Estradiol</b>	8182.60	0.12210	67015.56	0.94651	Fluorescencia
<b>Ketoconazol</b>	8457.55	0.18290	46241.39	0.98675	Fluorescencia
<b>Ketorolaco</b>	2368.54	0.10910	21709.81	0.98495	UV-Visible
<b>Metotrexato</b>	8241.52	1.39522	5906.97	0.94688	UV-Visible
<b>Oxitetraciclina</b>	6551.66	0.46815	13994.79	0.98757	UV-Visible
<b>Sulfametoxazol</b>	10717.21	0.13183	81295.68	0.98811	Fluorescencia
<b>Tenoxicam</b>	242.50	0.59834	405.29	0.98044	UV-Visible
<b>Tetraciclina</b>	5992.04	0.27183	22043.34	0.98193	UV-Visible
<b>Trazodona</b>	1141.105	0.08639	13208.76	0.98320	Fluorescencia

Donde  $K_M$ , conocida como constante de Michaelis-Menten, representa la relación entre la velocidad de reacción catalizada y la concentración del sustrato en la cual la velocidad inicial es igual a la mitad de la velocidad máxima, como una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato (Segel, 1976), el menor valor de  $K_M=0.06450$  mM presentado en la oxidación del diclofenaco y el mayor,  $K_M= 1.39522$  mM en la del metotrexato, indica que existe una mayor afinidad por el diclofenaco, se puede suponer que es debido a que su molécula es menos compleja que la del metotrexato, ya que presenta menos radicales y anillos aromáticos, según se observa en la Tabla 6.

---

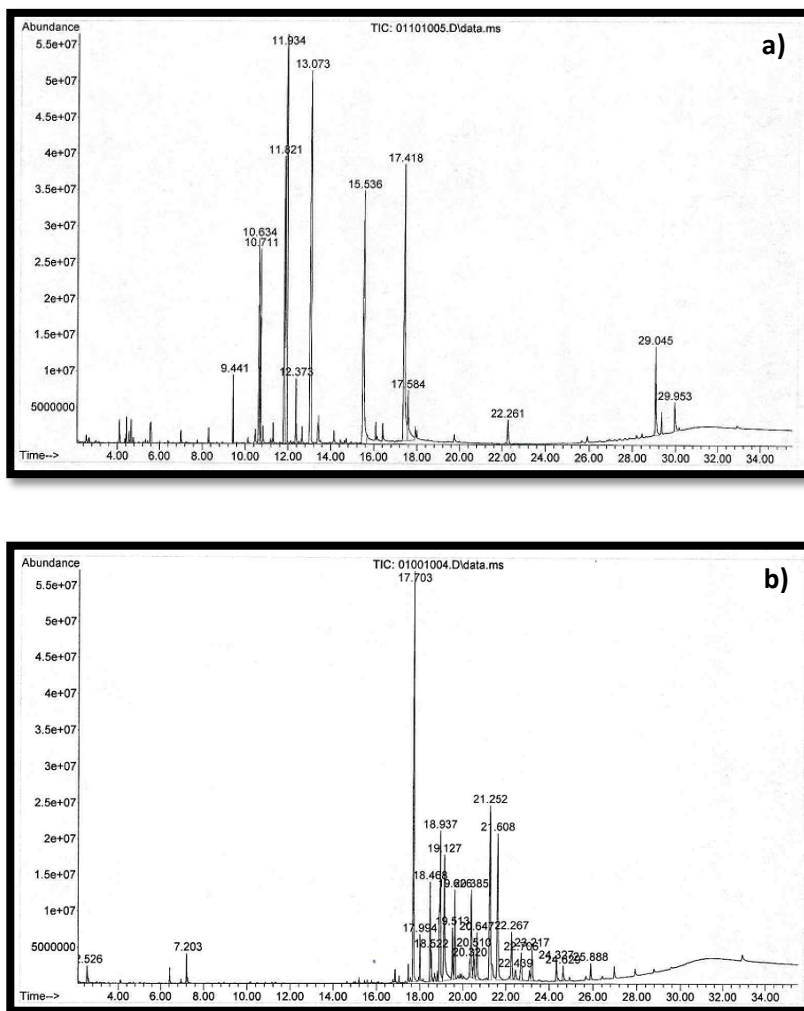
Lo mismo ocurre con  $V_{\max}$ , que indica la velocidad máxima cuando todos los sitios activos de la enzima estén ocupados por moléculas de sustrato, representado por el valor máximo al que tiende la curva (ver Figura 11). El sulfametoxazol muestra el mayor valor de  $V_{\max}$  de  $10717.21 \text{ min}^{-1}$ , mientras que el tenoxicam presenta un valor de  $242.50 \text{ min}^{-1}$ , de esta manera los compuestos con valores de  $V_{\max}$  más altos indican que hay un mayor número de moléculas de sustrato que se están transformando en producto por unidad de tiempo, asimismo el cociente  $V_{\max}/K_M$ , conocido como coeficiente de especificidad, indica la eficiencia catalítica de la enzima a concentraciones de sustrato menores de la de saturación, el valor más alto de esta relación también indica qué sustrato es el más adecuado para la enzima, para este caso corresponde al diclofenaco.

Comparando los valores de velocidades máximas con el ensayo usado comúnmente para la cloroperoxidasa en el que se mide la velocidad de cloración del sustrato monoclorodimedona a diclorodimedona de  $22000 \text{ min}^{-1}$  (Gideon, 2009) o con la cloración de hidrocarburos aromáticos en presencia de peróxido de hidrógeno, donde las velocidades de reacción varían de  $0.6 \text{ min}^{-1}$  para naftaleno y  $758 \text{ min}^{-1}$  para 9-metilantraceno (Vázquez-Duhalt *et al*, 2001) y la oxidación de pesticidas organofosforados como el fosmet y el paratión con velocidades de  $145.8 \text{ min}^{-1}$  y  $334.8 \text{ min}^{-1}$ , respectivamente (Hernández *et al*, 1998). Dado que los fármacos utilizados en los ensayos poseen moléculas complejas, las velocidades máximas presentadas son factibles.

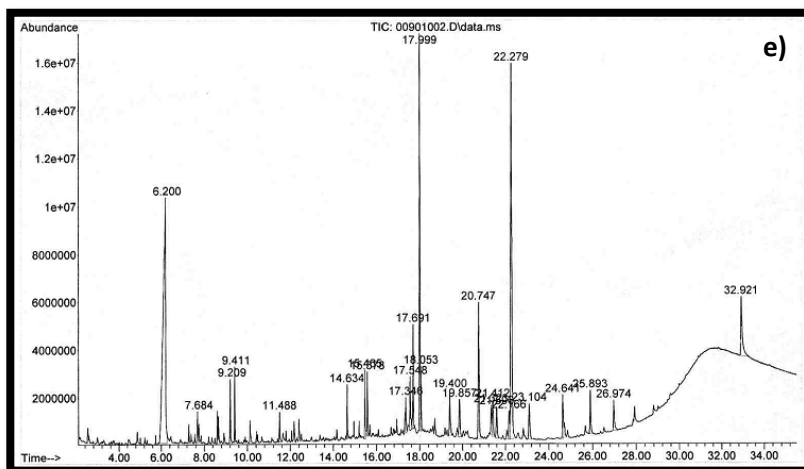
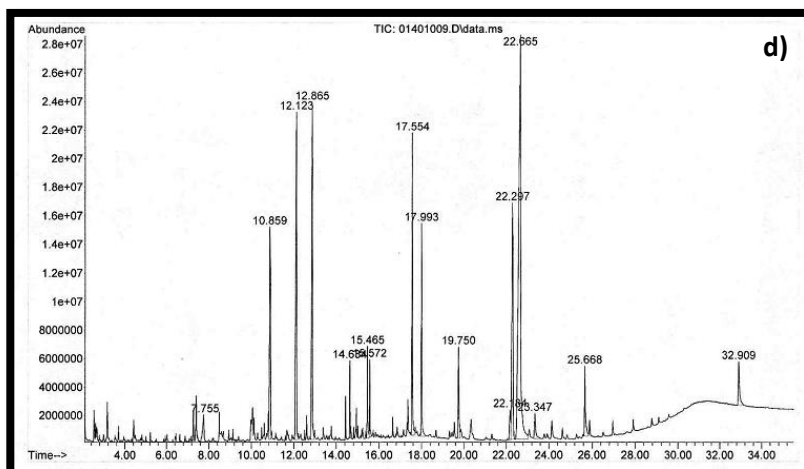
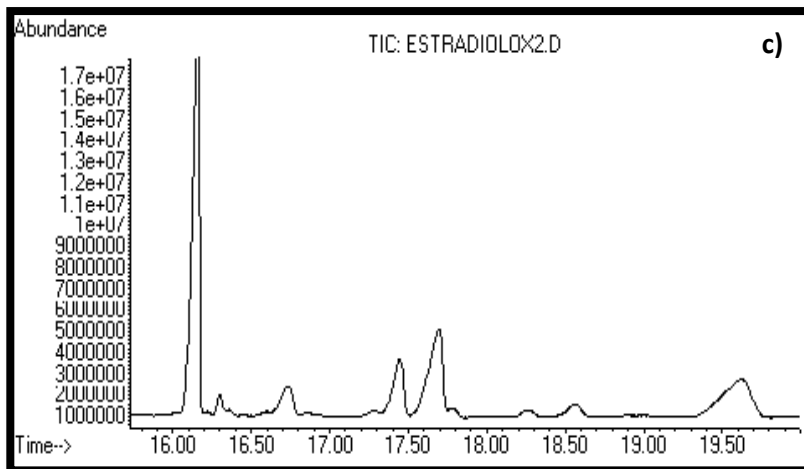
### 4.3 Identificación de productos de oxidación

A continuación se presentan los resultados del análisis de los posibles productos de reacción de la oxidación de los fármacos de acuerdo con el procedimiento y condiciones descritos en la sección 3.3.6.

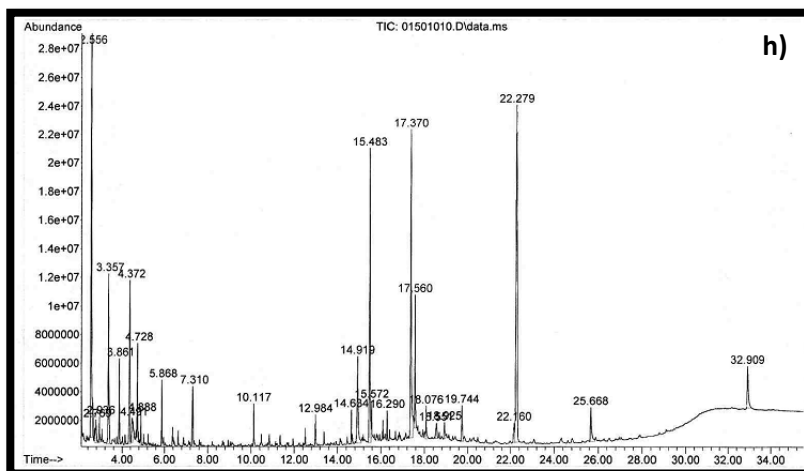
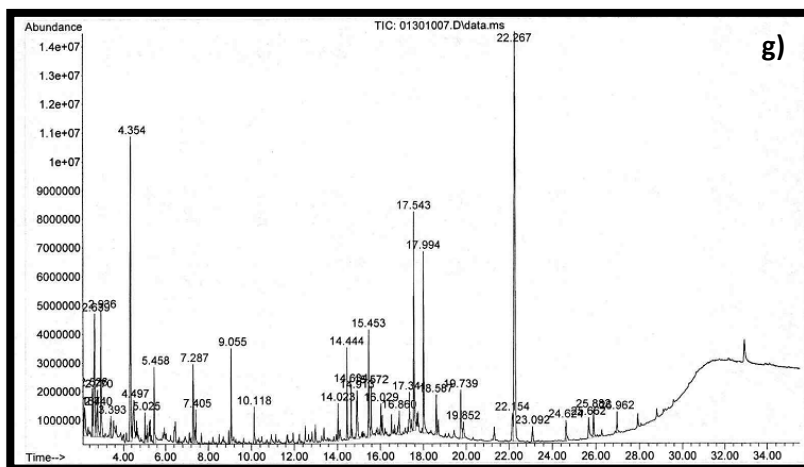
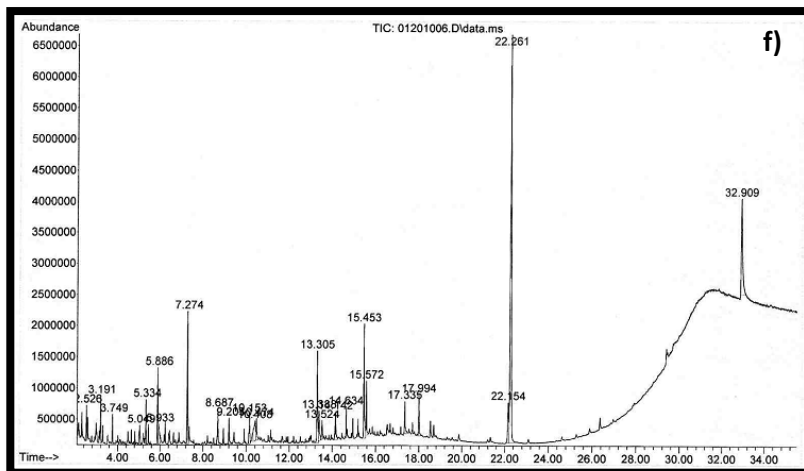
En la Figura 12 se muestran los cromatogramas procedentes del análisis de las muestras correspondientes a las reacciones para algunos de los fármacos, donde la mayoría de los productos aparecen entre los 6 y los 23 minutos.



**Fig. 12: Cromatograma que muestra los posibles productos de la oxidación de:**  
**a) ambroxol y b) diclofenaco.**



**Fig. 12: Cromatograma que muestra los posibles productos de la oxidación...continuación de: c) estradiol, d) ketoconazol y e) ketorolaco.**



**Fig. 12: Cromatograma que muestra los posibles productos de la oxidación...continuación de: f) metrotexato, g) oxitetraciclina y h) tetraciclina.**

---

La halogenación catalizada por enzimas es un proceso biológico común que ocurre en la naturaleza, en la reacción de la cloroperoxidasa, un anión halogenuro ( $X^-$ , X: Cl, Br, I) es activado por el catión halonio ( $X^+$ ) a través de la oxidación dependiente de peróxido de hidrógeno, y el catión halonio es transferido a la molécula receptora del halógeno, de esta manera, la cloroperoxidasa es responsable de la formación del enlace carbono-halógeno en un gran número de sustratos (Nobuya, 1988). Igualmente, se ha reportado que la cloroperoxidasa puede catalizar diversos tipos de reacciones, como la cloración dependiente del peróxido, deshidrogenación, descomposición de  $H_2O_2$  e introducción de oxígeno (Vázquez-Duhalt *et al*, 2001), capaz de oxidar moléculas complejas, como los compuestos aromáticos, en este caso los fármacos. De acuerdo con el mecanismo presentado en la sección 2.6.2 se produce un radical del sustrato, a partir del cual pueden surgir tres reacciones secundarias posibles: oxidación, dimerización o cloración (Ortiz de Montellano, 2010).

Para la identificación de los productos, se consideraron los espectros cuya concordancia con las bases de datos fue mayor o igual a 90% y describiendo algunos de los compuestos que se presentan en la Tabla 16, las cloroanilinas son comunes en las reacciones catalizadas por la cloroperoxidasa en sustratos donde existen grupos aminobenceno (anilina), ya que una característica importante de la cloroperoxidasa es la habilidad de introducir  $Cl^-$  en una gran cantidad de sustratos orgánicos y  $Br^-$  (Corbett *et al*, 1980), tal y como ocurre en la molécula del ambroxol. El ácido 2-[(2,6-diclorofenil)amino]-bencenoacético corresponde al diclofenaco mismo, mientras que las fenazinas son compuestos que se encuentran en la naturaleza y son producidos por algunas bacterias como *Pseudomonas spp* (Schettino *et al*, 2002).

**Tabla 16: Productos de reacción de mayor abundancia en la oxidación de algunos fármacos seleccionados**

Fármaco	Producto	Concordancia	Peso molecular (Da)	Tiempo de retención (min)
Ambroxol	2,6-dibromo-4-cloroanilina	99%	285.360	11.821
	2,4,5-tricloroanilina	98%	196.460	9.441
	2,4,6-tribromoanilina	98%	329.810	13.073
Diclofenaco	Ácido 2-[(2,6-diclorofenil)amino]-bencenoacético	99%	296.149	19.127
	2,6-dicloroanilina	96%	162.020	7.203
	1,6-diclorofenazina	94%	249.095	18.522
Estradiol	Producto monoclorado	NE*	NE*	17.442
	Producto monoclorado	NE*	NE*	17.693
	Producto diclorado	NE*	NE*	19.631
Ketoconazol	Diisocitilato	93%	390.560	22.297
	Hidroquinona	91%	110.110	7.755
	Dibutilftalato	91%	278.340	15.572
Ketorolaco	Ácido benzoico	95%	122.120	6.200
	Dibutilftalato	93%	278.340	15.578
	Ácido-isobutil 2-metilpent-3-il-éster-ftálico	90%	306.397	14.634
Metotrexato	Ácido 3,5-dicloro-4-oxo-4H-piridina-1-acético	98%	222.025	13.524
	Caprolactama	94%	113.158	7.274
	2,4,6-Triclorofenol	93%	197.450	8.687

\*NE= No especificado

**Tabla 16: Productos de reacción de mayor abundancia en la oxidación de algunos fármacos seleccionados...continuación**

Fármaco	Producto	Concordancia	Peso molecular (Da)	Tiempo de retención (min)
Oxitetraciclina	Caprolactama	94%	113.158	7.287
	9-cloro-1-fenacinaol	92%	230.650	16.029
	2-cloroacetamida	91%	93.510	2.936
Tetraciclina	Ácido dicloroacético	97%	128.942	4.491
	2,2-dicloroacetamida	91%	127.960	4.372
	Caprolactama	90%	113.158	7.310

En la oxidación del ketoconazol y el ketorolaco están el diisocitilftalato (DIOF) y el dibutilftalato (DBF) respectivamente; aunque existe una lista de ftalatos prohibidos por la Comisión Europea, ambos se excluyen (ECHA, 2010). En cambio, la hidroquinona, que se emplea como agente en fotografía y rayos X y como antioxidante es conocido por su toxicidad para las especies acuáticas, pero hasta una concentración de  $1.0 \mu\text{gL}^{-1}$  para especies de agua dulce y de  $8.0\mu\text{gL}^{-1}$  para especies de aguas salada no existen efectos (UNEP, 2007).

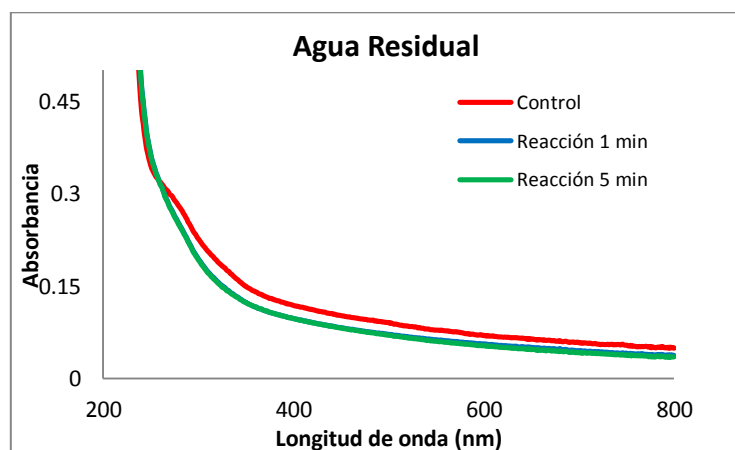
Otro de los productos, el ácido benzoico es utilizado como agente antimicrobiano en pesticidas, sin embargo la exposición a residuos de este compuesto es mínima comparada con su ocurrencia natural en cultivos, aditivos para alimentos, usos farmacéuticos y cosméticos y no se reportan efectos visibles en humanos en concentraciones de 0.5 a 1.0 g/días (EPA, 2010). Mientras que la caprolactama encontrada como producto de reacción de los últimos tres compuestos de la Tabla 16, usado en la fabricación de fibras sintéticas, presenta efectos irritantes luego de exposición crónica, pero no ha demostrado tener otros efectos en la salud, además de no estar clasificado como carcinógeno y el 2,4,6-triclorofenol que solía ser usado en Estados Unidos como antiséptico, pesticida y conservador es catalogado como probable

carcinógeno y posee efectos respiratorios mediante inhalación (EPA, 2000). El ácido dicloroacético es utilizado en la síntesis de materiales orgánicos, como ingrediente en fármacos, astringente tópico y fungicida y se ha detectado su presencia en sistemas de distribución de aguas subterráneas y superficiales de Estados Unidos, en concentraciones medias de 6.9 y 17 mgL<sup>-1</sup> y aunque en diversos estudios se ha detectado la hepatocarcinogénesis inducida por este ácido en roedores, esto depende mucho de la dosis o de la especie (WHO, 2005).

Finalmente para el estradiol, se ha reportado que los derivados clorados y bromados, presentan menor actividad estrogénica y menores afinidades de enlace a los receptores alfa y beta que los derivados fluorados (Liu *et al*, 2003).

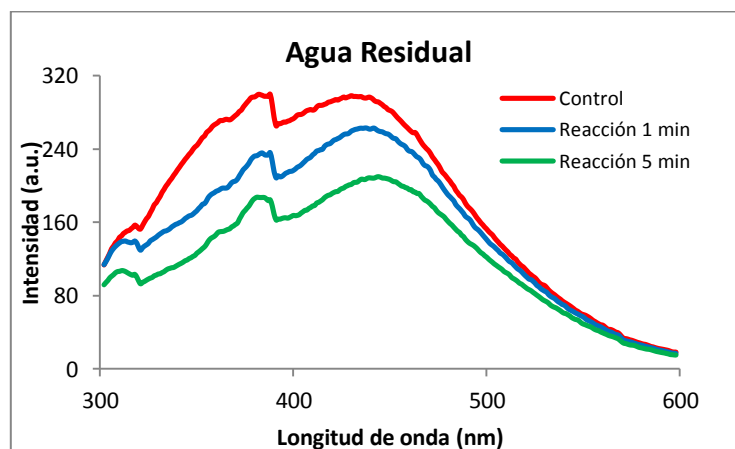
#### 4.4 Capacidad oxidativa de la enzima usando como medio de reacción un efluente real de una planta de tratamiento de agua residual

En la Figura 13 se muestra el ensayo realizado con la muestra de agua residual, antes y después de agregar la enzima, aunque mínimos se observan cambios de absorbancia, lo cual indica la posible reacción de oxidación de los componentes existentes en la muestra.



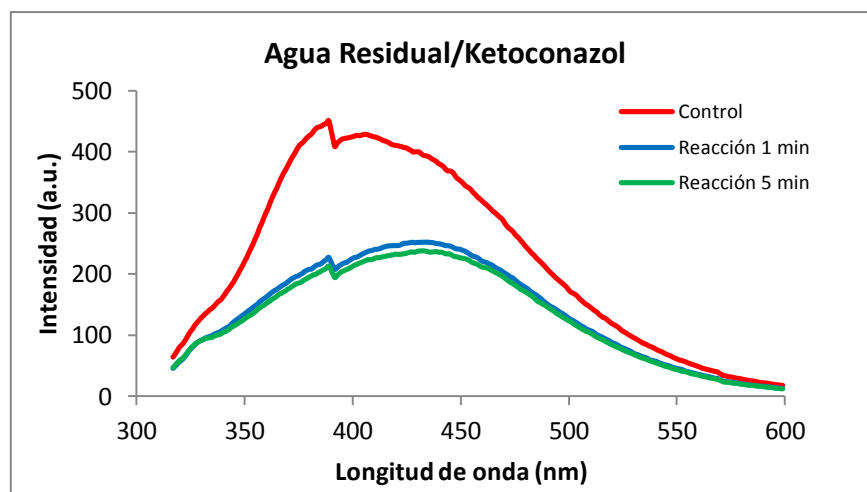
**Fig. 13:** Espectro de absorbancia antes (control) y después de 1 y 5 minutos de reacción para la muestra de agua residual con pH modificado a 3.

De igual manera se realizó el mismo ensayo, pero llevando a cabo el monitoreo de la reacción por espectrofotometría de fluorescencia, con una longitud de onda de excitación de 280 nm y de emisión de 380 nm. Debido a que los compuestos en el agua fluorescen, los cambios de intensidad son más perceptibles y se comprueba que existe oxidación de los compuestos presentes (Figura 14).



**Fig. 14: Espectro de fluorescencia antes (control) y después de 1 y 5 minutos de reacción para la muestra de agua residual con pH modificado a 3.**

Finalmente utilizando también el método anterior se analizó la reacción de agua residual con ketoconazol añadido, siendo la longitud de onda excitación 295 nm y de emisión 318 nm, mismas condiciones para el ketoconazol disuelto en el medio de reacción. Como se observa en la Figura 15 también se presenta una disminución de la intensidad.



**Fig. 15:** Espectro de absorbancia antes (control) y después de 1 y 5 minutos de reacción para la muestra de agua residual/ketoconazol con pH modificado a 3.

Siguiendo una cinética utilizando tres concentraciones diferentes de peróxido de hidrógeno, en el punto de saturación de acuerdo con la Figura 11-d, se obtuvieron las velocidades máximas de reacción para la oxidación de ketoconazol en el medio de reacción conformado por el amortiguador de acetatos y en el agua residual pH 3. Se puede observar en la Tabla 17 que no existe gran diferencia entre los valores de las velocidades para ambos casos.

**Tabla 17:** Velocidad de oxidación del ketoconazol en el agua residual pH 3 y en el amortiguador de acetatos a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] mM	Velocidad de reacción ketoconazol en agua residual pH 3 (min <sup>-1</sup> )	Desviación estándar	Velocidad de reacción ketoconazol en medio de reacción (min <sup>-1</sup> )	Desviación estándar
0.4	5261.12	126.94	6701.33	55.76
0.5	5350.65	191.93	7015.02	46.91
0.6	6607.58	298.67	7472.69	59.59

En la Tabla 18 se muestran los resultados de las mediciones de los parámetros fisicoquímicos de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección 3.3.7 para tres diferentes muestras: el agua residual sin oxidación catalizada por la enzima, el agua residual con pH modificado a 5 para la medición de demanda bioquímica de oxígeno

(mínimo especificado por la NMX-AA-028-SCFI-2001) y pH 3 para los demás parámetros y una muestra de agua residual luego de 1 h de reacción.

**Tabla 18: Parámetros fisicoquímicos medidos a) agua residual sin oxidar b) agua residual pH modificado y c) agua residual luego de la reacción 1h**

Parámetro	a)	b)	c)
pH	7.80	3.03	3.05
Color (UPt-Co)	50	128.7	61.7
Turbiedad (UNF)	19	22	20
Conductividad (mScm <sup>-1</sup> )	1.41	3.88	2.55
Sólidos totales (mgL <sup>-1</sup> )	1.25	2.06	3.29
Sólidos suspendidos totales (mgL <sup>-1</sup> )	0.02	0.02	0.02
Sólidos disueltos totales (mgL <sup>-1</sup> )	1.23	2.04	3.23
Demanda química de oxígeno (mgL <sup>-1</sup> )	350	221	196
Demanda bioquímica de oxígeno (mgL <sup>-1</sup> )	560	460	40

De acuerdo con NOM-001-SEMARNAT-1996 para las descargas de aguas residuales a aguas y bienes nacionales, el pH debe encontrarse en un rango de 5 a 10 unidades, debido a la modificación que requiere la muestra a tratar para llevar a cabo la reacción con el pH óptimo para la enzima, luego del tratamiento es necesaria su neutralización. Esta misma norma contempla para los sólidos suspendidos totales un límite máximo permisible de 40 a 200 mgL<sup>-1</sup> dependiendo del destino de la descarga, debido a que la muestra provenía del efluente del tratamiento secundario de la planta, este valor es mucho menor al límite. Para el caso de la demanda bioquímica de oxígeno el límite máximo permisible está en un rango de 30 a 200 mgL<sup>-1</sup>. Las muestras de agua antes de llevar a cabo la reacción de oxidación catalizada con la cloroperoxidasa no cumplen con este límite, en cambio después de la reacción disminuye en casi 93%. Además las reacciones ocurridas durante la oxidación posiblemente sean la causa del incremento de la conductividad, debido a que muchos compuestos presentes se vuelven más polares al ser oxidados, mientras que otros se vuelven insolubles, lo que provocaría el aumento en la turbiedad. Aunque no existe un límite máximo permisible de DQO contemplado en la normatividad mexicana para aguas residuales, la Comisión Nacional del Agua establece

---

un indicador donde aguas superficiales con un valor de DQO mayor a  $200 \text{ mgL}^{-1}$  son consideradas fuertemente contaminadas (CONAGUA, 2010), aun dentro de este rango con la reacción se logra disminuir dicho parámetro en un 44%, pero depende en gran medida del tipo de compuestos que se encuentren presentes en el agua.

Finalmente se puede apreciar a simple vista en la Figura 16-c el cambio en el color y turbiedad que existe en cada una de las muestras analizadas, como el agua luego de transcurrida la reacción es más clara que las muestras anteriores.



**Fig. 16: Variación de color y turbiedad de las tres diferentes muestras analizadas: a) agua residual sin oxidar, b) agua residual pH 3 y c) agua residual luego de la reacción 1h.**

---

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que la enzima tiene la capacidad para catalizar la oxidación de la mayoría de los fármacos seleccionados, comprobado por la disminución de absorbancia, intensidad y área medidos.

Los diferentes valores de constantes cinéticas de las reacciones demuestran una probable influencia de la estructura de la molécula de cada fármaco, como algunos compuestos son sustratos más afines para la cloroperoxidasa, según los valores de  $K_M$  obtenidos, diclofenaco, ketorolaco y trazodona son mejores sustratos en comparación con el metotrexato o ambroxol.

También se demostró que la enzima no se ve afectada por el cambio de medio de reacción, pudiendo catalizar la oxidación del ketoconazol tanto en el amortiguador como en el agua residual y que aun sin agregar un compuesto, ocurren cambios que modifican las características fisicoquímicas del agua.

Es importante tener en cuenta de que las reacciones que ocurren y los productos generados dependen mucho de la muestra a tratar, su origen, características y el tipo de compuestos presentes, las concentraciones y mezclas de los mismos presentes. Sin embargo, se puede considerar el tratamiento biocatalítico con cloroperoxidasa como una opción para el tratamiento de los contaminantes emergentes.

La mayoría de los productos de reacción resultaron compuestos aromáticos clorados, pero se sugiere la realización de más pruebas para determinar con exactitud los productos que se producen de la oxidación de cada uno de los fármacos analizados, los efectos que pudieran ocasionar en el ambiente y compararlos con los de los fármacos mismos.

---

## REFERENCIAS

Arenas, I., & López, J. (2004). Espectrofotometría de Absorción, en Métodos de Laboratorio. Maestría en Ciencias Bioquímicas (Vol. 7). Instituto de Biotecnología UNAM.

Ayala, M., Batista, C., & Vazquez-Duhalt, R. (2011). Heme destruction, the main molecular event during the peroxide-mediated inactivation of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Biological Inorganic Chemistry*, 16, 63-68.

Bahnmüller, S., Gunten, U. v., & Canonica, S. (2014). Sunlight-induced transformation of sulfadiazine and sulfamethoxazole in surface waters and wastewater effluents. *Water Research*, 57, 183-192.

Barceló, D. & López, M. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Panel Científico-Técnico de Seguimiento de la política de agua, Fundación Nueva Cultura del Agua.

Bisswanger, H. (2011). *Practical enzymology* (2nd. ed.) Weinheim: Wiley-Blackwell.

Brozinski, J., Lahti, M., Meierjohann, A., Oikari, A., & Kronberg, L. (2012). The anti-inflammatory drugs diclofenac, naproxen and ibuprofen are found in the bile of wild fish caught downstream of a wastewater treatment plant. *Environmental Science & Technology*, 47, 342-347.

Conesa, A., de Veld, F. v., Sheldans, R., Punt, P., & de Hondel, C. v. (2001). Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 17635-17646.

---

Cuklev, F., Fick, J., Cvijovic, M., Kristiansson, E., Förlin, L., & Larsson, D. (2012). Does ketoprofen or diclofenac pose the lowest risk to fish?. *Journal of Hazardous Materials*, 229-230, 100-106.

Deblonde, T., Cossu, C., & Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 442-448.

Dong, Z., Senn, D., Moran, R., & Shine, J. (2013). Prioritizing environmental risk of prescription pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65, 60-67.

Eibes, G., Debernardi, G., Feijoo, G., Moreira, M., & Lema, J. (2011). Oxidation of pharmaceutically active compounds by a ligninolytic fungal peroxidase. *Biodegradation*, 22, 539-550.

European Chemicals Agency (ECHA). (2010). Review of new available information for dibutyl phthalate (DBP). Evaluation of new scientific evidence concerning the restrictions contained in annex XVII to regulation (EC) No. 1907/2006.

Escher, B., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., & McArdell, C. (2011). Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospitals wastewater. *Water Research*, 45, 75-92.

Fålas, P., Ledin, A., Andersen, H., & La Cour Jansen, J. (2012). Occurrence and reduction of pharmaceuticals in water phase at Swedish wastewater treatment plants. *Water Science & Technology*, 66(4),783-791.

García, C., Gortáres, P., & Drogui, P. (2011). Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción . *Química Viva*, 2, 96-105.

---

Gideon, G. (2009). 6 A Beginner's Guide to Isolation, Analysis and Use of Home-Grow Enzyme Biocatalysis. In *Practical Biotransformation: A Beginner's Guide* (1st ed., p. 220). Padstow, Cornwall G.B.: Wiley.

Gil, M., Soto, A., Usmo, J., & Gutiérrez, O. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción+Limpia*, 7(2), 52-57.

Göbel, A., Mcardell, C., Joss, A., Siegrist, H., & Giger, W. (2007). Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Science of the Total Environment*, 372, 361-371.

Golet, E., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A., & Giger, W. (2003). Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environmental Science & Technology*, 37, 3243-3249.

González, M., Gonzalo, S., Rodea, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., *et al.* (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*, 47, 2050-2064.

Grossberger, A., Hadar, Y., Borch, T., & Chefetz, B. (2014). Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environmental Pollution*, 185, 168-177.

Hernández, J., Robledo, N., Velasco, L., Quintero, R., Pickard, M., & Vazquez-Duhalt, R. (1998). Chloroperoxidase-Mediated Oxidation of Organophosphorus Pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 61(1), 87-94.

Hey, G. (2013). Application of chemical oxidation processes for the removal of pharmaceuticals in biologically treated water. Lund University, Sweden: Water and Environmental Engineering, Department of Chemical Engineering.

---

Hutchinson, T., Lyons, B., Thain, J., & Law, R. (2013). Evaluating legacy contaminants and emerging chemicals in marine environments using adverse outcome pathways and biological effects-directed analysis. *Marine Pollution Bulletin*, 74, 517-525.

Igos, E., Benetto, E., Venditti, S., Kohler, C., Cornelissen, A., Moeller, R., *et al.* (2012). Is it better to remove pharmaceuticals in decentralized or conventional wastewater treatment plants? A life cycle assessment comparison. *Science of the Total Environment*, 438, 533-540.

International Programme on Chemical Safety. (2007). Hydroquinone. UNEP Publications. United Nations Environment Programme.

Jean, J., Perrodin, Y., Pivot, C., Trepo, D., Perraud, M., Droguet, J., *et al.* (2012). Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. *Journal of Environmental Management*, 103, 113-121.

Jelic, A., Gros, M., Ginebrenda, A., Céspedes-Sánchez, R., & Ventura, F. (2011). Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research*, 45, 1165-1176.

Jímenez, C. (2011). Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: Productos farmacéuticos. *Revista Lasallista de Investigación Colombia*, 8(2), 143-153.

John, R. (2002). 2Photometric Assays. In *Enzyme Assays: A Practical Approach* (2nd ed., pp. 49-77). Oxford: Oxford University Press.

Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Richle, P., & Siegrist, H. (2004). Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: Consequences for plant optimization. *Environmental Science & Technology*, 38, 3047–3055.

---

Joss, A., Keller, E., Alder, A., Göbel, A., Mcardell, C., & Ternes, T. (2005). Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research*, 39, 3139–3152.

Larcher, S., & Yargeau, V. (2012). Biodegradation of sulfamethoxazole: current knowledge and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 309–318.

Lindberg, R., Olofsson, U., Rendahl, P., Johansson, M., Tysklind, M., & Andersson, B. (2006). Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. *Environmental Science & Technology*, 40, 1041-1048.

Liu, X., Zhang, F., Li, Y., Van Breemen, R., Swanson, S., Botton, J. *et al.* (2003). Effect of halogenated substituents on the metabolism and estrogenic effects of the equine estrogen, equilenin. *Chemical Research in Toxicology*, 16, 741-749.

Lloret, L., Eibes, G., Lú-Chau, T., Moreira, M., Feijoo, G., & Lema, J. (2010). Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochemical Engineering Journal*, 51, 124-131.

Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J., Aparicio, I., & Alonso, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of Hazardous Materials*, 239-240, 40-47.

Martínez, M., & Moctezuma, C. (2006). Espectrofluorimetría, en Métodos fisicoquímicos en biotecnología. Instituto de Biotecnología UNAM.

- 
- Murugesan, K., Chang, Y., Kim, Y., Jeon, J., Kim, E., & Chang, Y. (2010). Enhanced transformation of triclosan by laccase in the presence of redox mediators. *Water Research*, 44, 298-308.
- Nobuya, I. (1988). Studies on the halogenation reactions catalyzed by the haloperoxidases from *Caldariomyces fumago* on *Coralina pilulifera*. Kyoto University.
- Ort, C., Lawrence, M., Reungoat, J., Eaglesham, G., Carter, S., & Keller, J. (2010). Determining the fraction of pharmaceutical residues in wastewater originating from a hospital. *Water Research*, 44, 606-615.
- Ortiz de Montellano, P. (2010). Catalytic mechanisms of heme peroxidases. In *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts* (pp. 79-107). Berlin: Springer.
- Ostadhadi, S., Tabatabaei, M., Forootanfar, H., Kolahdouz, S., Ghazi, M., & Faramarzi, M. (2012). Degradation of some benzodiazepines by a laccase-mediated system. *Bioresource Technology*, 125, 344-347.
- Rao, M., Scelza, R., Scotti, R., & Gianfreda, L. (2010). Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 333- 353.
- Rivera, J., Sánchez, M., Ferro, M., Prados, G., & Ocampo, R. (2013). Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere*, 93, 1268-1287.
- Roig, B., Marquenet, B., Delpla, I., Bessonneau, V., Sellier, A., Leder, C., *et al.* (2014). Monitoring of methotrexate chlorination in water. *Water Research*, 57, 67-75.

---

Rubio, A., Chica, E., & Peñuela, G. (2013). Procesos de tratamiento de aguas residuales para la eliminación de contaminantes orgánicos emergentes. *Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 8(3), 93-100.

Sándor, Z., Papp, Z., Kosáros, T., Hegedüs, R., & Csengeri, I. (2012). Potencial Effects of pharmaceuticals and their residues in aquatic environment. *Studia Universitatis*, 22(2), 247-253.

Santos, L., Gros, M., Rodríguez, S., Delerue, C., Peña, A., Barceló, D., *et al.* (2013). Contribution of hospital effluents to the loads of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, 461-462, 302-316.

Sathishkumar, P., Chae, J., Unnithan, A., Palvannan, T., Yong, H., Lee, K., *et al.* (2012). Laccase-poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofiber: Highly stable, reusable, and efficacious for the transformation of diclofenac. *Enzyme and Microbial Technology*, 51, 113-118.

Schettino, B., Valera C, Delgado L & González R (2002). Reducción de cuenta microbiana total en efluentes de tratamiento utilizando productos del metabolismo de *Pseudomonas Aeruginosa*. Congreso de Ciencias Ambientales. Trabajo realizado por Laboratorio de Ingeniería Bioquímica UAEM.

Segel, I. (1976). *Biochemical calculations: How to solve mathematical problems in general biochemistry* (2nd ed.). New York: Wiley.

SEMARNAT, Comisión Nacional del Agua. (2007). *Estadísticas del agua en México*, 1a edición, CNA, México.

---

SEMARNAT. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación el 23 de abril de 2003.

Sim, W., Lee, J., Lee, E., Shin, S., Hwang, S., & Oh, J. (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere*, 82, 179-186.

Suárez, S., Lema, J., & Omil, F. (2010). Removal of Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Research*, 44, 3214-3244.

Suzuki, K., Hirai, H., Murata, H., & Nishida, T. (2003). Removal of estrogenic activities of 17 $\beta$ -estradiol and ethinylestradiol by lignolytic enzymes from white rot fungi. *Water Research*, 37, 1972-1975.

Ternes, T. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32(11), 3245-3260.

Torres, E., & Ayala, M. (Eds.). (2010). Biocatalysis Based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts. Berlin: Springer.

Torres, E., Bustos, I., & Borgne, S. L. (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*, 46, 1-15.

Torres-Duarte, C., & Vazquez-Duhalt, R. (2010). Applications and Prospective of Peroxidase Biocatalysis in the Environmental Field. In E. Torres & M. Ayala (Eds.), *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases* (pp. 179-206). Berlin Heidelberg: Springer.

---

U.S. Environmental Protection Agency. (2010). Benzoic acid. Summary document. Chemical Safety and Pollution Prevention.

U.S. Environmental Protection Agency. (2000). Caprolactam. Hazard summary. Integrated Risk Information System.

Vázquez-Duhalt, R., Ayala, M., & Márquez-Rocha, F. (2001). Biocatalytic chlorination of aromatic hydrocarbons by chloroperoxidase of *Caldariomyces fumago*. *Phytochemistry*, 58, 929-933.

Vázquez-Duhalt, R., Ayala, M., & Márquez-Rocha, F. (2001). Biocatalytic chlorination of aromatic hydrocarbons by chloroperoxidase of *Carldaryomices fumago*. *Phytochemistry*, 58, 929-933

Velázquez, B. (2008). Farmacología: Básica y Clínica (18 ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.

Verlicchi, P., Aukidy, A., & Zambello, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment— A review. *Science of the Total Environment*, 429, 123–155.

Wen, X., Jia, Y., & Li, J. (2009). Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*-A white rot fungus. *Chemosphere*, 75, 1003-1007.

World Health Organization. (2005). Dichloroacetic acid in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality.

Wu, J., Zhang, L., & YAng, Z. (2010). A review on the analysis of emerging contaminants in aquatic environment. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40, 234-245.

---

---

Yan, Z., Lu, G., Wu, D., Ye, Q., & Xie, Z. (2013). Interaction of 17 $\beta$ -estradiol and ketoconazole on endocrine function in goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology*, 132, 19-25.