



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



“La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra”

**OXIDACIÓN BIOCATALÍTICA DE ANTIBIÓTICOS
SULFONAMIDAS COMO CONTAMINANTES
EMERGENTES**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

GABRIELA BAI RÁN PÉREZ

Asesor de tesis:

Dr. Eduardo Torres Ramírez

Noviembre 2017



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



“La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra”

OXIDACIÓN BIOCATALÍTICA DE ANTIBIÓTICOS SULFONAMIDAS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

GABRIELA BAI RÁN PÉREZ

Comité tutorial:

Asesor y Tutor	Dr. Eduardo Torres Ramírez
Integrante Comité Tutorial	Dr. J Santos Hernández Zepeda
Integrante Comité Tutorial	Dr. Ricardo Munguía Pérez
Integrante Comité Tutorial	Dra. Rosalía del Carmen Castelán Vega

Noviembre 2017



C. GABRIELA BAIRÁN PÉREZ

Por este conducto me permito comunicarle que los miembros del jurado integrado por:

<i>Dr. Miguel Ángel González Fuentes</i>	<i>Presidente</i>
<i>Dra. Edith Chávez Bravo</i>	<i>Secretario</i>
<i>Dra. Georgette Rebollar Pérez</i>	<i>1er. Vocal</i>
<i>Dra. María Guadalupe Tenorio Arvide</i>	<i>2do. Vocal</i>
<i>Dr. Jorge Antonio Yáñez Santos</i>	<i>Suplente</i>

designado para la defensa de su tesis "*Oxidación biocatalítica de antibióticos sulfonamidas como contaminantes emergentes*" han manifestado mediante su voto que ésta cumple con los méritos suficientes para ser defendida como tesis de grado de Maestría en Ciencias Ambientales, por lo que este Posgrado le autoriza la impresión de la misma.

Sin otro asunto en lo particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE

"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"

H. PUEBLA DE Z., NOVIEMBRE 7 DE 2017

DR. RICARDO DARÍO PEÑA MORENO
SECRETARIO ACADÉMICO



RDPM/anma
c.c.p. Archivo
c.c.p. Minutario

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada, para la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron en esta etapa de mi vida, apoyándome, animándome siempre a seguir adelante.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Eduardo Torres Ramírez por cada una de sus enseñanzas, por la paciencia, por la atención que siempre me presto y sobre todo gracias por brindarme su amistad y su confianza.

Gracias por cada una de las palabras alentadora que me dio y por la oportunidad de realizar este trabajo.

“Fue un placer para mi haber realizado este proyecto bajo su asesoría”

No puedo olvidar a mis amigos del laboratorio, los cuales hicieron que los días fueran más amenos.

Gracias al posgrado de ciencias ambientales, y al departamento de microbiología especialmente Dr. Edith Chávez por el apoyo en la realización de este proyecto.

Dedicatorias

*El éxito en la vida
no se mide por lo que logras,
sí no por los obstáculos que superas.*

Este trabajo quiero dedicarlo a mi familia, la cual siempre me han apoyado en cada una de las decisiones que he tomado.

En primer lugar, quiero dedicarlo a mis papas por su apoyo, comprensión y cariño que siempre me han dado.

A mi mamá por el apoyo incondicional que siempre me ha brindado, por cada una de sus palabras de ánimo, por sus consejos, por siempre ser una mama tan comprensiva y cariñosa, por ser más que mi mama una amiga.

A mi papa por cada uno de los consejos que siempre me has dado, por enseñarme que con esfuerzo y trabajo siempre es posible conseguir cada una de las cosas que deseamos, porque sé que siempre podre contar contigo, gracias por ser un papa ejemplar.

A mis hermanos por su cariño, su apoyo, ustedes siempre han sido mi ejemplo a seguir, a cada uno de ustedes los admiro muchísimo por las grandes personas que son.

A mi hermana Luz porque en ella siempre puedo encontrar una amiga, porque has sido siempre como mi segunda mama, porque sé que siempre estarás a mi lado cuando te necesite.

A mi hermana Lety porque siempre me has apoyado, porque cuando te he necesitado siempre has estado ahí y sé que siempre podre contar con tu apoyo y cariño, gracias por ser tan buena hermana.

A mi hermano Rubén por tu apoyo, por el ejemplo que me has dado de ser tan trabajador, por tu confianza y cariño, eres el mejor hermano.

Este nuevo logro no es solo mío es de cada uno de ustedes, gracias por estar a mi lado.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	4
III. ANTECEDENTES	5
3.1 Importancia del agua	5
3.2 Agua y su contaminación	6
3.3 Antibióticos como contaminantes emergentes	10
3.3.1 Sulfonamidas.....	15
3.4 Efectos de los antibióticos en el medio ambiente.....	19
3.4.1 Resistencia Bacteriana	19
3.5 Marco legal	20
3.6 Biocatálisis ambiental.....	22
IV. FORMULACIÓN DE LAS PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	27
V. HIPÓTESIS	27
5.1 Hipótesis general	27
VI. OBJETIVO.....	28
6.1 Objetivo general	28
6.2 Objetivos particulares	28
VII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	29
7.1 Localización.....	29
7.2 Fase de campo	29
7.2.1 Establecimiento del experimento.....	29
7.2.2 Toma de muestra de agua residual tratada	29
7.3 Fase de laboratorio.....	29
7.3.1 Establecimiento del experimento o bioensayo.....	29
7.4 Variables de respuesta	31
7.4.1 Conversión biocatalítica de antibióticos	31
7.4.2 Optimización de la transformación biocatalítica de antibióticos	34

7.4.3 Identificación de productos de reacción	36
7.4.4 Evaluación de la biodegradabilidad de antibióticos y productos de reacción	36
7.4.5 Caracterización del agua residual tratada	37
7.4.6 Pruebas de oxidación biocatalítica en el agua residual tratada	39
7.5 Pruebas de susceptibilidad en bacterias del río Santa Elena	39
7.6 Análisis estadístico	40
VIII. RESULTADOS	41
8.1 Determinación de la capacidad oxidativa de la manganosa peroxidasa (MnP)	41
8.2 Optimización de la transformación de antibióticos	43
8.3 Productos de reacción identificados (HPLC-Masa)	49
8.4 Biodegradabilidad de los antibióticos y productos de reacción	51
8.5 Planta de tratamiento de San Simón Atzitzintla	52
8.6 Caracterización del agua de la planta de tratamiento de San Simón Atzitzintla.	57
8.7 Aplicación del tratamiento biocatalítico en agua residual tratada	59
8.8 Pruebas de susceptibilidad	61
IX. MEDIDAS A IMPLEMENTAR PARA DISMINUIR EL IMPACTO AMBIENTAL DE LOS ANTIBIÓTICOS	67
X. CONCLUSIONES	69
XI. LITERATURA CITADA	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fármacos detectados en agua de diferentes zonas a concentraciones de (μgL^{-1}) (Ramos 2009).	9
Tabla 2: Ejemplos de antibióticos más comúnmente empleados en la ganadería.....	11
Tabla 3: Antibióticos encontrados en diferentes muestras y países	14
Tabla 4: Clasificación de las Sulfonamidas de acuerdo a su acción.	17
Tabla 5: Sulfonamidas ocupadas en el sector veterinario para el tratamiento de diferentes enfermedades.....	18
Tabla 6: Enzimas utilizadas en la industria (Elaboración propia).....	23
Tabla 7: Ejemplos de oxidación de antibióticos mediante el uso de enzimas oxidativas	26
Tabla 8: Antibióticos utilizados en este estudio.....	30
Tabla 9: Condiciones utilizadas en la cromatografía de alta presión para cada uno de los antibióticos	33
Tabla 10: Diseño central compuesto: variables de entrada (inferior, intermedio y superior).....	35
Tabla 11: Kits utilizados para la caracterización del agua	38
Tabla 12: Diseño central compuesto ensayado con el antibiótico sulfametoxazol: porcentaje de conversión obtenidos.....	44
Tabla 13: Productos de reacción obtenidos.....	49
Tabla 14: Valores de DBO_7 para los antibióticos de tipo sulfonamidas y productos de reacción	52
Tabla 15: Propiedades físico - químicas para el agua residual tratada de San Simón Atzitzintla	58
Tabla 16: Lecturas de bioquímicas de las cepas aisladas de las muestras de agua del río de Santa Elena.....	63
Tabla 17: Pruebas de susceptibilidad a sulfonamidas probadas a concentraciones de 25, 50, 100, 200 ppm para cada antibiótico	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fuentes y distribución de los antibióticos (Elaboración propia)	13
Figura 2: Mecanismo de acción sulfonamidas	16
Figura 3: Mecanismo de reacción de las Peroxidasas.....	24
Figura 4: Diseño de la estrategia experimental.....	31
Figura 5: Oxidación del sulfametoxazol por la Manganese Peroxidasa antes y después de 10 min de reacción.....	41
Figura 6: Curva de oxidación del sulfametoxazol.	42
Figura 7: Gráficos superficie de respuesta: efectos e interacciones de las variables dependientes sobre la respuesta.	46
Figura 8: Cinéticas de oxidación para sulfonamidas (sulfametoxazol, sulfanilamida, sulfasalazinasulfacetamida y sulfadiazina) ajustadas al modelo de primer orden (línea roja).....	48
Figura 9: Mecanismo de reacción de la enzima Dihidropteroate sintasa (DHPS).....	50
Figura 10: Diagrama de flujo planta de tratamiento San Simon Atzitzintla	57
Figura 11: Cromatogramas obtenidos para cada uno de los antibióticos al aplicar el tratamiento biocatalítico usando como medio de reacción agua residual.	60
Figura 12: Colonias bacterianas encontradas en las muestras de agua del río Santa Elena.....	62

ABREVIATURAS

CPO: Cloroperoxidasa

DBO: Demanda biológica de oxígeno

DCC: Diseño central compuesto

DQO: Demanda química de oxígeno

DHPP: Dihidropterina pirofosfato

DHPS: Dihidropteroate sintasa

EMB: Agar eosina azul de metileno

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta presión

K_m: Concentración con la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima

LIA: Agar, Lisina, Hierro

M.C: Agar MacConkey

MIO: Movilidad, Indol, Ornitina

MnP: Manganeso peroxidasa

MR: Rojo metilo

PABA: Ácido p-aminobenzoico

TSI: Triple azúcar hierro

U: Unidades enzimáticas

UFC: Unidades formadoras de colonias

VB: Agar verde brillante

V_{max}: Velocidad máxima

VP: Peroxidasa versátil

Vp: Voges proskauer

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo la aplicación de un tratamiento biocatalítico para la degradación de cinco antibióticos de la familia sulfonamidas (sulfametoxazol, sulfasalazina, sulfacetamida, sulfanilamida, sulfadiazina), mediante el uso de la enzima manganeso peroxidasa. Dicho tratamiento fue aplicado en muestras modelo, y posteriormente en muestras de agua residual de la planta de tratamiento de San Simón Atzizintla.

Se optimizaron las condiciones de ensayo en sulfametoxazol, mediante un Diseño Central Compuesto (DCC) para su análisis por el método de superficie de respuestas, cuyas condiciones óptimas fueron: 0.33 mM de Peróxido de Hidrógeno, 3.2 U de enzima y tiempo de reacción de 15 min; esta condición se aplicó para los cuatro antibióticos restantes obteniendo porcentajes de conversión mayores al 90% en 15 min.

En el caso de las muestras de agua residual tratada se aplicaron las condiciones óptimas encontradas mediante el DCC, obteniendo porcentajes de conversión mayores al 80 % para sulfametoxazol, sulfasalazina y sulfadiazina.

Por otro lado, se realizaron pruebas de susceptibilidad con el propósito de determinar de manera indirecta la presencia de sulfonamidas en la zona de estudio, mediante cepas bacterianas resistentes a sulfonamidas. Estas pruebas se realizaron en muestras de agua recolectadas en el río Santa Elena, con las cuales se aislaron colonias bacterianas para su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas. Dichas pruebas sugieren que las sulfonamidas han estado presentes en el agua del río Santa Elena, ya que las diferentes cepas bacterianas aisladas presentaron resistencia a las 5 sulfonamidas probadas y a cada una de las concentraciones estudiadas.

I. INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los recursos más importantes para la humanidad. Es un bien transversal a todas las actividades ambientales, sociales y económicas, ya que es uno de los pocos elementos sin los cuales no podría mantenerse la vida en el planeta. Sin embargo, la contaminación de este recurso es un problema ecológico que desde principios de la industrialización nos ha afectado debido a la gran cantidad de desechos que las industrias generan. Además de ello, otro factor que ha influido es el aumento de la población que demanda una mayor cantidad de agua, y por consecuencia provoca una mayor contaminación de la misma. El nivel de contaminación actual ha provocado que la naturaleza no tenga el tiempo suficiente para autopurificarse. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud el agua está contaminada “cuando su composición se ha modificado de modo que no reúne las condiciones necesarias para el uso, al que se le ha destinado en su estado natural”. Esta composición puede ser alterada por contaminantes de naturaleza química, física o biológica. Un tipo de contaminantes químicos recientemente detectados es el de los contaminantes emergentes. Estos compuestos habían pasado inadvertidos debido a que su muy baja concentración en los compartimientos ambientales (en el orden de ng o $\mu\text{g/L}$) dificultaba su detección con las técnicas instrumentales anteriores, sin embargo, con el desarrollo de técnicas más sensibles, su presencia en el medio ambiente ha sido continuamente reportada. Un contaminante emergente es un compuesto de variado origen o naturaleza química, cuyo efecto contaminante es solo recientemente reconocido, aunque no han sido regulados ni su impacto ambiental completamente entendido. Entre los contaminantes emergentes se incluyen algunos plaguicidas, productos farmacéuticos como analgésicos, antihipertensivos, antibióticos, drogas ilícitas, hormonas, y esteroides; productos de cuidado personal como protectores solares, fragancias, aditivos de cremas, etc.

Un caso particular de estos contaminantes son los antibióticos, los cuales son sustancias que sirven para matar o inhibir organismos considerados infecciosos, por lo cual se utilizan de manera común para la salud humana, y de los cuales se producen industrialmente miles de kilogramos al año. Además de su uso terapéutico, los antibióticos se utilizan también para aumentar el peso del ganado, y en agricultura para evitar las infecciones en cultivos vegetales. Esto habla de un uso intensivo de los antibióticos a nivel mundial. La contaminación ambiental por antibióticos tiene diferentes fuentes: desde los efluentes de la industria de síntesis, las excretas de animales y

humanos (que contienen restos de antibióticos no metabolizados, así como sus metabolitos), la mala disposición de antibióticos caducados y las descargas hospitalarias. Una vez presentes en el medio ambiente la distribución de estos es por diferentes vías dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de cada sustancia. El primer compartimento al que llegan los antibióticos después de su uso es principalmente el agua; de ahí puede distribuirse a suelo o sedimentos, a animales y plantas acuáticas; una parte de esta agua contaminada llega a las plantas de tratamiento, donde son depuradas tras someterse a distintos procesos de descontaminación, en donde la mayoría de compuestos orgánicos son normalmente transformados; sin embargo, debido a su actividad biológica intrínseca, se han encontrado diversos antibióticos en el efluente de salida de las plantas de tratamiento. Por lo anterior, existe una genuina preocupación e interés por el estudio del impacto ambiental de estos compuestos. Su estudio debería involucrar conocer de manera integral el problema causado por los antibióticos, desde su fuente u origen hasta los métodos de tratamiento. Este trabajo aborda en lo posible la problemática ambiental asociada a los antibióticos, y de manera específica propone un método de tratamiento sustentable complementario al existente en las plantas de tratamiento.

Para este estudio, se ha seleccionado la familia de los antibióticos sulfonamidas. De acuerdo con lo que ha sido reportado en la literatura científica esta familia es la de efecto ambiental más grave. Para abordarlo se estudiaron en primer lugar, las causas de la contaminación por estos compuestos, su distribución en los compartimientos ambientales, su toxicidad, así como su impacto en el medio ambiente. En segundo lugar, se diseñaron las condiciones de reacción para la remoción de los contaminantes seleccionados mediante un Diseño Central Compuesto, y la optimización mediante el estudio de superficie de respuesta. Lateralmente, se visitó y describió la zona de estudio seleccionada “San Simón Atzizintla” como zona modelo para aplicar las tecnologías desarrolladas en el laboratorio. En la corriente de agua del río Santa Elena se encontraron microorganismos resistentes a los antibióticos seleccionados como un indicativo de que estos compuestos han estado presentes en la zona de estudio el tiempo suficiente para generar microorganismos resistentes. Debido a las condiciones de trabajo de la planta de tratamiento es muy probable que los compuestos no hayan sido transformados y por lo tanto, regresados a la corriente de agua sin alteración dado que se encontró que son resistentes a la cloración. El estudio incluyó pruebas de degradación en muestras de aguas residuales tratadas, de degradabilidad bajo los métodos de la OCDE y de identificación de los productos de reacción. Con los resultados logrados se concluye, que las

tecnologías estudiadas son potencialmente útiles en la degradación de contaminantes emergentes del tipo antibiótico sulfonamidas en aguas residuales tratadas.

II. JUSTIFICACIÓN

Debido al impacto ambiental que los antibióticos están causando, es importante estudiar la problemática general para proponer soluciones que permitan minimizar la presencia e impacto de estos contaminantes en los cuerpos de agua. Uno de los enfoques dirigido a contribuir a disminuir el impacto ambiental, es el desarrollo de tecnologías sustentables para el tratamiento complementario de efluentes residuales.

En la actualidad existen muchos tratamientos ya reportados para la degradación de estos contaminantes entre los que destacan los tratamientos fisicoquímicos en los que incluye la ultrafiltración, oxidación, y empleo de adsorbentes y los tratamientos biológicos que son tratamientos con membrana y combinados.

Esta investigación tiene como finalidad evaluar una técnica especialmente interesante para la degradación de antibióticos como lo es la biocatálisis ambiental. Dicha técnica tiene como propósito transformar (oxidar) contaminantes a compuestos menos tóxicos o sin toxicidad, mediante el uso de enzimas oxidativas. Las enzimas son catalizadores sustentables ya que se producen ecológicamente a partir de organismos vivos, son moléculas fácilmente biodegradables, generan mínima o nula cantidad de desechos contaminantes.

Este tratamiento presenta ciertas ventajas en comparación a los otros tratamientos, entre ellas las siguientes: no demanda energía, son métodos de tratamiento rápidos, trabaja en condiciones suaves de operación, por lo que es amigable con el medio ambiente.

La justificación social de este proyecto radica en la contribución de la tecnología aplicada en el mejoramiento de la calidad del agua residual tratada.

III. ANTECEDENTES

3.1 Importancia del agua

El agua es uno de los recursos naturales indispensables para la vida, es un elemento de la naturaleza integrante de los ecosistemas naturales, fundamental para el sostenimiento y la reproducción de la vida en el planeta ya que constituye un factor indispensable para el desarrollo de los procesos biológicos, no existe sustituto para esta ya que no se conoce una forma de vida que prescindiera de ella.

Es esencial para que vegetales, animales, el ser humano y todas las formas de vida conocidas puedan existir, no debemos olvidar que los organismos de todos los seres vivos están compuestos de una alta proporción de agua, así, el agua se vuelve un elemento de suma importancia para la existencia de la vida.

El agua es un bien de primera necesidad para los seres vivos y un elemento natural imprescindible en la configuración de los sistemas medioambientales, no solo es importante como recurso vital sino también como recurso económico e industrial. En México, más del 75% del agua dulce de que se dispone se usa en actividades agrícolas, y de esta, el 57% se pierde o desperdicia por utilizar métodos o una infraestructura ineficiente. (FEA et al., 2006). La cantidad de agua que se tiene en el planeta relativamente no varía, la variación radica en la forma y la calidad en la que se encuentra esta. El desperdicio y la contaminación han causado que en 50 años el país disponga de menos de la mitad del agua y que México sea catalogado como un país con una disponibilidad de promedio baja, esto puede llegar a empeorar en los próximos 50 años, en la medida que aumente la población y que el cambio climático global perturbe los regímenes de precipitaciones (Villazán et al., 2013).

La disponibilidad de agua gobierna la vida y en consecuencia a los ecosistemas y, de manera paradójica, los ecosistemas llegan a influir en la disponibilidad, la cantidad y la calidad del agua. Por ejemplo, los bosques y las selvas están estrechamente vinculados con la dinámica del agua y, en consecuencia, con la diversidad de flora y fauna silvestres. Estos ecosistemas conforman una barrera física capaz de retener el agua y recargar los acuíferos subterráneos. Anteriormente el agua era considerada como un recurso inagotable y es por ello que no existía la preocupación por protegerla, hoy se sabe que no es así, ya que el acelerado

empobrecimiento del recurso y la grave escasez que padecen millones de personas nos han obligado a tomar medidas para protegerla y buscar nuevas tecnologías para su descontaminación.

Referente a esto la agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible incluyó un objetivo específico sobre agua y saneamiento (ODS6), el cual establece “garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y el saneamiento para todos.” Entre las metas que dicho objetivo se propone son: mejorar la calidad del agua, esto reduciendo la contaminación, eliminando el vertimiento y minimizando la emisión de productos químicos y materiales peligrosos, y con esto lograr reducir a la mitad el porcentaje de aguas residuales sin tratar y aumentando considerablemente el reciclado y la reutilización sin riesgos a nivel mundial.

Otra de las metas es la creación de capacidad en actividades y programas relativos al agua y el saneamiento, como los de captación de agua, desalinización, uso eficiente de los recursos hídricos, tratamiento de aguas residuales, reciclado y tecnologías de reutilización.

3.2 Agua y su contaminación

El agua es un recurso natural indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente; lamentablemente, como consecuencia del rápido desarrollo humano, económico y el uso inadecuado que se le ha dado, ha sufrido un continuo y alarmante deterioro (Barceló y López, 2007). A pesar de que el agua es uno de los elementos más comunes en la tierra, solo podemos hacer uso de una mínima cantidad de ella. La problemática de la disponibilidad de agua se agrava si consideramos que una gran parte de la que podríamos utilizar no tiene las características que requerimos o bien está contaminada. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el agua está contaminada “cuando su composición se haya modificado de modo que no reúna las condiciones necesarias para el uso, al que se le hubiera destinado en su estado natural”.

El problema de la contaminación del agua no es nuevo pues ha acompañado al hombre en toda su historia. Sin embargo, el deterioro más severo y extendido de los ríos y lagos del mundo se ha dado a partir del siglo XVIII con el inicio de la revolución industrial y la implementación de una variedad de procesos de transformación que empleaban grandes volúmenes de agua y, en consecuencia, también generaban enormes cantidades de agua de

desecho (SEMARNAT 2005).

La industrialización ha tenido graves repercusiones en la calidad del agua y el medio ambiente. Se calcula que la producción global de aguas residuales es aproximadamente de 1 500 km³, tomando en cuenta que un litro de aguas residuales contamina 8 litros de agua dulce, la carga mundial de contaminación puede ascender actualmente a 12 000 km³.

De acuerdo con la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), en México, la industria y la agricultura son las responsables de la mayor contaminación del recurso agua, ya que menos de 25% del agua residual que se vierte a ríos y lagos es tratada. Por su parte, la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) afirma que sólo se trata 15% de las aguas residuales y que la industria consume 6 km³ de agua y descarga anualmente 5.3 km³ de aguas residuales. Otro factor que ha influido es el aumento de la población ya que la demanda de agua es mayor, y la generación de desechos por las diferentes actividades cotidianas, se ha incrementado de manera exponencial en las últimas generaciones.

La presencia de una nueva clase de contaminantes ha sido motivo de estudio, debido al impacto ambiental que estos están generando, estos son los llamados contaminantes emergente, dentro de los cuales los que probablemente suscitan mayor preocupación, son los fármacos, estos compuestos incluyen antibióticos, hormonas, analgésicos, tranquilizantes y productos de quimioterapia. El primer estudio sobre la contaminación por productos farmacéuticos tuvo lugar en una planta de tratamiento de residuos de Kansas City en 1976. Los resultados fueron publicados y luego ignorados por 15 años, sin embargo, en los últimos años se ha presentado un especial interés en ellos (Hignite C y Azarnoff D 1977). Los compuestos farmacéuticos han sido encontrados principalmente en aguas superficiales y subterráneas e incluso en agua potable; así como en suelo, organismos acuáticos y terrestres, y en menor proporción en aire en forma de aerosoles. Las concentraciones a las que se han encontrado en agua se sitúan normalmente en el rango de ng/L o µg/L, mientras que, en suelos y sedimentos en donde pueden persistir durante largos periodos de tiempo, alcanzan concentraciones de hasta g/Kg (Hernando M et al., 2006).

Los productos farmacéuticos, una vez que llegan al agua, pueden ser transportados y distribuidos al aire, suelo o sedimentos, dependiendo las propiedades fisicoquímicas del producto, de las condiciones atmosféricas y de las características del medio receptor.

En la Tabla 1 se ejemplifican algunos fármacos que han sido encontrados como contaminantes de agua residual, efluentes de las plantas de tratamiento y agua superficial (Ramos, 2009).

Tabla 1: Fármacos detectados en agua de diferentes zonas a concentraciones de (μgL^{-1}) (Ramos 2009).

Familia	Medicamento	[μgL^{-1}]		
		Agua residual	Efluente de planta de Tratamiento	Agua superficial
Antibiótico	Trimetoprin	0,0002 - 10,7	0,154 - 0,39	0,00003
	Sulfametoxazol	0,001 - 79,9	0,128 - 0,62	0,0001- 0,050
	Eritromicina	0,03 - 3,9	0,0006 - 1,1	0,034 - 0,0017
	Claritromicina	0,46 - 1,7	0,21	0,0001- 0,0006
	Roxitromicina	0,025 - 1,7	0,54 - 0,87	0,0001- 0,0006
	Metronidazol	0,006 - 24,5	---	---
	Ciprofloxacina	0,2 - 124,5	0,249 - 0,40	0,0001
	Ofloxacina	0,2 - 7,6	0,600	0,0331 - 0,306
	Tilosin	1,5	0,128 - 0,88	0,002 - 0,050
Antiinflamatorio	Diclofenaco	0,35 - 4,114	0,005 - 2,13	0, 225
	Ibuprofeno	1,200 - 84	0,005 - 7,3	0,226
	Naproxeno	0,700 - 17,1	0,025 - 1,84	0,068 - 0,266
	Ketoprofeno	0,289 - 2,0	0,005 - 0,21	---
	Indometacina	0,64 - 0,95	0,10 - 0,507	---
	ÁcidoMetanámico	---	---	0,068
Reguladores lípidos	Bezafibrato	0,42 - 7,60	0,005 - 4,6	0,27 - 3,1
	Ácido Clofibrico	< 0,066 - 1,0	0,066 - 0,361	0,270
	Fenolibrato	< 0,026	< 0,026 - 2,35 3	---
	Gemfibrozil	0,965	0,436 - 2,366	---

3.3 Antibióticos como contaminantes emergentes

Los antibióticos se encuentran entre los medicamentos más vendidos y consumidos en México: representan un mercado anual de 960 millones de dólares y el segundo lugar en ventas anuales (14.3%) en farmacias privadas en el país, que es una proporción mayor comparada con la de otros países con mercados farmacéuticos grandes (Dresler et al., 2008). El uso de antibióticos no está restringido para el consumo humano, un buen porcentaje es utilizado en el sector pecuario, esto con propósitos terapéuticos, de prevención en eventos con alto riesgo de infección y como promotores de crecimiento. Se calcula que aproximadamente la mitad de las 22 mil toneladas de antibióticos que se producen anualmente en los Estados Unidos de América se destinan a los animales (Steinfeld et al., 2009). De acuerdo lo publicado en el libro “La larga sombra del ganado”, el Instituto de Medicina de los Estados Unidos de América estima que cerca del 80 por ciento de los antibióticos administrados al ganado en este país se suministran por razones no terapéuticas. Entre los antibióticos más utilizados en la ganadería se encuentran las sulfonamidas, penicilinas, tetraciclinas, neomicina, bacitracina, estreptomicina, gentamicina, y cloranfenicol. En la Tabla 2 se muestran información de este grupo de antibióticos.

Tabla 2: Ejemplos de antibióticos más comúnmente empleados en la ganadería
(Elaboración propia)

Compuesto	Modo de acción	Aplicación
Penicilina (β-lactámicos)	Inhibe el paso en la síntesis de la pared celular y mueren	Infecciones causadas, por lo general por organismos Gram positivos como los estreptococos y los estafilococos, pero también las originadas por bacterias Gram negativas como los meningococos y los gonococos.
Tetraciclina (tetraciclina)	Inhibición de la síntesis de proteínas	La neumonía y otras infecciones en las vías respiratorias; el acné; infecciones en la piel, los genitales y el sistema urinario; y la infección que causa úlceras estomacales (<i>Helicobacter pylori</i>)
Neomicina (aminoglucósidos)	Inhibición de la síntesis de proteínas	Infecciones de la piel provocadas por bacterias
Estreptomina (aminoglucósidos)		Nefrotóxica y ototóxica
Gentamicina (aminoglucósidos)		
Bacitracina (aminoglucósidos)	Interfiere con la desfosforilación del C ₅₅ -fosfato de isoprenil, una molécula que transporta los elementos estructurales del peptidoglicano en la membrana celular bacteriana	Infecciones de la piel y los ojos y la prevención de infecciones en heridas. A menudo se usa como cuidado preventivo después de la aplicación de tatuajes
Sulfonamidas (Sulfas)	Inhiben a las bacterias tanto grampositivas como gramnegativas.	Infecciones urinarias, respiratorias, nocardiosis, toxoplasmosis, colitis ulcerosa, dermatitis, enfermedades infecciosas.

Respecto a la contaminación provocada por antibióticos, el proceso de ingreso y distribución en el ambiente se describe brevemente a continuación (Figura 1). Las fuentes de antibióticos como contaminantes son la agroindustria, los efluentes hospitalarios y doméstico, y la industria de síntesis química (Quesada et al., 2009). Los antibióticos provenientes de dichas fuentes son distribuidos de diferentes formas al medio ambiente; por ejemplo, en el caso de la agroindustria, una vez que el antibiótico es suministrado al ganado una porción importante no se degrada en el cuerpo del animal y es desechado mediante las excretas (excremento y orina) en el caso de sulfametoxazol y sulfadiazina es excretado un 14% y 57% mediante orina y un 80-85 % y 40-45% mediante biotransformación respectivamente (Vives et al., 2004); una parte de éstas, contamina al suelo y posteriormente al agua subterránea; el excremento es en ocasiones aplicado como abono por lo que contamina tanto al suelo, a los cultivos y a la aguas subterráneas. La contaminación por antibióticos desde la industria de síntesis, domicilios y hospitales son incorporadas directamente al drenaje o aguas superficiales debido a un inadecuado o carente tratamiento de los efluentes líquidos de estas fuentes.

Solo una parte de cuerpos de agua contaminados llegan a las plantas de tratamiento (alrededor del 40% en México) (Peña et al., 2013), en donde las diferentes etapas de tratamiento disminuyen importantemente el nivel de contaminación del agua; sin embargo, algunos de los antibióticos resultan ser resistentes a los procesos metabólicos tanto en los compartimientos ambientales como en el reactor biológico de las plantas de tratamiento, ya que han sido detectados a la salida de éstas. Debe recordarse que estos compuestos están sintetizados o producidos con la función de eliminar bacterias, por lo que son resistentes al ataque microbiano. Al salir de la planta de tratamiento sin transformación los antibióticos son reincorporados a las corrientes de agua, en donde estas son utilizadas con diferentes fines como el riego de cultivos, para producción de agua potable, o solo reincorporadas a los cuerpos de agua. En los tres casos los antibióticos tienen un impacto ambiental en diferentes grados que debe estudiarse para cuantificarse y remediarse.

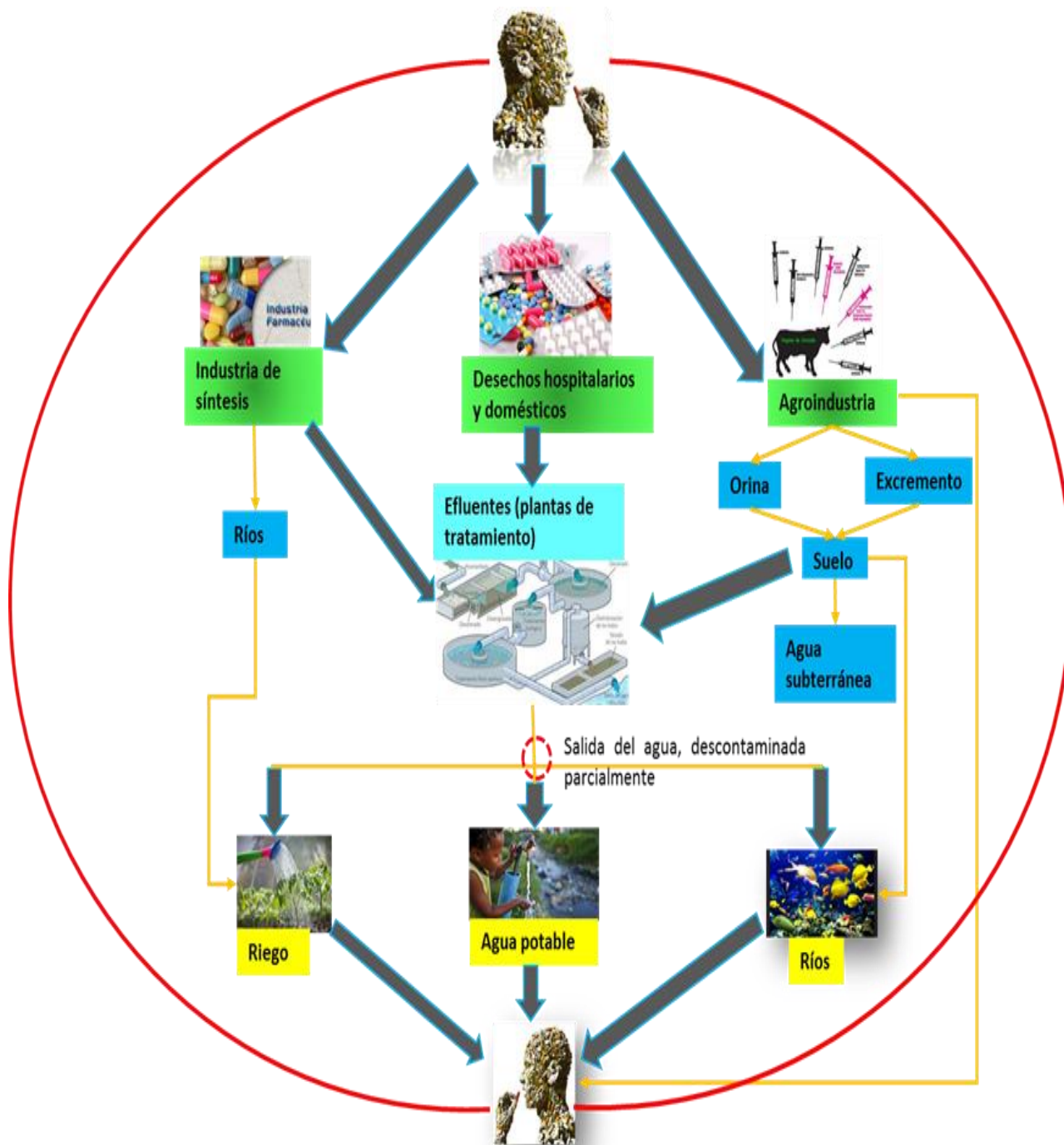


Figura 1: Fuentes y distribución de los antibióticos (Elaboración propia)

Diferentes estudios han reportado la presencia de antibióticos en ríos, aguas de mar, plantas etc. En la tabla 3 se resumen dichos estudios, así como a la concentración a la que se han detectado.

Tabla 3: Antibióticos encontrados en diferentes muestras y países (Elaboración propia)

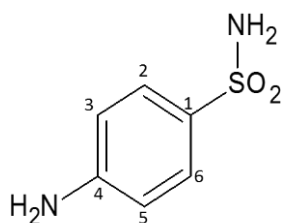
País o lugar	Antibiótico	Tipo de muestra	Concentración	Referencia
España	Sulfametoxazol Sulfadiazina	Salida de una depuradora de aguas residuales	24.6 µg/l 10.5 µg/l	Fundación TEKNIKER, 2010
Bejín	Sulfonamidas	Agua residual municipales	2916 µg/l	W. Li et al., 2013
España	Sulfametoxazol Tetraciclina	Ríos (Jarma, Mazanares, Guadarrama, Henares, Tajo)	326 µg/l 23 ng/l	R. López-Serna et al., 2013
China	Oxitetraciclina	Río (Perla, amarillo, Hai, Liao)	652 ng/l	X. Peng et al., 2009; 2011; 2008
Corea	Sulfonamidas	Estiércol (Ganado vacuno, porcino y avícola)	0.49, 8.44, 1.39 mg/kg	X. Li et al., 2013; G. Na et al., 2013; X. Hu et al., 2010
China	Oxitetraciclina Tetraciclina Sulfametoxazol	Plantas (Hojas de cilantro) Hojas de rábano	78-330 mg/kg 1.9-5.6 mg/kg 2.7 mg/Kg	X. Hu et al., 2010
Bahía de Bohai	Sulfametoxazol	Agua de mar	0.51-6.3 ng/l	Q. Zheng et al., 2012
Mar Amarillo	Sulfametoxazol	Agua de mar	0.10-16.6 ng/l	R. Zhang et al., 2013
China	Tetraciclina Sulfonamidas	Agua de mar	2.11-9.23 ng/l	G. Na et al., 2013
China	Tetraciclina Sulfonamidas	Sedimentos y organismos acuáticos	71.32 mg/kg 2.18-63.87 mg/kg	G. Na et al., 2013

Como se puede ver en la tabla anterior la detección de antibióticos en los diferentes compartimentos es un tema desactualizado en la literatura científica. A pesar de que se encuentran en concentraciones bajas, su actividad biológica y efectos en el ambiente son de preocupación mundial. Entre los antibióticos con mayor reporte se encuentra el sulfametoxazol, éste antibiótico fue encontrado en los diferentes compartimentos de diferentes países. Es importante resaltar que los antibióticos de la familia sulfonamida son parcialmente resistentes a la degradación en los reactores biológicos de las plantas de tratamiento (véase tabla 3 el ejemplo de España).

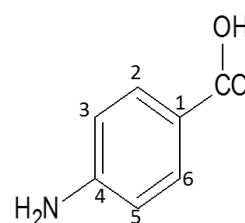
3.3.1 Sulfonamidas

Las sulfonamidas fueron las primeras drogas eficaces empleadas para el tratamiento sistémico de infecciones bacterianas en el ser humano.

Estos fármacos contienen un grupo sulfuro unido a un anillo de benceno y grupos NH_2 , su compuesto base es la sulfanilamida, cuya estructura es similar al PABA (ácido p-aminobenzoico), factor requerido por las bacterias para la síntesis del ácido fólico. El grupo amino libre ($-\text{NH}_2$) en posición 4 es importante ya que dicha molécula está relacionada con su actividad antibacteriana, inhibiendo a la enzima dihidropteroato. Las sustituciones a nivel del radical sulfonilo modifican las características farmacocinéticas, pero no la actividad antibacteriana. Las sustituciones en el grupo amino en posición 4 dan compuestos de menor absorción intestinal (Cue Bruguera et al., 1999).



Estructura general de las Sulfanilamidas



Estructura Ácido p-aminobenzoico (PABA)

El mecanismo de acción de las sulfonamidas es esquematizado en la figura 2. Las sulfonamidas en concentraciones terapéuticas bajas son bacteriostáticas porque interfieren con la transformación del ácido p-aminobenzoico (PABA), lo que impide la formación del ácido fólico, por lo que la bacteria no puede continuar sus procesos vitales y de reproducción (Calvo y Martínez, 2008). Las sulfonamidas son inhibidores competitivos; es decir, forman un complejo con la enzima Dihidropteroato sintasa en el mismo sitio de reconocimiento al cual se une el PABA; por lo que en presencia de antibiótico, la enzima es incapaz de catalizar la síntesis del ácido fólico; sin dicho metabolito las bacterias no pueden sintetizar los ácidos nucleicos (ADN) que necesitan para su crecimiento.

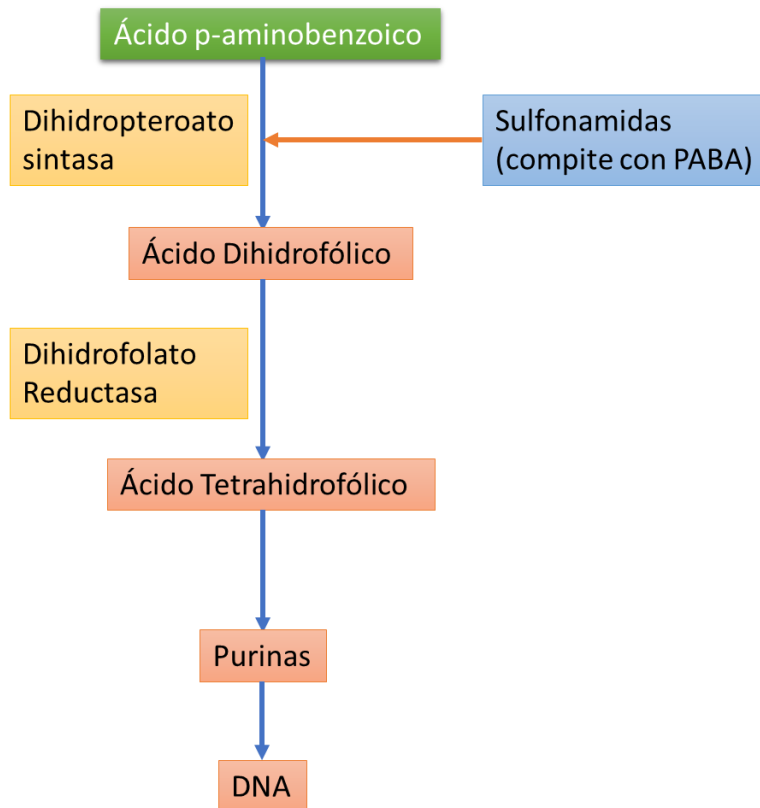


Figura 2: Mecanismo de acción sulfonamidas

Por sus características farmacocinéticas las sulfonamidas pueden clasificarse en: sulfonamidas de acción rápida, acción intermedia, acción prolongada, no absorbibles y uso tópico. En la tabla 4 se ejemplifica dicha clasificación.

Tabla 4: Clasificación de las Sulfonamidas de acuerdo a su acción. (Elaboración propia)

Acción rápida	Acción intermedia	Acción prolongada	No absorbibles	Uso tópico
Sulfametizol	Sulfametoxazol	Sulfadimetoxina	Sulfasalazina	Sulfasalazina
Sulfamerazina	Sulfadiazina	Sulfadimidina	Sulfasuxidina	Sulfacetamida
Sulfasomidina	Sulfamoxol	Sulfapiridina	Sulfatalidina	Sulfanilamida
Sulfatiazol	Sulfametrol	Sulfamonometoxina	Ftalilsulfatiazol	Sulfadiazina de plata

En el sector salud las sulfonamidas son prescritas para tratar infecciones del tracto urinario, infecciones oculares, infecciones de quemaduras, colitis ulcerativa, artritis reumatoide, toxoplasmosis, etc. La amplia gama de aplicaciones y el tipo de enfermedades tratadas convierten a las sulfonamidas en agentes sumamente importantes para la medicina veterinaria. En la tabla 5 se puede ver que las sulfonamidas inhiben tanto a bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas, son utilizadas en el tratamiento de infecciones de origen bacteriano, coccidial y protozoario de numerosas especies de animales (Oie, 2015).

Tabla 5: Sulfonamidas ocupadas en el sector veterinario para el tratamiento de diferentes enfermedades. (Elaboración propia)

	Géneros bacterianos	Grupo de enfermedades	Especie animal
Gram negativas	Escherichia coli Proteus Salmonella	Enteritis y septicemias	Gallina: colisepticemia, enteritis infecciosa, infecciones del ombligo Cerdo: colibacilosis, enteritis, septicemia Ternera: colibacilosis, enteritis, septicemia Cordero: enteritis, septicemia Potro: septicemia
	Pasteurella Bordetella Haemophilus	Enfermedades del aparato respiratorio y septicemias	Gallina: coriza aviar Cerdo: bronconeumonía, rinitis atrófica, neumonía, pleuroneumonía Ternera: neumonía
Gram positivo	Fusobacterium Necrophorum	Infecciones del aparato respiratorio y heridas infectadas	Cerdo: Influenza, heridas infectadas Ternera: Difteria, septicemia
	Staphylococcus Streptococcus	Abscesos, heridas infectadas, artritis, septicemias	Gallina: Artritis, heridas infectadas, infecciones del saco vitelino, septicemia Cerdo: absceso, septicemia, neumonía, artritis, meningitis
	Listeria Erysipelotrix	Septicemias	Aves de corral: Septicemias, encefalitis Pavo, pato, ganso: Septicemias

3.4 Efectos de los antibióticos en el medio ambiente

Los antibióticos en el medio ambiente provocan efectos negativos tanto para el ser humano como para los organismos acuáticos y terrestres. Algunas de las afectaciones que estos pueden provocar es la mutagenicidad, tal es el caso del sulfametoxazol, usado en medicina humana y veterinaria, el cual ha sido frecuentemente encontrado en concentraciones de $0.01-2 \mu\text{g l}^{-1}$ en aguas superficiales (Bahnmüller et al, 2014); a estas concentraciones ha resultado ser mutagénico, aunque no agudamente tóxico, para algunos organismos acuáticos, y fitotóxico para las algas. Una consecuencia detectada y reportada es que la presencia continua de antibióticos en el ambiente ha producido que las bacterias generen resistencia.

3.4.1 Resistencia Bacteriana

La resistencia a los antibióticos es la capacidad de las bacterias para soportar el efecto de los antibióticos sobre ellas, las bacterias pueden volverse resistentes por una mutación en sus genes o por la adquisición de genes de resistencia presentes en otro microorganismo, este es un proceso natural; sin embargo, el uso indiscriminado de antibióticos ha acelerado este proceso.

Entre las fuentes de antibióticos que provocan resistencia microbiana se encuentran: el entorno clínico debido al uso ampliamente extendido de los mismos, aguas residuales de hospitales, municipios, industria farmacéutica, la agricultura, el ganado y en general los animales destinados a consumo (Rocha et al., 2015).

Se ha estimado que la producción total de antibióticos administrados al ganado en los Estados Unidos (EE. UU.), Australia y China es igual o mayor a lo administrado en humanos, así mismo, se estima que el 80% de los 8 millones de pollos destinados a consumo humano cada año en los EE. UU son tratados con antibióticos para prevenir muerte temprana.

Cada vez es más evidente el incremento de la resistencia bacteriana, por ejemplo, para algunas bacterias aisladas de tratamientos biológicos de aguas residuales se han encontrado genes de resistencia a las sulfonamidas (Larcher y Yargeau, 2012). El reporte *antimicrobial resistance: Global report on surveillance 2014*, elaborado por la Organización Mundial de la

Salud (OMS) indica que existen diferentes microorganismos que ya presentan variaciones resistentes a antibióticos en niveles difícil de ignorar. Entre las enfermedades provocadas están la tuberculosis, influenza, malaria; algunos microorganismos resistentes son *Escherichia coli* y el *Staphylococcus aureus*.

Tal es el grado de la resistencia bacteriana que algunos medicamentos están perdiendo su efectividad, estos son sobre todo medicamentos derivados de la penicilina y del grupo de los beta-lactámicos, al igual que las cefalosporinas y tetraciclinas. En el caso especial de las sulfonamidas la resistencia de estas está muy extendida, tanto para gérmenes comunitarios como nosocomiales. Los microorganismos desarrollan resistencia por mecanismos que pueden ser de naturaleza cromosómica o extracromosómica, a través de mutaciones que producen una enzima dihidropteroato sintetasa alterada, que puede llegar a ser hasta 1.000 veces menos sensible al antibiótico (Smilack J.D.1999). La resistencia también puede darse a nivel metabólico por aumento de la producción de PABA lo que neutraliza la competencia de las sulfas.

Adicionalmente, los mecanismos de resistencia a sulfonamidas están relacionados con la adquisición de genes mutantes mediante elementos móviles, se han descrito los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* relacionados con integrones que codifican formas mutantes de la enzima dihidropteroato sintasa, que no son inhibidas por el antibiótico (Susan M. et al., 2011).

3.5 Marco legal

Entre las legislaciones relacionadas uso o disposición de los antibióticos, se puede mencionar a la Ley Federal de Sanidad Animal, que tiene por objeto fijar las bases para el diagnóstico, prevención, control y erradicación de las enfermedades y plagas que afectan a los animales; procurar el bienestar animal y regular las buenas prácticas pecuarias (DOF 07/06/2012). Esta ley en su Artículo 18 inciso VII, establece las medidas en materia de buenas prácticas pecuarias mediante la emisión de disposiciones de reducción de riesgos de contaminación, las cuales podrán comprender los requisitos, especificaciones, criterios o procedimientos sin perjuicio de otras disposiciones legales aplicables en materia de salud para establecer los límites máximos de residuos permitidos de antibióticos, compuestos hormonales, químicos

y otros productos equivalentes. Sin embargo, dichos límites no están explícitamente indicados en la ley.

Respecto a la regulación de la venta de los antibióticos en el Diario Oficial de la Federación (DOF) se establece el Acuerdo por el que se determinan los lineamientos a los que estará sujeta la venta y dispensación de antibióticos (DOF: 27/05/2010). En dicho Acuerdo se hace mención que la venta y dispensación de antibióticos deberá llevarse a cabo única y exclusivamente contra la exhibición de la receta médica correspondiente; sin embargo, no existe ningún apartado en el que se establezca la cantidad de antibióticos que debe dispensarse.

El primer documento oficial en el que aparece la lista de fármacos incluidos los antibióticos es en la NOM-040-ZOO-1995, posteriormente la NOM -064-2000 establece los lineamientos para clasificar a los medicamentos según el nivel de riesgo; sin embargo, no aparece la lista de medicamentos, sino que aparece en un complemento de dicha norma, en la cual clasifica a los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos: el Grupo I compuesto por aquellos ingredientes activos de productos farmacéuticos veterinarios restringidos para venta mediante receta médica cuantificada y uso exclusivo del médico veterinario; Grupo II conformado por aquellos ingredientes activos de productos farmacéuticos veterinarios que para su comercialización requieren receta médica simple; y el Grupo III, consideran aquellos ingredientes activos de productos farmacéuticos veterinarios de libre venta en el país.

Para el caso especial de las sulfonamidas, estas están clasificadas en el Grupo II como quimioterapéuticos y requiere de receta médica simple para su venta.

El acuerdo antes mencionado sufrió una modificación en el cual ya no aparecen los antibióticos como promotores de crecimiento, por lo cual SAGARPA emitió un aviso oficial el cual establece que queda “prohibido” el uso de los antibióticos como promotores de crecimiento; sin embargo, de acuerdo al reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal (RLFSA, 2012), los registros de productos ante SAGARPA deben renovarse cada 5 años, y la gran mayoría de productos farmacéuticos veterinarios se presentaron a renovación a finales del 2013 y principios de 2014, por lo cual estos pueden seguirse utilizando hasta que se renueve su registro, a finales del 2018 y principios de 2019.

En materia de medio ambiente, la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGGEPA) junto con la Ley de Sanidad Fitopecuaria se encargan de establecer las especificaciones en materia de salud ambiental; enfatizando en políticas ambientales, protección al ambiente y contaminación del suelo y agua (SAGARPA, 2015; LGEEPA, 2012), dentro de la cual no se encontró nada relacionado al uso de antibióticos como contaminantes.

3.6 Biocatálisis ambiental

La contaminación e impacto ambiental de los fármacos como contaminantes requieren de diferentes estrategias para su estudio y tratamiento. Debido a que los antibióticos de la familia de las sulfonamidas son parcialmente resistentes a la degradación en los sistemas naturales, y aún en las plantas de tratamiento, es importante investigar e implementar tecnologías sustentables para su tratamiento. Una técnica con potencial de aplicación en la remediación de la contaminación por antibióticos es la biocatálisis ambiental.

La biocatálisis ambiental tiene como propósito el tratamiento de contaminantes orgánicos, con el objetivo de transformarlos a compuestos menos tóxicos o biodegradables, para esto se necesita de enzimas poco selectivas y específicas, con una amplia variabilidad de sustratos (Torres Eduardo y Méndez Albores, 2014).

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas, aceleran la velocidad de reacción miles o millones de veces.

Los procesos enzimáticos se consideran sustentables debido a las características que las enzimas poseen, estas son las siguientes:

Son altamente eficaces y específicos, esto debido a que tienen un gran poder catalítico y un elevado rendimiento; funcionan en condiciones suaves, a presión atmosférica, temperatura ambiente y amplios intervalos de pH; son biodegradables; se producen ecológicamente a partir de organismos vivos y nutrientes naturales.

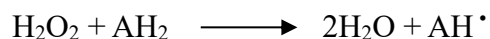
Debido a estas características las enzimas han sido consideradas como catalizadores muy atractivos para su empleo en diversas áreas industriales, en la Tabla 6 se muestran algunos ejemplos del uso que se les da.

Tabla 6: Enzimas utilizadas en la industria (Elaboración propia)

Industria	Enzima	Aplicación
Panificadora	Lipoxidasa	Blanqueamiento de la harina y contribuye a formar una masa más blanda
	Amilasa	Hidrólisis del almidón a azúcares más sencillos
Cervecera	Amilasas	Hidrólisis del almidón a azúcares más sencillos
	Papaína	Fragmentación de las proteínas presentes en la cerveza y evita que ésta se enturbie durante el almacenamiento o la refrigeración.
Vinificación	Pectinasas	Mejora en la clarificación y extracción del jugo
	Glucosa-oxidasa	Evita el oscurecimiento y los sabores desagradables
Cárnica	Papaína, fiscina	Ablandamiento de carne
	Bromelina	Producción de hidrolizados
Papelera	Hemicelulasas	Refuerzan el blanqueo del papel (bleach-boosting)
	Celulasas	Aclaramiento de la lignina o celulosa
	Oxidoreductasas	

En cuanto al tratamiento ambiental, dos familias particularmente interesantes son las peroxidasas y las lacasas.

Las peroxidasas son hemoproteínas que 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).



Donde el AH₂ representa un compuesto aromático reducido, y AH[•] al compuesto aromático oxidado. El mecanismo de reacción de las peroxidasas es por radicales libres, por lo que se genera un radical que es posteriormente estabilizado reaccionando con otro compuesto de

diferente o de la misma naturaleza (Fig. 3), generándose en ocasiones polímeros del compuesto; o si el radical es estabilizado por oxígeno, se generan hidróxidos o quinonas. En ambos casos, los productos exhiben propiedades de toxicidad menores y una mayor degradabilidad (para el caso de hidróxidos o cetonas) o una mayor facilidad para removerlos posteriormente por filtración o adsorción para casos de polímeros.

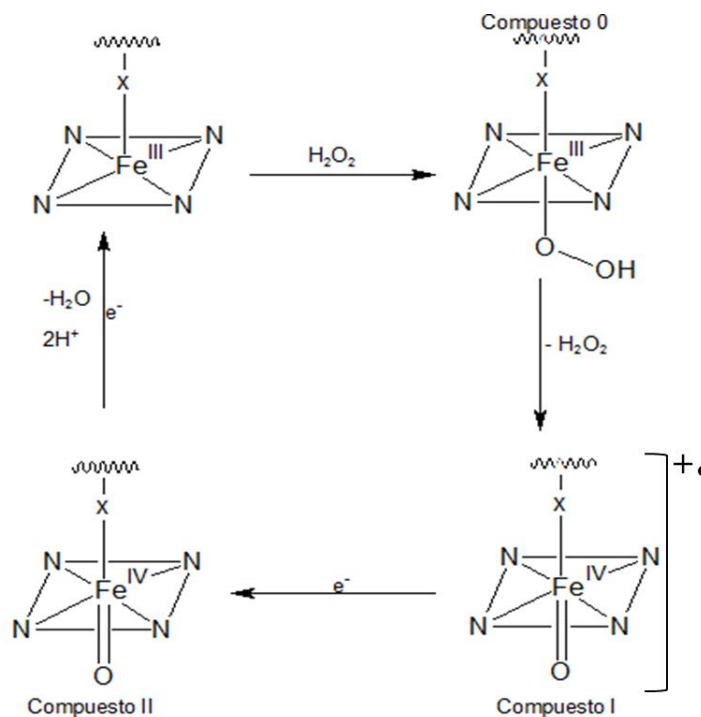


Figura 3: Mecanismo de reacción de las Peroxididasas.

La enzima manganeso peroxidasa (MnP) es ampliamente distribuida entre los hongos causantes de pudrición blanca, es una hemoproteína con fuerte preferencia por Mn⁺² como sustrato, este lo oxida a Mn⁺³, utilizando el peróxido de hidrogeno, como agente oxidante, en la reacción que se ilustra a continuación



El Mn^{+3} funciona como mediador redox, ya que puede oxidar a diversos sustratos de naturaleza aromática, como los fenoles y algunos de sus derivados. La enzima puede funcionar a veces sin la presencia de manganeso catalizando la oxidación directamente de varios compuestos contaminantes. Debido a esta función, al enzima suele llamarse también peroxidasa versátil.

Para el caso de los contaminantes farmacéuticos en especial los antibióticos, se han realizado diferentes estudios, en los cuales mediante procesos enzimáticos se han obtenido productos con menor actividad antimicrobiana, por ejemplo, el caso de triclosán en donde se obtuvo una conversión del 90% en 60 min y sulfadimetoxina reportando una conversión del 100% en 30 min. Como se puede observar las enzimas son utilizadas en diferentes tipos de antibióticos, y en algunos casos se obtienen productos de menor toxicidad, mientras que en otros no se han realizado estudios de toxicidad o degradabilidad, que es algo necesario de estudiar para proponer una determinada tecnología de tratamiento. En la Tabla 7 se resumen algunos ejemplos reportados de aplicación de enzimas oxidativas para la oxidación de antibióticos.

Tabla 7: Ejemplos de oxidación de antibióticos mediante el uso de enzimas oxidativas

Antibiótico	Enzima	Conversión (%)	Referencia
Triclosán	MnP (manganeso peroxidasa)	90% en 60 min	Inoue Y et al., 2010.
	Lacasa	12 h tiempo de reacción	Murugesan K et al., 2010.
Sulfametoxazol	VP (peroxidasa versátil)	80 %	Eibes G et al., 2011.
	CPO (cloroperoxidasa)	98% en 20 min	Xiao Zhang et al., 2016
Sulfadimetoxina	lacasa de la cepa <i>Perenniporia</i> TFRI 70	100%, 30 min de tiempo de reacción	Shin-Sian Weng et al., 2012.
Sulfamonometoxina	Lacasa de la cepa <i>Perenniporia</i> TFRI 70	100% 30 min tiempo de reacción	Shin-Sian Weng et al., 2012.
Tetraciclina	MnP	72.5%	Wen X et al., 2010.
Oxitetraciclina	MnP	84,3%	Wen X et al., 2010)
Trimetoprima	Lacasa	50-70%, 5 h de tratamiento	Touahar IE et al., 2014.
	VP		

IV. FORMULACIÓN DE LAS PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

El problema de la contaminación por antibióticos es un problema grave que no solo afecta la salud de los organismos, esta involucra a los mantos acuíferos en los cuales se ha detectado la presencia de este tipo de contaminantes, así como su distribución al medio ambiente, la falta de normas que regulen estos contaminantes, aunado al uso indiscriminado tanto en el tratamiento del ser humano como el uso veterinario y la gestión incorrecta de estos residuos, por mencionar algunos, son puntos importantes para entender la problemática ambiental causada por este tipo de contaminantes. Por esto, es necesario la búsqueda de tratamientos que causen un menor impacto ambiental y que degraden o transformen a estos contaminantes a productos de menor toxicidad, como el que se propone en este trabajo de biocatálisis.

Por lo anterior, se han formulado las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Tendrá la enzima manganeso peroxidasa la capacidad de oxidar o transformar antibióticos de la familia sulfonamidas en sistemas modelos?
- ¿Cuál es la biodegradabilidad de los productos de reacción biocatalítica?
- ¿Qué conversiones se obtienen al extrapolar el sistema biocatalítico en una muestra de agua residual tratada?

V. HIPÓTESIS

5.1 Hipótesis general

Los antibióticos sulfonamidas serán oxidados de forma biocatalítica a moléculas más biodegradables con altos grados conversión usando manganeso peroxidasa tanto en un sistema modelo como en agua residual tratada.

VI. OBJETIVO

6.1 Objetivo general

Caracterizar la transformación biocatalítica de antibióticos sulfonamidas usando a la enzima manganeso peroxidasa

6.2 Objetivos particulares

- Optimizar las condiciones de reacción (tiempo de reacción, cantidad de enzima, concentración de agente oxidante) para la conversión de antibióticos por vía enzimática
- Identificar los productos de la reacción biocatalítica.
- Determinar la biodegradabilidad de los productos de reacción
- Análisis de las condiciones de operación de la Planta de Tratamiento de San Simón Atzizintla.
- Realizar pruebas de susceptibilidad con el propósito de determinar de manera indirecta la presencia de sulfonamidas en la zona de estudio.
- Aplicar la metodología a muestras de agua residuales reales provenientes de la planta de tratamiento del San Simón Atzizintla.

VII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

7.1 Localización

Esta investigación se realizó en el Centro de Química-ICUAP, específicamente en el laboratorio de Bioinorgánica Aplicada, Edif. IC8, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Col. San Manuel, Puebla Pue., México.

7.2 Fase de campo

7.2.1 Establecimiento del experimento

Se tomaron muestras simples de agua de la planta de tratamiento de San Simón Atzitzintla, y se recopiló información socioeconómica del área geográfica, para conocer las posibles fuentes de contaminación por antibióticos.

7.2.2 Toma de muestra de agua residual tratada

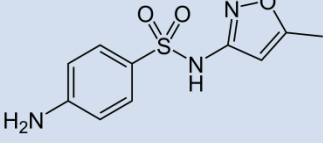
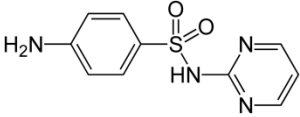
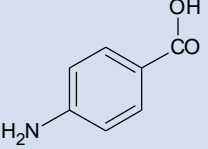
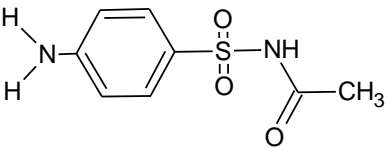
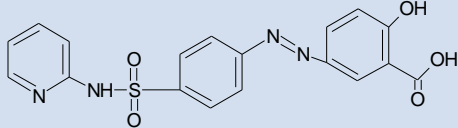
Se recolectó una muestra simple de agua residual tratada (antes de cloración) de la planta de tratamiento de San Simón Atzitzintla. La muestra se mantuvo a una temperatura de 4°C hasta su caracterización en el laboratorio.

7.3 Fase de laboratorio

7.3.1 Establecimiento del experimento o bioensayo

La Tabla 8 describe los antibióticos sulfonamidas ensayados en este trabajo. Se prepararon soluciones stock en agua a una concentración 200 μM en agua para su posterior ensayo en las reacciones de transformación.

Tabla 8: Antibióticos utilizados en este estudio

Antibiótico	Estructura química	Masa molecular
Sulfametoxazol		253,279 g/mol
Sulfadiazina		250,278 g/mol
Sulfanilamida		172.2 g/mol
Sulfacetamida		214.24 g/mol
Sulfasalazina		398.39g/mol

El esquema siguiente describe la estrategia experimental aplicada en este estudio (Figura 4).

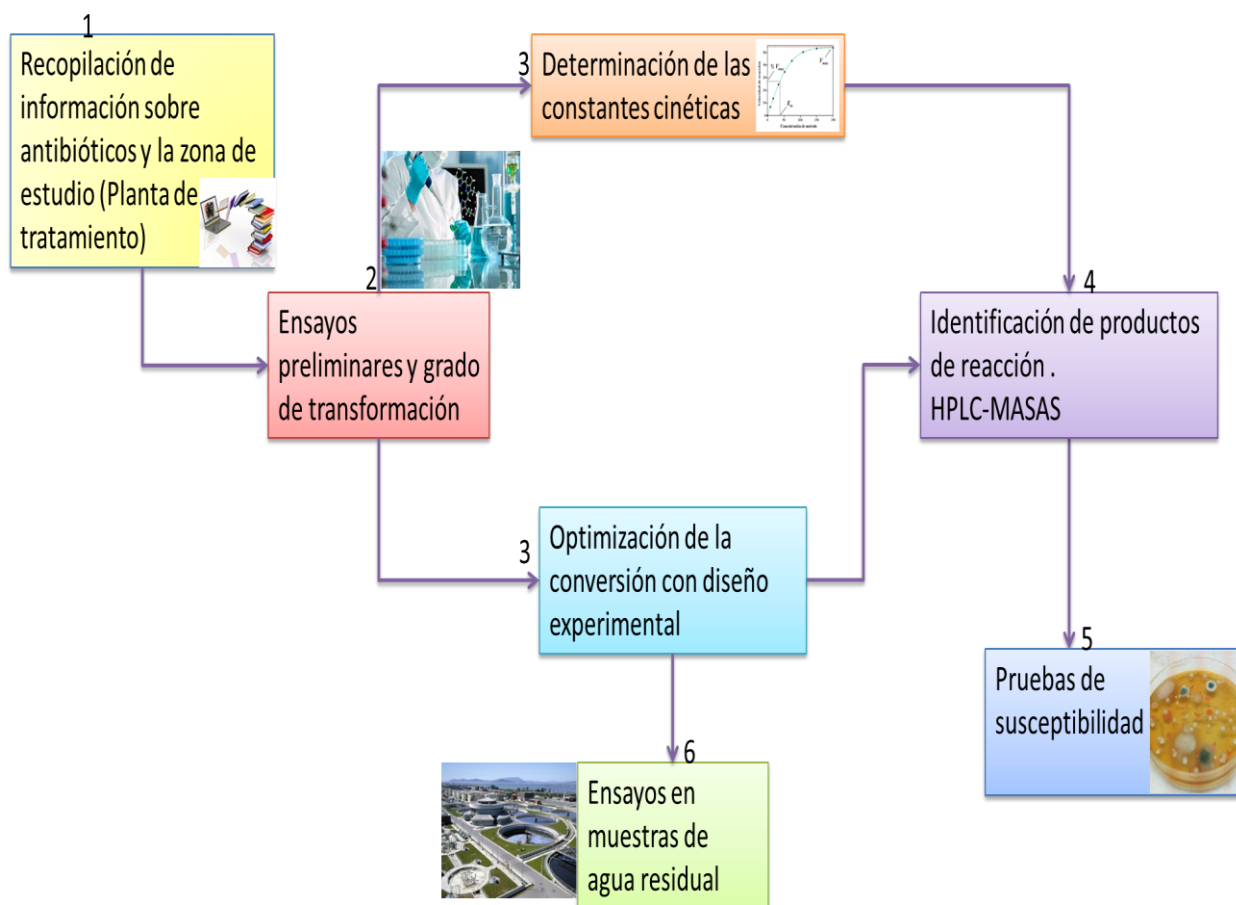


Figura 4: Diseño de la estrategia experimental.

7.4 Variables de respuesta

7.4.1 Conversión biocatalítica de antibióticos

La determinación de la capacidad oxidativa de la enzima manganoso peroxidasa (MnP), se realizó en muestras modelo, las cuales se prepararon en un amortiguador de malonato de sodio de pH 4.5, 50 mM, con los antibióticos a concentraciones micromolares y diferentes unidades de enzima. Estas muestras se llevaron a un volumen de 1 ml en agitación constante

y temperatura ambiente. La transformación de los compuestos se monitoreó por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) a diferentes tiempos de reacción. Las condiciones utilizadas para HPLC para cada uno de los antibióticos se muestran en la tabla 9.

Los datos experimentales se ajustaron a una reacción de primer orden para obtener el valor de la constante de reacción. Una reacción de primer orden es aquella en la que la velocidad de reacción depende de la concentración de uno de los reactivos elevado a la potencia 1.

La velocidad de desaparición de A se describe de la siguiente manera (Ecuación 1):

$$v = \frac{\partial[A]}{\partial t} = k[A]$$

$$\int_{[A]_0}^{[A]_t} \frac{\partial[A]}{[A]} = -K \int_{t_0}^t \partial t$$

$$\ln[A] - \ln[A]_0 = -Kt$$

$$[A] = [A]_0 e^{-kt} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde A_0 es la concentración inicial y A la concentración a diferentes tiempos (t) del antibiótico, y k es la constante de reacción. El ajuste se realizó con el programa Origin Pro 8.

El grado de conversión de los compuestos se calculó tomando el área bajo la curva después de la reacción, es decir una vez que se agregó la enzima, respecto al área bajo la curva antes de la reacción, expresado de la siguiente manera (Ecuación 2).

$$\% \text{ conversión} = 100 - \frac{(\text{área después de la reacción}) (100)}{\text{área antes de la reacción}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Tabla 9: Condiciones utilizadas en la cromatografía de alta presión para cada uno de los antibióticos

Antibiótico	Fase móvil	Flujo isocrático	Longitud de onda de detección (nm)	Tiempo de retención (min)	Log P
Sulfametoxazol	ACN y ácido fosfórico 20Mm; pH =2 (30:70)	0.7 ml/min	270	7.19	0.89
Sulfadiazina	ACN y ácido fosfórico 20Mm; pH =2 (10:90)	0.7 ml/min	265	9.82	-0.9
Sulfanilamida	ACN y ácido fosfórico 20Mm; pH =2 (10:90)	0.7 ml/min	259	4.12	-0.62
Sulfacetamida	ACN y ácido fosfórico 20Mm; pH =2 (25:75)	0.7 ml/min	268	5.54	-0.96
Sulfasalazina	ACN y ácido fosfórico 20Mm; pH =2 (70: 30)	1.0 ml/min	350	2.92	3.13

El equipo utilizado fue un HPLC Perkin Elmer serie 200 acoplado a un detector UV, utilizando una columna C₁₈ fase reversa, tamaño de partícula de 5 µM, de 150 mm de largo por 3.0 mm de diámetro externo.

7.4.2 Optimización de la transformación biocatalítica de antibióticos

La optimización de las condiciones de ensayo se realizó a través de un Diseño Central Compuesto (DCC) y su posterior análisis por el método de superficie de respuesta. El DCC se construyó a partir de un diseño factorial 2^3 , y se agregaron puntos axiales, dando lugar a 20 experimentos. Las variables de entrada en tres niveles de composición (inferior, intermedio y superior): tiempo de reacción 5-15 min; cantidad de enzima 0.32 a 3.20 U; y concentración de peróxido 0.33 mM a 1 mM. Se usó el programa Design Expert 7.0.0 versión de prueba para la construcción del DCC y la optimización por superficie de respuesta. La variable respuesta fue la conversión del antibiótico. Dicho diseño se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10: Diseño central compuesto: variables de entrada (inferior, intermedio y superior)

Estándar	Factor 1	Factor 2	Factor 3
	A: Peróxido (mM)	B: Enzima (U)	C: Tiempo (Min)
18	1	3.2	5
9	0.67	1.76	10
6	0.33	3.2	15
13	0.67	3.2	10
2	0.67	1.76	10
10	1	1.76	10
20	0.67	1.76	10
5	0.67	1.76	10
7	0.33	0.32	15
4	0.33	0.32	5
1	1	0.32	15
15	0.33	1.76	10
19	0.67	1.76	15
8	0.67	1.76	5
16	1	3.2	15
3	0.67	1.76	10
14	0.33	3.2	5
17	0.67	0.32	10
12	1	0.32	5
11	0.67	1.76	10

7.4.3 Identificación de productos de reacción

Se llevó a cabo la reacción en un volumen de 50 ml, empleando para ello un reactor de vidrio conectado a un baño recirculador para mantener la temperatura a 25 °C bajo agitación constante. Una vez completada la reacción, la extracción de los productos se llevó a cabo en un embudo de separación, agregando 50 ml de diclorometano junto con la mezcla de reacción, agitando vigorosamente, separando la fase orgánica a través de sulfato de sodio para eliminar residuos de agua. La fase orgánica se evaporó en un minirrotavapor a volumen de 1 ml. El resto del volumen se transfirió a un vial para secar completamente usando una corriente de nitrógeno gaseoso. La muestra fue analizada por cromatografía de líquidos acoplada a masas LC-MS (cromatógrafo Serie 1260) acoplado con un detector ESI- Q-TOF-MS (6520 de Agilent Technologies) en el laboratorio de Adsorción y Cromatografía del Centro de Química-ICUAP.

7.4.4 Evaluación de la biodegradabilidad de antibióticos y productos de reacción

Las pruebas de biodegradabilidad se realizaron mediante demanda biológica de oxígeno (DBO), siguiendo el método de la OCDE 301D para los antibióticos y la mezcla de productos de reacción (OCDE 301D).

La prueba consiste en la medición del oxígeno disuelto a los 7 días, en botellas Winkler de 300 ml, siguiendo la metodología descrita a continuación:

Se agregan 100 ml de medio mineral el cual se prepara a partir de soluciones Stock de concentraciones apropiadas de componentes minerales, las cuales son fosfatos de potasio y sodio más cloruro de amonio, cloruro de calcio, sulfato de magnesio y cloruro de hierro (III). Posteriormente se pone la sustancia de prueba, en este caso el antibiótico o producto de reacción a una concentración de 2 ppm, se agrega un mililitro de inóculo proveniente del efluente tratado de la planta de tratamiento de Izúcar de Matamoros. Por último, el volumen restante de las botellas es llenado con agua desionizada.

La cuantificación del oxígeno disuelto se realiza mediante el método Winkler de modificación de azida, para lo cual se utilizó un kit de reactivos de oxígeno disuelto marca HANNA Instruments siguiendo la metodología proporcionada por el fabricante. Esta consiste en tomar una muestra de 60 ml de la solución contenida en las botellas Winkler, adicionar 5 gotas del reactivo A (solución de azida), 5 gotas del reactivo B (solución de hidróxido de sodio) y dejar reaccionar por 2 minutos, posteriormente agregar 10 gotas del reactivo C (solución de ácido sulfúrico) dejando reposar hasta la completa disolución del precipitado formado. Esta solución es medida a 420 nm en un fotómetro HI 83099 marca HANNA Instruments, mediante el método 32 correspondiente a la cuantificación de oxígeno disuelto entre 0 y 10 mg O₂/l.

7.4.5 Caracterización del agua residual tratada

Se llevó a cabo la caracterización del agua de la planta de tratamiento de San Simón Atzitzintla, esta consistirá en la determinación de la cantidad de hierro, sulfato, fosfato, nitrato, cloro libre, magnesio, calcio, DBO, DQO, pH y conductividad, presentes en el agua. Dicha caracterización se realizó mediante los kits de HANNA instruments a excepción de la medición del pH, conductividad y valores de DBO, los cuales fueron medidos con un potenciómetro marca OAKLON, modelo pH 700, una sonda de conductividad y la DBO siguiendo el método de la OCDE 301 durante 5 días, respectivamente.

Los kits utilizados en la medición de los parámetros antes mencionados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Kits utilizados para la caracterización del agua

Parámetro medido	Kit utilizado	Método	Longitud de onda (nm)
Hierro	HI 93746-01	Adaptación del método TPTZ (2,4,6-Tri-(2-piridil) 5 triazina)	575
Sulfato	HI 93751-01	El sulfato es precipitado con cristales de cloruro de bario	466
Fosfato RB	HI 93713-01	Adaptación del método de ácido ascórbico	610
Nitrato	HI 93728-01	Adaptación del método de reducción de cadmio	525
Magnesio	HI 937520-01	Adaptación del método calmagita	466
Cloro libre	HI 93701-01	Adaptación del método EPA DPD 330.5	525
Calcio	HI 937521-01	Adaptación del método Oxalato	466
DQO₅	HI 93754C-25	Adaptación del método USEPA 410.4	610

7.4.6 Pruebas de oxidación biocatalítica en el agua residual tratada

Se llevaron a cabo ensayos de oxidación enzimática en muestras reales de aguas residuales de la planta de tratamiento de San Simón Atzitzintla en las condiciones de reacción óptimas determinadas en las muestras modelo de laboratorio. Estas se realizaron ajustando el pH del agua a 4.5 y agregando los antibióticos a una concentración 10 μ M. La transformación de estos compuestos al igual que las muestras modelo se monitorearon mediante HPLC bajo las condiciones anteriormente descritas.

7.5 Pruebas de susceptibilidad en bacterias del río Santa Elena

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron con el propósito de determinar de manera indirecta la presencia de sulfonamidas en la zona de estudio, mediante el aislamiento de cepas resistentes. Para dichas pruebas se utilizaron dos muestras de agua de 1 litro cada una, recolectadas del río Santa Elena

Para el aislamiento de las cepas bacterianas, se tomaron 100 microlitros de las muestras de agua previamente agitadas durante 10 min, esta se sembró por extensión en superficie en diferentes medios de cultivo (MacConkey (M.C), agar verde brillante (VB), y Agar eosina azul de metileno (EMB), se incubaron por 24 h a 36 °C.

Posteriormente se escogieron colonias bacterianas, para su identificación mediante pruebas bioquímicas y su lectura mediante tablas de identificación.

Para la realización de las pruebas bioquímicas, se prepararon diferentes medios de cultivo MIO, TSI, LIA, Citrato, MR-VP, estos se vertieron en tubos de ensayo, y posteriormente se sembró cada una de las colonias en un juego de cada medio, se incubaron a 36 ° C por 24 horas, una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de estos. Con las mismas cepas aisladas se realizaron las pruebas de susceptibilidad de sulfonamidas (sulfametoxazol, sulfadiazina, sulfasalazina, sulfacetamida y sulfanilamida), estas mediante el método de Kirby Bauer, dicho método es empleado para la determinación de la

susceptibilidad de las bacterias frente a un agente microbiano, consiste en diluir el cultivo bacteriano en solución salina al 0.85 % hasta obtener una turbidez equivalente al tubo 5 de la escala de Mc Farland que corresponde a 1.5×10^8 UFC/ml, posteriormente se sumerge un aplicador de algodón estéril en esta solución, este se siembra uniformemente en placas de medio Mueller-Hinton, posteriormente se colocan los sensidiscos previamente humedecidos, cada sensidisco en una concentración diferente (25,50, 100 y 200 ppm), incubar las cajas a 36 °C por 24 horas, una vez que ha pasado el tiempo de incubación, se observa si hay formación de halo de inhibición.

7.6 Análisis estadístico

Para la contrastación de la hipótesis, las respuestas obtenidas de la experimentación biocatalítica se evaluaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de tres vías, con un intervalo de confianza del 95%.

VIII. RESULTADOS

8.1 Determinación de la capacidad oxidativa de la manganeso peroxidasa (MnP)

Se ensayó preliminarmente la capacidad oxidativa de la enzima manganeso peroxidasa contra el antibiótico sulfametoxazol; mediante los cromatogramas obtenidos se observó la disminución del área después de 10 minutos de reacción, lo cual nos indica una transformación del antibiótico por la enzima (Fig.5).

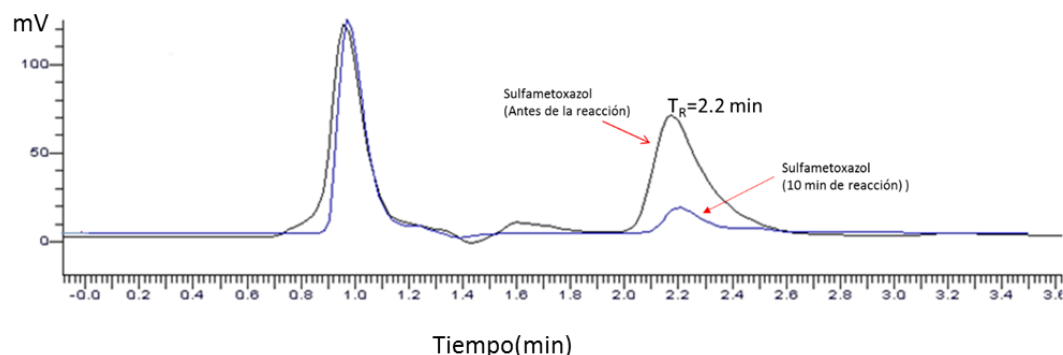


Figura 5: Oxidación del sulfametoxazol por la manganeso peroxidasa antes y después de 10 min de reacción.

Posteriormente se elaboró la cinética de oxidación para el sulfametoxazol, dicha curva se obtuvo monitoreando la reacción cada minuto durante 10 minutos, a una concentración de peróxido de 0.5 mM y 6.4 unidades de enzima. Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo exponencial, obteniendo una $R^2=0.97$, lo cual indica un buen ajuste (Fig. 6). Después de 10 minutos de reacción se alcanzó una conversión del 81.77 %.

El ajuste matemático proporciona el valor de la constante de primer orden (k) de 0.1810 min^{-1} . La constante de reacción es una constante de proporcionalidad entre la velocidad de reacción y la concentración, que permite conocer a la primera en función del valor de la segunda. Esto es de importancia ya que con el valor de la constante es posible predecir el valor de la velocidad de reacción en un rango de concentraciones del sulfametoxazol. Como es sabido, las enzimas, incluida la MnP, siguen una cinética de Michaelis Menten, la cual es la combinación de una reacción de primer orden y una de orden cero, dando lugar a una hipérbola característica cuando se grafica la velocidad de reacción contra la concentración

de sustrato. Para este estudio, no es necesario la caracterización cinética completa, es decir, la obtención de las constantes de la cinética de Michaelis Menten ya que la concentración de los antibióticos como contaminantes es muy baja, por lo que la enzima eventualmente trabajaría en condiciones de una reacción de primer orden, de ahí la importancia de la obtención de esta constante.

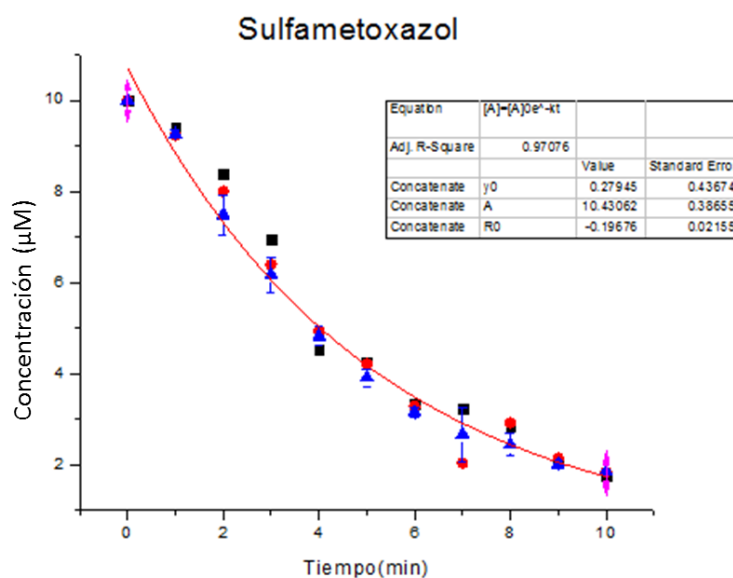


Figura 6: Curva de oxidación del sulfametoxazol.

Tomando en cuenta la ecuación de Michaelis Menten (ecuación 3):

$v = V_{max} * S / (K_m + S)$ a concentraciones muy por debajo de la K_m (que es la concentración con la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima, (V_{max})) la ecuación se reduce a:

$$v = (V_{max}/K_m) * S \quad (\text{Ecuación 3})$$

el valor de V_{max}/K_m es normalmente conocido como la constante de especificidad de una enzima. Al igualar esta ecuación con la ecuación 3, se obtiene:

$k = V_{max}/K_m$; es decir, la constante de reacción es igual a la constante de especificidad de la enzima, y servirá para determinar qué sustrato de los antibióticos es mejor para la misma, es decir, con qué sustrato se alcanza el mejor desempeño de la enzima.

Una vez que se observó que la manganeso peroxidasa oxida al sulfametoxazol, se procedió a optimizar el porcentaje de conversión de dicho antibiótico.

8.2 Optimización de la transformación de antibióticos

Con el propósito de optimizar la conversión de antibiótico se generó un diseño central compuesto (DCC) y se optimizó mediante la metodología de superficie de respuesta. Los diferentes porcentajes de conversión del DCC se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Diseño central compuesto ensayado con el antibiótico sulfametoxazol: porcentaje de conversión obtenidos

Ensayo	Factor1 A: H ₂ O ₂ (mM)	Factor 2 B: Enzima (U)	Factor 3 C: Tiempo (Min)	Respuesta Conversión (%)
18	1	3.2	5	32.58
9	0.67	1.76	10	43.79
6	0.33	3.2	15	96.57
13	0.67	3.2	10	65.48
2	0.67	1.76	10	52.73
10	1	1.76	10	49.25
20	0.67	1.76	10	44.99
5	0.67	1.76	10	38.42
7	0.33	0.32	15	11.81
4	0.33	0.32	5	9.87
1	1	0.32	15	8.32
15	0.33	1.76	10	64.23
19	0.67	1.76	15	59.28
8	0.67	1.76	5	45.98
16	1	3.2	15	56.56
3	0.67	1.76	10	59.79
14	0.33	3.2	5	60.47
17	0.67	0.32	10	13.19
12	1	0.32	5	7.59
11	0.67	1.76	10	54.08

Como puede observarse las variables dependientes tienen un efecto importante en la respuesta, ya que esta varía desde 7 % hasta 80 % dependiendo de los valores de las tres variables. El mayor porcentaje de remoción o conversión se logró en el ensayo 6, 0.33 mM de peróxido de hidrógeno, 3.2 unidades de enzima adicionada y 15 minutos de reacción.

Posteriormente, las respuestas se ajustaron a un modelo cuadrático (Ecuación 4) por el método de mínimos cuadrados, alcanzado un $R^2 = 0.90$, es decir, el modelo puede predecir con una certeza del 90% la conversión.

$$\text{conversión} = +51.60 - 7.22 * A + 24.46 * B + 5.96 * C - 5.70 * A * B + 0.40 * A * C + 5.12 * B * C + 1.35 * A^2 - 15.94 * B^2 - 2.65 * C^2 \quad \text{Ecuación 4}$$

Con base en el modelo se construyeron los gráficos de superficie de respuesta (Fig. 7), donde se observan los efectos e interacciones de las variables dependientes sobre la respuesta. Como puede observarse, la cantidad de enzima es una variable de mayor efecto, donde los cambios en la respuesta son mayores conforme se cambia la cantidad de enzima; mientras que el tiempo y el peróxido afectan de menor manera; de hecho, el peróxido tiene un efecto negativo en la actividad enzimática, a mayor concentración de peróxido menor actividad. El peróxido de hidrógeno es indispensable como agente oxidante, sin embargo, es al mismo tiempo un inactivador de la enzima, por lo que la disminución de la actividad puede indicar que la enzima se inactiva a mayores concentraciones.

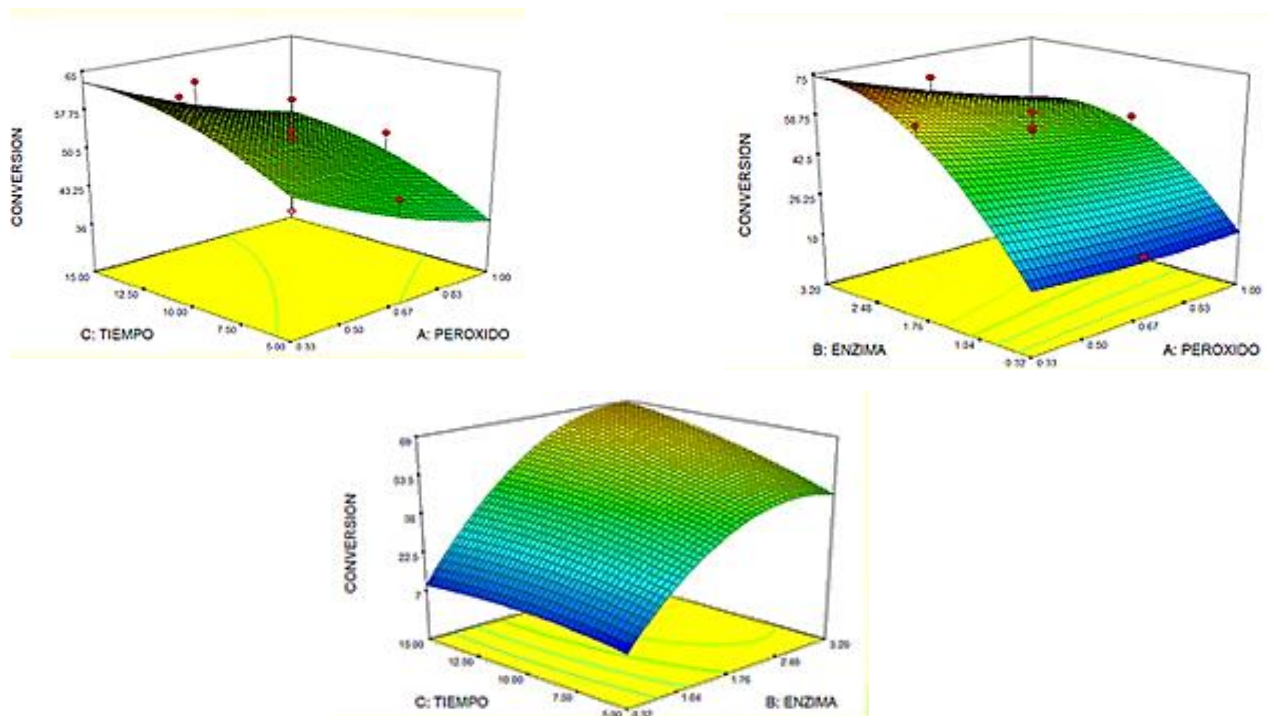


Figura 7: Gráficos superficie de respuesta: efectos e interacciones de las variables dependientes sobre la respuesta.

Se puede concluir que, a una mayor cantidad de enzima, mayor tiempo de reacción y menor concentración de peróxido se alcanzan las conversiones mayores.

Las condiciones óptimas fueron encontradas aplicando el algoritmo del software maximizando la respuesta y minimizando las variables dependientes (es conveniente tiempos cortos, y cantidades menores de enzima y peróxido); el resultado fue: concentración de peróxido de hidrógeno 0.33 mM, 3.2 unidades de enzima y 15 minutos de reacción. Esta condición óptima obtenida mediante el diseño central compuesto se aplicó para el resto de antibióticos en estudio. Las conversiones alcanzadas fueron altas, 94, 100, 95 y 100 % para la sulfanilamida, sulfadiazina, sulfacetamida y sulfasalazina, respectivamente. Posteriormente se elaboraron las curvas de oxidación para cada uno de los antibióticos (Fig. 8). Las cinéticas se realizaron monitoreando cada minuto la reacción durante 10 min, a una concentración de 0.33 mM de peróxido, 10 μ M de antibiótico y 3.2 U de enzima para

sulfametoxazol y sulfanilamida; para el caso de la sulfadiazina, sulfacetamida y sulfasalazina, se utilizaron 0.32 U de enzima, debido a que la reacción es muy rápida.

Todas las cinéticas de oxidación (Fig.8) presentan un buen ajuste al modelo exponencial con una $R^2 > 0.97$, esto nos indica que las oxidaciones enzimáticas de los antibióticos ensayados siguen el comportamiento de una reacción de primer orden, es decir, dependientes únicamente de la concentración del antibiótico. Mediante estas curvas se obtienen los valores de las constantes de reacción para cada uno de los antibióticos: sulfametoxazol 0.337 min^{-1} , sulfanilamida 0.346 min^{-1} , sulfasalazina 0.205 min^{-1} , sulfacetamida 0.452 min^{-1} y sulfadiazina 0.362 min^{-1} . El significado físico de la constante de primer orden (k), se aproxima a la fracción del sustrato que es convertido a producto por unidad de tiempo. Un valor de constante de 1 significa que el 100% del sustrato se transforma en un minuto. En este caso el valor promedio de las constantes es de 0.34 min^{-1} indicaría que en un minuto el 34% de las sulfonamidas se transforman. Si tomamos la definición anterior de la k como una medida de la constante de especificidad, se puede determinar que la sulfacetamida y la sulfadiazina presentan los valores más altos de la k , lo que indica que son mejores sustratos para la enzima. Esto puede corroborarse al comparar los porcentajes de conversión al tiempo final. Los porcentajes de conversión obtenidos a los 10 min son mayores al 90 %, siendo para sulfametoxazol 93.41 %, sulfanilamida 93.9 %, sulfasalazina 90.15 %, sulfacetamida 92.34 % y en el caso de la sulfadiazina del 100 %. Las reacciones en ausencia de la enzima no produjeron cambios en el área cromatográfica, lo que indica que no hay transformación química en las condiciones de reacción ensayadas. Lo anterior permite concluir que la enzima manganeso peroxidasa tiene la capacidad de oxidar a dichos antibióticos de la familia de las sulfonamidas en tiempos cortos de reacción y a altas conversiones.

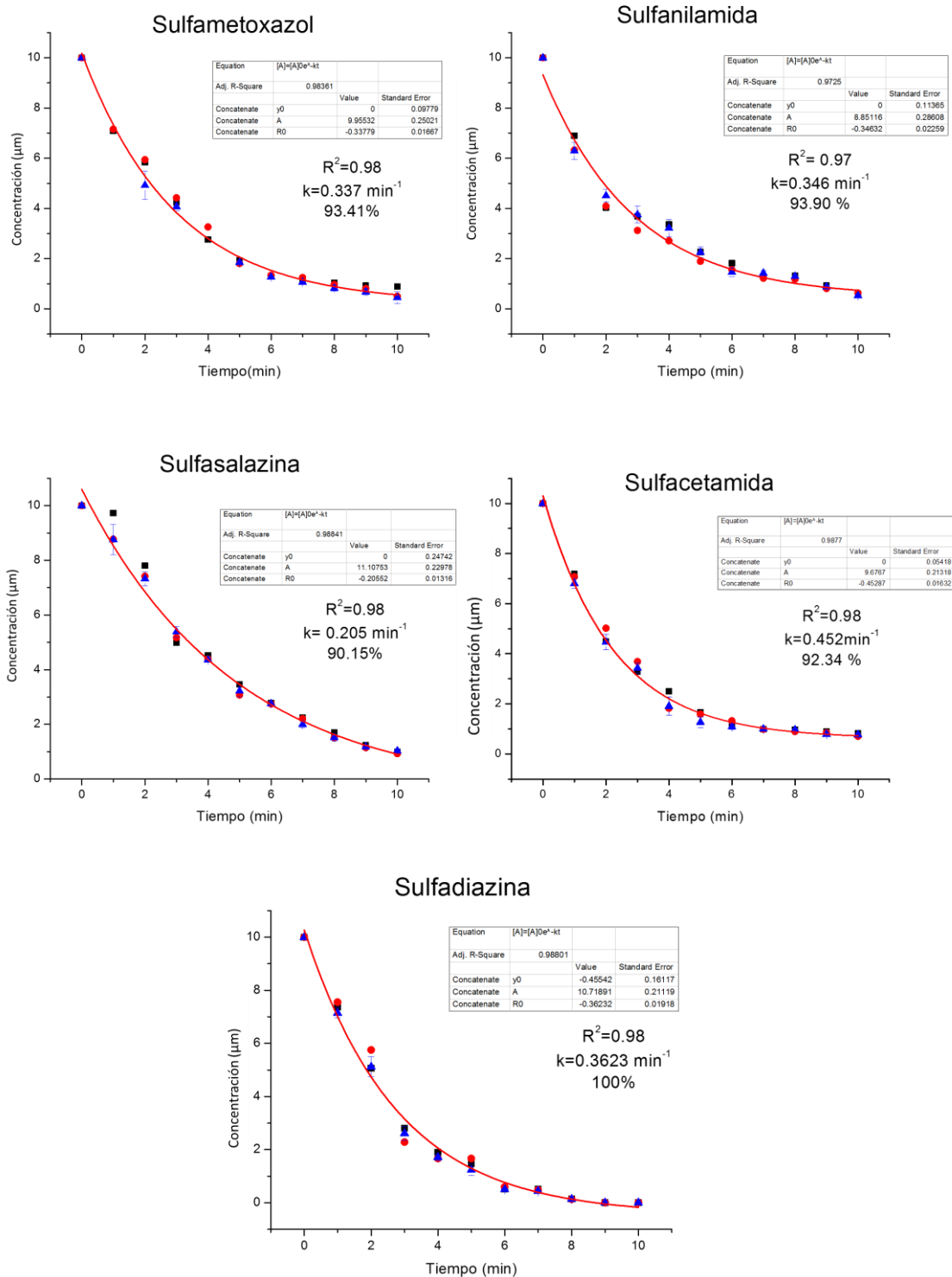


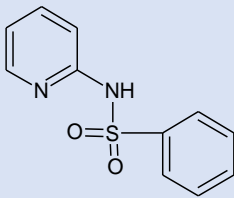
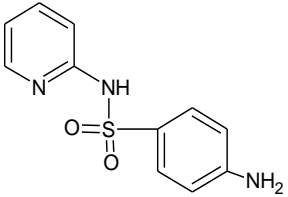
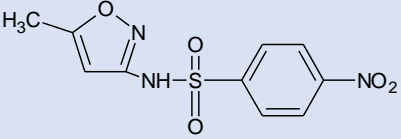
Figura 8: Cinéticas de oxidación para sulfonamidas (sulfametoxazol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfacetamida y sulfadiazina) ajustadas al modelo de primer orden (línea roja)

Los productos generados mediante el tratamiento biocatalítico y una vez que se observaron altas conversiones para los antibióticos probados, se mandaron a identificar, para posteriormente medir su biodegradabilidad.

8.3 Productos de reacción identificados (HPLC-Masa)

Respecto al análisis por HPLC-masas, se identificaron productos de reacción para la sulfasalazina y el sulfametoxazol, para el resto de compuestos no fue posible su identificación debido a la formación de polímeros insolubles. En la tabla 13 se muestran los productos de reacción encontrados.

Tabla 13: Productos de reacción obtenidos

Antibiótico	Estructura del producto propuesto	Masa experimental	Masa teórica	T _R (min)	Error (ppm)
Sulfasalazina (PM 388.394)		235.0506	235.0536	6.775	0.11
		250.0633	250.0645	11.28	4.71
Sulfametoxazol (PM 254.0594)		284.0343	284.0336	14.081	2.59

T_R: Tiempo de retención

Las masas experimentales exactas de las formas desprotonadas de estos productos de transformación enzimática están en concordancia con las masas teóricas calculadas, con errores menores a 5 ppm, lo que indica un porcentaje muy alto de seguridad de que se tratan esos productos.

Con base a la identificación de los productos de reacción generados con el tratamiento biocatalítico, se puede hipotetizar que dichos productos ya no tienen la misma actividad antibacteriana. Cabe recordar el mecanismo de reacción de la enzima Dihidropteroate sintasa (DHPS) presenta como un evento molecular importante la participación del grupo amino libre (-NH₂) en la posición 4 del ácido p-aminobenzoico en una reacción de condensación (Figura 9).

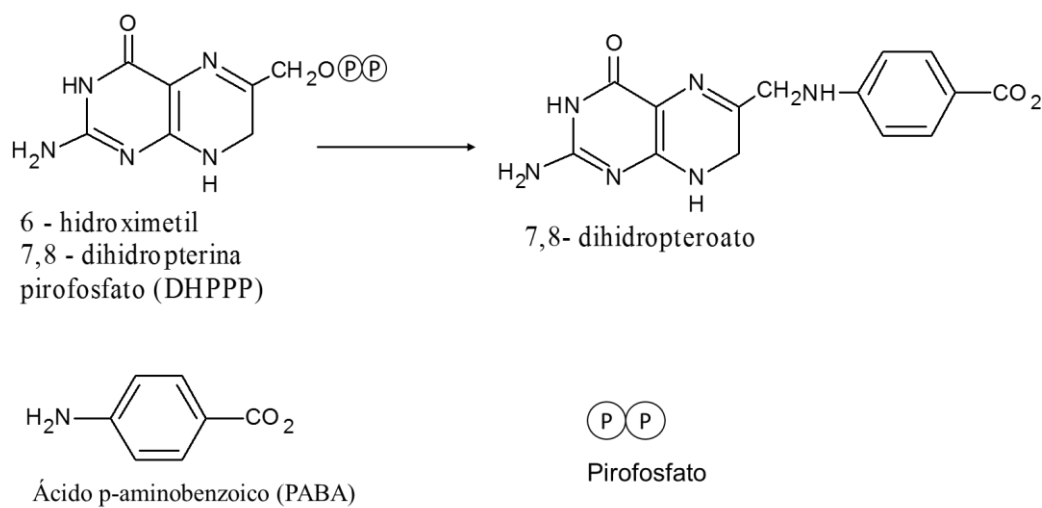


Figura 9: Mecanismo de reacción de la enzima Dihidropteroate sintasa (DHPS)

El primer paso consiste en la unión del compuesto 6 - hidroximetil - 7,8 - dihidropterina pirofosfato (DHPPP), lo que causa un reacomodamiento estructura de la enzima DHPS para crear un sitio de reconocimiento al segundo compuesto (PABA), en donde el grupo amino de la posición 4 tiene un papel fundamental en el reconocimiento (Kyung et al., 2012; y ColinColin et al., 2008). En el tercer paso, la enzima cataliza el ataque nucleofílico por el grupo amino del PABA, desplazando el grupo fosfato del DHPPP, formándose el ácido dihidropteroico (Figura 9). Las sulfonamidas inhiben a la enzima DHPS al unirse en el mismo

sitio de reconocimiento que el PABA, en donde el grupo amino en la posición 4 y un grupo sulfonamida en la posición 1 de las sulfonamidas son necesarios para la actividad antibacteriana; es decir, para inhibir a la enzima DHPS. Como la transformación biocatalítica del sulfametoxazol elimina el grupo amino, es posible que la actividad antibacteriana se vea disminuida. Por otro lado, la hidrólisis de la sulfasalazina genera dos productos, uno sin amino, y el otro con un grupo amino en la posición 4 y el grupo sulfonamida en la 4, por lo que es posible que el primer producto no tenga actividad antibacteriana sin grupo amino y sulfonamida, pero el segundo podría aun presentar actividad antibiótica. Es necesario realizar estudios adicionales para poder concluir con mayor certeza.

Con el propósito de evaluar la biodegradabilidad de los sustratos y de los productos generados, se realizaron las pruebas de biodegradabilidad siguiendo el método de la OCDE 301 D.

8.4 Biodegradabilidad de los antibióticos y productos de reacción

Estas pruebas se realizaron siguiendo la metodología descrita en la sección 7.4.4, los resultados para cada uno de los antibióticos se resumen en la tabla 14. Como se puede observar los valores obtenidos son muy pequeños y para el caso de sulfanilamida son negativos, lo que indica que el consumo de oxígeno del experimento control (sólo medio mineral e inóculo) consumió mayor cantidad de oxígeno que el experimento en presencia del antibiótico. Lo anterior indica que estos antibióticos son muy difíciles de biodegradar ya que el consumo de oxígeno es muy bajo, es decir, el microorganismo no crece. Una razón adicional puede ser que los compuestos, al ser antibióticos hayan eliminado a las bacterias del inóculo, es decir, sean tóxicos al inóculo por lo que no hay crecimiento.

Para el caso de los productos el valor de 4.65 mg O₂/l, tanto para el sulfametoxazol como la sulfasalazina, nos indica que al parecer los productos que se están generando son más biodegradables que el antibiótico como tal, ya que la cantidad de oxígeno consumido es mayor para estos. Sin embargo, puede significar también que los productos tienen menor actividad antibiótica y permiten el crecimiento de los microorganismos, los cuales lo

metabolizan. Como se mencionó, los productos de reacción del resto de antibióticos al no ser identificados no fue posible realizar la prueba de biodegradabilidad.

Tabla 14: Valores de DBO₇ para los antibióticos de tipo sulfonamidas y productos de reacción

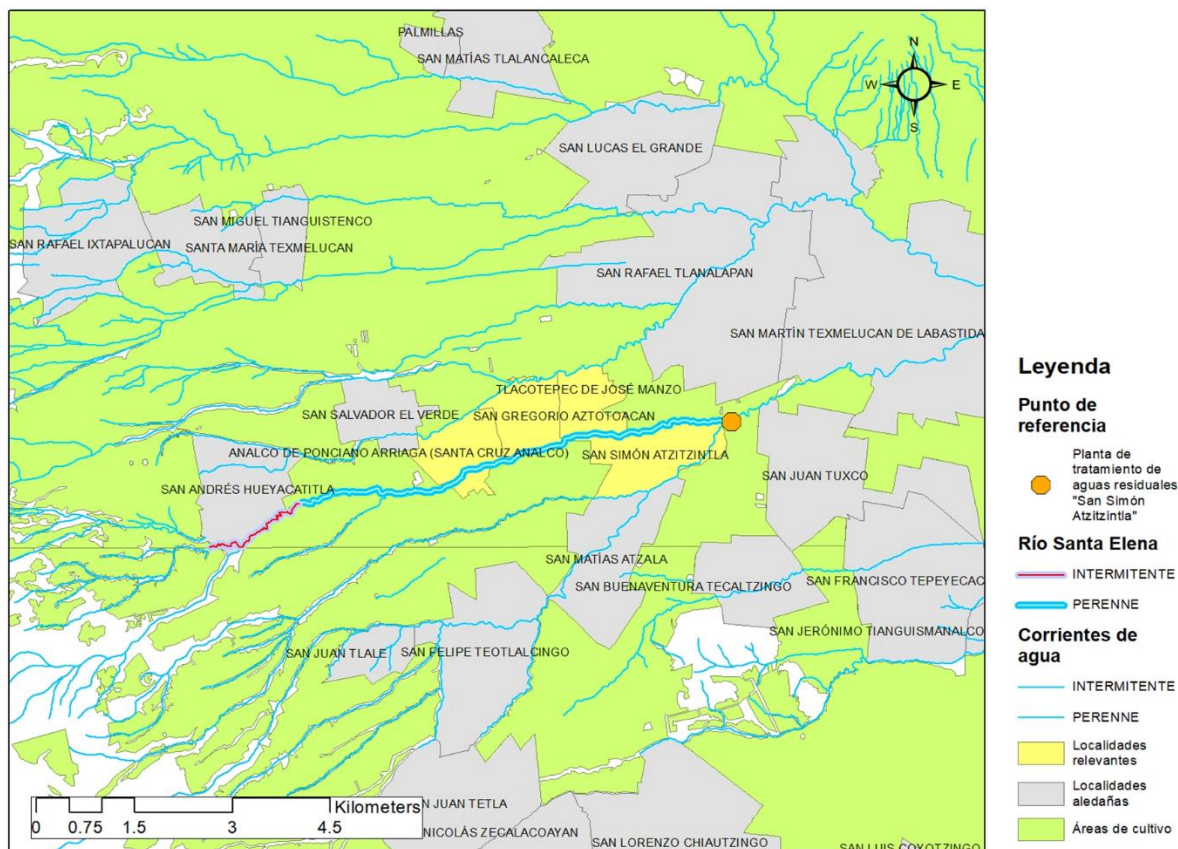
Antibiótico	DBO₇ (mg O₂/l)
Sulfametoxazol	0.15
Sulfadiazina	0.25
Sulfanilamida	-1.15
Sulfasalazina	1.4
Sulfacetamida	1.9
Producto Sulfametoxazol	4.65
Producto sulfasalazina	4.65

Posteriormente se visitó la zona de estudio (Planta de tratamiento de San Simón Atzitzintla), de la cual se tomó una muestra simple de agua residual tratada, para su caracterización y aplicación como medio de reacción, en el tratamiento biocatalítico, bajo la condición óptima encontrada.

8.5 Planta de tratamiento de San Simón Atzitzintla

Se realizó la visita a la planta de tratamiento de San Simón Atzitzintla, ubicada en el municipio de San Salvador el Verde Puebla, localidad de San Simón Atzitzintla (Mapa1), fue construida entre el 2008 y 2009, su rehabilitación fue en el año 2014 con una inversión de \$5 307 443.97 MN.

Dicha planta trata el agua de 4 localidades de San salvador el verde las cuales son: San Simón Atzitzintla, Tlacotepec de Jose Manzo, Analco y San Gregorio, tiene una capacidad de 50 l/s y su cuerpo receptor es el río Santa Elena conforme a la norma oficial mexicana **NOM-003-ECOL-1997**, la cual establece los límites maximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas reutilizadas.



Mapa 1: Ubicación de la planta de tratamiento y localidades aledañas

La planta de tratamiento cuenta con un proceso de lodos activados, y está conformada por:

- 2 canales desarenadores los cuales son utilizados en el pretratamiento del agua.



- Cárcamo de bombeo los cuales sirven para bombear el agua hacia un filtro, el cual elimina las partículas mas pequeñas . Los sólidos del cárcamo son depositados en toneles, para posteriormente ser recolectados por los camiones de basura, se genera alrededor de un tonel cada dos días.



- Reactor anaeróbico en los cuales las bacterias anaerobias degradan la materia orgánica, dichas bacterias catabolizan y asimilan su alimento en ausencia de oxígeno.
- En la planta se cuenta con 6 reactores anaeróbicos de 8 m de profundidad cada uno.



- Reactor biológico, como su nombre lo indica en este se lleva a cabo un proceso biológico, esto es mediante la adición de bacterias, para el caso de la planta de tratamiento, se le agrega la bacteria MRT, esta mezcla es aireada a 3.5 l aire /s y temperatura alrededor de 19 °C. La aireación se realiza con el propósito de proporcionar el oxígeno necesario a las bacterias para que puedan descomponer la materia orgánica. La dimensión de este reactor es de 12.30 m de largo por 4.30 m de ancho.



- Espesador de lodos. Los lodos son desechados aproximadamente cada 6 meses, tiene una capacidad máxima de 400 kg.



- Cloración este es el último proceso por el que pasa el agua, es la etapa de desinfección para esta es utilizado hipoclorito, administrando 4 ml de cloro por cada 10 L de agua



Los componentes descritos anteriormente son ilustrados en el diagrama de flujo Fig.10 , el cual muestra todos los elementos que conforman la planta de tratamiento.

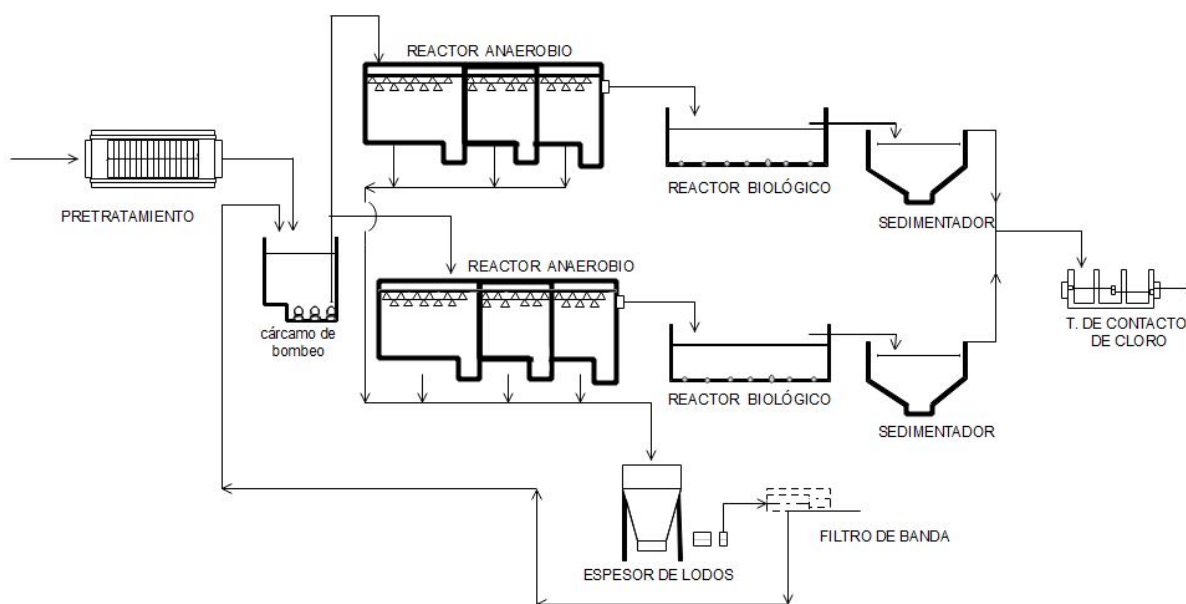


Figura 10: Diagrama de flujo planta de tratamiento San Simon Atzitzintla

Se pudo observar que la planta de tratamiento no cuenta con un programa de mantenimiento, el personal técnico no está adecuadamente capacitado para el funcionamiento correcto de la planta, esta es operada por una sola persona. La planta de San Simón opera 18 horas al día, y se detiene de 4 a 7 a.m., debido a que en estas horas no hay descargas de agua, esta no opera continuamente debido a descargas tóxicas de una fábrica textil ubicada en las cercanías que provocan que el reactor biológico se inactive o desestabilice. El agua que a sido tratada es principalmente utilizada para el riego de los diferentes cultivos de esta localidad.

8.6 Caracterización del agua de la planta de tratamiento de San Simón Atzitzintla.

Se colectó una muestra simple en la planta de tratamiento de San Simón Atzitzintla en el proceso después de la cloración. La muestra se conservó en refrigeración a 4 °C y posteriormente se realizó la caracterización de esta, se determinó la cantidad de Hierro, Sulfato, Fosfato, Nitrato, Cloro libre, Magnesio, Calcio, DBO, DQO, pH y conductividad (tabla 15), presentes en este tipo de agua.

Tabla 15: Propiedades físico - químicas para el agua residual tratada de San Simón Atzitzintla

Parámetro	Norma	Límite máximo permisible	Valor obtenido
Fe⁺²	NOM-127-SSA1-1994	0.30 mg/l	0.178 mg/l
SO₄⁻²	NOM-127-SSA1-1994	400 mg/l	90 mg/l
P	*	*	14.4 mg/l
P₂O₅	*	*	31 mg/l
PO₄³	*	*	40.2 mg/l
NO₃-N	NOM-127-SSA1-1994	10.00 mg/l	24 mg/l
NO₃	NOM-127-SSA1-1994	0.05 mg/l	104 mg/l
Cloro libre	NOM-127-SSA1-1994	0.2-1.50 mg/l	0.1 mg/l
Mg⁺²	*	*	10 mg/l
Ca⁺²	*	*	145 mg/l
DBO	NOM-003-ECOL-1997	20 mg O ₂ /l contacto directo 30 mgO ₂ /l contacto indirecto u ocasional	2.05 mg O ₂ /l
DQO	*	*	651.38 mg O ₂ /l
Conductividad	*	*	1448 µs/cm
pH	*	6.5-8.5	7.0

Con base en los límites permisibles que la NOM-003-ECOL-1997 los valores de DBO, los cuales son servicios al público con contacto directo de 20 mg/l y servicios al público con

contacto indirecto u ocasional 30 mg/l, el agua está dentro de los parametros permisibles teniendo un valor de 2.05 mg O₂/l.

Tomando como referencia la NOM-127-SSA1-1994 dedicada a la salud ambiental en cuanto a los límites permisibles de la calidad del agua para uso y consumo humano para los demás parámetros medidos, se puede ver que que cloro libre, hierro, sulfatos y el pH estan dentro de los parametro establecidos , a excepción de nitratos que sale fuera de los limites permisibles con un valor de 24 y 104 mg/l, siendo los límites de 10 y 0.05 mg/l respectivamente. La alta DQO indica la posible presencia de compuestos persistentes.

8.7 Aplicación del tratamiento biocatalítico en agua residual tratada

Se aplicó la condición óptima obtenida en las muestras modelo utilizando el agua residual de la planta de tratamiento como medio de reacción, esta se probó para los cinco antibióticos (sulfametoxazol, sulfasalazina, sulfadiazina, sulfanilamida, sulfacetamida), obteniéndose 91, 87 y 100 % respectivamente, para el caso de sulfanilamida se obtuvo un 13 % y un 47 % para sulfacetamida. En la Figura 11 se muestran los cromatogramas obtenidos para cada uno de los antibióticos, en donde se puede ver la disminución del área del pico una vez que la enzima ha sido agregada y ha transcurrido los 15 min de reacción, esto nos indica la transformación del antibiótico por la enzima.

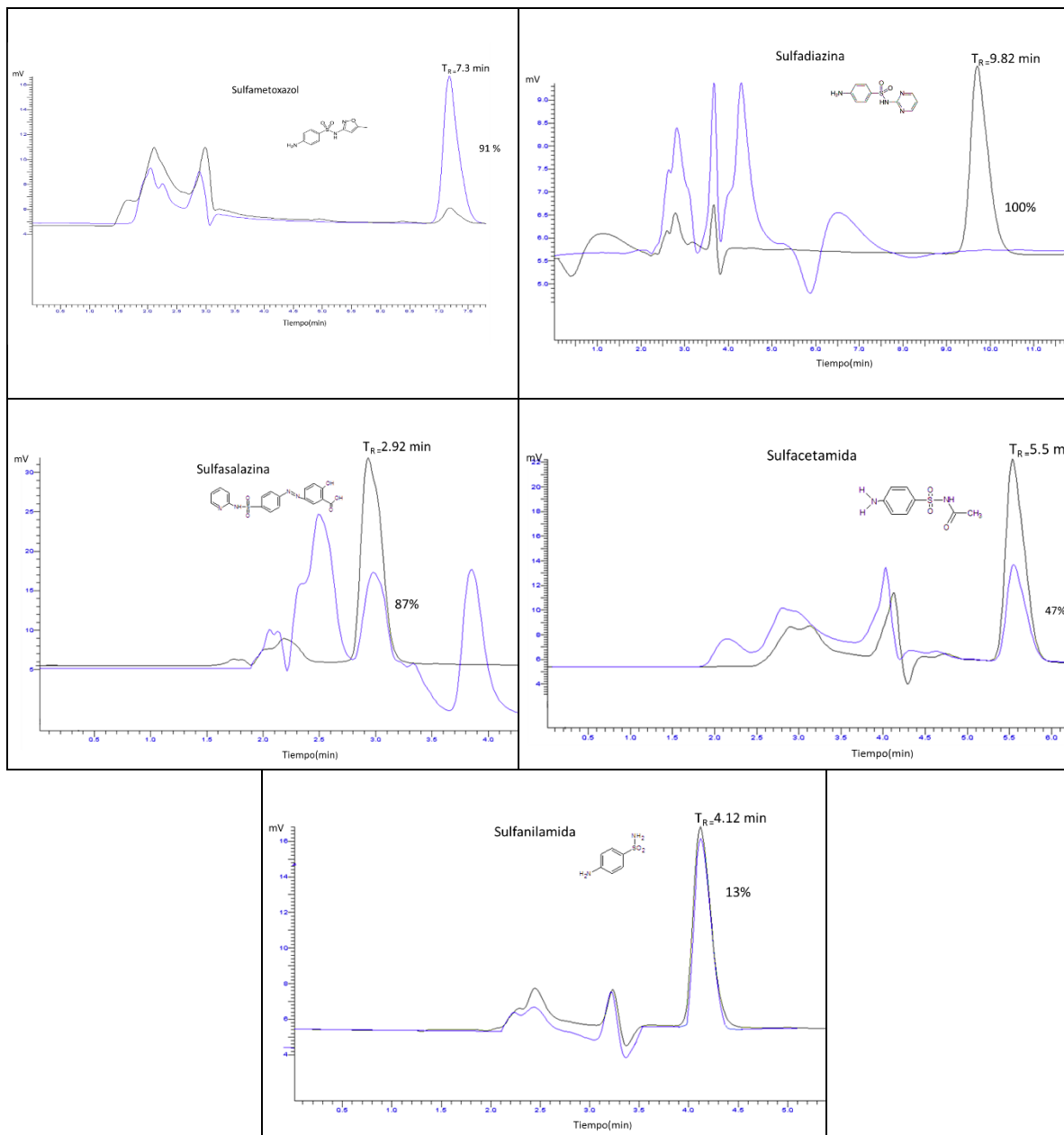


Figura 11: Cromatogramas obtenidos para cada uno de los antibióticos al aplicar el tratamiento biocatalítico usando como medio de reacción agua residual.

La capacidad de la enzima manganeso peroxidasa de mantener su actividad catalítica la coloca como un biocatalizador con alto potencial de aplicación ya que se logran altas conversiones en tiempos cortos de reacción. Esta enzima también puede oxidar otros compuestos de importancia ambiental como hidrocarburos policíclicos aromáticos, colorantes, plaguicidas, fenoles, y otros compuestos farmacéuticos, por lo que, unido a los resultados de este trabajo, sería en principio aplicarla como un biocatalizador con amplia variedad de reacciones, poco selectivo y rápido. Aun así, es necesario llevar a cabo mayor cantidad de estudios para mejorar su estabilidad, y con ello, disminuir los costos de operación.

8.8 Pruebas de susceptibilidad

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron con el propósito de determinar de manera indirecta la presencia de sulfonamidas en la zona de estudio, mediante el aislamiento de cepas resistentes. Para dichas pruebas se utilizaron dos muestras de agua, recolectadas del río Santa Elena. A partir de estas se realizó el aislamiento de cepas bacterianas, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC/ml) en los diferentes medios de cultivo (EMB, M.C y VB) y se hizo una ponderación de estas obteniendo 1160 y 652 UFC/ml para EMB, 172, 440 UFC/ml en MC y 320, 952 UFC/ml con VB (Figura 12).

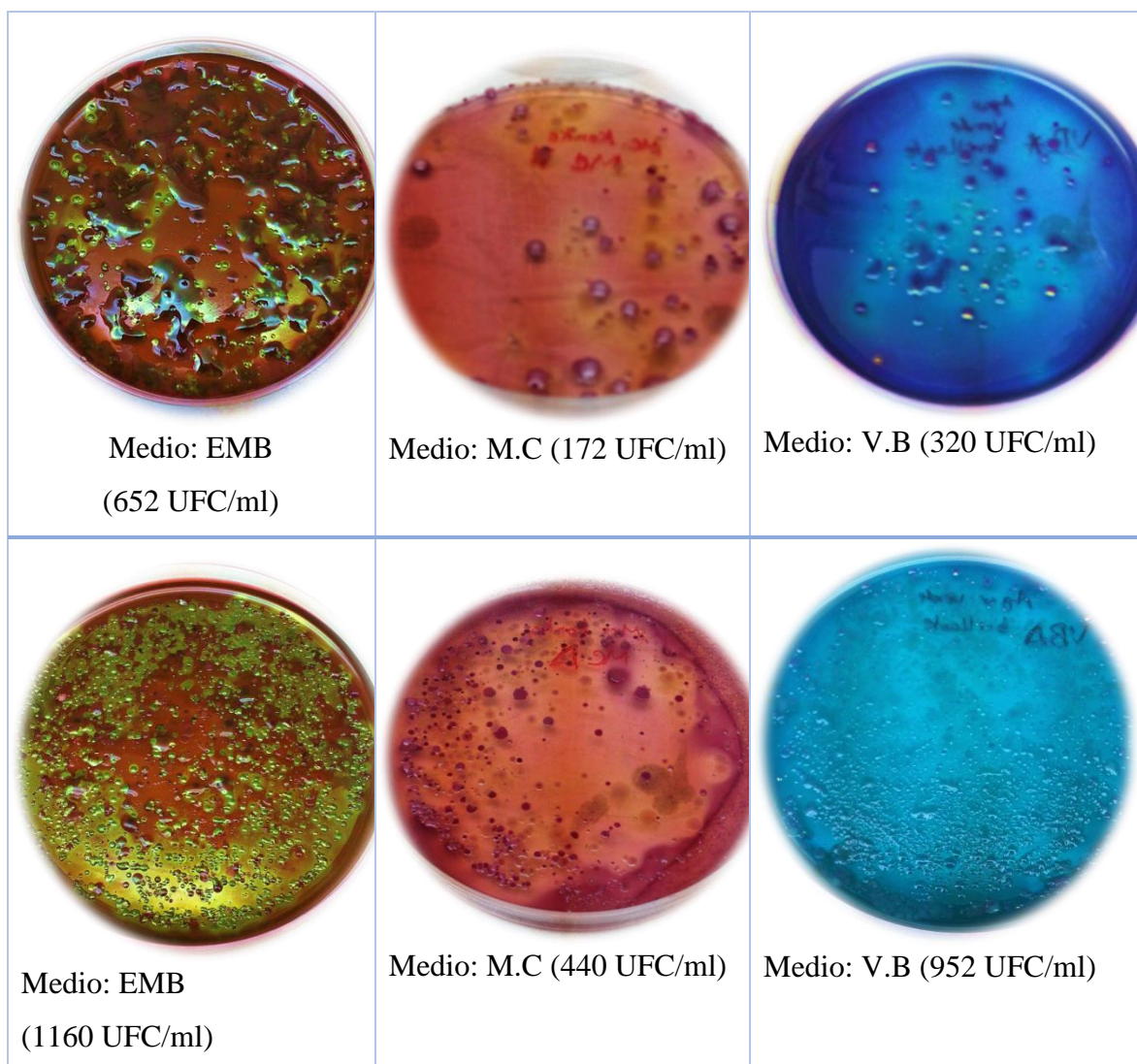


Figura 12: Colonias bacterianas encontradas en las muestras de agua del río Santa Elena

De estas colonias bacterianas se aislaron 13 y se realizaron pruebas bioquímicas para su identificación, dichas pruebas se reportan en la tabla 16, los resultados obtenidos de estas pruebas se llevaron a tablas de identificación de enterobacterias de las cuales se identificaron, 4 cepas *Edwardsiella tarda*, 5 *Salmonella gallinarum*, 2 *Salmonella pollorum*, 1 *Proteus vulgaris* y una cepa de *Salmonella I*.

La introducción de estas cepas al medio ambiente es principalmente por piensos contaminados, animales infectados (gallinas y pollos), y por el ser humano.

Tabla 16: Lecturas de bioquímicas de las cepas aisladas de las muestras de agua del río de Santa Elena

Muestra	I	RM	Vp	Cit	TSI	LIA	Identificación
1 T	+	+	-	-	+	d	<i>Proteus vulgaris</i>
2T	-	+	-	-	+	+	<i>Salmonella gallinarum</i>
1	-	+	-	-	+	+	<i>Salmonella gallinarum</i>
2	+	+	-	-	+	+	<i>Edwardsiella tarda</i>
3	+	+	-	-	+	+	<i>Edwardsiella tarda</i>
4	-	+	-	+	+	+	<i>Salmonella I.</i>
5	-	-	+	-	+	+	<i>Salmonella pollorum</i>
1*T	+	+	-	-	+	+	<i>Edwardsiella tarda</i>
2*T	+	+	-	-	+	+	<i>Edwardsiella tarda</i>
1*	-	+	-	-	+	+	<i>Salmonella gallinarum</i>
2*	-	+	-	-	+	+	<i>Salmonella gallinarum</i>
3*	-	+	-	-	+	+	<i>Salmonella gallinarum</i>
4*	-	-	+	-	+	+	<i>Salmonella pollorum</i>

+ Prueba positiva al indicador medido

- Prueba negativa al indicador medido

Con las 13 cepas identificadas, se realizaron las pruebas de susceptibilidad mediante el método de Kirby Bauer descrito anteriormente. Se encontró que 12 de estas cepas presentan resistencia ante los cinco tipos de sulfonamidas probadas (sulfametoxazol, sulfanilamida, sulfacetamida, sulfasalazina y sulfadiazina) y a cada una de las concentraciones estudiadas (25, 50, 100 y 200 ppm para cada uno de los antibióticos), una sola cepa del género *Salmonella gallinarum* fue medianamente sensible ante las diferentes sulfonamidas y sus respectivas concentraciones, formando halos de inhibición de 11 y 12 mm considerados como intermedios o medianamente sensibles, dichos resultados se presentan en la tabla 17.

Tabla 17: Pruebas de susceptibilidad a sulfonamidas probadas a concentraciones de 25, 50, 100, 200 ppm para cada antibiótico

Cepas	Sulfametoxazol	Sulfacetamida	Sulfasalazina	Sulfadiazina	Sulfanilamida
<i>Proteus vulgaris</i>	R	R	R	R	R
<i>Salmonella gallinarum</i>	R	R	R	R	R
<i>Edwardsiella tarda</i>	R	R	R	R	R
<i>Edwardsiella tarda</i>	R	R	R	R	R
<i>Edwardsiella tarda</i>	R	R	R	R	R
<i>Salmonella I</i>	R	R	R	R	R
<i>Salmonella pollorum</i>	R	R	R	R	R
<i>Salmonella pollorum</i>	R	R	R	R	R
<i>Salmonella gallinarum</i>	I	I	I	I	I
<i>Salmonella gallinarum</i>	R	R	R	R	R
<i>Salmonella gallinarum</i>	R	R	R	R	R
<i>Salmonella gallinarum</i>	R	R	R	R	R
<i>Edwardsiella tarda</i>	R	R	R	R	R
<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R

R=resistente I= medianamente sensible

Las pruebas de susceptibilidad a sulfonamidas a bacterias aisladas de las muestras de agua del río de Santa Elena pueden indicar que dichos antibióticos han estado o están presentes en el río antes mencionado, ya que diferentes cepas presentan resistencia bacteriana ante esta clase de antibióticos.

Con los resultados obtenidos de estas pruebas y con base a las principales fuentes de contaminación de los antibióticos descrito en la Fig.1, se deduce que las principales fuentes de contaminación por antibióticos (sulfonamidas), en la localidad de San Simón Atzitzintla, es probablemente la agroindustria y desechos domésticos, ya que dicha localidad no cuenta con una industria de síntesis y las cepas bacterianas identificadas son introducidas por animales y humanos.

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana han sido utilizadas en diferentes estudios para reportar la resistencia bacteriana y los genes que confieren resistencia a sulfonamidas en muestras de agua, por ejemplo: muestras de aguas superficiales del río Jiulong en el sureste de China, para detectar residuos de antibióticos sulfonamídicos y aislar bacterias resistentes, en las que encontraron una abundancia promedio de bacterias resistentes en las muestras de agua de 3.69×10^4 y 2.17×10^3 UFC ml⁻¹ en agosto de 2011 y mayo de 2012 respectivamente (Ou Danyun et al., 2015), otra investigación fue el estudio de la presencia de genes de resistencia a sulfonamidas en ambientes acuáticos con el objetivo de identificar posibles depósitos de microorganismos resistentes que podrían ser una amenaza para la salud humana y animal, encontrando que los genes más frecuentes fueron sul I y sul II presentes en todos los lagos del zoológico de Brasil (Silva C et al., 2016).

IX. MEDIDAS A IMPLEMENTAR PARA DISMINUIR EL IMPACTO AMBIENTAL DE LOS ANTIBIÓTICOS

La disminución del impacto ambiental de los antibióticos no puede ser alcanzada únicamente por la aplicación del tratamiento tecnológico para mitigar la contaminación, dado que en México solo se trata un 40% del agua residual. Aún en Países en donde se trate el 100% de sus aguas, la mejor solución es aplicar una serie de medidas que contribuyan de manera sustentable a solucionar el problema de la contaminación por fármacos. Las propuestas tienen que ir acompañadas de normas o regulaciones sobre la producción, comercialización, uso, y disposición antibióticos.

Es necesario contar también con una normativa ambiental sobre la cantidad máxima permitida de antibióticos en los diferentes compartimientos ambientales, incluida el agua potable. Para ello, es necesario un programa de monitoreo continuo. La combinación de regulaciones y medidas de manejo es fundamental para alcanzar un manejo integral y sustentable del recurso agua, y con ello contribuir a lograr los objetivos de la agenda 2030.

Por ejemplo, es necesario diseñar programas nutricionales en animales para reducir la necesidad de tratamiento con antibióticos durante el crecimiento, manejo adecuado del estiércol usando métodos como la fermentación, compostaje y contención de residuos animales. También es necesario un programa de actualización de los sistemas de tratamiento de aguas residuales en hospitales y municipios. Respecto a las políticas públicas son necesarias para establecer no solo programas adecuados de administración de antibióticos en el entorno clínico, sino también para el uso de antibióticos en la prevención y tratamiento de enfermedades de animales. Los programas de monitoreo por otra parte se enfrentan al gran reto de identificar a más de 3000 sustancias farmacéuticas empleadas hoy en día.

Tomando las regulaciones existentes de la Unión Europea (UE) como ejemplo, las contenidas en el programa de regulación REACH, evalúan, autorizan y restringen el uso de casi todas las sustancias químicas importadas en la UE (Regulación CE No. 1907/2006), principalmente las relacionadas a la actividad agrícola: la Directiva de Uso Sostenible (Directiva, 2009) se enfoca a los productos químicos para la protección de las plantas; respecto a las fuentes de contaminación puntuales, existen varias Directivas y regulaciones importantes como la Directiva de Emisiones Industriales (Directiva 2010), el Registro Europeo de Transferencia

y liberación de Contaminantes (Regulación EC No 166/2006), la Regulación EC No 1107/2009 respecto a la comercialización de productos fitosanitarios y la Directiva sobre Tratamiento de las Aguas Residuales Urbanas (Directiva del Consejo, 1991). Por último, la Directiva Marco del agua (Directiva 2000) proporciona una red de seguridad, incluida la identificación y el control, así como una lista de sustancias prioritarias para las cuales se encuentran establecidos los límites de concentración en la Directiva sobre normas de calidad medioambiental (Directiva 2008).

Todas estas medidas son necesarias para poder minimizar el problema de la contaminación por antibióticos, así mismo el incremento de la resistencia bacteriana que es el principal problema asociado a dicha contaminación.

Respecto a la zona de Estudio, en la visita que se realizó a la planta de tratamiento ubicada en la localidad de San Simón Atzitzintla, se pudo observar que no se cuenta con un programa de mantenimiento; el personal técnico no está adecuadamente capacitado para el funcionamiento correcto de la planta, que es operada por una sola persona; la planta no opera continuamente debido a descargas tóxicas provenientes de una fábrica textil ubicada en las cercanías que provocan que el reactor biológico se inactive o desestabilice. El agua que es tratada, aunque cumple con lo establecido en la NOM-003-ECOL-1997, aun contiene microorganismos y una Demanda Química de Oxígeno alta, que sugiere la presencia de materia orgánica recalcitrante. En San Simón Atzitzintla no se cuenta con datos para la cuantificación de las fuentes de contaminación por antibióticos, es decir no se cuenta con registros de la cantidad de antibióticos que son vendidos en farmacias y veterinarias, así como tampoco existe un registro de las enfermedades más frecuentes ni de las prescripciones médica emitidas, todo ello dificulta la identificación de los agentes causales del impacto ambiental de antibiótico en esta zona.

X. CONCLUSIONES

Se puede concluir que la enzima manganeso peroxidasa es capaz de oxidar a los cinco antibióticos estudiados, con altas velocidades, tiempos cortos de reacción y obteniendo altos porcentajes de conversión, mayores al 90%.

Las pruebas de biodegradabilidad indican que los antibióticos son compuestos tóxicos o poco degradables al obtenerse valores alrededor de cero de la DBO; mientras que dos productos de reacción del sulfametoxazol y sulfasalazina, presenta mayor biodegradabilidad que los antibióticos, ya sea por tener menor capacidad antimicrobiana o mayor biodegradabilidad.

Las pruebas realizadas en muestras de agua real nos indican que la enzima manganeso peroxidasa es capaz de oxidar a 3 de los antibióticos (sulfametoxazol, sulfasalazina y sulfadiazina), bajo la condición óptima ensayada en muestras modelo, obteniendo porcentajes de conversión mayores al 80 %.

En cuanto a las pruebas de susceptibilidad sugieren que las sulfonamidas han estado presentes en el agua del río Santa Elena, ya que diferentes cepas bacterianas aisladas presentaron resistencia ante estos antibióticos a concentraciones de 25, 50, 100, 200 ppm.

Como se puede ver en los diferentes resultados presentados a lo largo de este trabajo el tratamiento biocatalítico es una interesante alternativa para la degradación de antibióticos; sin embargo, es necesario la realización de estudios posteriores para profundizar en el estudio de los productos generados mediante este tratamiento.

XI. LITERATURA CITADA

- **Barceló, D.** y López, M. (2007). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. En: Panel Científico- Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC.
- **Bahn Müller, S.,** Gunten, U., Canonica, S. (2014). Sunlight-induced transformation of sulfadiazine and sulfamethoxazole in surface waters and wastewater effluents. *Water Research*, 57, 183-192.
- **Calvo, J.** y Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27, 44-52.
- **Colin, L.,** Minnis, D., Derrick, J. (2008). Dihydropteroate synthase from *Streptococcus pneumoniae*: structure, ligand recognition and mechanism of sulfonamide resistance. *Biochemical Journal*, 412 (2), 379-388.
- **Conesa, A.,** Veld, F., Sheldans, R., Punt, P., Hondel, C. (2001). Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 17635-17646.
- **Cue, M** y Morejon, M. (1999). Antibacterianos de acción sistémica: Parte III. Sulfonamidas y tetraciclinas. *Med Gen Integr*, 15, 156-167.
- **Diario Oficial de la unión europea.** (1991, 21 de mayo). Directive 91/27/EEC of 21 May 1991 concerning urban waste-water treatment. Official Journal; L135, 30/05/1991, 40–52.
- **Diario Oficial de la unión europea.** (2000, 23 de octubre). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a

framework for Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Union; L327, 22.12.2000, 1–73.

- **Diario Oficial de la unión europea.** (2008, 16 de diciembre). Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy. Official Journal of the European Union; L348, 24.12.2008, 84–97.
- **Diario Oficial de la unión europea.** (2010, 24 de noviembre). Directive 2010 EU of the European Parliament and of the Council of 24 November 2010 on industrial emissions (integrated pollution prevention and control). Official Journal of the European Union; L334, 17.12.2010, 17–119.
- **Dreser, A.,** Wirtz, V., Corbett, K., Echániz, G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Publica Mex*, 50, 10-26.
- **Eibes, G.,** Debernardi, G., Feijoo, G., Moreira, M., Lema, J. (2011). Oxidation of pharmaceutically active compounds by a ligninolytic fungal peroxidase. *Biodegradation*, 22(3), 539-50.
- **González, A.,** Terrón, M., González, T., Cuenca, A., Carbajo, J. (2005). *Biodegradación de compuestos aromáticos por hongos basidiomicetos.* En *Biotecnología y medioambiente.* (pp. 90-111) Madrid: Ephemera.
- **González, T.** (2001). *Aspectos fisiológicos y moleculares de la decoloración enzimática de efluentes de destilería con el basidiomiceto Trametes sp* (Tesis Doctoral). Departamento de Microbiología, Universidad de Alcalá, España.
- **Hernando, M.,** Heath, E., Petrovic, M., Barcelo, D. (2006). Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 985-991.

-
- **Henning, S.,** Pierre, G., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., Haan, C. (2009). *La larga sombra del Ganado*. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/011/a0701s/a0701s00.htm>.

 - **Hignite, C y Azarnoff, D.** (1977). Drugs and drugs metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and Salicylic acis in sewage water effluent. *Life Sci*, 20(2), 337-341.

 - **Inoue, Y.,** Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., Nishida, T. (2010). Elimination and detoxification of triclosan by manganese peroxidase from white rot fungus. *Journal of Hazardous Materials*, 180(1-3),764-767.

 - **Kiiskinen, L.,** Kruus, K., Bailey, M., Ylösmäki, E., Siika-aho, M., Saloheimo, M. (2004). Expression of Melanocarpusalbomyceslaccase in Trichodermareeseiand characterization of the purified enzyme. *Microbiology*, 150, 3065-3074.

 - **Kyung, y.,** Wu, L., Zhao, Y., Waddell, B., Ferreira, A., Lee, R., Donald, B., Stephen, W. (2012). Catalysis and Sulfa Drug Resistance in Dihydropteroate Synthase. *Science*,335, 1110-1114.

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

 - **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.

 - **Nikolaou, A.,** Meric, S., Fatta, D. (2007). Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1225-1234.

-
- **OIE** (Organización Mundial de Sanidad Animal). (2015). Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria. Recuperado de: http://www.oie.int/fileadmin/home/esp/our_scientific_expertise/docs/pdf/sp_oie_list_antimicrobials_mayo2015.pdf

 - **Ou, D.**, Chen, B., Bai, R. (2015). Contamination of sulfonamide antibiotics and sulfamethazine-resistant bacteria in the downstream and estuarine areas of Jiulong River in Southeast China. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 12104-12113.

 - **Quesada, P.**, Jáuregui, U., Wilhelm, A., Delmas, H. (2009). Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. *Ciencias Biológicas*, 40(3),173-179.

 - **Ramos, A.** (2009). Medicamentos de consumo humano en el agua, propiedades físico-químicas. *Rev Cubana Hig Epidemiol*, 47(2).

 - **Rocha, C.**, Reynolds, N., Simons, M. (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 32(1),139-45.

 - **Salas, R.** (2015). Alertan de bacterias super resistentes a los antibióticos. *Excelsior*. Recuperado de :[://www.excelsior.com.mx/nacional/2015/04/06/1017307](http://www.excelsior.com.mx/nacional/2015/04/06/1017307).

 - **Sándor, Z.**, Papp, Z., Kosáros, T., Hegedüs, R., Csengeri, I. (2012). Potencial Effects of pharmaceuticals and their residues in aquatic environment. *Studia Universitatis Vasile Goldis*, 22(2), 247-255.

 - **Shin, S.**, Kuo, L., Hong T. (2012). The implication of mediators for enhancement of laccase oxidation of sulfonamide antibiotics. *Bioresource Technology*, 113, 259-264.

-
- **Smilack J.** (1999). Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 74, 730-734.

 - **Steinfeld, H.,** Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., Cees, H. (2009). La larga sombra del Ganado. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/011/a0701s/a0701s00.htm>.

 - **Mosquito, S.,** Ruiz, J., Theresa, O. (2011) Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en Escherichia Coli asociadas a diarreas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(4),648-56.

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

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

 - **Torres, E.,** Méndez, A. (2014). Biocatálisis Ambiental: Detección, cuantificación y tratamiento de contaminantes emergentes. Recuperado de <http://www.icuap.buap.mx/sites/default/files/revista/2014/01/biocatalisis.pdf>

 - **Thurston, C.** (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19–26.

 - **Touahar, I.,** Haroune, L., Ba, S., Bellenger, J., Cabana, H. (2014). Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Science of The Total Environment*, 481,90-99.

 - **Unión Europea.** (2006, 18 de diciembre). Regulation (EC). No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the

Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/ EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93. Official Journal of the European Union, L39611. Retrieved from <http://www.reach-compliance.eu/irish/legislation/docs/launchers/launch-2006-1907-EC.html>.

- **Unión Europea.** (2006, 18 de enero). Regulation (EC). No 166/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 January 2006 concerning the establishment of a European Pollutant Release and Transfer Register and amending Council Directives 91/689/EEC and 96/61/EC. Official Journal of the European Union, L33, 4.2.2006, 1-17. Retrieved from (<http://eur-lex.europa.eu/oj/direct-access.html>).
- **Unión Europea.** (2009, 21 de octubre). Regulation (EC). No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Official Journal of the European Union, L 309, 24.11.2009,1-50. Retrieved from (<http://eur-lex.europa.eu/oj/direct-access.html>).
- **Villazán, F., Villazán, N., Rodales, M.** (2013). La situación del recurso hídrico en México, el consumo interno, mediante autoproducción. Una alternativa económica en los oopas. *INCEPTUM*, 3 (14), 25 – 37.
- **Vives, A., Vetriglia, M., Medvedovsky, D., Rothlin, R.** (2004). Inhibidores de la síntesis de ácido tetrahidrofólico. Recuperado de <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/quimioterapicos-inhibidores-de-la-sintesis-de-acido-tetrahidrofolic.pdf>.
- **Welinder, K.** (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2 (3), 388-393.