

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE FÁRMACOS PRESENTES EN AGUA RESIDUAL MEDIANTE DOS PROCESOS COMBINADOS: OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA-LODOS ACTIVADOS Y OXIDACIÓN ENZIMÁTICA-LODOS ACTIVADOS

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. EN B. CELESTINO ODÍN RODRÍGUEZ NAVA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. IGNACIO GONZÁLEZ MARTÍNEZ

ASESORES:

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

DR. HUGO CÉSAR RAMÍREZ SAAD

CIUDAD DE MÉXICO

MAYO 2017

AGRADECIMIENTOS

A la vida, por todas las sensaciones y emociones que he tenido oportunidad de experimentar; por mostrarme todas las maravillas que me han motivado a querer ser un hombre de ciencia; por tener salud y seres queridos a mi lado.

A mi hija preciosa Ana Quetzalli, literalmente me acompañaste durante todo el proceso del doctorado, tu llegada a este mundo representó una nueva etapa en mi vida lleno de sorpresas y me hizo crecer como persona. Quetzalli hermosa, llenas de infinita felicidad mi ser todo el tiempo y me motivas a enfrentar a la vida con la mejor actitud, para verte siempre crecer feliz.

A mi familia gracias por acompañarme y motivarme para llevar a cabo mis proyectos. Han sido el ejemplo que a marcado mis inquietudes profesionales.

Nacho un especial agradecimiento por tu confianza depositada en mí, por tu paciencia, por enseñarme y ayudarme a crecer como persona y como profesional.

A mis asesores, los doctores Hugo Ramírez y Octavio Loera por su paciencia, enseñanzas y apoyo brindado para llevar a cabo éste trabajo.

A mis sinodales, los doctores Margarita Teutli y Germán Buitrón, por sus acertdos comentarios que enriquecieron el escrito.

A mis amigos y alumnos que me apoyaron durante este tiempo. Paco, Cinthya, Leslie, Fuad, Jessica, Jennifer, Magaly, Rafael, Rocio, Ana, Griselda, Edith, Omar, Daniel e Itzel. Muchas gracias!

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa en Programa Nacional de Posgrados de calidad (PNPC) del CONACYT con la referencia 001466.

El Presente trabajo se desarrolló en los laboratorios de: Biología Molecular del departamento de Biotecnología y Electroquímica Aplicada del departamento de Química, ambos en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad-Iztapalapa. Al igual que en el laboratorio de Ecología Molecular del departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad-Xochimilco.

PRODUCTOS DE ESTA TESIS

PUBLICACIÓN

Rodriguez-Nava O. Ramírez-Saad H. Loera O. Gonzalez I. 2016. Evaluation of the simultaneous removal of recalcitrant drugs (bezafibrate, gemfibrozil, indomethacin and sulfamethoxazole) and biodegradable organic matter from synthetic wastewater by electro-oxidation coupled with a biological system. Environmental Technology. No. 37(23): 2964-2974.

PARTICIPACIÓN EN EVENTOS ACADÉMICOS NACIONALES

Año	Evento	Nombre de la ponencia
2015	1° Congreso Nacional AMICA	Estudio de la correlación entre actividades enzimáticas de lacasa y manganeso peroxidasa con la remoción de fármacos
2014	XLVII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas	Evaluación de la degradación de fármacos mediante enzimas peroxidadas producidas por tres hongos ligninocelulíticos
2014	XLVII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas	Optimización del método para la cuantificación de fármacos mediante electroforesis capilar
2013	National Congress of Biotechnology and Bioengineering	Studyng emergent pollutans degradation:sludge and activated adaptation in synthetic wastewater to avoid bulking formation

PARTICIPACIÓN EN EVENTOS ACADÉMICOS INTERNACIONALES

Año	Evento	Nombre de la ponencia
2015	66th Annual meeting of the International Society of Electrochemistry	Removal of emerging pollutants and biodegradable organic matter from wastewater by combined electrochemical-biological processes
2013	64th Annual meeting of the International Society of Electrochemistry	Evaluation of pharmaceutical compounds containing in synthetic wastewater using the FM01-LC electrochemical reactor and its effect on the microbial population structure of an activated sludge

Ciudad de México a 11 de mayo del 2017

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Evaluación de la remoción de fármacos presentes en agua residual mediante
dos procesos combinados: oxidación electroquímica-lodos activados, y
oxidación enzimática-lodos activados**

Que presentó

Celestino Odín Rodríguez Nava

Comité Tutorial:

Director: Dr. Ignacio González Martínez

Asesor: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor: Hugo César Ramírez Saad

Jurado:

Presidente: Dr. Oscar Armando Monroy Hermosillo _____
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Secretario: Dr. Hugo César Ramírez Saad _____
Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco

Vocal: Dra. María Maura Margarita Teutli León _____
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ingeniería

Vocal: Dr. Germán Buitrón Méndez _____
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Ingeniería

RESUMEN

La degradación de fármacos en plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales representa un reto, ya que los efluentes de aguas residuales municipales y hospitalarios contienen productos farmacéuticos en bajas concentraciones, y materia orgánica biodegradable, en mayor concentración. Varios fármacos han mostrado ser recalcitrantes y persistentes en las plantas de tratamiento, además de ser tóxicos sobre diversas especies bioindicadoras. Para contribuir a disminuir la problemática provocada por la presencia de fármacos en aguas residuales; en este trabajo se evaluaron tres diferentes procesos para remover los fármacos; dos de ellos, fueron procesos combinados y uno enzimático. Los fármacos considerados en este trabajo son: bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol.

En los procesos combinados, el objetivo fue proponer un tren de tratamiento para la eliminación simultánea de los fármacos y materia orgánica biodegradable presentes en agua residual sintética, a través de dos etapas: la primera o pre-tratamiento, tiene como propósito degradar parcialmente los fármacos (formar intermediarios más biodegradables), controlando las condiciones de operación para evitar la oxidación de la materia orgánica biodegradable; la segunda etapa, tiene como objetivo degradar simultáneamente los fármacos previamente oxidados junto con la materia orgánica por los lodos activados. En el tercer proceso se evaluó la degradación de los fármacos bezafibrato, gemfibrozil, indometacina, diclofenaco y sulfametoxazol por enzimas lignolíticas producidas por tres hongos basidomicetos, *Trametes maxima*, *Pleurotus sp* y *Pycnoporus sanguineus* en un medio de cultivo idóneo.

Con respecto a la evaluación del sistema combinado enzimático-lodos activados, en el pre-tratamiento se utilizó el producto comercial Biolite®, el cual contiene la enzima lacasa en bajas concentraciones. Utilizando 300 mg L⁻¹ del producto comercial en agua residual sintética, en una hora de reacción, se removieron: 25 % de bezafibrato, 1.5 % de gemfibrozil, 0.24% de indometacina y 4.92 % de sulfametoxazol; no obstante, estos compuestos fueron

eliminados completamente en el reactor de lodos activados sin verse afectado el desempeño en la remoción de la materia orgánica (83.77 %) del agua residual por los lodos activados. Mientras que el sistema de lodos activados sin pre tratamiento enzimático, sólo removió 68 % de la materia orgánica biodegradable y 40% del fármaco sulfametoxazol.

Adicionalmente, se evaluó la degradación de los fármacos bezafibrato, gemfibrozil, indometacina, sulfametoxazol y diclofenaco, por las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa producidas por tres hongos basidomicetos (*Trametes maxima*, *Pleurotus* sp. y *Pycnoporus sanguineus*) en medio de cultivo Sivakumar. En este experimento, la mayor eficiencia de degradación de fármacos se obtuvo con el hongo *Trametes maxima*, el cual produjo el extracto enzimático con mayores actividades específicas: lacasa (1985.7 ± 67.4 U mg⁻¹ de proteína) y manganeso peroxidasa (387.6 ± 67.4 U mg⁻¹ de proteína). En una hora de reacción, el extracto enzimático producido por este hongo degradó 32.59; 90.2; 43.39; 60.76 y 72.62 % de los fármacos bezafibrato, diclofenaco, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol, respectivamente. En este trabajo se atribuye la degradación de los fármacos a la enzima manganeso peroxidasa debido a la correlación entre la actividad enzimática y el porcentaje de degradación de todos los fármacos en los tres hongos evaluados; además se encontró que la enzima lacasa por si sola no fue capaz de degradar los fármacos seleccionados a excepción del diclofenaco.

En lo que respecta al sistema combinado electroquímico-lodos activados, para el retratamiento electroquímico, se determinaron los parámetros de operación del reactor de laboratorio tipo filtro prensa FM01-LC con recirculación (flujo de 1.2 L s⁻¹ y densidad de corriente de 1.56 mA cm⁻²), utilizando como ánodo el diamante dopado con boro. Los parámetros de operación del reactor fueron seleccionados a partir de las pruebas de microelectrólisis, con el fin de transformar la biodegradabilidad de los fármacos, sin modificar la concentración de la materia orgánica y asimismo, controlar la producción de cloro para que, por un lado, evitar la formación de microorganismos filamentosos causantes de “bulking” en el proceso biológico, y por otro lado, para no afectar la operación de los lodos activados. Las aguas residuales tratadas previamente en el reactor FM01-LC, se alimentaron directamente al reactor de lodos activados para eliminar el 100% de los fármacos

y 83% de la materia orgánica biodegradable; por el contrario, los fármacos contenidos en las aguas residuales, sin pre tratamiento electroquímico previo, fueron persistentes en el proceso biológico y provocaron la formación de bulking.

El análisis de huella metagenómica de las comunidades microbianas presentes en los reactores de lodos activados, alimentados con agua residual y fármacos, mostraron que los pre-tratamientos enzimático y electroquímico, así como la presencia de fármacos modificaron la estructura de la comunidad microbiana de los lodos activados, con respecto al reactor de lodos activados alimentado con agua residual; a pesar de esto, el desempeño de los lodos activados en la remoción de la materia orgánica biodegradable fue eficiente.

ABSTRACT

Drug degradation in conventional wastewater treatment plants is a huge challenge; given the fact that municipal and hospital wastewater effluents contain pharmaceuticals in low concentrations and biodegradable organic matter in higher concentrations, biodegradable organic matter turns out to be the main pollutant. Several drugs have proved to be recalcitrant and persistent in wastewater treatment plants and these substances are toxic to different bioindicators. To diminish the problem caused by the presence of drugs in wastewater, three different processes of drug removal were evaluated in this work. Two combined processes (pre-treatment- activated sludge) were enzymatic-activated sludge and electrochemical oxidation-activated sludge. The third process evaluated was a single enzymatic process. The drugs considered in this study are: bezafibrate, gemfibrozil, indomethacin and sulfamethoxazole.

In the combined processes, the main aim was to simultaneously eliminate pharmaceutical compounds and biodegradable organic matter in synthetic wastewater using a two stage treatment train. The first stage was a pre-treatment to partially degrade the drugs (forming more biodegradable intermediates) controlling the operation conditions to avoid degrading biodegradable organic matter. The second stage was aimed to simultaneously degrade the previously oxidized drugs and BOM by activated sludge. In the third process, degradation of bezafibrate, gemfibrozil, indomethacin, diclofenac and sulfamethoxazole was evaluated by ligninolytic enzymes produced by three basidiomycetes: *Trametes maxima*, *Pleurotus sp.* and *Pycnoporus sanguineus*.

In enzymatic-activated sludge processes, a commercial product used (Biolite®) contained laccase enzyme in low concentrations. The pre-treatment consisted in removing BGIS with 0.3 g L⁻¹ of Biolite® (this concentration was previously selected based on specific activity of this commercial product) in synthetic wastewater in one hour of reaction time. Low drug removal efficiencies were obtained: bezafibrate, 1.5% for gemfibrozil, 0.24% for indomethacin and 4.92% for sulfamethoxazole. However, these compounds were completely eliminated in the activated sludge reactor without affecting the performance in biodegradable

organic matter removal (83.77%), whereas the activated sludge system without enzymatic pre-treatment only removed 68% of organic matter and 40% of sulfamethoxazole.

Also, the degradation of bezafibrate, gemfibrozil, indomethacin, sulfamethoxazole and diclofenac drugs was evaluated by laccase and manganese peroxidase enzymes produced by three basidiomycete fungi (*Trametes maxima*, *Pleurotus sp.* and *Pycnosporus sanguineus*) grown in Sivakumar culture. In this experiment, the highest efficiency of drug degradation was obtained with *Trametes maxima*, which produced the enzymatic extract with the highest specific activity: laccase ($1985.7 \pm 67.4 \text{ U mg}^{-1}$) and manganese peroxidase ($387.6 \pm 67.4 \text{ U mg}^{-1}$). In one hour of reaction, the enzymatic extract produced by *Trametes maxima* degraded 32.59, 90.2, 43.39, 60.76 and 72.62% of bezafibrate, diclofenac, gemfibrozil, indomethacin and sulfamethoxazole, respectively. In this work, the degradation of drugs is attributed to manganese peroxidase enzyme due to the correlation between the enzymatic activity and removal % in the three species evaluated. In addition, it was found that laccase enzyme can only degrade diclofenac.

In electro-oxidation-activated sludge process for the simultaneous removal of recalcitrant bezafibrate, gemfibrozil, indomethacin and sulfamethoxazole drugs and biodegradable organic matter from wastewater, high removal efficiencies were attained without affecting the performance of activated sludge too. Drugs degradation was performed by advanced electrochemical oxidation and the activated sludge process for biodegradable organic matter degradation in a continuous reactor. The selected electrochemical parameters from microelectrolysis tests (1.2 L s^{-1} and 1.56 mA cm^{-2}) were maintained to operate a filter press laboratory reactor FM01-LC using boron-doped diamond as anode. The low current density was chosen in order to remove drugs without decreasing organic matter and chlorine concentration control, so as to avoid bulking in the biological process. The wastewater previously treated by FM01-LC was fed directly (without chemical modification) to the activated sludge reactor to remove 100% of drugs and 83% of biodegradable organic matter; conversely, drugs contained in wastewater without electrochemical pre-treatment were persistent in the biological process and promoted bulking.

The analysis of the metagenomics footprint of the microbial communities present in activated sludge fed with synthetic wastewater and drugs showed that the enzymatic and electrochemical pre-treatments as well as the presence of drugs modified the microbial community structure of the activated sludge with respect to the activated sludge reactor fed with only synthetic wastewater. In spite of this, the performance of activated sludge in the removal of biodegradable organic matter by the two processes was efficient.

Contenido

ACRÓNIMOS.....	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO I.	5
PROBLEMÁTICA DE LOS FÁRMACOS EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS	5
Explotación de agua para consumo humano en el planeta	6
Consumo del agua potable en México	7
Generación de aguas residuales en México.....	8
Ruta de los fármacos hacia cuerpos de aguas naturales.....	11
Remoción de compuestos farmacéuticos en plantas de tratamiento	12
Efecto tóxico de fármacos sobre especies bioindicadoras.....	16
Crustáceo.....	17
Fármacos persistentes en plantas de tratamiento de aguas residuales y tóxicos en ecosistemas acuáticos	22
CAPÍTULO II.	23
DEGRADACIÓN DE FÁRMACOS POR PROCESOS BIOLÓGICOS, ENZIMÁTICOS, ELECTRÓQUÍMICOS Y COMBINADOS.....	23
Degradación de fármacos mediante procesos biológicos.....	24
Degradación de fármacos por sistemas enzimáticos.....	26
Degradación de fármacos por sistemas de oxidación electroquímica	29
Degradación de fármacos por sistemas combinados	34
CAPÍTULO III.....	37
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO	37
CAPÍTULO IV.....	40
Evolución de la técnica analítica de electroforesis capilar	41
Ventajas de la técnica analítica de electroforesis capilar	41
Electroforesis Capilar de Zona	42
Metodología para cuantificación de fármacos en agua residual sintética	45
Procedimiento de preparación de agua residual sintética:.....	47
Purificación de fármacos conforme al método EPA 1694.	48
Cuantificación de los fármacos	49
Resultados y discusión de cuantificación de fármacos por electroforesis capilar de zona.....	50
Efecto del pH de buffer de fosfatos para la optimización del método de electroforesis capilar de zona.....	51
Selección de la concentración de buffer de fosfatos.	52
Velocidad de migración de los fármacos.	53
Comparación del porcentaje de respuesta y resolución entre cada fármaco.	55
Conclusión	59
CAPÍTULO V.	61

EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LOS FÁRMACOS POR SISTEMA COMBINADO DE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO-LODOS ACTIVADOS Y EFECTO DEL PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO SOBRE LODOS ACTIVADOS	61
Metodología para la evaluación de la degradación de fármacos por un sistema combinado enzimático-lodos activados	62
Evaluación del efecto del pre-tratamiento enzimático sobre las comunidades bacterianas de los lodos activados	65
Resultado del sistema enzima-lodos activados	66
Conclusiones de la evaluación de la degradación de fármacos por un sistema combinado enzimático-lodos activados y efecto del pre-tratamiento de lodos activados sobre los lodos activados	80
CAPÍTULO VI	81
EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE FÁRMACOS POR ENZIMAS LIGNOLÍTICAS PRODUCIDAS POR HONGOS BASIDIOMICETOS	81
Degradación de fármacos por enzimas peroxidasas producidas por los hongos <i>Trametes maxima</i> , <i>Pleurotus sp.</i> y <i>Pycnoporus sanguineus</i>	82
Metodología para la evaluación de la degradación de fármacos por enzimas peroxidasas	82
Resultados de degradación de fármacos con enzimas lignolíticas producidas por hongos basidiomicetos	84
Conclusiones	90
CAPÍTULO VII	92
DEGRADACIÓN DE FÁRMACOS MEDIANTE UN SISTEMA COMBINADO DE OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA Y BIOLÓGICO	92
Metodología para evaluación de sistema combinado electroquímico biológico en la remoción de fármacos	93
Experimentos microelectrólisis	95
Operación del reactor electroquímico	96
Experimentos biológicos	97
Evaluación de la estructura de la comunidad microbiana	98
Resultados y discusión	98
CAPÍTULO VIII	111
ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PROCESOS DE OXIDACIÓN EVALUADOS EN LA DEGRADACIÓN DE FÁRMACOS	111
Análisis comparativo de los procesos combinados	112
Perspectivas de los tratamientos enzimáticos y combinados en la degradación de fármacos	116
BIBLIOGRAFÍA	118
ANEXOS	127
ANEXO 1. MARCO CONCEPTUAL	127
Enzimas lignolíticas	127
Lacasa	127
Manganeso Peroxidasa	132
Lignina Peroxidasa	133

Procesos de Oxidación Avanzada.....	134
Incineración Electroquímica	136
ANEXO 2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	146
Soluciones para DQO	146
Solución de dicromato de potasio.....	146
Solución de sulfato de plata en ácido sulfúrico.....	146
Determinación de la DQO. (El procedimiento se realizó conforme al procedimiento descrito en la norma NMX-AA-030-SCFI-2001)	146
Sólidos suspendidos volátiles. (Se determinaron conforme a la norma NMX-AA-034/2008)	147
ANEXO 3. ANÁLISIS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	147

Contenido de figuras

Figura 1. Sectores con mayor consumo de agua en la República Mexicana en 2014(CONAGUA, 2015)	7
Figura 2. Aumento de la demanda de agua potable para uso público en México (CONAGUA, 2015)	8
Figura 3. Incremento de la capacidad instalada en el tratamiento de aguas residuales municipales en México (CONAGUA, 2015)	9
Figura 4. Rutas comunes de los fármacos al suelo y a cuerpos de agua	11
Figura 5. Fármacos degradados y recalcitrantes en PCTAR localizadas en diferentes partes del mundo.....	14
Figura 6. Fármacos con mayor nivel de toxicidad EC_{50} y LOEC sobre diferentes especies bioindicadoras (a partir de los datos reportados por Santos <i>et al.</i> 2010).....	19
Figura 7. Concentración más baja en donde se observó efecto (LOEC) sobre diferentes especies bioindicadoras por los fármacos estudiados (elaborado a partir de los datos reportados por Santos <i>et al.</i> 2009).	20
Figura 8. Electroferograma típico obtenido por equipo de electroforesis capilar	45
Figura 9. Diagrama de flujo para determinar el límite de detección de los fármacos en ARS	50
Figura 10. Perfiles de migración en electroforesis capilar de amoxicilina (A), bezafibrato (B), gemfibrozil (G), indometacina (I) y sulfametoxazol(S), a diferentes concentraciones de buffer de fosfatos (pH 7) indicados en la figura	51
Figura 11. Áreas obtenidas a partir de los electroferogramas de los fármacos de amoxicilina, bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol a los valores pH de 7, 8 y 9 utilizando 30 mM de buffer de fosfatos	52
Figura 12. Influencia de la concentración del buffer de fosfatos pH 8, sobre las áreas obtenidas por las señales electroforéticas de cada uno de los fármacos amoxicilina, bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol contenidos en la solución madre.....	53
Figura 13. Efecto de la concentración del buffer de fosfatos sobre la velocidad de migración de ABGIS a los diferentes valores de pH 7, 8 y 9.....	54
Figura 14. Electroferogramas de los fármacos bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol (BGIS) [40 ng L ⁻¹ de cada uno] en agua residual sintética extraídos por fase sólida C ₁₈ . Los electroferogramas se obtuvieron con el método optimizado: buffer de fosfatos a una concentración de 30 mM y un tiempo de inyección de 15 segundos.	58
Figura 15. Curva de calibración de los fármacos bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol presente en el agua residual sintética, purificados y concentrados previamente en columna C ₁₈ por el método EPA 1964.	59
Figura 16. Diagrama del sistema utilizado para la operación del reactor de lodos activados. Las condiciones de operación se muestran en la figura.	65
Figura 17. Actividad específica de enzima lacasa a diferentes concentraciones del producto comercial Biolite® en ARS, utilizando ABTS como sustrato.	67
Figura 18. Degradación de fármacos después de 1 hora de reacción de la mezcla conteniendo Biolite en ARS (300 mg/L) y 200 µg/L de fármacos.	68
Figura 19. Electroferogramas de los fármacos en ARS con una concentración de 200 µg L ⁻¹ , obtenidos después de 6 horas de exposición con el producto comercial Biolite a diferentes concentraciones indicadas en la figura.....	69
Figura 20. Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico al 12 %, carriles B, D y F corresponden al producto comercial Biolite con una masa de 92 µg; carriles A, C y E corresponden a un coctel de enzimas obtenida del laboratorio de bioquímica de macromoléculas de la UAM-I. En la figura se identifican las bandas correspondientes a la enzima lacasa.	70

Figura 21. Evaluación de la remoción de DQOs por los reactores R1 (ARS), R2 (ARS+BGIS), R3 (ARS+ABGIS tratado previamente con enzima comercial Biolite®). Influentes con figuras sólidas y efluentes con figuras sin fondo.....	72
Figura 22. Producción de lodos activados como SSVLM (mg L ⁻¹) durante la operación de los reactores R1 (ARS), R2 (ARS+BGIS), R3 (ARS+ABGIS tratado previamente con enzima comercial Biolite®).....	73
Figura 23. Relación F: M (alimento-microorganismos) obtenida durante la operación de los lodos activados aerobios R1, R2 y R3	74
Figura 24. Perfiles de bandeos obtenidos en la PCR-DGGE del fragmento V6-V8 del 16S rRNA proveniente de los reactores R1 (ARS), R2 (ARS+BGIS) y R3 (ARS+BGIS tratado previamente con Biolite), a diferentes días de operación indicados en la figura.	76
Figura 25. Patrones de PCR-DGGE (derecha) y dendrograma de similitud (izquierda) de los genes 16SrRNA en su región variable V6-V8 obtenidas por el método UPGMA, a partir de las muestras de los lodos activados presentes en los reactores R1 (ARS), R2 (ARS+BGIS) y R3 (ARS+BGIS tratado previamente con Biolite), a diferentes días de operación 121, 124, 127,139 y 161 días, indicados en la figura.	77
Figura 26. Reconstrucción filogenética de las secuencias del gen 16SrRNA de los reactores R1 (ARS), R2 (ARS+BGIS) y R3 (ARS+BGIS previamente tratados con el producto comercial Biolite)	79
Figura 27. Actividades enzimáticas específicas de lacasa y MnP determinadas después de 9 días de cultivo de los hongos en medio Sivakumar modificado (2010).	84
Figura 28. Áreas de los fármacos (BZF, bezafibrato; DCF, diclofenaco; GBF, gemfibrozil; IND, indometacina; SMX, sulfametoxazol), obtenidas para los tratamientos control (sin hongo) y con <i>Pleurotus</i> sp.....	85
Figura 29. Áreas de los fármacos (BZF, bezafibrato; DCF, diclofenaco; GBF, gemfibrozil; IND, indometacina; SMX, sulfametoxazol) obtenidas para los tratamientos control (sin hongo) y <i>Pycnoporus sanguineus</i>	86
Figura 30. Áreas de fármacos (BZF, bezafibrato; DCF, diclofenaco; GBF, gemfibrozil; IND, indometacina; SMX, sulfametoxazol) obtenidas para los tratamientos control (sin hongo) y <i>Trametes máxima</i>	86
Figura 31. Relación entre el porcentaje de degradación de los fármacos (A): bezafibrato (BZF),diclofenaco (DCF),gemfibrozil (GBF),indometacina (IND), y sulfametoxazol (SMX) y la actividad enzimática específica de MnP (B)	88
Figura 32. Producción de H ₂ O ₂ por los hongos <i>Trametes máxima</i> , <i>Pleurotus</i> sp. y <i>Pycnoporus sanguineus</i> a los 9 días de cultivo	89
Figura 33. Degradación de diclofenaco (2mg L ⁻¹) utilizando lacasa comercial con una actividad 1112 U L ⁻¹ en medio de cultivo Sivakumar modificado (sin glucosa, ni extracto de levadura).	90
Figura 34. Celda típica de tres electrodos: BDD como electrodo de trabajo, barra de grafito como contra electrodo y electrodo de calomel como de referencia, para llevar a cabo las pruebas de microelectrólisis en agua residual sintética con y sin los fármacos BGIS	96
Figura 35. Reactor electroquímico FM01-LC, usado para llevar el pre-tratamiento del ARS+BGIS que posteriormente fue alimentada en el reactor de lodos activados.	97
Figura 36. Curvas de la corriente muestreada contra sobrepotencial (E-OCP), construidas a partir de las curvas de corriente transiente correspondientes, obtenidas en la placa BDD (1cm ²) en ARS con / sin BGIS a dos velocidades de agitación de la solución: (a) 100 rpm y (b) 1300 rpm.	100
Figura 37. Electroferograma típico obtenido mediante electroforesis capilar de zona de los BGIS previamente purificados del ARS por extracción en fase sólida utilizando cartucho C-18	101
Figura 38. Remoción de DQO en el reactor FM01-LC utilizando como ánodo BDD (64 cm ²) durante la electrolisis con una concentración inicial de 200 µg L ⁻¹ de cada fármaco, (flujo= 1.2 L	

min ⁻¹) a la densidad de corriente de 1.56 mA cm ⁻²	102
Figura 39. Remoción de BGIS y (e) producción de cloro activo durante la electrolisis a 1.56 mA cm ⁻² en ARS con una concentración inicial de 200 µg L ⁻¹ de cada fármaco, a un flujo de 1.2 L min ⁻¹ en el reactor FM01-LC. Cada fármaco fue evaluada por electroforesis capilar: (a) bezafibrato, (b) gemfibrozil, (c) indometacina y (d) sulfametoxazol	103
Figura 40. Variación de la DQO de los influentes (figuras rellenas) y efluentes (figuras vacías) durante la operación de los reactores de lodos activados con 1.3 días de residencia hidráulica. R1(a, b); R2(c, e) y R3 (f,g).....	105
Figura 41. Remoción de los fármacos BGIS por los lodos activados del reactor R2 alimentado con ARS+BGIS.....	106
Figura 42. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el índice volumétrico de lodos en los reactores de lodos activados aeróbicos. Los reactores se alimentaron con: (a) ARS; (b) ARS + BGIS y (c) ARS+ BGIS previamente electrolizada.	107
Figura 43. Imágenes de SEM obtenidas de los bioflóculos de los lodos activados después de 51 días de operación en los reactores de tipo Eckenfelder con TRH=2 días. La imágenes corresponden a bioflóculos de los siguientes reactores: (a) R1-ARS; (b, c) R2-ARS+ BGIS y (d) R3-ARS+ BGIS electrolizada.	108
Figura 44. Perfil de las bandas obtenidas por DGGE con un gradiente de desnaturalización del 30-56% de los reactores R1, R2 y R3 al final de la operación	109
Figura 45. Dendrograma de análisis de similitud de las comunidades microbianas presentes en los lodos activados de los reactores R1, R2 y R3, al final de la operación.....	110
Figura 46. Mecanismo de oxidación de la enzima lacasa	129
Figura 47. Ciclo catalítico de MnP.....	133
Figura 48. Mecanismo de oxidación de la enzima LiP	134

Contenido de tablas

Tabla 1. Fármacos con degradación menor al 50% en PCTAR.....	15
Tabla 2. Toxicidad por exposición de diferentes fármacos sobre varias especies indicadores (Santos <i>et al.</i> 2010).	17
Tabla 3. Fármacos que presentan mayor efecto tóxico sobres especies bioindicadoras	21
Tabla 4. Fármacos persistentes en plantas de tratamiento de aguas residuales y tóxicos sobre especies indicadoras en ambientes acuáticos	22
Tabla 5. Estudios de remoción de fármacos utilizando diferentes sistemas de procesos biológicos. 25	
Tabla 6. Estudios de degradación de fármacos utilizando hongos lignolíticos	28
Tabla 7. Estudios de degradación de fármacos por oxidación anódica utilizando BDD.....	33
Tabla 8. Comparación entre los métodos analíticos de electroforesis capilar y cromatografía de líquidos de alta resolución.....	42
Tabla 9. Composición reportada del agua residual sintética formulada conforme a la norma ASTM International (1998).....	48
Tabla 10. Porcentaje de respuestas y resolución de los picos, calculados a partir de las áreas bajo la curva, tiempos de migración y ancho de los picos obtenidos de los electroferogramas	56
Tabla 11. Linealidad de las curvas de calibración de los fármacos obtenidos a partir del método EPA 1964 y precisión de las respuestas obtenidas a partir de experimentos realizados por triplicado	59
Tabla 12. Condiciones de alimentación de los reactores de lodos activados para evaluar efecto del pre-tratamiento enzimático sobre la degradación de los fármacos.....	64
Tabla 13. Condiciones de operación de los reactores aerobios de lodos activados, con tiempo de residencia hidráulica de 12 h, y alimentación de aire de 2 L min^{-1} , pH 7.	71
Tabla 14. Relación filogenética encontrada al realizar BLASTn de las secuencias obtenidas. Se muestran los porcentajes de cobertura y similitud obtenidos con la secuencia con mayor proximidad	78
Tabla 15. Composición del medio de cultivo Sivakumar <i>et al.</i> (2010) modificado.....	82
Tabla 16. Remoción de los fármacos por el extracto	87
Tabla 17. Condiciones de operación de los reactores de lodos activados, los cuales se operaron a pH 7 y concentración de oxígeno disuelto de $2 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$	104
Tabla 18. Resumen de los resultados obtenidos en los reactores biológicos	108
Tabla 19. Condiciones experimentales de los pre-tratamientos evaluados para el estudio de la degradación de los fármacos	112
Tabla 20. Desempeño de los pre-tratamientos sobre la remoción de los fármacos contenidos en agua residual sintética*.	113
Tabla 21. Comparación del desempeño de los lodos activados alimentados por agua residual sintética tratada previamente por los pre-tratamientos enzimático (P1) y electroquímico (P2).....	114
Tabla 22. Relación entre actividades y % de remoción de los fármacos por los hongos Trametes máxima, Pleurotus sp. y Pycnoporus sanguineus cultivado en medio Sivakumar (2010).	116
Tabla 23. Potenciales redox de algunos agentes oxidantes	135
Tabla 24. Constantes de velocidad de remoción (k en $\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) del radical hidroxilo en comparación con el ozono para algunos compuestos orgánicos (Teel <i>et al.</i> 2001).....	135
Tabla 25. Ventajas y desventajas de reactores electroquímicos con diferentes materiales de electrodos	137
Tabla 26. Estudios de remoción de compuestos recalcitrantes mediante reactores electroquímicos con diferentes electrodos.....	145

ACRÓNIMOS

ABGIS	Fármacos amoxicilina, bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sinfónico)
ARS	Agua residual sintética
BDD	Doped diamond bored
BGIS	Fármacos bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol
BZF	Bezafibrato
CE	Electroforesis capilar
COT	Carbono orgánico total
DBO	Demanda biológica de oxígeno
DCF	Diclofenaco
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
DQOs	Demanda química de oxígeno soluble
DSA	Ánodo dimensionalmente estable
ECZ	Electroforesis capilar de zona
EOF	Flujo electroosmótico
GBF	Gemfibrozil
IND	Indometacina
IVL	Índice volumétrico de lodos
MOB	Materia orgánica biodegradable
OH•	Radical libre hidroxilo
PCTAR	Plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales
POA	Procesos de oxidación avanzada
SMX	Sulfametoxazol
SSVLM	Sólidos suspendidos volátiles en el licor mezclado
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean

INTRODUCCIÓN

Los fármacos consumidos por el humano tienen su destino final principalmente en cuerpos de agua. Son considerados contaminantes emergentes debido al reciente incremento de estos compuestos en ríos, lagos, plantas de tratamiento y por tener efectos tóxicos sobre especies bioindicadoras; además de no estar considerados en la normatividad en materia de descargas de aguas residuales (Boxall, 2004; Owen y Jobling, 2012). Aunque estos compuestos están en bajas concentraciones en aguas residuales (Miège *et al.* 2009), los hallazgos sugieren que son un grave problema para los ecosistemas naturales, debido a su toxicidad sobre especies; además, se ha encontrado que algunos fármacos analgésicos o anti-inflamatorios causan daño al DNA (ácido desoxirribonucleico), y estrés oxidativo en *Daphnia magna* (Santos *et al.*, 2010; Gómez-Oliván *et al.* 2014). La mayoría de los fármacos al no degradarse en las plantas convencionales de aguas residuales (PCTAR) son considerados recalcitrantes (Miège *et al.*, 2009); en adición, se tiene evidencia que los fármacos modifican la composición y estructura de las comunidades microbianas presentes en los lodos activados de las PCTAR (Kraigher, *et al.*, 2008).

Se han realizado estudios de degradación de fármacos mediante diferentes procesos químicos-biológicos, tales como procesos de oxidación avanzada, o bien biológicos por sistemas aerobios o anaerobios, enzimáticos, entre otros (Sirés y Brillas, 2012; Urrea *et al.*, 2009 y Mansour *et al.*, 2014). La mayoría de estos estudios se han realizado en medios sintéticos y condiciones experimentales que favorecen la degradación de los fármacos. Por ejemplo, en procesos biológicos se han usado medios de cultivo para favorecer el crecimiento microbiano; en medios enzimáticos se utilizan comúnmente soluciones amortiguadoras sólo con la enzima y el compuesto a degradar; de igual manera, en los procesos de oxidación avanzada generalmente se utiliza un compuesto orgánico único. Desafortunadamente, la problemática de los fármacos presentes en aguas residuales municipales no es tan simple, debido a que las aguas residuales son una mezcla compleja que contiene materia orgánica biodegradable (MOB), sólidos suspendidos volátiles en el licor mezclado (SSVLM), surfactantes y diversas sales disueltas como iones cloruros y sulfatos, principalmente. La MOB, es el contaminante principal en las aguas residuales, mientras que los fármacos están

presentes en bajas concentraciones (la concentración de la materia orgánica es al menos mil veces mayor que la concentración de los fármacos). Por su bajo costo de operación, tradicionalmente la MOB se elimina mediante el proceso biológico de lodos activados aerobios, que son el corazón de una PCTAR. Desafortunadamente, estas plantas no son eficientes en la remoción de fármacos y se requiere de al menos otro proceso para eliminarlos completamente. Los tratamientos de oxidación avanzada y tratamientos enzimáticos, se han utilizado para degradar parcialmente compuestos recalcitrantes a intermediarios más biodegradables (Fontmorin *et al.*, 2013), los cuales se eliminan con un proceso biológico adicional. Generalmente, estos estudios se llevan a cabo en condiciones óptimas de degradación; por ejemplo, en el caso de oxidación avanzada se ocupa sólo un electrolito soporte y el compuesto orgánico que se desea degradar; en los procesos biológicos comúnmente se adicionan nutrientes para favorecer el crecimiento microbiano y el compuesto orgánico que se desea estudiar que es usado como fuente de carbono y energía por las bacterias.

En el presente trabajo, se propone un enfoque novedoso aplicando dos pre-tratamientos por separado; uno enzimático utilizando lacasas, y otro electroquímico utilizando diamante dopado con boro (BDD) como ánodo; para eliminar o transformar los fármacos presentes en aguas residuales sin degradar significativamente la MOB, y que posteriormente ésta sea degradada en un reactor de lodos activados. Se utilizó agua residual sintética elaborada a partir de una norma estandarizada para tener una composición similar al agua residual municipal y poder adicionar los fármacos en estudio para evaluar sus efectos en ambos sistemas. Finalmente, se evaluó el efecto de los fármacos y los pre-tratamientos sobre la comunidad microbiana de los lodos activados expuestos al agua residual previamente tratada por cada sistema: enzimático y electroquímico, en comparación con agua residual sin fármacos y agua residual con fármacos sin pre tratamiento.

La estructura de esta tesis es la siguiente: en el primer capítulo se describe la problemática del recurso hídrico debido a su explotación y contaminación, con énfasis en los compuestos farmacéuticos, así como el tratamiento de éstas aguas residuales, y su toxicidad sobre especies bioindicadoras, con el propósito de seleccionar los fármacos de uso común en el

humano, que sean persistentes en plantas de tratamiento y tengan toxicidad sobre especies bioindicadoras.

En el segundo capítulo se describen estudios de degradación de fármacos con tecnologías utilizadas en este trabajo como sistemas de pre-tratamiento (electroquímico y enzimático), tratamientos biológicos y sistemas combinados.

En el tercer capítulo se describe la justificación y planteamiento del proyecto, mientras que en el cuarto capítulo se describe la estrategia para desarrollar una metodología para cuantificar los fármacos en bajas concentraciones en el agua residual sintética, mediante la técnica analítica de electroforesis capilar de zona (ECZ).

En el quinto capítulo se presentan los resultados del estudio de degradación de fármacos por el sistema acoplado enzimático-lodos activados; en el capítulo sexto se muestran los resultados obtenidos con enzimas lignolíticas producidas por basidiomicetos en la degradación de fármacos, en el séptimo capítulo se describen los resultados del proceso combinado electroquímico-lodos activados y finalmente, en el capítulo octavo se presenta un análisis comparativo de los procesos evaluados en este trabajo, una conclusión general y se mencionan perspectivas para estudios posteriores.

CAPÍTULO I.

PROBLEMÁTICA DE LOS FÁRMACOS EN ECOSISTEMAS ACUÁTICOS

Explotación de agua para consumo humano en el planeta

Actualmente, el recurso hídrico en el país como en el resto del mundo, se encuentra bajo una creciente presión de explotación y consumo. Esto se debe al rápido crecimiento demográfico, la urbanización y el consumo excesivo de este recurso en el hogar, industria y agricultura, que conlleva a la generación de efluentes conteniendo una cantidad importante de contaminantes con diferente naturaleza química. Estos contaminantes tienen su destino final en ríos, lagos, lagunas y finalmente en el mar; afectando la vegetación natural y también a las especies acuáticas.

El balance global de agua en el planeta es de aproximadamente 1,386 billones de hm^3 , de los cuales el 97.5% es agua salada y sólo el 2.5% es agua dulce, es decir 35 billones de hm^3 . De esta cantidad casi el 70% no está disponible para consumo humano porque se encuentra en glaciares, nieve y hielo, quedando para consumo humano sólo 10.4 billones de hm^3 . En lo que respecta a México, el agua dulce renovable que se puede explotar proviene de la precipitación pluvial y equivale a 0.14% de los 10.4 billones de hm^3 que está disponible a nivel mundial. Este porcentaje son 1 449 471 millones de m^3 de agua en un año, de esta cantidad sólo está disponible para explotación humana 447 260 millones de m^3 (0.04 % del consumo humano a nivel mundial), el resto se evapora y transpira regresando a la atmósfera (CONAGUA, 2015).

En México de los 447,260 millones de m^3 de agua disponible, se destina (figura 1) 343,138 millones de m^3 (76.72%) a la agricultura principalmente; seguido del abastecimiento público con 63,466 millones de m^3 (14.19%); la industria de generación de energía eléctrica consume 21,871 millones de m^3 (4.89%) y la industria autoabastecida demanda 18,829 millones de m^3 (4.21%).

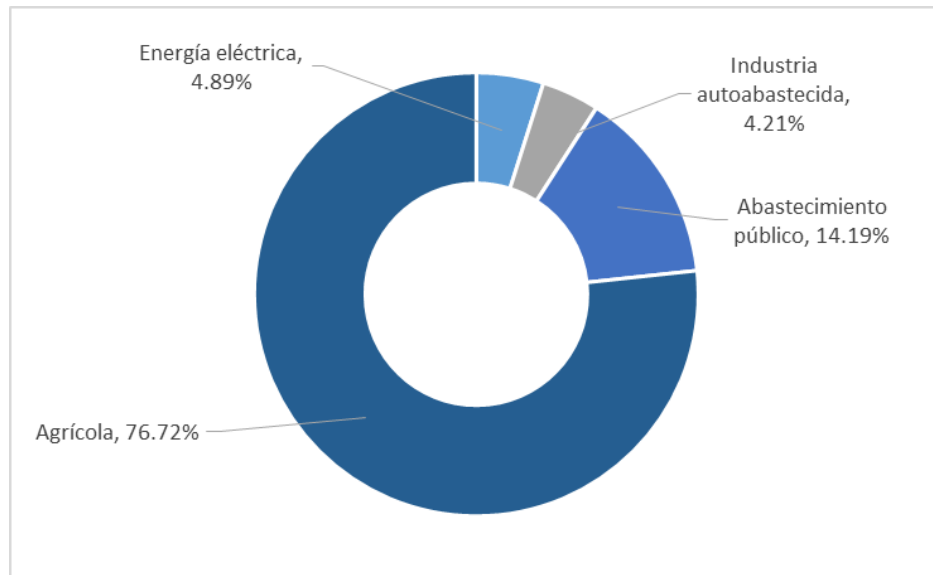


Figura 1. Sectores con mayor consumo de agua en la República Mexicana en 2014 (CONAGUA, 2015)

Consumo del agua potable en México

El abastecimiento público de agua es principalmente a través del suministro de agua potable a la población, este tipo de agua se obtiene de plantas potabilizadoras, las cuales acondicionan la calidad del agua de las fuentes superficiales y/o subterráneas para consumo humano. La creciente demanda de agua potable por la población, ha promovido que los estados de la República incrementen las plantas potabilizadoras hasta tener $96.3 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ de agua potabilizada en las 779 plantas del país en 2014 (Figura 2). El incremento en la demanda de agua potable provoca que cada año se tenga mayor cantidad de aguas residuales de tipo municipal que se descargan al ambiente, aguas residuales que contienen fármacos.

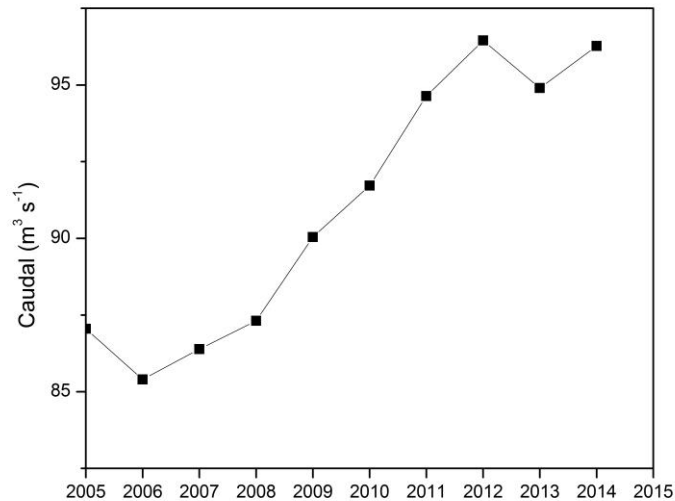


Figura 2. Aumento de la demanda de agua potable para uso público en México (CONAGUA, 2015)

Generación de aguas residuales en México

Se consideran aguas residuales municipales a las que se vierten en sistemas de alcantarillado o cuerpos de agua, producto de actividades domésticas (uso de agua potable). Estas aguas tienen su destino final en ríos, lagos, lagunas, océanos y en el suelo, junto con estas aguas se emite miles de contaminantes al ambiente, poniendo en riesgo a la salud humana y los ecosistemas. En México se colectan a través del sistema de alcantarillado $211\text{m}^3\text{ s}^{-1}$, aunque ha habido un incremento en la capacidad instalada para el tratamiento de aguas residuales (Figura 3), hasta el año 2014 solo se trataron $111.3\text{ m}^3\text{ s}^{-1}$ en 2,337 plantas de tratamiento, es decir solo el 52.8% de aguas residuales son tratadas en PCTAR. Por lo regular estas plantas de tratamiento de aguas residuales tienen entre 80 a 90 % de eficiencia en la remoción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), si las aguas residuales tienen en promedio 300 mg L^{-1} , podrían removerse $240\text{-}270\text{ mg L}^{-1}$, quedando una DBO remanente de $30\text{-}60\text{ mg L}^{-1}$ (CONAGUA, 2015). Esta situación expone el problema de contaminación que tiene el agua en México, debido a que prácticamente la mitad del agua residual que se descarga, no cuenta con la calidad mínima requerida por la legislación mexicana. Los parámetros de calidad de las aguas residuales que considera la autoridad ambiental en el país, se encuentran definidos en las siguientes Normas Oficiales Mexicanas: NOM-001-SEMARNAT-1996 que establece

“los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales”; NOM-002-SEMARNAT-1996 que establece “los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal”, NOM-003-SEMARNAT-1997 que establece “los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicio al público”.

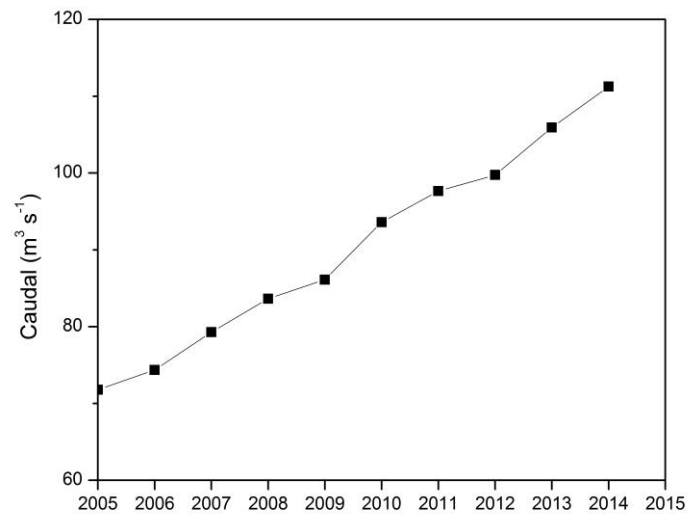


Figura 3. Incremento de la capacidad instalada en el tratamiento de aguas residuales municipales en México (CONAGUA, 2015)

Los parámetros de calidad del agua tratada regulados por las normas oficiales antes mencionadas son: DBO, para medir indirectamente la materia orgánica biodegradable presente en agua residual; fósforo y nitrógeno como indicadores de nutrientes; sólidos suspendidos totales en el licor mezclado como parámetro físico que afecta el paso de luz; presencia de algunos metales pesados por su carácter tóxico. El riesgo a la salud por infecciones se mide a través de la cantidad de coliformes y huevos de helminto.

La DBO, se define como la cantidad de oxígeno utilizado por los microorganismos para degradar la materia orgánica, siempre y cuando esta materia orgánica sea de fácil asimilación biológica para llevar a cabo su metabolismo; esta característica limita a la DBO como parámetro para medir los contaminantes con características recalcitrantes o tóxicas, debido a

que podrían inhibir la actividad microbiana. Otra alternativa para la medición de materia orgánica es a través de la cuantificación de la demanda química de oxígeno soluble (DQOs), este parámetro mide el oxígeno equivalente necesario para mineralizar completamente la materia orgánica e inorgánica. En agua residual cuya concentración de materia orgánica es alta y se tiene una relación DBOs/DQOs baja (<0.5), quiere decir que los compuestos orgánicos son poco biodegradables. El parámetro de DQOs no está regulado actualmente en la normatividad oficial mexicana, tampoco la relación DBOs/DQOs; menos aún los compuestos orgánicos específicos cuya toxicidad está comprobada (Goodguide, 2016).

En la actualidad, el conocimiento del efecto de las sustancias tóxicas al ambiente y al ser humano ha aumentado significativamente. Por ejemplo, en México el reporte de sustancias tóxicas se realiza a través del instrumento conocido como Cédula de Operación Anual del Registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes, en el cual se reportan 104 sustancias. Este reporte lo deben de realizar industrias y empresas tanto públicas como privadas año con año, desafortunadamente la mayoría de las instalaciones no reportan las emisiones de tóxicos listados por este instrumento.

También diversos productos farmacéuticos y de cuidado personal han mostrado tener un nivel de toxicidad sobre especies bioindicadoras (Santos *et al.* 2010). Estos fármacos llegan a su destino final a través de aguas residuales y son recalcitrantes en las PCTAR (Miège *et al.* 2009).

En México solamente en 2004, se reportó un gasto en medicamentos de 14,400 millones de dólares equivalentes al 1.5 % del PIB y 20.9% del gasto total de salud, un poco alto en comparación con otros países integrantes de la OCDE, donde el promedio es de 17.7% (OCDE, 2007). En 2010, la Procuraduría Federal del Consumidor, realizó un sondeo para determinar los hábitos de consumo de medicamentos entre los mexicanos, entre los medicamentos auto medicados por los mexicanos se encuentran paracetamol, ampicilina o sulfametoxazol, antihistamínicos, antiespasmódicos y diclofenaco. Los antibióticos más utilizados son la ampicilina, amoxicilina, penicilina, ciprofloxacina, terramicina, lincomicina, sulfametoxazol, eritromicina y claritromicina. Siendo los estados con mayor

consumo la Ciudad de México, seguido por el Estado de México, Jalisco, Guanajuato y Veracruz (PROFECO, 2010).

Ruta de los fármacos hacia cuerpos de aguas naturales

En la figura 4 se muestran las rutas que siguen los fármacos hasta depositarse en el ambiente, en donde el suelo y los cuerpos de agua son los receptores principales de éstos contaminantes. Estos fármacos son desechados por los animales de crianza y humanos a través de sus heces y orinas cuando están bajo un tratamiento médico. Se debe recordar que, en el caso del ser humano, los desechos se emiten a las aguas residuales a través del sistema de red de alcantarillado para canalizarse a las PCTAR, éstas aguas residuales no son tratadas en su totalidad, sólo el 53 % se tratan en plantas, sin embargo, éstas no remueven en su totalidad las sustancias farmacéuticas, como se verá mas adelante.



Figura 4. Rutas comunes de los fármacos al suelo y a cuerpos de agua

Remoción de compuestos farmacéuticos en plantas de tratamiento

Se han realizado estudios de cuantificación de diferentes fármacos en cuerpos de agua y se ha evaluado la persistencia de éstos en plantas de tratamiento. Por ejemplo, Heberer (2002), detectó diferentes compuestos farmacéuticos en sistemas de tratamiento de aguas residuales, entre los que identificó, se encuentran analgésicos y anti-inflamatorios como: paracetamol, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, ibuprofeno, 4-aminoantirina, aminofenazona, codeína, fenoprofeno, naproxeno, fenazona y propifenazona. Antibióticos como claritromicina, roxitromicina, lincomicina, sulfatiazol, ciprofloxacina, norfloxacina y enrofloxacin, cloranfenicol, tylosin y trimetoprima. Antiepilépticos como carbamazepina; beta bloqueadores tales como, metoprolol, bisoprolol y nadolol; entre los reguladores de lípidos se reportó ácido clofibrato, etofibrato, bezafibrato, gemfibrozil y ácido fenofibrato.

Adicionalmente, muchos de estos fármacos muestran ser persistentes en plantas de tratamiento, después del tratamiento biológico. Por ejemplo, el estudio realizado por Zhou, *et al.* (2009), en el efluente de un sistema de tratamiento de aguas residuales, se detectaron los fármacos: propranolol, sulfametoxazol, carbamazepina, indometacina y diclofenaco en concentraciones que variaron desde 14 ng L^{-1} a $1.8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Para identificar los fármacos que son de difícil degradación en las PCTAR, se construyó una base de datos a partir de los resultados reportados por Lishman *et al.* (2006), Clara *et al.* (2005), Sim *et al.* (2010), Hijosa Valsero *et al.* (2010), Joss *et al.* (2006), Langford y Thomas (2009), Lindqvist *et al.* (2005), Matamoros *et al.* (2009), Nakada *et al.* (2007) y Watkinson *et al.* (2007), los resultados se muestran en la figura 5.

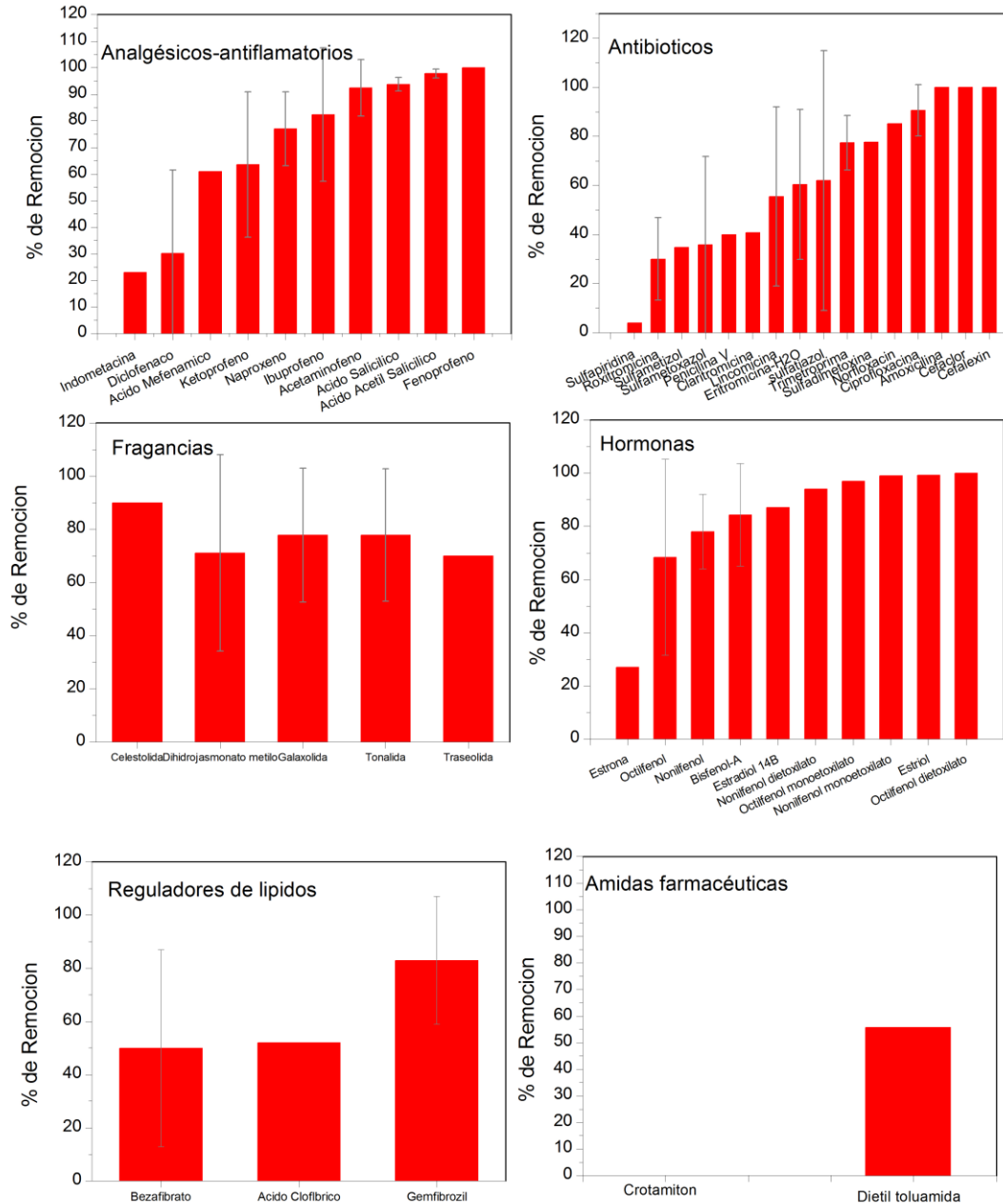


Figura 5. Fármacos degradados y recalcitrantes en PCTAR localizadas en diferentes partes del mundo

De acuerdo a las publicaciones revisadas, los fármacos que presentaron remociones menores al 50%, se consideraron compuestos de difícil degradación en PCTAR. Los resultados se muestran en la tabla 1:

Tabla 1. Fármacos con degradación menor al 50% en PCTAR

Tipo de fármaco	Nombre del principio activo	Referencias
Analgésicos	Indometacina y diclofenaco	Lishman et al. (2006), Clara et al. (2005), Sim et al. (2010), Hijosa Valsero et al. (2010), Joss et al. (2006), Langford y Thomas (2009), Lindqvist et al. (2005), Matamoros et al. (2009), Nakada et al. (2007,) y Watkinson et al. (2007).
Antibióticos	Clindamicina, monensina, sulfamerazina, ácido nalidíxico, enrofloxacina, trimetoprima, sulfapiridina, roxitromicina, sulfametizol, sulfametoxazol, penicilina V y claritromicina	
Hormonas	Ácido nonilfenoxi-acético, estrona	
Reguladores de lípidos	Bezafibrato y ácido clofíbrico.	
Amida farmacéutica	Crotamiton	

La persistencia en el ambiente de algunos fármacos, está principalmente asociada a la baja biodegradabilidad. Joss *et al.* (2006) propusieron evaluar la biodegradabilidad a través de la constante de velocidad de la reacción de pseudo primer orden, expresada en la siguiente fórmula:

$$\frac{dC}{dt} = kXS$$

En donde:

C= es la concentración total del compuesto (g L^{-1})

S= Concentración soluble del compuesto (g L^{-1})

t= tiempo (s)

k= constante de velocidad de reacción ($\text{L g}^{-1}\text{s}^{-1}$)

X= concentración de sólidos suspendidos (g L^{-1})

Si $k < 0.1 \text{ L g}^{-1}\text{d}^{-1}$ significa que tienen una biodegradabilidad menor al 20 %, y con valores de k mayores a $10 \text{ L g}^{-1}\text{d}^{-1}$ tienen una biodegradabilidad mayor al 90%. Utilizando este criterio, Joss *et al.* (2006) encontraron que los siguientes compuestos tienen baja degradabilidad: sulfametazina, diazepam, carbamazepina, diclofenaco, indometacina, diatrizoato, tonalide y galaxolide.

Efecto tóxico de fármacos sobre especies bioindicadoras

Para determinar el efecto tóxico de los diferentes fármacos sobre diversas especies indicadoras, se consideraron los datos reportados por Santos *et al.* (2010), para experimentos de toxicidad de concentración letal media (CL_{50}), concentración de inhibición media (EC50) y concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC). Para identificar los compuestos que presentan una mayor toxicidad sobre las especies bioindicadoras, se consideraron concentraciones menores a 1 mg L^{-1} del parámetro EC50 y LOEC, debido a que los fármacos se encuentran en el orden de nanogramos a microgramo por litro en aguas residuales. En la tabla 2 se muestran los datos.

Tabla 2. Toxicidad por exposición de diferentes fármacos sobre varias especies indicadores (Santos *et al.* 2010).

Tipo de fármaco	Compuesto	Tipo	Especie indicadora	Tiempo	CL ₅₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	LOEC (mg/L)
Analgésico	Diclofenaco	Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	28 d			0,005
	Diclofenaco			21 d			0,001
	Ibuprofeno	Cnidario	<i>Hydra attenuata</i>	96 h	22,36	1,65	1
	Ibuprofeno	crustáceos anfípodos	<i>Gammarus sp.</i>	--			0,00001
	Indometacina	Especie de camarón	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	24 h	16,14		
	Indometacina	Pez japonés	<i>Oryzias latipes</i>	96h	81,92		
	Naproxeno	Cnidario	<i>Hydra attenuata</i>	96 h	22,36	2,62	5
	Naproxeno	Rotífero planctónico	<i>Brachionus calyciflorus</i>	48 h	0,56		
	Naproxeno	Pulga de agua	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	7 d	0,33		
Anti convulsivo	Carbamazepina	Cnidario	<i>Hydra attenuata</i>	96 h	29,4	15,52	5
		Crustáceo	<i>Gammarus pulex</i>				0,00001
		Pulga de agua	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	7 d		777	0,1
		Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	21 d			0,001
Antibióticos	Ácido oxolínico	Cianobacterias	<i>Microcystis aeruginosa</i>	72 h		0,18	
	Amoxicilina			<i>Synechococcus leopoliensis</i>			0,00222
	Claritromicina	Alga	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	96 h		0,011	0,0063
		Crustáceo planctónico	<i>Daphnia magna</i>	96 h		0,04	0,0063
	Clortetraciclina	Cianobacterias	<i>Microcystis aeruginosa</i>			0,05	
	Eritromicina	Alga	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	72 h		0,02	
						0,0366	
	Espiramicina	Cianobacteria	<i>Microcystis aeruginosa</i>			0,005	
	Levofloxacina	Alga	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	96 h	1,2		0,63
		Crustáceo planctónico	<i>Daphnia magna</i>	21 d	0,34		0,063
	Lincomicina	Alga	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	72 h		0,07	
Novobiocina	Cnidario	<i>Hydra attenuata</i>	96 h	>100	NC	100	
Ofloxacina	Especie de camarón	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	48 h	33,98	0,53		

Continuación tabla 2. Toxicidad por exposición de diferentes fármacos sobre varias especies indicadores (Santos *et al.* 2010).

Tipo de fármaco	Compuesto	Tipo	Especie indicadora	Tiempo	CL ₅₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	LOEC (mg/L)
Antibióticos	Oxitetraciclina	Cnidario	<i>Hydra attenuata</i>	96 h	>100	40,13	100
		Cianobacteria	<i>Microcystis aeruginosa</i>	72 h		0,207	
		Pulga de agua	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	24 h		18,56	
				7 d		0,18	
	Alga	<i>Selenastrum capricornutum</i>				0,342	
	Penicilina G	Cianobacteria	<i>Microcystis aeruginosa</i>			0,006	
	Sulfadiazina	Cianobacteria	<i>Microcystis aeruginosa</i>	72 h		0,135	
	Sulfametoxazol	Cnidario	<i>Hydra attenuata</i>	96 h	>100	NC	10
				24 h		15,51	
		Pulga de agua	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	7 d		0,21	
	Sulfapiridina	Cnidario	<i>Hydra attenuata</i>	96 h	>100	21,61	5
	Tetraciclina	Cianobacteria	<i>Microcystis aeruginosa</i>			0,09	
	Tilosina	Alga	<i>Selenastrum capricornutum</i>			0,411	
Trimetropin	Cnidario	<i>Hydra attenuata</i>	96 h	>100	NC	>100	
Estimulante	Cafeína	Cnidario	<i>Hydra attenuata</i>	96 h	>100	NC	>100
Hormona	17 α -etinilestradiol	Pez	<i>Pimephales promelas</i>	21 d			0,000001
Regulador de lípidos	Ácido clofíbrico	Pulga de agua	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	48 h		200	0,1
		Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	21 d			0,005
	Atorvastatina	Planta acuática	<i>Lemna gibba</i>	7d			0,3
	Bezafibrato	Cnidario	<i>Hydra attenuata</i>	96 h	70,71	25,82	1
				24-48 h	60,91	0,44	0,3125
				24-48h	64,97	1,44	0,3125
	Fenofibrato	Rotífero planctónico	<i>Brachionus calyciflorus</i>	24 h	77,3	0,44	0,312
	Gemfibrozil	Pulga de agua	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	7 d		0,53	0,156
Simvastatina	Camarón fantasma	<i>Palaemonetes pugio</i>	96 h	1,18		1,25	
Gemfibrozil	Cnidario	<i>Hydra attenuata</i>	96 h	22,36	1,18	1	

De los datos reportados por Santos *et al.* (2010), se establece que el nivel de toxicidad de un mismo fármaco varía sobre diferentes especies bioindicadoras; sin embargo, la diversidad de datos reportados y especies estudiadas son amplias. Para identificar los fármacos con mayor toxicidad sobre especies bioindicadoras, a partir de los datos de la tabla 2, se construyó la figura 6.

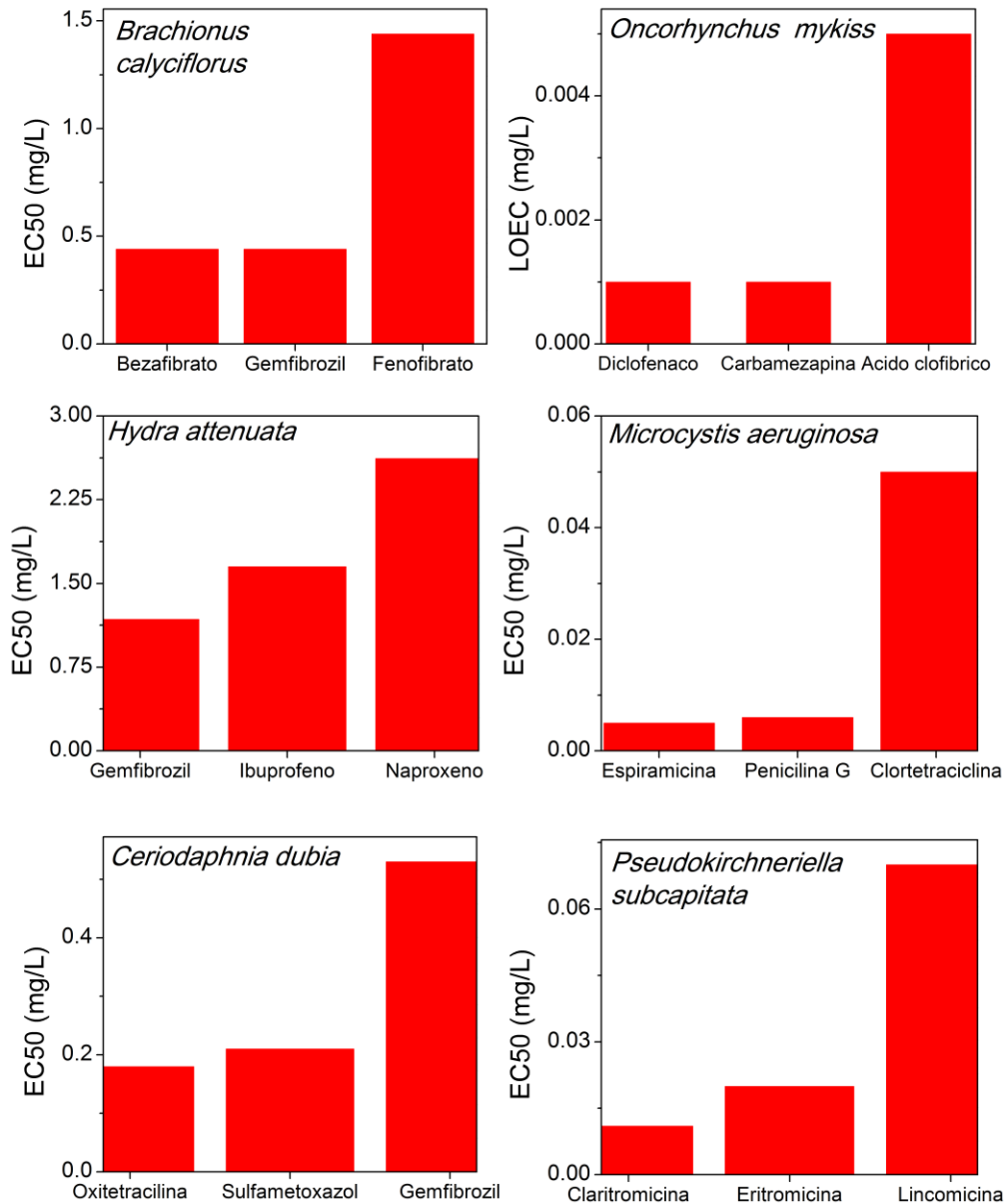


Figura 6. Fármacos con mayor nivel de toxicidad EC_{50} y LOEC sobre diferentes especies bioindicadoras (a partir de los datos reportados por Santos *et al.* 2010)

Con el objetivo de identificar compuestos que representan un mayor riesgo a los ecosistemas, a partir de la información obtenida por Santos *et al.* (2010), se seleccionaron los compuestos que tienen mayor efecto tóxico utilizando el parámetro LOEC como referencia, independientemente de la especie bioindicadora (Figura 7).

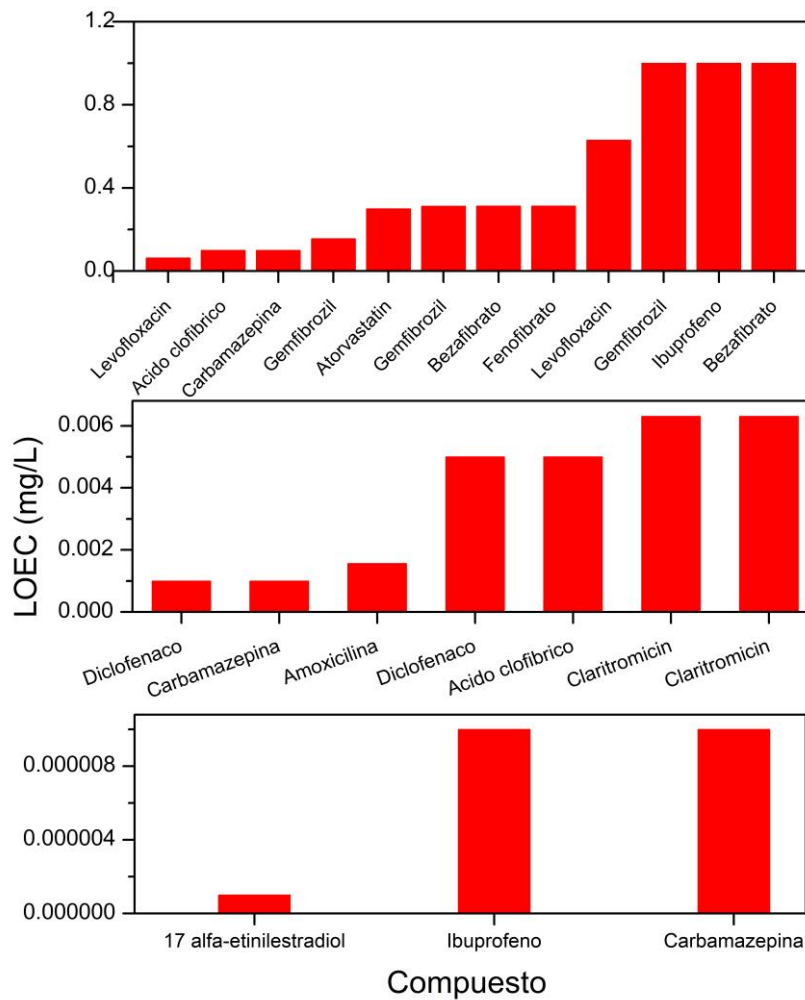


Figura 7. Concentración más baja en donde se observó efecto (LOEC) sobre diferentes especies bioindicadoras por los fármacos estudiados (elaborado a partir de los datos reportados por Santos *et al.* 2009).

De los datos mostrados en las figuras 6 y 7, se identificaron a los fármacos con mayor toxicidad sobre especies bioindicadoras (Tabla 3).

Tabla 3. Fármacos que presentan mayor efecto tóxico sobre especies bioindicadoras

- Tipo	Nombre del fármaco
- Analgésicos	Diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno
- Antibióticos	Espiramicina, penicilina G, clortetraciclina, tetraciclina, sulfadiazina, ácido oxolínico, oxitetraciclina, sulfametoxazol, claritromicina, lincomicina, amoxicilina, levofloxacina
- Hormonas	17 α -etinilestradiol
- Reguladores de lípidos	Gemfibrozil, fenofibrato, ácido clofíbrico, bezafibrato y atorvastatín.
- Anti convulsivos	Carbamazepina

Dentro de los estudios de toxicidad, también se reportan diferentes efectos crónicos sobre especies indicadoras; por ejemplo Hong *et al.* (2007), encontraron que el diclofenaco causa inducción en la producción de vitelogenina en peces japoneses (medaka) a una concentración de $1\mu\text{g L}^{-1}$, provocando hermafroditismo en peces machos. En otro estudio (Brion *et al.* 2004), se observó el efecto del 17β -estradiol sobre peces cebra (*D. rerio*) mediante el análisis de las gónadas, encontrando que una concentración de 100 ng L^{-1} del compuesto, provoca una interrupción en el proceso de diferenciación sexual y en las generaciones siguientes observaron una disminución de huevos producidos. Gómez-Oliván *et al.* (2014) comprobaron daño en el DNA y estrés oxidativo por diclofenaco, sobre el crustáceo bioindicador *Hyalella azteca*.

Adicionalmente hay evidencia, que los fármacos afectan la estructura de la comunidad microbiana de lodos activados utilizados en el tratamiento de aguas residuales a nivel piloto. Kraigher *et al.* (2008) evaluaron la influencia de fármacos comúnmente utilizados, sobre la diversidad microbiana, los compuestos probados fueron cuatro de tipos anti-inflamatorio (ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno y diclofenaco) y un regulador de lípidos en sangre (ácido clofíbrico). El análisis se realizó utilizando la técnica de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción, amplificando el gen 16SrRNA para obtener el efecto sobre la comunidad microbiana por los fármacos en estudio. Los resultados mostraron alta influencia de los fármacos naproxeno, ketoprofeno e ibuprofeno, sobre la diversidad microbiana,

después de dos meses de exposición, disminuyó el número de unidades taxonómicas operacionales dentro del grupo Betaproteobacteria.

Fármacos persistentes en plantas de tratamiento de aguas residuales y tóxicos en ecosistemas acuáticos

En los puntos anteriores, se identificaron los fármacos que tienen persistencia en plantas de tratamiento de aguas residuales y mayor toxicidad sobre especies bioindicadoras presentes en diferentes niveles tróficos en un ambiente acuático, en la tabla 4 se muestran los fármacos que presentaron alguna característica anterior.

Tabla 4. Fármacos persistentes en plantas de tratamiento de aguas residuales y tóxicos sobre especies indicadoras en ambientes acuáticos

Tipo de fármaco	Nombre del fármaco
Analgésicos	Indometacina , diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno
Antibióticos	Clindamicina, monensina, sulfamerazina, ácido nalidíxico, enrofloxacina, trimetropin, sulfapiridina, roxitromicina, sulfametizol, sulfametoxazol, penicilina V, claritromicina, espiramicina, penicilina G, clortetraciclina, tetraciclina, sulfadiazina, ácido oxolínico, oxitetraciclina, claritromicina, lincomicina, amoxicilina, levofloxacina
Hormonas	Ácido nonilfenoxiacético, ácido nonilfenoxietoxiacético, estrona, 17 α -etinilestradiol
Reguladores de lípidos	Bezafibrato, gemfibrozil, fenofibrato, ácido clofíbrico y atorvastatín.

En el presente trabajo, con el objetivo de tener una mezcla de fármacos con diferente función médica, se seleccionaron los fármacos amoxicilina, bezafibrato, gemfibrozil, indometacina, sulfametoxazol y diclofenaco, por presentar efectos adversos sobre el ambiente ya que son persistentes en plantas de tratamiento de aguas residuales y, tóxicos sobre especies bioindicadoras (tabla 4), además de que son de consumo común por el ser humano.

CAPÍTULO II.

DEGRADACIÓN DE FÁRMACOS POR PROCESOS BIOLÓGICOS, ENZIMÁTICOS, ELECTRÓQUÍMICOS Y COMBINADOS

Como se ha mencionado en la introducción, para eliminar compuestos recalcitrantes y materia orgánica es importante realizar un tren de tratamiento de aguas residuales. En el presente trabajo se han seleccionado dos procesos iniciales para transformar los fármacos a intermediarios biodegradables. El primero utiliza la enzimas lacasa que tienen la capacidad de transformar una gama importante de compuestos aromáticos debido a su baja especificidad. El segundo pre-tratamiento es un proceso electroquímico utilizando como ánodo BDD, el cual genera radicales libres OH^{\bullet} , que son altamente reactivos con la materia orgánica, llevándola hasta la mineralización. Posteriormente, cada efluente de estos dos tratamientos se alimentó a un proceso biológico de lodos activados aerobios, los cuales degradarán completamente los fármacos o metabolitos (si existen), junto con la materia orgánica biodegradable, evitando así el destino de estos compuestos en el ambiente.

Existen pocos estudios de sistemas combinados para la remoción de fármacos presentes en aguas residuales, por lo que en la revisión bibliográfica primero se presentarán sistemas biológicos que se han utilizado en la remoción de estos compuestos, después se presentará estudios previos que han utilizado enzimas oxidasas y peroxidas, para la remoción de fármacos, posteriormente con sistemas electroquímicos y finalmente con sistemas combinados.

Degradación de fármacos mediante procesos biológicos

Dentro de los tratamientos biológicos que se han estudiado, destacan; lodos activados, sistemas anaerobios utilizando biofiltros, reactores de membrana, reactor anaerobio completamente agitado, reactor de biomembrana, entre otros. Estos procesos evaluados tienen eficiencias de remoción desde 20% hasta 100%, (aunque en algunos casos, sólo se refieren a una transformación solamente y no a una mineralización), los tiempos de residencia de los procesos biológicos van desde horas hasta meses. En la tabla 5 se muestran los diferentes resultados de remoción de fármacos. Adicionalmente, la mayoría de los estudios se realizan en condiciones favorables para el crecimiento microbiano.

Tabla 5. Estudios de remoción de fármacos utilizando diferentes sistemas de procesos biológicos.

Tipo de Reactor	V _R	Compuestos y concentración	Inóculo	pH	T°C	Eficiencia de remoción	Referencia
Biofiltro	15 L	PA2050 mg L ⁻¹ 2-EHA 4000 mg L ⁻¹	Lodo anaerobio	7-7.4	N.R.	90% PA 100% 2-EHA	Chen <i>et al.</i> (1994)
Sistema de microfiltración acoplado a birreactor de membrana		Ac. clofibrico 80 ng L ⁻¹ Diclofenaco 155 ng/L, Ketoprofeno 267 ng L ⁻¹ , Ac. mefenámico 42 ng L ⁻¹ , Primidona 45 ng L ⁻¹	Lodo activado	7	N.R.	N.R.	Kimura <i>et al.</i> (2009)
Planta de lodos activados	7.5 L	Antibióticos 3 µg L ⁻¹ , 29 mg L ⁻¹ de DQO por anti-inflamatorios, agentes contrastantes, reguladores de grasas y nootrópicos.	Lodo activado	7.1-7.7			Joss <i>et al.</i> (2006)
Biorreactor de membrana	6.4 L	3 µg/L de antibióticos, Analgésicos, Agentes contrastantes, regulador de grasas 14 mg/l de DQO	Lodo activado	7.5-8.1	N.R.	N.R.	Joss <i>et al.</i> (2006)
Tratamiento biológico aerobio convencional	N.R.	Aciclovir 170-2580 mg L ⁻¹ ; Ac. nalidíxico 222 mg L ⁻¹ ; Naproxeno 324 mg L ⁻¹	Lodos activados aerobios	6.7	25	100% Aciclovir 20 % de Ac. nalidíxico 100% de naproxeno	Mascolo <i>et al.</i> (2010)
Biorreactor con membrana airlift	8L	Acetaminofén 1 g L ⁻¹	Lodo activado	N.R.	25	100 % de acetaminofén en 24 h	Shariati <i>et al.</i> (2010)

PA-Ac. Piválico;

2-EHA- Ac. 2-Etilhexanoico

Degradación de fármacos por sistemas enzimáticos

Adicionalmente se han realizado estudios de degradación de fármacos a través de enzimas lignolíticas como: lacasa, manganeso peroxidasa y lignino peroxidasa, producidas por hongos basidiomicetos. Entre los hongos de la pudrición blanca más usados se encuentran: *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Paraconiothyrium variabile*, *Echinodontium taxoddi*. Las actividades enzimáticas obtenidas en los diferentes estudios, se encuentran en amplio intervalo de magnitud. De los estudios revisados, se han obtenido porcentajes de remoción de fármacos del 5.6 al 100%. Los fármacos más estudiados han sido: naproxeno, ibuprofeno, acetaminofén, ácido salicílico, ketoprofeno, codeína, eritromicina, metronidazol, ciprofloxacina, azitromicina, cefalexina, propranolol, carbamazepina, 10,11-EpoxiCBZ, 2-HydroxyCBZ, acridona, citalopram, tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina, sulfametoxazol, sulfatiazol, y benzodiazepinas.

Dentro de los estudios destacan el realizado por Marco-Urrea *et al.* (2009), donde ensayaron la degradación de ibuprofeno, ácido clofíbrico y carbamazepina utilizando hongos como *Trametes versicolor*, *Irpex lacteos*, *Ganoderma lucidium* y *Phanerochaete chrysosporium*; después de 7 días de incubación, el ibuprofeno fue degradado por las cuatro cepas. *Trametes versicolor* fue el único hongo capaz de degradar el ácido clofíbrico con valores de remoción cercanos al 97% con una concentración inicial de 5 mg L⁻¹. La carbamazepina fue degradada ligeramente por *T. versicolor* (56%), pero cuando este hongo se agregó en forma de pellet, la degradación de este compuesto fue cercana al 70%. Con respecto a la actividad enzimática en *T. versicolor*, las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa fueron producidas en un medio definido. La lacasa sola y junto con mediadores no oxidó los compuestos antes mencionados; de igual forma se realizaron pruebas de inhibición para el citocromo P450 encontrando resultados similares, lo que sugiere que un sistema de enzimas diferentes a las evaluadas, participan en el primer paso de la reacción de los compuestos estudiados.

Utilizando la misma cepa de *Trametes versicolor*, Auriol *et al.* (2008), probaron dos enzimas; peroxidasa de rábano (HRP) y lacasa para remover estrógenos en efluentes (utilizaron agua residual simulada y real) de plantas de tratamiento, encontrando que se necesita una dosis de

HRP de 8-10 U mL⁻¹ para remover completamente los estrógenos del agua residual real, en un periodo de una hora, y para el agua sintética sólo se requirió 0.032 U mL⁻¹. Mientras que para eliminar los estrógenos utilizando lacasa, se requirió de una dosis de 20 U mL⁻¹ para removerlos completamente; este sistema se comportó de manera similar en agua sintética y real. Además, en este estudio se determinaron las cinéticas enzimáticas de ambas enzimas, encontrando que tienen la misma afinidad por el sustrato.

Zhang y Geißen (2010) experimentaron con la enzima lignina peroxidasa, producida por *Phanerochaete chrysosporium*, evaluaron diferentes valores de pH y el efecto de la presencia de H₂O₂ sobre la actividad enzimática, en la degradación de los fármacos carbamazepina y diclofenaco. Ambas condiciones de reacción presentaron una fuerte influencia en la degradación de estos dos fármacos por la lignina peroxidasa. La degradación completa del diclofenaco se logró en valores de pH entre 3 y 4.5, con una concentración de 24 ppm de H₂O₂. Mientras que la degradación de la carbamazepina fue menor al 10%, y se incrementó ligeramente hasta 15% al agregar peróxido de hidrógeno. La adición de alcohol veratrílico a una temperatura de 30°C, no aumentó la degradación de la carbamazepina y no se encontraron efectos negativos sobre la degradación del diclofenaco.

Entre los pocos trabajos que han propuesto degradar los compuestos aquí evaluados con enzimas oxidasas y peroxidadas, se encuentran: Touahar *et al.* (2014) quienes degradaron un cocktail de fármacos entre los que se encontraban bezafibrato, indometacina y diclofenaco, utilizando las enzimas lacasa, versatil peroxidasa y glucosa oxidasa, que fueron agregadas mediante cross-linking, las eficiencias de degradación obtenidas para todos los fármacos fueron mayores al 80%.

En la tabla 6, adicionalmente se muestra el resumen de tres investigaciones consultadas adicionalmente .

Tabla 6. Estudios de degradación de fármacos utilizando hongos lignolíticos

Hongo	Compuestos probados	Condiciones	% Reducción			Referencias
			Medio estéril	Medio no estéril		
<i>Trametes Versicolor</i>	Naproxeno	pH=4.5	100	-		Cabana <i>et al.</i> 2007
	Ibuprofeno	T=25°C	100	100		
	Acetaminofén	Flujo= 0.96mL/h	100	100		
	Ácido salicílico	Flujo aire= 12L/h	0	-		
	Ketoprofeno	Conductividad	35	100		
	Codeína	Medio estéril	100	-		
	Eritromicina	Medio no estéril	100	-		
	Metronidazol		100	-		
	Ciprofloxacina		-	35		
	Azitromicina		-	100		
	Cefalexina		-	-51		
	Propranolol		-	100		
	Carbamazepina		-37	100		
	10,11-EpoxiCBZ		100	79		
	2,HydroxyCBZ		46	100		
Acridona		100	100			
Citalopram		100	100			
<i>Trametes versicolor</i>	Tetraciclina	T= 30°C	MnP	Lacasa	+ HBT	Suda <i>et al.</i> 2012
	Clortetraciclina	150rpm.	72.5%	16%	100%	
	Doxiciclina	15min- 1 h de reacción	84.3%	48%		
	Oxitetraciclina		93%	14%		

MnP, enzima manganeso peroxidasa

Degradación de fármacos por sistemas de oxidación electroquímica

La oxidación electroquímica forma parte de procesos de oxidación avanzada (POA), estos procesos se destacan por su capacidad de oxidar compuestos recalcitrantes hasta su mineralización (Juárez, 2008). Klavarioti *et al.* (2009) definen a los POA como métodos de oxidación de compuesto refractarios por especies altamente reactivas, tales como radicales hidroxilo (OH^\bullet).

En los estudios de degradación de fármacos que han utilizado diferentes POA, la fotocatalisis heterogénea es la más común con 32% de los casos, seguido por ozonación (30%), fenton y fotofenton (13%), UV/ H_2O_2 (12%), electrólisis (8%), sonólisis (4%) y oxidación subcrítica con solo 1% (Klavarioti *et al.*, 2009).

Sin embargo, existen pocos estudios para degradar fármacos mediante sistemas electroquímicos utilizando BDD como ánodo, por ejemplo Domínguez *et al.* (2010) evaluaron la degradación del fármaco ketoprofeno utilizando como ánodo BDD, con el objetivo de encontrar las condiciones de flujo, densidad de corriente, pH y concentración de electrolito soporte en donde tuvieran mayor eficiencia de remoción. Estadísticamente, se encontró que las condiciones para remover completamente el ketoprofeno fueron: pH de 3.99, flujo 1.25 mL min^{-1} , densidad de corriente de 235 mA cm^{-2} y una concentración de electrolito soporte de sulfato de sodio de 0.5 M. Otro estudio similar llevado a cabo por el mismo grupo de trabajo (González *et al.* 2011), pero con el fármaco trimetoprima, encontraron que con pH 3, flujo de 1.25 mL min^{-1} , y una densidad de corriente de 207 mA cm^{-2} se degradó 100% del fármaco.

Brillas *et al.* (2010) evaluaron la mineralización del diclofenaco en solución neutra usando dos ánodos, platino y BDD. Se utilizó una concentración de este compuesto de 175 mg L^{-1} y una concentración de electrolito soporte de 0.05 M (Na_2SO_4), pH 5.8, la solución se electrolizó con una densidad de corriente de 100 mA cm^{-2} . Cuando se utilizó platino, se alcanzó una remoción del fármaco medido como carbono orgánico total (COT) del 96 % en 120 min, mientras la solución del pH disminuyó hasta 3.5, a este valor de pH se atribuye la

alta remoción debido a que el fármaco puede ser protonado, provocando su precipitación. Cuando se utilizó BDD, el pH aumentó a 10, mientras que la remoción de COT fue de 75% en 360 min, en donde probablemente exista la formación de ácidos carboxílicos. A partir de este experimento evidenciaron la importancia de mantener el pH constante. Cuando se mantuvo el pH a 6.5, la densidad de corriente encontrada para mineralizar completamente el fármaco fue de 150 mA cm^{-2} a los 360 min utilizando BDD como ánodo; mientras que con platino, sólo se alcanzó una mineralización del 40%. Dentro de la cinética de degradación encontraron los intermediarios: 2-hidroxifenilacético, ácido 2,5-dihidroxifenilacético, 2,6-dicloroanilina y 2,6 diclorohidroquinona.

La degradación de tetraciclina también ha sido estudiada por Brinzila *et al.* (2012), quienes también utilizaron BDD como ánodo aplicando una densidad de corriente constante de 300 A m^{-2} , y $5 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$, probaron diferentes tasas de recirculación de flujos: 37, 75 y 100 L h^{-1} , bajo estas condiciones de operación se encontró que a mayor flujo volumétrico mayor la eficiencia de mineralización, llegando a 84, 85 y 87 %, respectivamente. Las cinéticas de degradación se evaluaron encontrando una cinética de pseudo primer orden.

García-Montoya *et al.* (2015), evaluaron la degradación de paracetamol y diclofenaco en un reactor filtro prensa (flujo de recirculación de 2 L min^{-1}), utilizando BDD como ánodo, con densidades de corriente en el intervalo de $156 - 6.25 \text{ mA cm}^{-2}$, y dos concentraciones iniciales del fármaco (50 y 100 mg L^{-1}), el electrolito utilizado fue una solución de $0.05 \text{ M Na}_2\text{SO}_4$. Durante la electrólisis, el pH se mantuvo constante entre 3 y 3.3, cuando se suministró 6.26 mA cm^{-2} , el % de mineralización para las soluciones de 50 y 100 mg L^{-1} de diclofenaco durante 180 min de electrólisis, fueron de 79.4 y 73%, respectivamente. Mientras que el paracetamol alcanzó porcentajes de mineralización de 54 y 51% a las concentraciones iniciales de 50 y 500 mg L^{-1} . La eficiencia en la degradación del paracetamol aumentó ligeramente cuando se experimentó con electro-fenton, utilizando una concentración de 0.5 mM de Fe^{2+} y con la generación de H_2O_2 en el sistema, la mineralización obtenida cuando la concentración inicial de paracetamol de 50 mg L^{-1} fue de 84 y 79 % a 100 mg L^{-1} . Consistentemente fueron cuantificadas la presencia de NO_2^- , NO_3^- y NH_4^+ comprobando la

mineralización. Adicionalmente se obtuvo que US\$ 0.0667 es el costo por KW h del tratamiento, los que equivale a \$1.2 M.N. el KW h.

Recientemente Brillas *et al.* (2016) estudiaron la incineración en medio ácido de clorhidrato con una concentración de 1.04 mM (100 mg L⁻¹ como carbono orgánico disuelto) en medio ácido (pH 3) comparando varios procesos: electro-oxidación avanzada, oxidación anódica con Pt, electro-fenton y foto-electro-fenton con BDD. En el proceso de oxidación se utilizó acero inoxidable como cátodo, mientras que en electro-fenton y foto-electro-fenton usó difusión de aire en el cátodo para producir H₂O₂. La mineralización en la oxidación anódica del fármaco fue pobre cuando se utilizó Pt, casi del 40%, mientras con BDD, 96% fue mineralizado en un periodo de 360 min a una densidad de corriente de 100 mA cm⁻². A estos mismos experimentos se adicionó H₂O₂ 20 mM, sin paso de corriente durante 120 min, a parte se expuso el sistema a luz UV 6W durante el mismo tiempo, en ambos casos no hubo mineralización del fármaco. Los resultados previos fueron comparados con el mismo sistema añadiendo Fe²⁺ 0.5mM y electro-fenton; en ambos sistemas se suministró oxígeno para la generación de H₂O₂, resultando el sistema de foto-electro-fenton más eficiente al alcanzar eficiencias de mineralización del 97 % en 240 min, mientras que electro-fenton alcanzó 92% en el mismo tiempo. El incremento de eficiencias de mineralización cuando se utiliza fenton se atribuye a la generación de mayor cantidad de OH• y en el caso de foto-electro-fenton a la generación de intermediarios como la especie de Fe (III)-carboxilato que en sinergia de BDD (OH•) y OH• remueven rápidamente los compuestos orgánicos. Se identificaron intermediarios como ácido oxálico, maléico, oxálico, glicónico, fórmico y acético.

Jara *et al.* (2007) utilizaron dos ánodos; Ti/IrO₂/Ta₂O₅ (DSA[®]) y ánodo tridimensional (3D) de carbón activado, en un reactor con membrana que separaba los electrodos, para la degradación de los antibióticos oxoflacinó y lincomicina, las pruebas las realizaron utilizando dos electrolitos soporte Na₂SO₄ y NaCl, a dos diferentes densidades de corriente (200 y 400 mA m⁻²). En todas las combinaciones se degradó el fármaco oxoflacinó utilizando el ánodo DSA; no obstante, la velocidad de degradación aumentó significativamente cuando la densidad de corriente se incrementó a 400 A m⁻² en NaCl como electrolito soporte, en donde

el cloro activo jugó un papel importante en la oxidación. El ánodo 3D no mostró resultados sobresalientes.

En la tabla 7 se muestran el resumen de las investigaciones antes mencionadas.

Tabla 7. Estudios de degradación de fármacos por oxidación anódica utilizando BDD

No.	Fármacos	Ánodo	Densidad de corriente (mA cm ⁻²)	Electrolito soporte	Eficiencia de remoción	Tiempo de electrolisis	Metabolitos	Otros	Referencia
1	Ofloxacina (25-50 mg L ⁻¹) Lincomicina	Ti/Pt, DSA Grafito 3D	200 y 400	Na ₂ SO ₄ (0.02N/0.2N) NaCl (0.02N/0.2 N)	>90% en Ofloxacina	N.R.	N.R.	La degradación es más rápida en el electrodo DSA con NaCl a 400 mA	Jara <i>et al.</i> 2007
2	Ketoprofeno (0.196 mM)	BDD	235	Na ₂ SO ₄ (0.5 M)	100	N.R.	N.R.	Flujo=1.42 ml min ⁻¹	Domínguez <i>et al.</i> 2010
3	Trimetoprima	BDD	207	Na ₂ SO ₄ (0.49 M)	100	N.R.	N.R.	Flujo 1.25 mL min ⁻¹	González <i>et al.</i> 2011
4	Diclofenaco	Ti BDD	150	Na ₂ SO ₄ (0.05 M)	40% 100%	360 min	2-Hidroxifenilacético, ácido 2,5-dihidroxifenilacético, 2,6- dicloroanilina y 2,6 diclorohidroquinona	pH se mantuvo con solución reguladora a 6.5	Brillas <i>et al.</i> 2010
5	Tetraciclina (150 mg L ⁻¹)	BDD	30	Na ₂ SO ₄ 5 g L ⁻¹	FR1(84) FR2 (85) FR3(87)	4 h	Se observan pero no se identifican	FR1=37 L h ⁻¹ FR2= 75 L h ⁻¹ FR3= 100 L h ⁻¹	Brinzila <i>et al.</i> 2012
6	Paracetamol 100mg L ⁻¹ Diclofenaco 100mg L ⁻¹	BDD BDD+Fe ²⁺	6.25	Na ₂ SO ₄ 0.05 M	51 79 73	180 min	p-benzoquinona	Flujo 2L min ⁻¹ pH 3	García-Montoya <i>et al.</i> 2015

FR Tasa de recirculación

Degradación de fármacos por sistemas combinados

La oxidación anódica es un POA eficiente debido a que los radicales OH^\bullet están fisisorbidos sobre BDD, además en la comparación con otros POA, la oxidación anódica puede ser selectiva a través del control del potencial (Sirés y Brillas 2012; Feng, *et al.* 2013). De tal manera que la oxidación anódica utilizando como ánodo BDD es una alternativa importante en el tratamiento de aguas residuales que contienen compuestos farmacéuticos en bajas concentraciones.

El electrodo de BDD se ha utilizado en diferentes trabajos para remoción de compuestos recalcitrantes como el fenol, el cuál ha sido ampliamente estudiado en los procesos de degradación (Fryda *et al.*, 1999; Iniesta *et al.*; 2001, Cañizares *et al.*; 2005), otros compuestos que se han degradado son azul índigo (Butrón *et al.*, 2007); con respecto a sustancias farmacéuticas existen pocos trabajos realizados como anteriormente se ha descrito.

En la mayoría de los estudios de degradación de fármacos se utilizan medios sintéticos, en el caso de procesos biológicos medios de cultivo y en sistemas electroquímicos el electrolito soporte es comúnmente sulfato de sodio. Sin embargo, la composición de las aguas residuales es más compleja, presenta materia orgánica en mayor proporción que los contaminantes emergentes como los fármacos, no cuenta con nutrimentos que favorezcan el crecimiento microbiano, el electrolito soporte principal es cloruro de sodio y en segundo lugar es el ion sulfato. Para tener un medio más cercano a la composición de una agua residual municipal, en el presente trabajo se utilizó agua residual sintética (ARS) formulada conforme a la norma ASTM D 5905-98, con el propósito de evaluar la factibilidad técnica de los procesos que se van a experimentar en agua con composición similar al agua residual de tipo municipal.

Los POA son tecnologías que producen radicales libres OH^\bullet que oxidan rápidamente la materia orgánica refractaria. Entre los POA que se han propuesto para la eliminación de fármacos en aguas residuales, se encuentran: foto-fenton; oxidación con ozono (Gao *et al.* 2014; Rodayan *et al.* 2010; Beltrán *et al.* 2008, Trovó *et al.*, 2009) y los procesos de oxidación foto catalítica (Nasuhoglu *et al.* 2011). Sin embargo, estos procesos tienen lugar en el seno

del líquido, provocando una degradación inespecífica de la materia orgánica (Ganzenko *et al.* 2014), esta degradación no específica aumenta los costos de operación de la degradación de la materia orgánica biodegradable. Otras técnicas como las fotoquímicas, disminuyen su eficiencia debido a la turbidez de las aguas residuales evitando la oxidación (Oller *et al.* 2011). En el estudio de la degradación de compuestos recalcitrantes como los fármacos, el acoplamiento de un proceso de oxidación avanzada y un proceso biológico, muestra una alternativa interesante para aumentar la degradación de estos compuestos, en donde el primero tratamiento aumenta la biodegradabilidad por oxidación química y el segundo lo mineraliza metabólicamente.

Utilizar BDD para degradar fármacos presentes en las aguas residuales como sistema de pre-tratamiento en el proceso de lodo activado es interesante por varias razones: primero, es una oxidación anódica indirecta la cual es eficiente debido a que el radical OH^\bullet es fisisorbido en el ánodo de BDD y la reacción de oxidación indirecta se puede controlar de forma selectiva a través del control del potencial a diferencia de otros POA, como el ozonificación, foto-fenton, etc. (Brillas 2012; Feng *et al.* 2013.); en segundo lugar, en presencia de iones cloruro, el poder oxidante de los radicales OH^\bullet disminuye y también se produce cloro activo (Guzmán-Duque *et al.* 2014.), esto podría oxidar preferencialmente los fármacos sobre la materia orgánica; y tercero, el cloro activo podría afectar el crecimiento microbiano, sin embargo en el funcionamiento de plantas de lodos activado, el cloro se utiliza comúnmente para controlar un fenómeno conocido como bulking (crecimiento de microorganismos filamentosos), estos microorganismos causan problemas en el funcionamiento de plantas de tratamiento en la operación unitaria de sedimentación y se controla con la adición de cloro a una concentración no mayor de 1 mg L^{-1} .

Por lo tanto, es necesario proponer una oxidación (pre-tratamiento) antes del tratamiento en el reactor biológico, con el objetivo de eliminar los fármacos presentes en las aguas residuales sin afectar el rendimiento de los lodos activados en la degradación de la materia orgánica. En nuestro conocimiento, no existe un sistema de oxidación como pre-tratamiento para eliminar simultáneamente diferentes fármacos de las aguas residuales.

Existen escasos estudios en donde los POA han sido utilizados como sistemas de pre-

tratamiento para aumentar la biodegradabilidad de contaminantes recalcitrantes en una solución específica; los intermediarios formados deben, por lo tanto, ser más biodegradables que los compuestos de interés, mientras que la oxidación de la materia orgánica debe permanecer limitada para asegurar una fuente de carbono asimilable en el tratamiento biológico posterior, disminuyendo así los costos de operación (Oller *et al.* 2011; Ganzenko *et al.* 2014). En los estudios de oxidación electroquímica, regularmente se llevan a cabo con un solo compuesto orgánico y una sal como electrolito soporte que comúnmente es sulfato de sodio, posteriormente para llevar a cabo el proceso de degradación biológica es necesario adicionar nutrientes. Por ejemplo, Fontmorin *et al.* (2013) estudiaron un proceso acoplado para eliminar el plaguicida clorado ácido 2,4-diclorofenoxiacético (500 mg L^{-1}) en una solución de Na_2SO_4 con una concentración de 0.1 M, posteriormente el medio electrolizado fue enriquecido con nutrientes para alimentar al lodo activado. Las determinaciones de carbono orgánico disuelto mostraron que una mineralización superior se observó en la solución electrolizada durante los dos primeros días, en comparación con el reactor biológico control. Este mismo grupo de investigación logró aumentar la degradación de sulfametazina con un lodo activado utilizando electro-fenton como sistema de pre-tratamiento (Mansour *et al.* 2014).

CAPÍTULO III.

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO

El consumo de fármacos aumenta la calidad de vida de la población en general y año con año, los gobiernos de los diferentes países del mundo, tienen como política incrementar el gasto en salud pública, en lo que se refiere a servicios médicos y suministro de medicamentos; sin embargo, estos fármacos, al ser parcialmente metabolizados son excretados al ambiente y generalmente resultan ser recalcitrantes en sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales, provocando efectos tóxicos agudos y crónicos a diferentes especies pertenecientes a niveles primarios y secundarios de la red trófica.

Por el impacto que pueden generar los fármacos en el ambiente, es necesario estudiar alternativas de tratamiento de aguas residuales que degraden parcialmente o totalmente estos compuestos. En este trabajo se evalúa la degradación simultánea de fármacos (bezafibrato, indometacina, gemfibrozil, diclofenaco, y sulfametoxazol) que mostraron efectos tóxicos crónicos sobre especies bioindicadoras, y además son de difícil degradación en sistemas de tratamientos de aguas residuales.

Mientras que el tratamiento por lodos activados es poco eficiente para la remoción de fármacos, los procesos de oxidación avanzada utilizando BDD como ánodo y sistemas enzimáticos podrían oxidar no sólo los fármacos sino también la MOB, haciendo menos específico y sobre todo más costoso el proceso de tratamiento de efluentes con fármacos. Para contribuir a la disminución de la problemática provocada por la presencia de fármacos en cuerpos de aguas; en el presente proyecto se propone un tren de tratamiento con dos etapas, la primera tiene como objetivo degradar parcialmente los fármacos (para hacerlos más biodegradables), controlando las condiciones de operación para evitar la oxidación significativa de la materia biodegradable. La segunda etapa del tren de tratamiento consiste en alimentar con el efluente previamente tratado a un reactor de lodos activados aerobios. En este trabajo se estudian dos tipos diferentes de pre-tratamiento: un sistema de tratamiento enzimático y una oxidación electroquímica indirecta.

La utilización de BDD como ánodo en la oxidación electroquímica indirecta de los fármacos presentes en las aguas residuales, como sistema de pre-tratamiento se seleccionó por varias razones: el poder oxidante de los radicales OH^\bullet disminuye en presencia de cloruros,

produciendo cloro activo (Guzmán-Duque et al 2014.), estos podrían oxidar preferencialmente los fármacos sobre la materia orgánica; y tercero, el cloro activo podría afectar el crecimiento microbiano; sin embargo, en el funcionamiento de plantas de lodos activado, el cloro se utiliza comúnmente para controlar un fenómeno conocido como bulking (crecimiento de microorganismos filamentosos), estos microorganismos causan problemas en el funcionamiento de plantas de tratamiento de sedimentación y se controla con la adición de cloro a una concentración no mayor de 1 mg L^{-1} . Por otra parte la degradación de los fármacos por enzimas lignolíticas es otra alternativa como sistema de pre-tratamiento para producir intermediarios más biodegradables debido a los diferentes mecanismos de oxidación que tienen estas moléculas.

El efecto de los pre-tratamientos electroquímico y enzimático sobre el lodo activado aerobio, se determinará mediante la evaluación del cambio comunidades microbianas, a través de la reamplificación del gen 16S rRNA.

Hipótesis

Los procesos de oxidación por enzimas lignolíticas y por electroquímica indirecta aumentarán la biodegradabilidad de fármacos recalcitrantes: bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol, para posteriormente ser mineralizados en conjunto con la materia orgánica biodegradable por un sistema de lodos activados aerobios.

CAPÍTULO IV.

IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS PRESENTES EN AGUA RESIDUAL POR EL MÉTODO ANALÍTICO INSTRUMENTAL DE ELECTROFORESIS CAPILAR

Un reto importante en el presente trabajo, fue optimizar el método de cuantificación de los fármacos presentes en el agua residual mediante la técnica analítica de electroforesis capilar de zona, debido a que los fármacos, bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol están en bajas concentraciones en el agua residual sintética. Para conocer un poco de esta técnica, primero se describe las generalidades y principios del funcionamiento de esta técnica analítica, y posteriormente se describe el trabajo realizado para la cuantificación de los fármacos en bajas concentraciones.

Evolución de la técnica analítica de electroforesis capilar

Según Martínez-Gómez *et al.* (2007), el término electroforesis fue utilizado por Tiselius en 1937 cuando observó que colocando una mezcla de proteínas en el interior de un tubo lleno de una solución reguladora y aplicando un campo eléctrico cada proteína migraba de forma distinta. Actualmente esta técnica ha sido aplicada en geles de poliacrilamida o agarosa, medios anticonvectivos que mejoran la eficiencia de la separación, en formato de placa o de tubo. Al introducir una pequeña cantidad de muestra, la carga eléctrica de cada soluto hace que migre en zonas discretas en función de su movilidad. A pesar de ser una de las técnicas de separación ampliamente utilizadas, presentaba como problema la dificultad en la detección y la automatización, tiempos largos de análisis y bajas eficiencias. Estos dos últimos problemas son causados por la limitación que supone la aplicación de altos voltajes. La técnica ha ido evolucionando a lo largo de los años, hasta que a partir de los años 60 se comienza a desarrollar la técnica de electroforesis en columnas capilares de sílice fundida naciendo así la electroforesis capilar (CE, Capillary Electrophoresis). Al principio sólo eran accesibles capilares de diámetro interno 1 mm hasta que hacia 1980, se introducen capilares de 75 micrómetros de diámetro interno (Martínez-Gómez *et al.*, 2007).

Ventajas de la técnica analítica de electroforesis capilar

Generalmente, el análisis de los diferentes analitos puede realizarse en unos minutos; se requiere de pequeñas cantidades de muestra, en el rango de nanolitros, con una alta reproducibilidad, y con un error estándar relativo de tiempo de migración menor a 0,5% (Venter *et al.*, 2001). Actualmente la técnica de electroforesis capilar, es una técnica analítica

instrumental que por sus características muestra varias ventajas con respecto a otras como HPLC, tales como los tiempos de respuesta, volúmenes de los disolventes utilizados y límite de detección (tabla 8).

Tabla 8. Comparación entre los métodos analíticos de electroforesis capilar y cromatografía de líquidos de alta resolución

Características	Electroforesis capilar	Cromatografía de líquidos de alta resolución
Mecanismo de Separación	Masa/carga	Intercambio de iones, tamaño de partícula
Tiempo de análisis	5-30 minutos	10-120 minutos
Detección	Conductividad, UV, arreglo de diodos	Conductividad, UV, arreglo de diodos
Volumen de separación	5-50 nL	10-100 µL
Precisión	Buena a excelente	Buena a excelente
Sensibilidad	Buena a excelente	Buena a excelente
Límite de detección	pico a nanomoles	Nano a micro moles
Consumo de disolventes orgánicos	Mililitros	Litros
Costo del equipo	Alto	Alto
Resultados	Cuantitativos	Cuantitativos

Electroforesis Capilar de Zona

El mecanismo de separación en la electroforesis capilar es el mismo de la electroforesis convencional, es decir, la movilidad electroforética de las especies cargadas en solución presenta una diferente velocidad de migración bajo la influencia de un campo eléctrico. Los cationes migran hacia el cátodo (electrodo de carga negativa) mientras que los aniones migran hacia el ánodo (electrodo de carga positiva) y las especies neutras no migran por sí solas. La migración diferencial de los compuestos está vinculada a la relación carga/masa y a la conformación de los analitos así como de la viscosidad del medio. Las propiedades del disolvente tales como la fuerza iónica, pH y la constante dieléctrica, también son importantes porque influyen sobre la carga efectiva del analito.

Se basa en la separación de los componentes individuales de una muestra, debido a las diferentes movilidades relativas por dos fenómenos que ocurren simultáneamente, la movilidad electroforética (que anteriormente se mencionó su concepto) y la movilidad electro-osmótica que da lugar al flujo electro osmótico (EOF, por sus siglas en inglés); estas

movilidades se modulan controlando la composición del electrolito soporte (solución amortiguadora) tanto en fuerza iónica como en pH.

La velocidad electroforética de los iones cargados hacia el cátodo, depende de si su carga es positiva o negativa, y la magnitud se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$v = \mu_{ep} E = \mu_{ep} \frac{V}{L}$$

En donde:

V = Velocidad de migración de la partícula cargada en un campo eléctrico (cm s^{-1})

μ_{ep} = Movilidad electroforética ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)

E = Magnitud del campo eléctrico (V cm^{-1})

V = Voltaje aplicado (V)

L = Longitud total del capilar (cm)

La movilidad electroforética está en función a la relación carga del ion y su masa, se expresa mediante la siguiente ecuación

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

q = Carga del ion

η = Viscosidad

r = Radio del ion

Los grupos silanol (SiO^-) forman parte de la pared del capilar de sílice fundida y no pueden moverse, sin embargo los contra iones (cationes), contenidos en la solución amortiguadora (conocida como electrolito soporte), se mueven bajo la influencia del campo eléctrico hacia el cátodo, originando el EOF. Debido a las fuerzas de fricción entre las moléculas del disolvente, el movimiento de los cationes junto con su esfera de solvatación se extiende inmediatamente por el líquido entero, generando el flujo electro osmótico. La separación de cada analito se debe a su diferencia entre las velocidades electroforéticas y no a la electro osmótica, debido a que cada analito tiene una movilidad electroforética específica y la velocidad electro osmótica es constante transportando los iones del ánodo al cátodo. La expresión para calcular la velocidad electro-osmótica es:

$$v_{eo} = \mu_{eo}E = \mu_{eo} \frac{V}{L}$$

Dónde:

v_{eo} = Velocidad electro-osmótica (V s)

μ_{eo} = Movilidad electro-osmótica (cm² V⁻¹ s⁻¹)

E = Campo eléctrico (V cm⁻¹)

V = Diferencia de voltaje (V)

L = Longitud total del capilar (cm)

La movilidad electro-osmótica se define con la siguiente expresión:

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon\zeta}{4\pi\eta}$$

Dónde:

ϵ = Constante dieléctrica

η = Viscosidad del buffer

ζ = Potencial zeta (Volts)

La muestra que está formada por un conjunto de aniones y cationes, se introduce dentro de este sistema ocupando una zona única. Al someter este sistema a la influencia de un campo eléctrico, las especies iónicas y la muestra migran debido a la movilidad electroforética y electro-osmótica hasta que el (los) analito(s) alcance(n) el detector del equipo, generando un electroferograma (Figura 8). Cuando haya transcurrido cierto tiempo desde el inicio de la aplicación del campo eléctrico, los componentes de la muestra migrarán cada uno a su velocidad y se separarán en diferentes zonas, según la movilidad de cada analito, que está principalmente dado por la relación carga/masa.

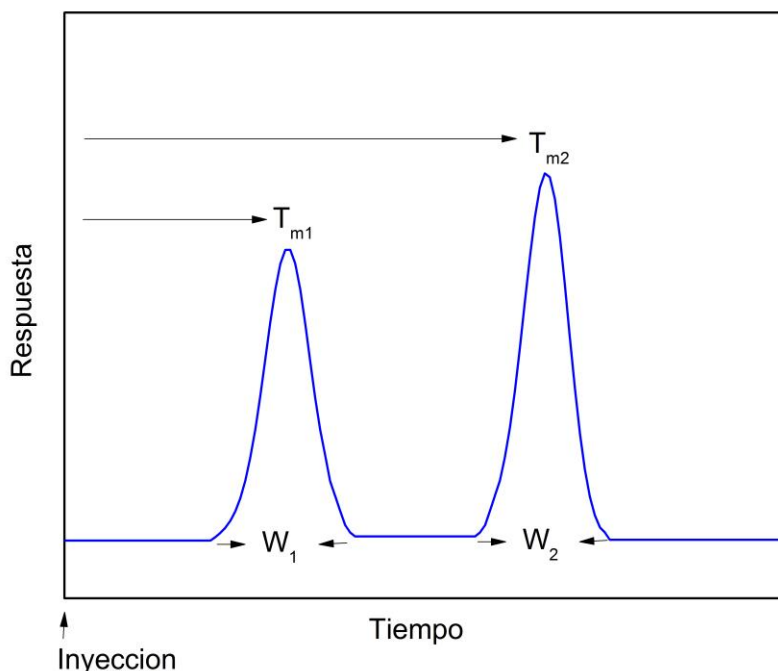


Figura 8. Electroferograma típico obtenido por equipo de electroforesis capilar

La separación de los analitos es importante en la cuantificación, depende del voltaje aplicado, pH, coeficientes de difusión de los analíticos, entre otros factores. Para calcularla rápidamente, se realiza a través de la resolución de cada fármaco, para este cálculo se utiliza el ancho de los picos obtenidos en un electroferograma y sus respectivos tiempo de migración.

$$R_s = 1.177 \times \left[\frac{T_{m2} - T_{m1}}{W_1 + W_2} \right]$$

En dónde:

T_{m2}, T_{m1} = Tiempos de migración (min)

W_1, W_2 = Anchos de cada pico (min)

Metodología para cuantificación de fármacos en agua residual sintética

Recordando que los parámetros de calidad del agua principales que se miden considerando

la normatividad oficial mexicana, son: pH, DBO, DQOs, SSTLM, coliformes fecales, nitrógeno total y fósforo total. Sin embargo, se tienen por ejemplo el límite máximo permisible de DBO para descarga a un cuerpo de agua natural para la protección de la vida acuática, es de 60 mg DBO L⁻¹ como promedio en un día. En este sentido los fármacos presentes en agua residual se encuentran en un intervalo de ng L⁻¹ a µg L⁻¹, lo que indica que la aportación de DBO por sustancia farmacéutica es marginal a pesar de que pueden afectar negativamente al ambiente como anteriormente se ha mencionado. Por lo tanto, es importante implementar un método para cuantificar bajas concentraciones de fármacos en agua residual. Para realizar un estudio sistemático de cuantificación de fármacos y evaluación de la degradación por diferentes tecnologías es importante utilizar una agua residual sintética con composición similar a las aguas residuales municipales, en el presente trabajo se utilizó una ARS estandarizada cuya composición está definida por la norma de referencia ASTM International (1998).

Para optimizar el método de electroforesis capilar de zona en la cuantificación de bajas concentraciones de fármacos, se realizó la siguiente estrategia:

- Determinar el valor de pH del buffer de fosfatos en una solución madre, a la cual se tiene una mayor señal de respuesta
- Determinar la concentración de buffer de fosfatos en una solución madre, a la cual se tiene una mayor señal de respuesta
- Evaluar el volumen de inyección para poder cuantificar la mínima concentración de fármacos presentes en agua residual sintética

Para realizar la cuantificación de fármacos en agua residual sintética, se prepararon las siguientes soluciones: NaOH 0.1 N, buffer de fosfatos de sodio a las concentraciones de 10 mM, 30mM y 50 mM, cada una de estas soluciones se ajustaron a tres diferentes valores de pH 7, 8 y 9, los cuales fueron ajustado con HCl o NaOH, ambas soluciones con una concentración de 1 M.

Se preparó una solución madre de fármacos a una concentración de 200 mg L⁻¹ de cada uno. Se pesaron 0.02 g de cada fármaco, el bezafibrato, gemfibrozil e indometacina se disolvieron

previamente en 3 mL de metanol aproximadamente. Los dos fármacos restantes (amoxicilina y sulfametoxazol) se disolvieron en agua desionizada, ambas soluciones se mezclaron y se aforaron a 100 mL y se adicionó 100 μ L de NH_4OH concentrado para redissolver el precipitado formado durante la preparación; la solución final se mantuvo en refrigeración a 4°C.

La preparación de agua residual sintética, se formuló conforme a la norma ASTM D 5905-98, a continuación se enlistan las sustancias necesarias:

- Agua destilada, agua tipo 1 según especificación D1193
- Kaolin , Grado USP previamente secado a 103°C
- Cerveza corona lighth, la cerveza previamente se agitó vigorosamente y se dejó reposar en refrigeración por 24 horas para disipar el CO_2
- Harina de trigo de uso general previamente secada a 103°C.
- Sales de agua de mar previamente secadas a 103°C. Las sales marinas de uso comercial para acuario, se encuentran disponibles en tiendas de mascotas.
- Solución de surfactante de Tritón X-100. Se agregó 1.2 g a un litro de solución de agua destilada.

Procedimiento de preparación de agua residual sintética:

La ventaja de formular una ARS, es poder modificar la composición para llevar diferentes tipos de estudios, en el presente trabajo se realizaron dos modificaciones en la composición, la primera fue no adicionar la harina para eliminar los sólidos suspendidos de naturaleza orgánica, en una PCTAR este parámetro se remueve previamente a la alimentación al reactor biológico por una operación unitaria conocida como sedimentación; la segunda modificación en la preparación fue variar la cantidad de cerveza para tener diferentes concentraciones en la MOB; y la tercera, fue adicionar o no los fármacos al ARS para poder evaluar el efecto de los pre-tratamientos.

El procedimiento fue el siguiente: en un matraz aforado se colocó aproximadamente 500 mL

de agua, se agregó 1 g de sales de agua de mar, 0.04 g de Kaolin, 10 mL de la solución de Triton X-100, 40 mL de cerveza, posteriormente se agitó ligeramente para disolver evitando la generación de espuma y por último se aforó en un litro de solución. El agua residual sintética se debe de mantener en refrigeración a 4°C por un periodo no mayor de 24 horas. La norma reporta los valores de diferentes parámetros de calidad del agua, los cuales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 9. Composición reportada del agua residual sintética formulada conforme a la norma ASTM International (1998).

Parámetro	Concentración (mg L ⁻¹)	Parámetro	Concentración (mg L ⁻¹)
DBO	>570	Selenio	<0.002
Plata	<0.0002	Estaño	<0.8
Aluminio	0.03	Talio	<0.001
Arsénico	<0.001	Vanadio	<0.2
Boro	0.1	Mercurio	<0.0002
Bario	0.003	Nitrógeno amoniacal	0.1
Berilio	<0.0002	Nitrógeno Kjeldahl	30
Calcio	10	Fósforo	8
Cobalto	<0.05	Nitrito (N-NO ₂ ⁻)	0.01
Hierro	0.1	Nitrato (N-Nitrato ₃ ⁻)	0.05
Potasio	26	Sólidos Suspendidos	232
Cobre	0.01	Sólidos Suspendidos volátiles	198
Níquel	0.003	Sólidos totales	2200
Plomo	<0.001	Sólidos Volátiles totales	1300
Cadmio	<0.001	Cloruros	490
Cromo	<0.001	DQO	3500
Zinc	0.02	Cianuro	<0.02
Magnesio	33	Orto fosfato	7
Manganeso	0.01	Sulfato	85
Molibdeno	0.03	Carbono Orgánico Total	1600
Sodio	200	Lista de contaminantes prioritarios USEPA	Por debajo de detección
Antimonio	<0.003		

Finalmente, para las muestras que contienen fármacos, se adicionó un mililitro de la solución madre de fármacos para tener una concentración final de 200 µg L⁻¹. En todos los casos se ajustó el pH a 7

Purificación de fármacos conforme al método EPA 1694.

Para purificar los fármacos del agua residual sintética y concentrarlos para su medición, se realizó conforme al método de la EPA No. 1694. A continuación se describe el procedimiento:

- A la muestra de ARS, se le agregó 500 mg de $\text{Na}_4\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se ajustó a un pH 2 con HCl concentrado
- Se acondicionó el cartucho Alltech Prevail de 500 mL (C 18) eluyendo a un flujo de 5 mL min^{-1} con 20 mL de metanol, 6 mL de agua desionizada, 6 mL de agua desionizada a pH 2
- Posteriormente sin dejar secar, se hizo pasar la muestra de ARS a pH 2 a través del el cartucho C_{18} a una razón de 5-10 mL/min
- Se lavó el cartucho con 10 mL de H_2O desionizada para eliminar el EDTA, se dejó secar el cartucho al vacío durante 5 min aproximadamente
- Posteriormente, se eluyeron los fármacos retenidos en el cartucho, con 12 mL de metano. Finalmente, la muestra se concentró con nitrógeno en baño maría a 50°C hasta un volumen aproximado de 1 mL, se le agregó 3 mL de metanol grado HPLC y se aforó con una solución de ácido fórmico-metanol al 0.1% para después leer en electroforesis capilar

Cuantificación de los fármacos

La cuantificación se determinó utilizando un equipo de electroforesis capilar marca Beckman modelo MDQ, con una columna de sílice fundida de 60 cm de largo y $75 \mu\text{m}$ de diámetro interno. La columna fue regenerada con 0.1 N NaOH durante 10 minutos a una presión de 20 psi, posteriormente, se realizó un segundo lavado con agua desionizada a las mismas condiciones y finalmente la columna se acondicionó con la solución de buffer de fosfatos de sodio 30 mM (pH 7). Para la lectura de las muestras, las condiciones del equipo fueron 18 kV de poder suministrado, presión de inyección de 0.5 psi, se utilizó un detector UV a 210 nm.

Para evaluar el límite de detección de la muestra del método llevó a cabo los siguientes pasos descritos en el diagrama de flujo (Figura 9).

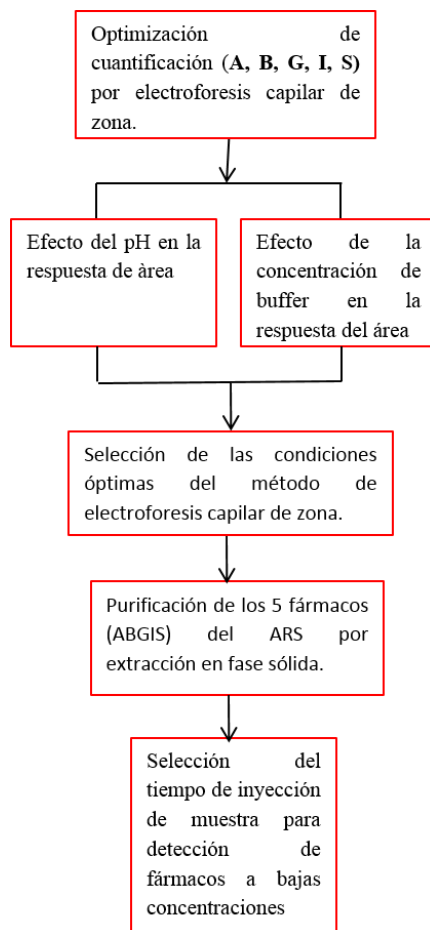


Figura 9. Diagrama de flujo para determinar el límite de detección de los fármacos en ARS

Resultados y discusión de cuantificación de fármacos por electroforesis capilar de zona

Antes de realizar las cuantificaciones de las áreas, se inyectó un blanco con buffer de fosfatos observando solo la línea base, posteriormente para identificar que pico corresponde a cada fármaco en el electroferograma, se inyectaron paulatinamente cada uno de ellos identificando el tiempo de migración y la posición de cada fármaco.

Para la optimización del método, se eligió trabajar con tres concentraciones diferentes de buffer de fosfatos 10, 30 y 50 mM, cada buffer se experimentó con tres diferentes valores de pH 7, 8 y 9 (ajustados con 1 M HCl o 1 M NaOH). Para cada condición se obtuvo el área generada por el electroferograma y se calculó la resolución entre los picos para definir

concentración de buffer y valor de pH con mejor respuesta.

La representación gráfica donde se presentan las señales asociadas a los compuestos separados por electroforesis capilar de zona, se conoce como electroferograma. En la figura 10, se muestran los electroferogramas obtenidos para los diferentes fármacos amoxicilina, bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol (ABGIS) con un buffer de fosfatos a pH 7 y tres diferentes concentraciones de 10, 30 y 50 mM. Además, se muestran los picos correspondientes a cada fármaco. En esta figura se observa un efecto sobre la velocidad de migración de los fármacos, la velocidad disminuye al aumentar la concentración del buffer, sugiriendo que la energía de la doble capa baja por el aumento de la concentración de las especies.

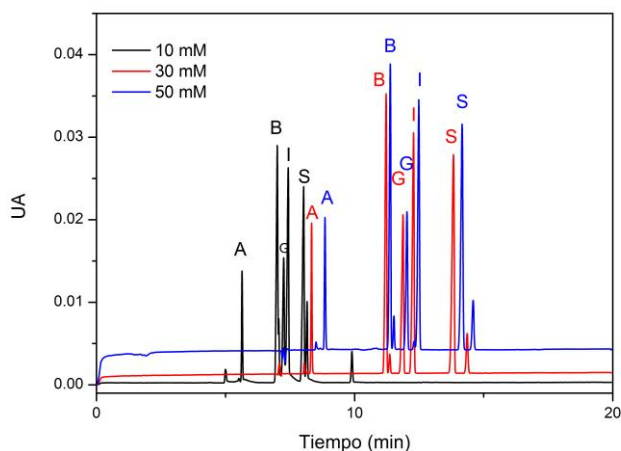


Figura 10. Perfiles de migración en electroforesis capilar de amoxicilina (A), bezafibrato (B), gemfibrozil (G), indometacina (I) y sulfametoxazol(S), a diferentes concentraciones de buffer de fosfatos (pH 7) indicados en la figura

Efecto del pH de buffer de fosfatos para la optimización del método de electroforesis capilar de zona

Para seleccionar el pH con mayor respuesta, se probaron tres valores de pH: 7, 8 y 9, fijando la concentración del electrolito de buffer de fosfatos a 30 mM, de los electroferogramas se obtuvo el área bajo la curva de cada pico de los fármacos a los diferentes valores de pH. De

los tres valores de pH que se utilizaron para la optimización del método de electroforesis capilar, el pH de 7 y 8 presentaron mayores áreas que a pH 9 (Figura 11). Esto indica que el pH tiene un efecto sobre la respuesta del equipo de electroforesis capilar de zona, afectando el flujo electro-osmótico, debido a que a un pH bajo afecta el transporte, siendo menor la velocidad de migración de los fármacos, provocando que la muestra tarda más en pasar por el detector del equipo; o bien por los valores de pKa de los fármacos, a pH 9 la mayoría están desprotonados, aumentando su movilidad electroforética y modificando sus propiedades espectrofotométricas.

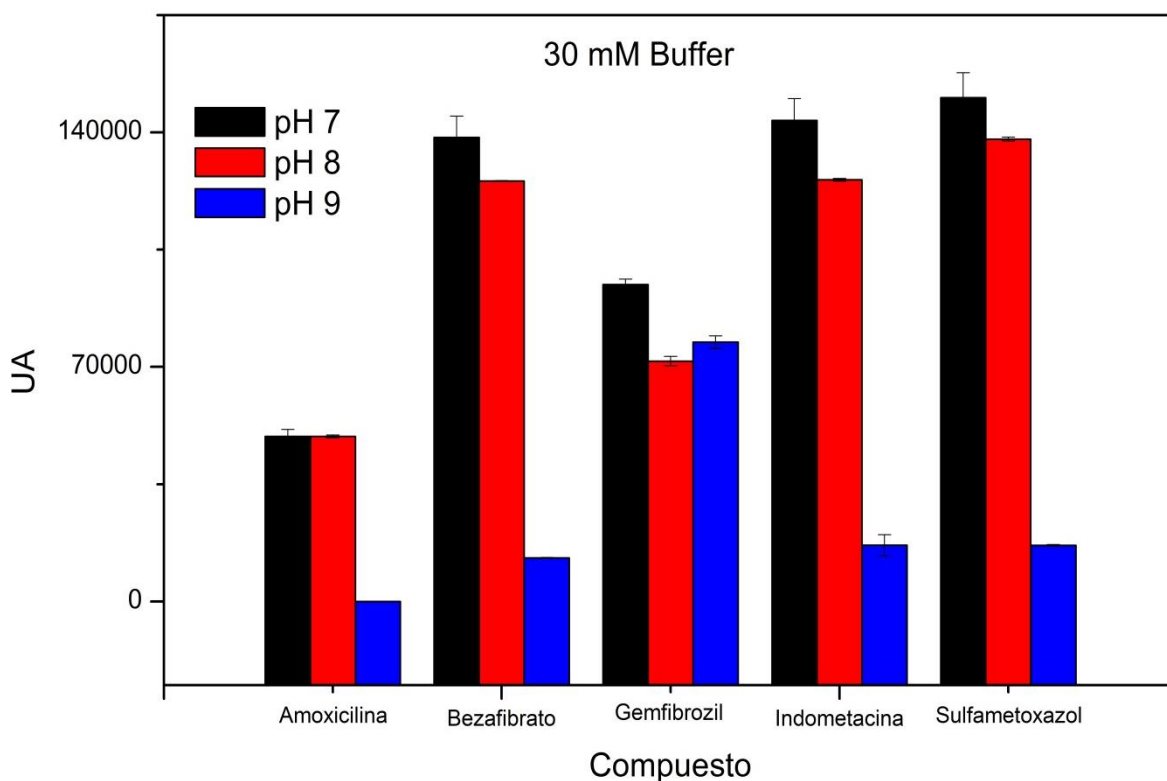


Figura 11. Áreas obtenidas a partir de los electroferogramas de los fármacos de amoxicilina, bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol a los valores pH de 7, 8 y 9 utilizando 30 mM de buffer de fosfatos

Selección de la concentración de buffer de fosfatos.

En la figura 12 se muestran las áreas correspondientes de las señales de cada uno de los fármacos obtenidas a tres valores de concentración de buffer de fosfatos (10, 30 y 50 mM) a

pH 7, este valor de pH fue seleccionado por los resultados obtenidos previamente. La figura 12, muestra que la respuestas en área de los picos de los fármacos son mayores con una concentración de 30 mM de buffer de fosfato, para los fármacos bezafibrato, indometacina y sulfametoxazol; mientras que para amoxicilina y gemfibrozil, las respuestas fueron mayores cuando el buffer tiene una concentración de 50 mM; este comportamiento posiblemente está asociados a la modificación de la doble capa que se forma en la superficie del capilar por el aumento de la fuerza iónica y a los valores de pKa de cada uno de los fármacos

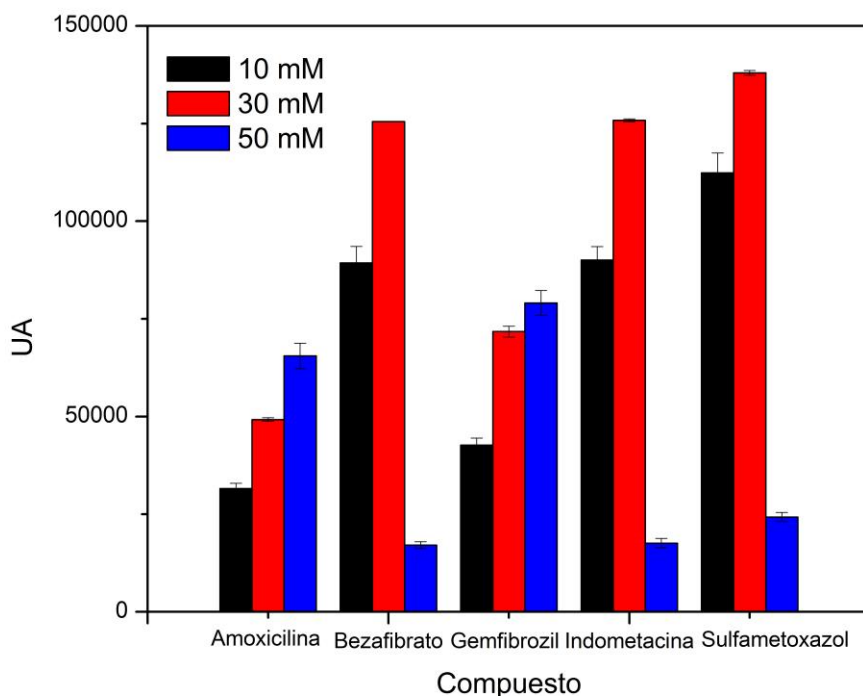


Figura 12. Influencia de la concentración del buffer de fosfatos pH 8, sobre las áreas obtenidas por las señales electroforéticas de cada uno de los fármacos amoxicilina, bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol contenidos en la solución madre

Velocidad de migración de los fármacos.

Hay que recordar que los fenómenos que definen la separación de los analitos a través de electroforesis capilar son los flujos electro-osmótico y electroforético; el primero presenta un perfil de distribución plano de forma que proporciona la misma velocidad a todos los solutos

debido a que el electrolito migra a condiciones turbulentas y, el segundo, provoca una migración diferenciada por la aplicación de un campo eléctrico debido a su relación carga/masa de los analitos. Cuando se introduce la muestra en la columna y se aplica una diferencia de potencial, cada uno de los componentes tendrá una movilidad total, en la cual también interviene el tiempo de migración de la muestra. La figura 13 muestra la comparación de las velocidades de migración de cada uno de los fármacos, a dos concentraciones de buffer que son 10 y 30 mM (se descartó 50 mM debido a la baja respuesta que se obtuvo en tres de los fármacos). La migración de los fármacos no se vio afectada significativamente en cada valor de pH; sin embargo, la velocidad de migración de los fármacos a una concentración de 10 mM estuvo en el intervalo entre 6- 8 cm min⁻¹, mientras que a 30 mM se obtuvieron velocidades de migración en el intervalo de 4- 6 cm min⁻¹. Este resultado sugiere una modificación en el potencial zeta, en donde al aumentar la concentración del buffer de fosfatos, aumenta la fuerza iónica desestabilizando la doble capa y disminuyendo la movilidad electro-osmótica.

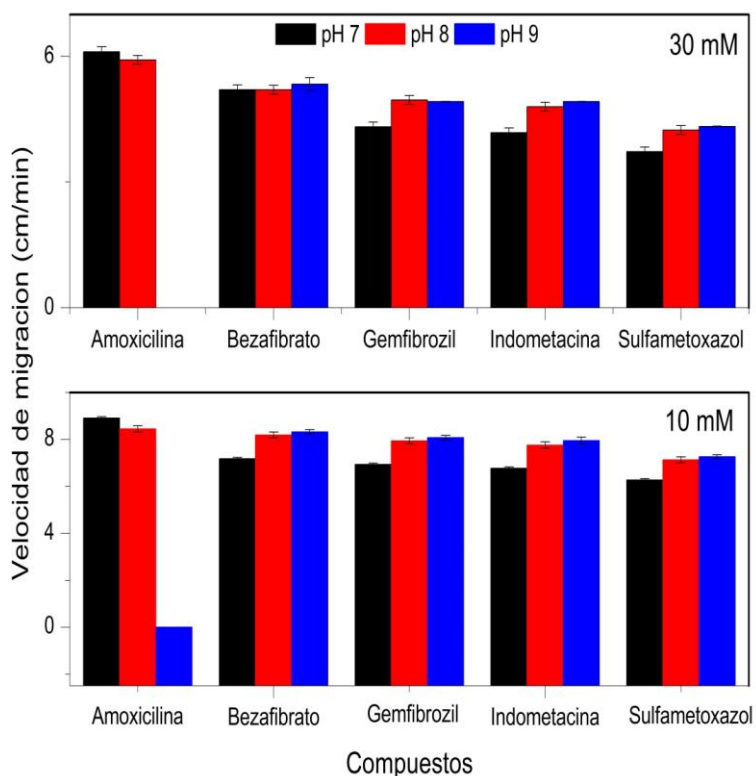


Figura 13. Efecto de la concentración del buffer de fosfatos sobre la velocidad de migración de ABGIS a los diferentes valores de pH 7, 8 y 9.

Comparación del porcentaje de respuesta y resolución entre cada fármaco.

Hasta este punto, las condiciones favorables para la cuantificación, se presenta en soluciones amortiguadoras de concentraciones 10 y 30 mM y pH de 7 y 8. Para definir una sola condición de pH y concentración, se consideró además, la resolución que hay entre cada pico para realizar una buena separación de los fármacos, así como el área bajo la curva en porcentaje. En la tabla 10 se muestran las concentraciones de amortiguador a las cuales se trabajaron y los diferentes valores de pH para la selección de operación del método de electroforesis capilar de zona, de cada fármaco, en la última columna de la tabla se señaló las condiciones que presentaron tanto mayor % en área como mayor magnitud en la resolución.

Para calcular el % de respuesta, se consideraron como 100 %, las áreas bajo las curvas de cada concentración de buffer de fosfatos 50 mM, a los diferentes valores de pH utilizados, debido a que en estas condiciones se obtuvieron menores valores bajo la curva. Por ejemplo, para calcular el porcentaje de respuesta del área bajo la curva de amoxicilina obtenido en la condición de buffer de fosfato 10 mM a pH 7, se consideró el área de amoxicilina obtenida en buffer fosfatos 50 mM al mismo pH como 100%, entonces se calculó el porcentaje de respuesta obtenido con amoxicilina con buffer de fosfatos 10 mM, mediante una regla de tres:

Promedio del área bajo la curva del electroferograma obtenido en buffer

50mM (pH 7) ----> 47324.33 -----100%

10 mM (pH7) ---->34612.00----- X= 73.13%

Para el cálculo de la resolución entre cada pico se consideró la siguiente ecuación:

$$Rs = 1.177 \times \left[\frac{T_{m2} - T_{m1}}{W_1 + W_2} \right]$$

En donde:

T_{m1}, T_{m2} = tiempo de migración de pico a pico adyacentes (min)

W_1, W_2 = ancho de cada pico (min)

Por ejemplo, para el cálculo de la resolución obtenida entre los picos contiguos de

amoxicilina y bezafibrato, se obtuvo que el tiempo de migración para la amoxicilina fue de 6.96 min (T_{m1}) y un ancho de pico de 0.1538 min (W_1), mientras que para el bezafibrato el tiempo de migración fue de 6.96 min (T_{m2}) y 0.15 de ancho min (W_2).

$$R_s = 1.177 \times \left[\frac{6.96 - 5.615}{0.19581 + 0.1538} \right] = 4.5358$$

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos para los % de respuesta y resolución de cada uno de los fármacos que se utilizaron en la prueba. La concentración de 30 mM de buffers de fosfatos y pH 7 fue la condición que presentó tanto mayor % de respuesta como mejor resolución en todos los fármacos.

Finalmente, para evaluar el límite de detección del equipo para fármacos presentes en agua residual, se varió el tiempo de inyección de una muestra de agua residual sintética con una concentración de 40 ng L⁻¹ de cada fármaco (para esto fue necesario adicionar 9 µL de la solución madre a un litro de ARS), previa purificación por extracción en fase sólida utilizando cartucho C₁₈. En la Figura 14 se muestran los electroferogramas obtenidos para 15 s de inyección, en este tiempo fue donde se detectaron los fármacos a la concentración antes mencionada, para corroborar que los picos señalados son los fármacos, se realizó el mismo procedimiento de purificación en fase sólida pero con una concentración al doble de fármacos (Spiking). El único fármaco que no tuvo una respuesta clara fue el sulfametoxazol, además la amoxicilina se perdió en el proceso de extracción en fase sólida, sugiriendo su carácter polar.

Tabla 10. Porcentaje de respuestas y resolución de los picos, calculados a partir de las áreas bajo la curva, tiempos de migración y ancho de los picos obtenidos de los electroferogramas

Implementación del método para cuantificación de fármacos presentes en agua residual por el método analítico instrumental de electroforesis capilar

Compuesto	Concentración	pH	% Respuesta	Resolución	Combinación con mayor % respuesta y resolución
Amoxicilina	10	7	73.13	4.53	
		8	48.11	0.32	
		9	0	0	
	30	7	104.03	6.65	√
		8	72.01	2.91	
		9	0	0	
	50	7	100	7.14	
		8	100	1.78	
		9	0		
Bezafibrato	10	7	804.55	0.77	
		8	522.82	0.88	
		9	589.60	0.71	
	30	7	964.1	1.32	√
		8	734.38	1.02	
		9	88.22	0.86	
	50	7	100	1.57	√
		8	100	1.65	
		9	100	1.43	
Gemfibrozil	10	7	70.38	0.59	
		8	47.17	0.36	
		9	40.83	0.47	
	30	7	119.67	0.63	√
		8	79.28	0.62	
		9	85.82	0.60	
	50	7	100	1.03	√
		8	100	1.10	√
		9	100	0.78	
Indometacina	10	7	861.57	1.11	
		8	511.62	0.76	
		9	656.78	1.12	
	30	7	980.01	1.83	√
		8	714.75	3.03	√
		9	112.34	2.58	√
	50	7	100	3.24	
		8	100	3.58	
		9	100	3.39	
Sulfametoxazol	10	7	704.52	N.A.	
		8	463.18	N.A.	
		9	510.23	N.A.	
	30	7	953.25	N.A.	√
		8	568.60	N.A.	
		9	81.00	N.A.	
	50	7	100	N.A.	
		8	100	N.A.	
		9	100	N.A.	

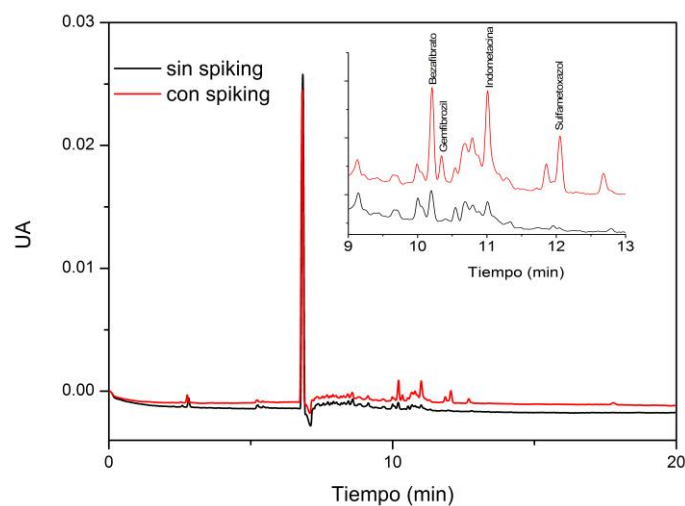


Figura 14. Electroferogramas de los fármacos bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol (BGIS) [40 ng L⁻¹ de cada uno] en agua residual sintética extraídos por fase sólida C₁₈. Los electroferogramas se obtuvieron con el método optimizado: buffer de fosfatos a una concentración de 30 mM y un tiempo de inyección de 15 segundos.

Para realizar una curva de calibración de los fármacos, fue necesario preparar diferentes concentraciones (0, 40, 80, 120, 160 y 200 µg L⁻¹) de los fármacos en agua residual sintética y seguir el procedimiento de purificación y concentración de la muestra conforme al método anteriormente descrito (U.S. Environmental Protection Agency, 2007). Las curvas de calibración para obtener la concentración de los fármacos a partir de las áreas siempre dieron un coeficiente de correlación r^2 de 0.99. La reproducibilidad de las mediciones, se obtuvo coeficientes de variación menores a 5% para todos los fármacos. En la figura 15 se muestra la curva de calibración de los fármacos y en la tabla 11 se muestra los parámetros de linealidad y precisión.

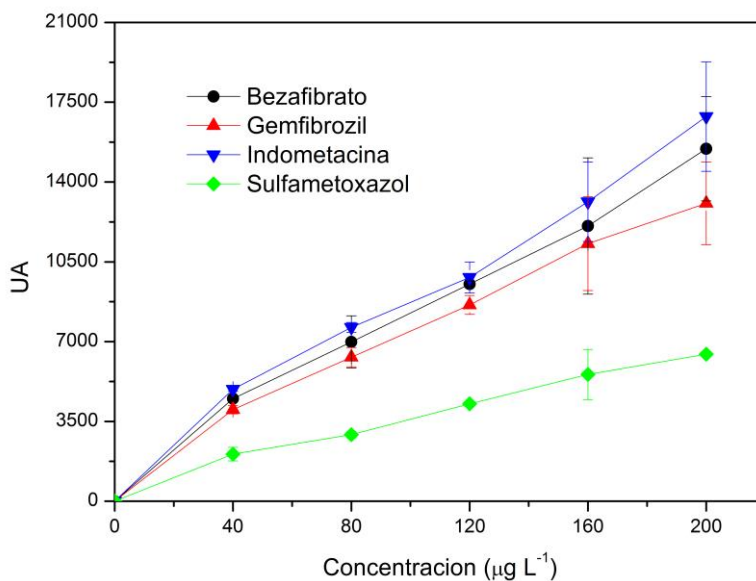


Figura 15. Curva de calibración de los fármacos bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol presente en el agua residual sintética, purificados y concentrados previamente en columna C₁₈ por el método EPA 1964.

Tabla 11. Linealidad de las curvas de calibración de los fármacos obtenidos a partir del método EPA 1964 y precisión de las respuestas obtenidas a partir de experimentos realizados por triplicado

Fármaco	Ecuación	R ²	Precisión (%)
Bezafibrato	Y=73.258x + 764.67	0.98	11.70
Gemfibrozil	Y= 63.904x + 828.02	0.98	9.59
Indometacina	Y=79.443x + 782.05	0.98	7.81
Sulfametoxazol	Y=31.479x +395.9	0.98	8.07

Conclusión

Es factible utilizar el agua residual sintética elaborada conforme a la norma ASTM (1998) para el estudio de degradación de fármacos en bajas concentraciones, debido a que se pudo purificar y concentrar los fármacos del ARS mediante el método de extracción en fase sólida descrito por la EPA. Se cuantificaron los fármacos óptimamente a pH de 7 de la solución de buffer de fosfatos con una concentración de 30 mM. Con esta condición se detectó hasta 40 ng L⁻¹ de los fármacos bezafibrato, gemfibrozil e indometacina con una inyección de 15 segundos a una presión de 0.5 psi. Las condiciones de operación del equipo fueron 18 kV de voltaje de separación, columna capilar de sílica fundida de 75 µm de diámetro interno con una longitud de 60 cm. La amoxicilina se pierde en el proceso de extracción.

CAPÍTULO V.

EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LOS FÁRMACOS POR SISTEMA COMBINADO DE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO-LODOS ACTIVADOS Y EFECTO DEL PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO SOBRE LODOS ACTIVADOS

Una vez optimizado el método de cuantificación de fármacos por electroforesis capilar de zona, se estudió la degradación de los fármacos BGIS por enzimas oxidasas y peroxidasas mediante dos estrategias. En la primera se evaluó un sistema combinado enzimático- lodos activados, utilizando agua residual sintética como se describe en la norma de referencia ASTM International (1998), con una concentración de fármacos BGIS de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ y un producto comercial con actividad de la enzima lacasa (Biolite®), el cual ha sido previamente utilizado en la degradación del colorante azul ácido 74 (Méndez Hernández, 2014). Para complementar el estudio de la degradación de los fármacos por enzimas oxidasas y peroxidasas, en el presente trabajo se utilizaron tres hongos diferentes en medio Sivakumar *et al.* (2010) modificado: *Trametes maxima*, *Pleurotus sp* y *Pycnoporus sanguineus*.

El objetivo del sistema combinado enzimático-lodos activados fue evaluar el efecto del pretratamiento enzimático sobre la degradación de materia orgánica y fármacos BGIS por los lodos activados, además de evaluar el efecto del pre-tratamiento sobre la diversidad microbiana de los lodos activados. Para lograr este objetivo se planteó la siguiente estrategia:

- Selección de la concentración de enzima comercial mediante la cuantificación de la actividad enzimática para la transformación de fármacos como bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol presentes en agua residual sintética.
- Determinación de la remoción de fármacos presentes en el agua residual sintética utilizando el producto comercial Biolite®.
- Evaluación del efecto de los fármacos y del pre-tratamiento enzimático sobre el desempeño de lodos activados aeróbicos, y finalmente
- Evaluación del efecto de los fármacos y de pre-tratamiento enzimático sobre la diversidad microbiana de los lodos activados mediante la electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE) y la secuenciación de la región variable V6-V8 del gen 16S ribosomal

Metodología para la evaluación de la degradación de fármacos por un sistema combinado enzimático-lodos activados

El agua residual sintética y solución madre de fármacos se prepararon como se describió en

el capítulo anterior, sólo modificando el contenido de harina, no se modificó la cantidad de cerveza por lo que la carga orgánica en este experimento resultó ser alta (4,000 mg/L DQO) como lo especifica la norma; sin embargo, la DQO generalmente reportada en aguas residuales se encuentra en el intervalo de 400 a 800 mg DQOs L⁻¹. En esta parte del trabajo se utilizó el agua residual sintética con alto contenido de DQO de acuerdo a la norma y la discusión de resultados se hace considerando esta diferencia. Los BGIS utilizados, se obtuvieron de fármacos comerciales, bezafibrato de Psicofarma, gemfibrozil de Rayere, sulfametoxazol de Best México e indometacina de Silanes México. Aunque por electroforesis capilar se pudo cuantificar concentraciones de los fármacos en el orden de ng L⁻¹, la concentración elegida de trabajo fue de 200 µg L⁻¹ para poder evaluar la degradación de los fármacos, debido que a bajas concentraciones, la evaluación de la cinética de la degradación resulta más compleja en ARS.

Para evaluar las actividades enzimáticas a las diferentes concentraciones del producto comercial Biolite® (100, 300 y 500 mg L⁻¹) en agua residual sintética con fármacos (200 µg L⁻¹), se preparó una mezcla con: 100 µL de 0.5 mM ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sinfónico)] como sustrato, 800 µL a pH 4.5 de 100 mM buffer de acetatos y 100 µL de solución a las diferentes concentraciones del producto comercial Biolite®. La actividad se obtuvo en un periodo de 5 min utilizando un equipo Lambda 3^a UV/VIS a 420nm ($\epsilon=3.6 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Una unidad de actividad fue definida como 1 µmol de ABTS oxidado por minuto por mg de proteína bajo las condiciones del ensayo enzimático (Chan-Cupul *et al.* 2014).

Obtenida las actividades, se procedió a cuantificar la remoción de fármacos presentes en el ARS a las diferentes concentraciones de la enzima comercial, se dejó reaccionar por una hora para cuantificar la degradación de los fármacos. La purificación de estos compuestos se realizó mediante el método EPA 1694 (U.S. Environmental Protection Agency, 2007) y la cuantificación se realizó utilizando la técnica de electroforesis capilar de zona, ambas descritas en el capítulo anterior.

Para la evaluación de la degradación de los fármacos por el sistema combinado enzimático- lodos activados, el inóculo se obtuvo del tanque de aeración del reactor biológico de la PTAR

ubicada en el Rosario en la Ciudad de México. Se operaron 3 reactores aeróbicos simultáneamente de lodos activados sin recirculación de éstos, con una capacidad de 2 L; a cada reactor se le adicionaron 205 mL de lodos activados y 2 L de agua residual sintética. Se alimentó a cada uno de los reactores con 3.84 L agua residual sintética por día, a una razón de (Q_L) de 2.66 mL min^{-1} con una bomba peristáltica (Masterflex L/5) para tener un tiempo de residencia celular (θ_c) de 12 horas, la aireación se mantuvo en 2 L min^{-1} (Figura 16). En la tabla 12 se describen las condiciones de alimentación de los reactores y el objetivo que persigue cada uno de ellos en el estudio de la degradación de fármacos por el sistema combinado enzimático-lodos activados.

Tabla 12. Condiciones de alimentación de los reactores de lodos activados para evaluar efecto del pre-tratamiento enzimático sobre la degradación de los fármacos

Reactor No.	Condición Experimental	Objetivo de estudio
1	Agua residual sintética	Evaluar el desempeño de los lodos activados sin fármacos y servir como blanco en el estudio.
2	Agua residual sintética + $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de fármacos (BGIS)	Evaluar los efecto de los fármacos sobre el desempeño del reactor de lodos activados y la población microbiana del lodo activado
3	Agua Residual Sintética + $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de fármacos, tratado previamente durante una hora con 300 mg L^{-1} de concentración de enzima comercial lacasa marca Biolite®	Evaluar la disminución del efecto de los fármacos sobre el desempeño del reactor de lodos activados; así como, la diversidad microbiana debido a la acción previa de la enzima lacasa

Durante un periodo de 161 días se evaluaron el desempeño de los reactores en continuo de lodos activados aerobios, a través de la medición de los parámetros de DQOs, SSVLM y relación F: M. La determinación de la DQOs y SSVLM se midieron conforme a los métodos descritos en APHA methods (APHA, 1998), para la determinación de la DQO se utilizó un espectrofotómetro marca Hach modelo DR 5000 y un termorreactor marca ThermoScientific modelo Orion COD165 (Anexo 1).

La relación F: M describe la proporción comida (food)- microorganismos (microorganisms), es un parámetro relacionado con el metabolismo celular y se determina mediante la siguiente expresión:

$$\frac{F}{M} = \frac{(DQO_{s_o} - DQO_{s_f})}{SSVLM\theta_c}$$

En donde

F/M = relación comida/microorganismos, mg DQOs mg SSVLM⁻¹ h⁻¹

DQO_{s_o} = Demanda química soluble en el influente del reactor, mg L⁻¹

DQO_{s_f} =Demanda química soluble en el efluente del reactor, mg L⁻¹

$SSVLM$ =Sólidos suspendidos volátiles en el licor mezclado, mg L⁻¹

θ_c =Tiempo de retención celular, h

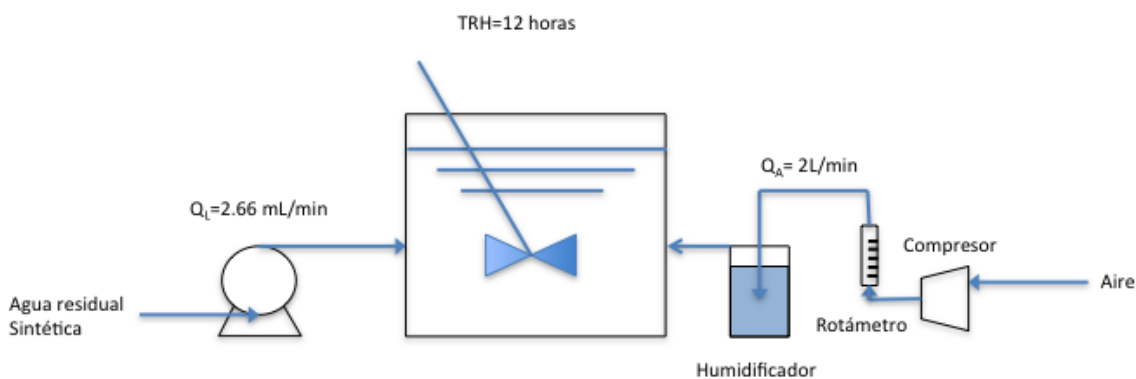


Figura 16. Diagrama del sistema utilizado para la operación del reactor de lodos activados. Las condiciones de operación se muestran en la figura.

Evaluación del efecto del pre-tratamiento enzimático sobre las comunidades bacterianas de los lodos activados

Finalmente, la evaluación del efecto del pre-tratamiento enzimático y la presencia de fármacos sobre la estructura de las comunidades microbianas de los lodos activados, se realizó mediante el análisis de huella metagenómica por DGGE, de amplicones de las regiones variables V6-V8 del gen 16SrRNA, seguido de agrupamiento por UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) de los perfiles generados, y secuenciación de las bandas seleccionadas. Primero se extrajo DNA metagenómico utilizando el kit de extracción de DNA WIZARD de la marca Promega (la metodología detallada se describe en el anexo 2), posteriormente se realizó la reamplificación por PCR del gen 16S rRNA en su región variable V6- V8, después con la técnica de DGGE con un gradiente desnaturante de 36-54%, se obtuvieron los patrones electroforéticos que representan a los distintos integrantes de cada consorcio microbiano. Estos patrones de

bandas se analizaron para obtener el comparativo de las poblaciones microbianas de los lodos activados de los reactores R1, R2 y R3. Finalmente, se realizaron cortes de las bandas representativas de cada tratamiento de los lodos activados, en diferentes tiempos de operación, se reamplificaron, se purificaron y se obtuvieron las secuencias correspondientes a la regiones V6-V8 del gen 16S rRNA. Las secuencias obtenidas se editaron manualmente utilizando los programas BioEdit[®] y Seaview, posteriormente se compararon utilizando Blast (Altschul *et al.* 1990), con las reportadas en la base de datos GenBank, del National Center for Biotechnology Information, para identificar secuencias similares. Después se llevó a cabo la reconstrucción filogenética mediante el método de Neighbor-joining implementado en el programa MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013).

Resultado del sistema enzima-lodos activados

La enzima lacasa que se considera en esta etapa para la evaluación de la degradación de los fármacos, se encuentra contenida en una formulación comercial de la marca Biolite, suministrada por la empresa Biotecsa, S.A. de C.V. En la primera etapa, se determinó la actividad enzimática utilizando ABTS a diferentes concentraciones del producto comercial, (100, 300 y 500 mg L⁻¹), en ARS con una concentración de fármacos ABGIS de 200 µg L⁻¹, dejando reaccionar la enzima con los fármacos durante una hora para evaluar si existe pérdida de la actividad de la enzima lacasa. En la figura 17 se muestra los resultados de actividad de las tres diferentes concentraciones ensayadas: 0.0018 U g⁻¹ para la concentración de 100 mg L⁻¹, 0.0252 U g⁻¹ para la concentración de 300 mg L⁻¹ y 0.022 U g⁻¹ para la concentración de 500 mg L⁻¹, todas las actividades resultaron bajas en comparación con otros estudios en donde degradan fármacos con lacasa (Auriol *et al.* 2008), esto podría indicar que el producto Biolite contiene una cantidad de lacasa mucho menor que la reportada por el proveedor. Aunque hubo un incremento en la actividad específica muy importante al utilizar una concentración del producto comercial de 300 mg L⁻¹ con respecto a obtenida 100 mg L⁻¹, con la concentración de 500 mg L⁻¹ la actividad específica disminuye ligeramente con respecto a la concentración de 300 mg L⁻¹, este comportamiento aparentemente anómalo, se discute más adelante.

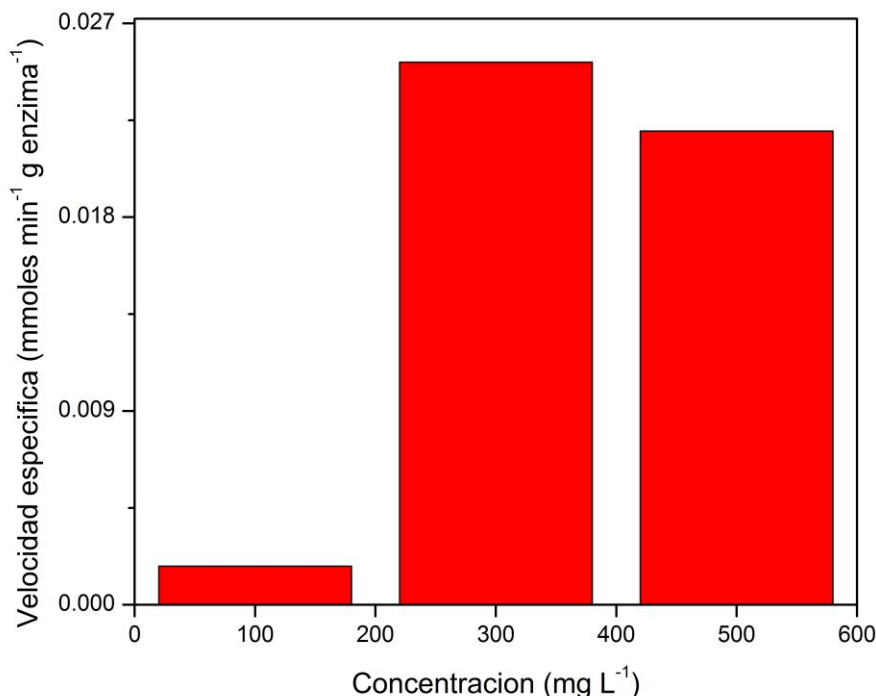


Figura 17. Actividad específica de enzima lacasa a diferentes concentraciones del producto comercial Biolite® en ARS, utilizando ABTS como sustrato.

Para evaluar la degradación de fármacos en ARS, la mezcla se dejó reaccionar con la enzima durante una hora, de acuerdo a lo reportado previamente (Méndez Hernández, 2014). La cuantificación de los fármacos se realizó mediante la técnica analítica de electroforesis capilar. Durante este intervalo de tiempo no se observó remoción significativa de los fármacos BGIS, los porcentajes obtenidos de degradación con una concentración de 300 mg L⁻¹ de producto comercial durante una hora de reacción fueron 25 % de bezafibrato, seguido por sulfametoxazol con 4.92 %, gemfibrozil 1.5 % y por último la indometacina con 0.24 % (Figura 18). Se decidió ensayar con un tiempo de reacción de seis horas y con un mayor intervalo de concentraciones del producto comercial Biolite en ARS (10, 100, 500, 1000 y 5000 mg L⁻¹) para determinar si la degradación se incrementa con el tiempo de reacción. La figura 19 muestra que al aumentar la concentración del producto comercial, no se obtiene una modificación de los fármacos indicando que no existe una degradación significativa y además que no existe absorción de los fármacos por el producto comercial. También, se obtiene un incremento proporcional de un pico alrededor de los 8 min, este incremento se

atribuye a la aportación de un compuesto proveniente del producto comercial Biolite®.

Sin embargo, existen varios trabajos, donde la enzima lacasa tiene actividad sobre diversos fármacos (Marco-Urrea *et al.*, 2009; Auriol, *et al.*; 2008 Zhang & Geißen, 2010). ¿A qué se debe que con este producto comercial no se tiene degradación importante?

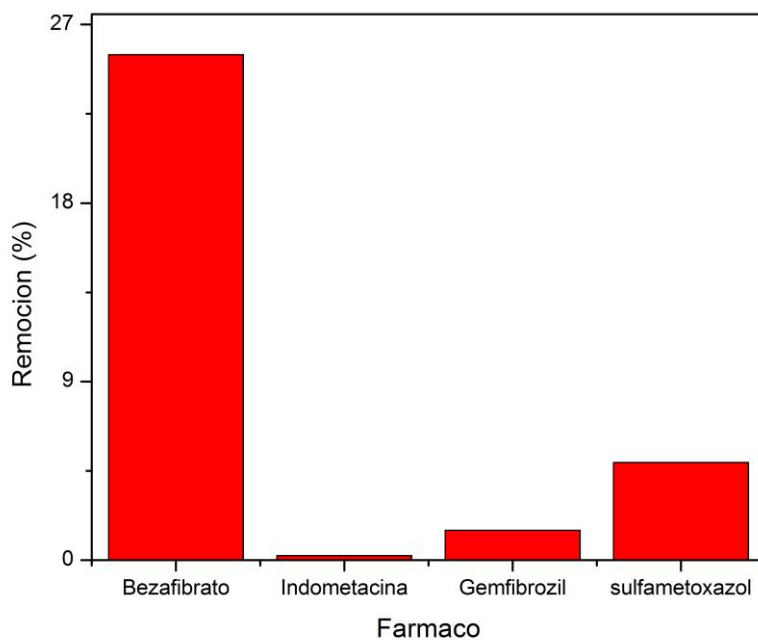


Figura 18. Degradación de fármacos después de 1 hora de reacción de la mezcla conteniendo Biolite en ARS (300 mg/L) y 200 µg/L de fármacos.

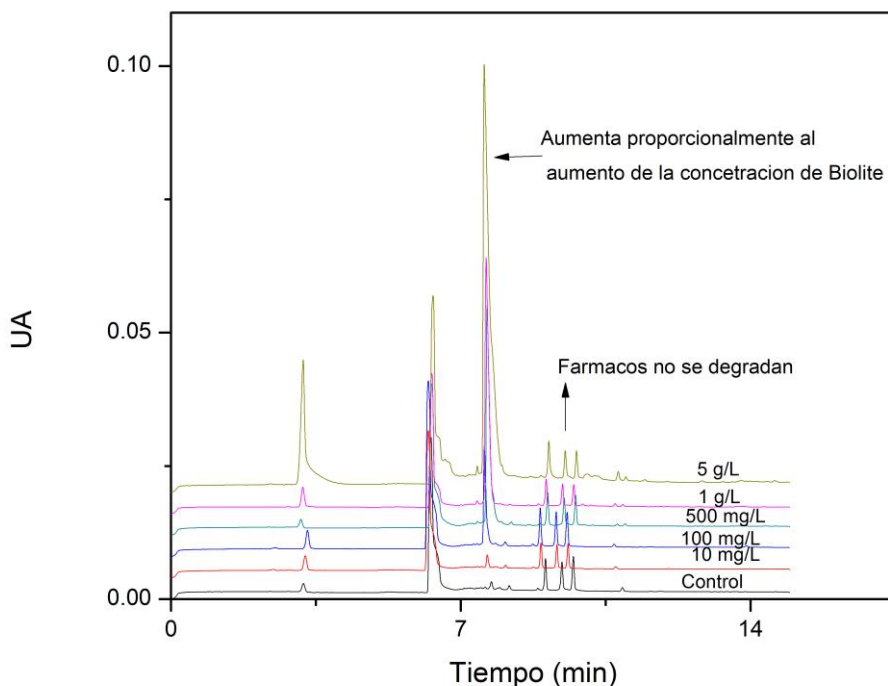


Figura 19. Electroferogramas de los fármacos en ARS con una concentración de $200 \mu\text{g L}^{-1}$, obtenidos después de 6 horas de exposición con el producto comercial Biolite a diferentes concentraciones indicadas en la figura

Se cuantificó la concentración de proteína mediante el reactivo de Bradford en una solución de 10 g L^{-1} Biolite®; para esta solución se cuantificó 2.3 mg L^{-1} , indicando que existe 0.23 mg de proteína por cada gramo de producto comercial Biolite. Adicionalmente, para corroborar la presencia de proteína, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %, en la figura 20 se muestra los resultados del gel de poliacrilamida. En las columnas B, D y F, se colocó la muestra de la solución de enzima del producto comercial Biolite y en las columnas A, C y E una muestra de un coctel de enzimas obtenida del laboratorio de bioquímica de macromoléculas de la UAM-Iztapalapa. Se ha reportado que el peso molecular de la enzima lacasa es alrededor de 65 kD , en este gel la proteína lacasa se encontraría cerca de la mitad (Figura 20 A, C, D); sin embargo, no se observa ninguna línea en los carriles B, D, E de la figura 20, verificando la baja concentración de esta enzima en el producto comercial y, por lo tanto, la baja actividad específica obtenida (Figura 17). Para lograr degradaciones de diversos fármacos, las actividades de enzima lacasa han sido mayores para degradar fármacos, por ejemplo Cabana *et al.* (2007) degradaron nonilfenol

completamente utilizando enzima lacasa con una actividad de 1 U L^{-1} , para bisfenol fue necesario 10 UL^{-1} y 100 U L^{-1} para tricolsan.

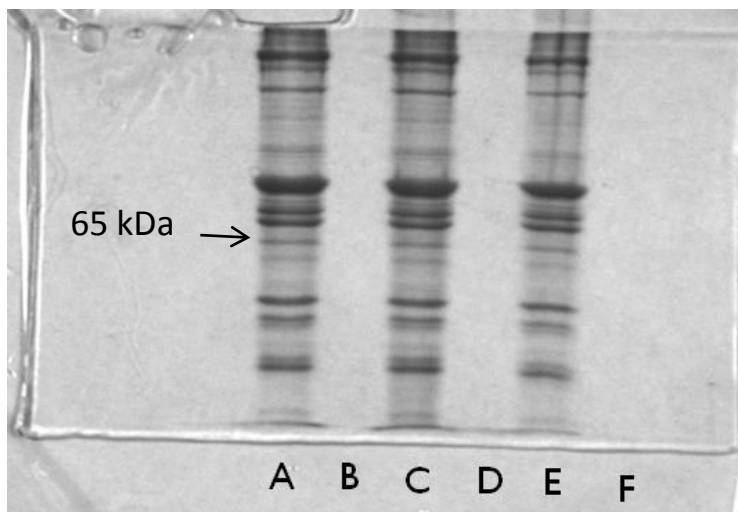


Figura 20. Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico al 12 %, carriles B, D y F corresponden al producto comercial Biolite con una masa de $92 \mu\text{g}$; carriles A, C y E corresponden a un coctel de enzimas obtenida del laboratorio de bioquímica de macromoléculas de la UAM-I. En la figura se identifican las bandas correspondientes a la enzima lacasa.

Hasta este momento parece ser que la magnitud de la actividad enzimática es relevante en la degradación de los fármacos. Aunque la actividad fue baja con el producto comercial Biolite®, ese producto permanece en el ARS durante la operación de los lodos activados y podría degradar los fármacos por tener mayor tiempo de reacción, por lo que se continuó con la experimentación planteada.

Para la evaluación de la degradación de los fármacos presentes en agua residual, los tres reactores operados fueron: R1 alimentado sólo con ARS preparada conforme a la norma; el segundo reactor R2 se alimentó con ARS con $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de BGIS, y el tercero R3 se alimentó con la mezcla de ARS con $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de BGIS, pre-tratada durante 1 hora con 300 mg L^{-1} de producto comercial Biolite. Para evaluar el desempeño de los reactores se cuantificó la DQOs, los SSVLM, y relación F:M. Las condiciones de operación de cada reactor se muestran en la tabla 13 en operación del reactor en régimen estacionario.

Tabla 13. Condiciones de operación de los reactores aerobios de lodos activados, con tiempo de residencia hidráulica de 12 h, y alimentación de aire de 2 L min⁻¹, pH 7.

No. Reactor	Alimentación	DQOs en el influente (mg L ⁻¹)	SSVLM (mg L ⁻¹)
R1	ARS	4,070.40 ±46.17	5,585.69±74.60
R2	ARS + BGIS	4,156.48±27.08	4,400.78±600.40
R3	ARS + BGIS tratado previamente con producto comercial Biolite®	4,314.35±49.24	5,125.71±92.16

En la figura 21, se muestra la degradación de la DQOs, de los tres reactores operados, el reactor R1 y R3 muestran un comportamiento similar, el R1 tiene alimentación de DQOs promedio en régimen estacionario de 4,070.40 ±46.17 mg L⁻¹, y una DQOs en el efluente de 1,063.41 ± 460 mg L⁻¹; el reactor R3 la alimentación promedio fue de 4,314.35 ±49.24 mg L⁻¹ y en el efluente la DQOs fue de 1,095.76±462.78 mg L⁻¹. Mientras que el reactor R2 que se alimentó con ARS y fármacos, tuvo una concentración promedio de 4,156.48±27.08mg L⁻¹ en el influente y en el efluente tuvo un comportamiento similar a R1 y R2 hasta el día 84 en donde la DQO alcanzó un valor de 1,1934 ±334.16 mg L⁻¹; después de este tiempo, el DQO en R2 comenzó a incrementar hasta llegar a un valor de 1,318.3 mg L⁻¹. Las eficiencias de remoción de cada reactor al final de la experimentación (161 días) fueron de 73.8, 68.28 y 74.60 % para los reactores R1, R3 y R2, respectivamente. El comportamiento del DQO en el reactor R2, sugiere la existencia de un efecto negativo de los BGIS sobre el desempeño del reactor, no obstante este fenómeno no se observó con el R3 que fue tratado previamente con la enzima comercial Biolite, recordando que en experimentación previa el producto comercial no presentó efecto sobre la remoción de los fármacos, esto puede ser debido a que el producto comercial también sea asimilado como fuente de carbono y energía por microorganismos de los lodos activados, contrarrestando el efecto negativo de los fármacos sobre los mismos; o bien dentro del producto comercial tenga aditivos que degraden los fármacos a una velocidad lenta, pero que no es proteína. O bien, que el producto comercial tenga lacasa en baja concentración, que degrade lentamente los fármacos.

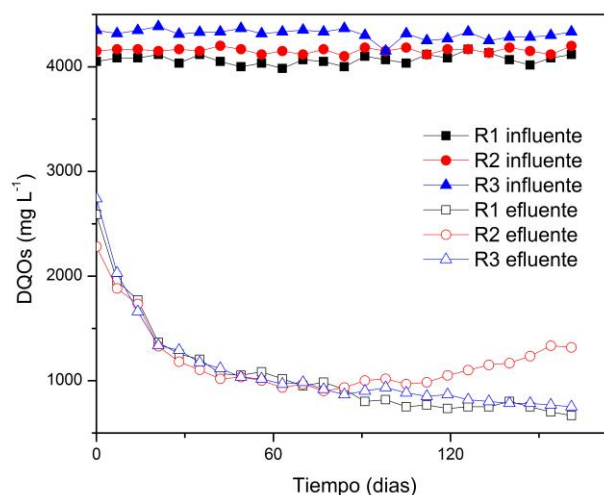


Figura 21. Evaluación de la remoción de DQOs por los reactores R1 (ARS), R2 (ARS+BGIS), R3 (ARS+ABGIS tratado previamente con enzima comercial Biolite®). Influente con figuras sólidas y efluentes con figuras sin fondo.

En la figura 22 se muestra el comportamiento de los lodos activados cuantificados como SSVLM. En todos los reactores, la etapa de estabilización duró alrededor de 25 días, teniendo como sustrato el agua residual sintética bajo las tres condiciones de operación. Posteriormente, todos los reactores presentaron la fase exponencial hasta llegar al día 37 en donde, el R1 y R3 se estabilizaron, mientras que el R2 presentó el máximo de SSVLM en el día 84 y posteriormente comenzó a disminuir. La producción de lodos fue diferente para cada reactor, el R1 en régimen estacionario fue $5,531.90 \pm 154.21 \text{ mg L}^{-1}$, y para el reactor R3 la producción de lodos fue de $5125.71 \pm 92 \text{ mg L}^{-1}$. Para el caso del reactor R2, la producción de lodos disminuyó a partir del día 84, coincidiendo con la disminución en la eficiencia de remoción de la DQOs (Figura 21); aunque al final del periodo se observó una estabilización, tanto en la remoción de DQOs como en la producción de lodos, es claro un efecto de los fármacos sobre el crecimiento microbiano y en la remoción de la materia orgánica. En trabajos como Joss *et al.* (2006), obtuvieron degradaciones de fármacos del 5 al 60% en sistemas convencionales de procesos biológicos, la diferencia es que el agua residual no tiene alta carga orgánica y la concentración de fármacos es muy baja, en el orden de ng L^{-1} ; diferente a la condición de operación llevada a cabo en el presente trabajo, en donde la concentración de fármacos es mayor y la carga orgánica igual, sugiriendo que $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de concentración de cada fármaco afecta la remoción de materia orgánica en un sistema aerobio.

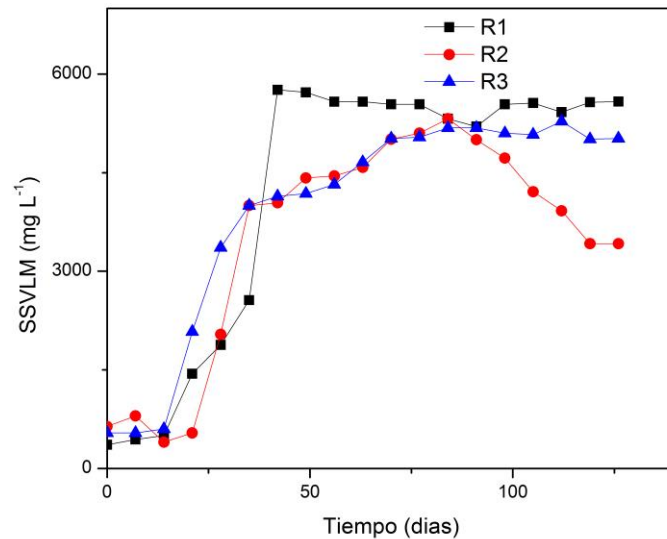


Figura 22. Producción de lodos activados como SSVLM (mg L^{-1}) durante la operación de los reactores R1 (ARS), R2 (ARS+BGIS), R3 (ARS+ABGIS tratado previamente con enzima comercial Biolite®)

El parámetro F: M, es una relación de consumo de materia orgánica como DQOs en determinado tiempo por una cantidad de microorganismos presentes, y está asociado directamente al metabolismo de los microorganismos. En los resultados obtenidos, se muestra un comportamiento similar en los reactores R1 y R3 durante todo el experimento (Figura 23), mientras que el reactor R2 que estuvo sólo en contacto con ARS + fármacos presentó al final de la operación, una ligera modificación del metabolismo hacia un proceso metabólico desasimilativo, desafortunadamente no hay reportes académicos con este enfoque, que permita hacer una comparación. Este efecto se presenta al final de la operación de los reactores, en donde ciertas especies microbianas podrán verse afectadas principalmente por la presencia del antibiótico sulfametoxazol, o bien la presencia de los reguladores de lípidos que podrían modificar el metabolismo por la interrupción en la formación de membranas (DugBank, 2016).

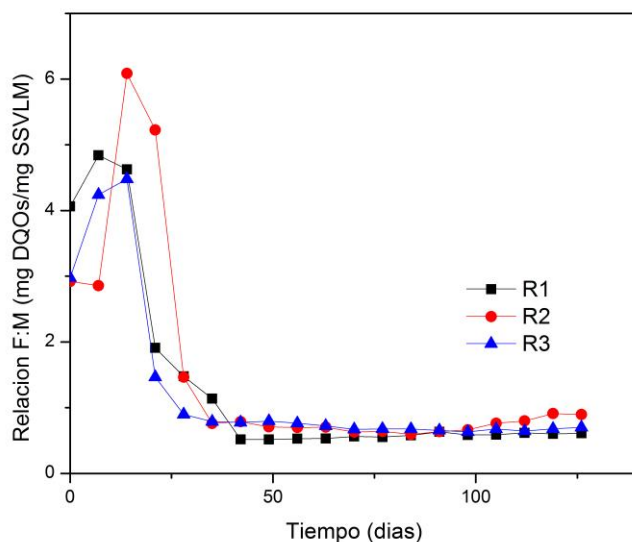


Figura 23. Relación F: M (alimento-microorganismos) obtenida durante la operación de los lodos activados aerobios R1, R2 y R3

En lo que se refiere a la remoción de estos mismos fármacos por los reactores de lodos activado, en el efluente del reactor R3 no se detectó ningún fármaco, mientras que en el reactor R2 sólo se presentó sulfametoxazol con una remoción del 42 %, lo que sugiere que la inhibición de la degradación de DQOs, puede ser debido a este compuesto. Las altas eficiencias de remoción de los fármacos, con respecto a lo reportado, podrían deberse a que no fue posible diferenciar los fármacos adsorbidos en la materia orgánica y los que se han degradado.

En cuanto a la evaluación de las comunidades microbiana en los reactores con presencia de fármacos BGIS y el pre-tratamiento utilizando el producto comercial Biolite®. Se evaluó la similitud entre las comunidades microbianas de los tres reactores, a diferentes tiempos de operación. Durante la operación se tomaron 3 o 4 muestras de lodos activados, los cuales se analizaron por la técnica de DGGE. Los periodos de operación de los reactores de lodos activados a los que se tomaron muestras fueron a los 121, 124, 127, 139 y 161 días. En la figura 24 se muestra los patrones obtenidos del PCR-DGGE. En el R1, las bandas 10,14, 17 y 21 se mantienen a través de tiempo, indicando que no se modifica la composición microbiana; mientras que para el reactor R2, sólo se mantiene la banda 14 y hay patrones de bandas que aparecen sólo para los lodos de este reactor (4, 5, 6, 7, 8 y 16); por otra parte,

tanto en el R2 como en R3, la banda 20 es común y las bandas 1 y 3 se encuentran claramente al final de la operación del reactor R3.

Es evidente que existe un cambio en los patrones de bandas con respecto al reactor blanco R1 como se muestra en la figura 25, indicando que tanto los fármacos como el pre-tratamiento enzimático modifican la estructura de la comunidad bacteriana de los lodos activados.

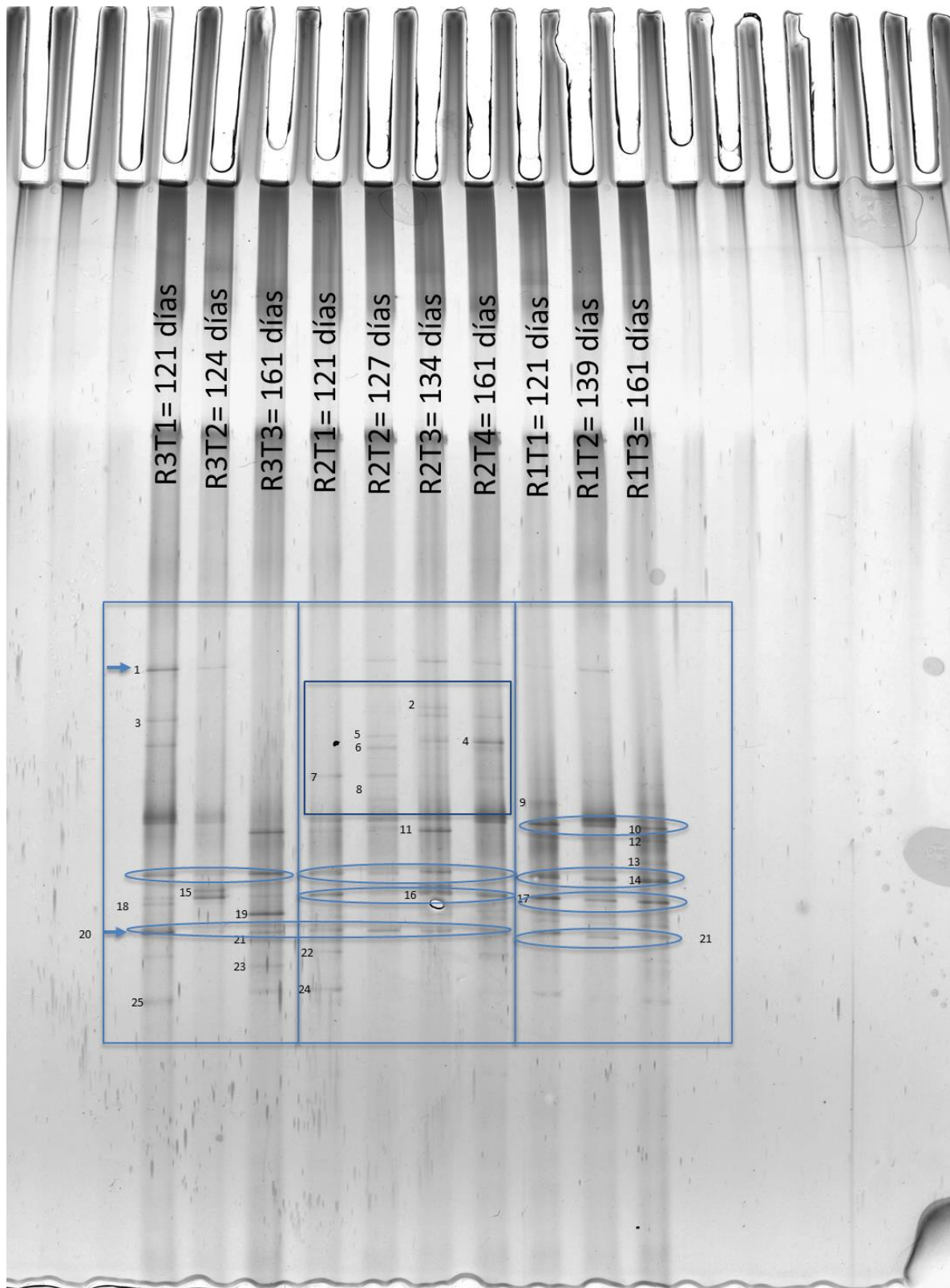


Figura 24. Perfiles de bandeo obtenidos en la PCR-DGGE del fragmento V6-V8 del 16S rRNA proveniente de los reactores R1 (ARS), R2 (ARS+BGIS) y R3 (ARS+BGIS tratado previamente con Biolite), a diferentes días de operación indicados en la figura.

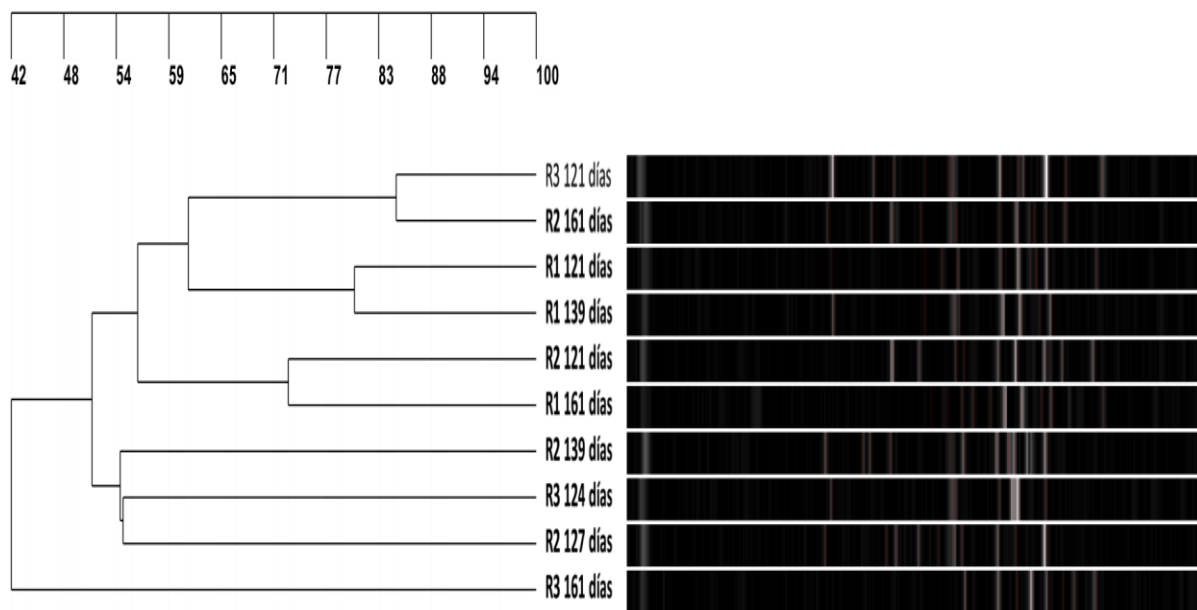


Figura 25. Patrones de PCR-DGGE (derecha) y dendrograma de similitud (izquierda) de los genes 16SrRNA en su región variable V6-V8 obtenidas por el método UPGMA, a partir de las muestras de los lodos activados presentes en los reactores R1 (ARS), R2 (ARS+BGIS) y R3 (ARS+BGIS tratado previamente con Biolite), a diferentes días de operación 121, 124, 127,139 y 161 días, indicados en la figura.

Finalmente, de la secuencias obtenidas por la amplificación del gen 16SrRNA en su región variable V6-V8 de los cortes de las bandas representativas de los reactores R1, R2 y R3, a diferentes tiempos de operación, y utilizando el software bioinformático MEGA6, se obtuvo el árbol filogenético (figura 26). A partir del árbol filogenético se obtuvo la relación filogenética de los organismos presentes en el lodo activado (Tabla 14). Prácticamente en el R1 predominan grupos bacterianos con similitud con Denitrifying bacterium y *Microbacterium* de los phyla β - Proteobacteria y Micrococcales respectivamente. En el reactor que fue alimentado sólo con fármacos (R2), adicionalmente se encontraron microorganismos relacionados a los géneros bacterianos: *Enterobacteriace*, *Camamonas* y *Leuconostoc*. En el reactor R3, se tuvieron microorganismos parecidos a *Acetobacter*, así como *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Los fármacos y el pre-tratamiento promovieron el crecimiento de microorganismos del phylum α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria y Bacilli; un posible grupo afectado por los fármacos es *Acetobacter* que se encontró en el R3 en la etapa del final de la operación y posiblemente el sulfametoxazol tenga efecto sobre esta especie.

Muter *et al.* (2017) encontraron que el phylum predominante en la presencia de 21 fármacos fue β -Proteobacteria, seguido de *Bacteroidetes* y Firmicutes; otros estudios muestran que los fármacos afectan a bacterias fijadoras de nitrógeno (Kraigher *et al.* 2008).

Tabla 14. Relación filogenética encontrada al realizar BLASTn de las secuencias obtenidas. Se muestran los porcentajes de cobertura y similitud obtenidos con la secuencia con mayor proximidad

No. Reactor	No. Banda	Organismo emparentado	Phylum	% Cobertura	% Similitud
R1	10	Denitrifying bacterium	β -Proteobacteria	89	80
	14	Denitrifying bacterium	β -Proteobacteria	90	78
	17	Denitrifying bacterium	β -Proteobacteria	91	81
	21	<i>Microbacterium</i> sp	Micrococcales	90	90
R2	4	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Bacilli	90	91
	5	Enterobacteriaceae bacterium	γ -Proteobacteria	91	78
	6	Enterobacteriaceae bacterium	γ -Proteobacteria	90	88
	7	<i>Microbacterium</i> sp	Micrococcales	89	80
	8	Enterobacteriaceae bacterium	γ -Proteobacteria	80	80
	14	Denitrifying bacterium	β -Proteobacteria	90	80
	15	<i>Camamonas</i>	β -Proteobacteria	91	81
R3	1	<i>Acetobacter aceti</i>	α -Proteobacteria	90	90
	3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Bacilli	89	88
	14	<i>Denitrifying bacterium</i>	β -Proteobacteria	88	78
	20	Acetobacter	α -Proteobacteria	80	80
	25	Acetobacter	α -Proteobacteria	91	81

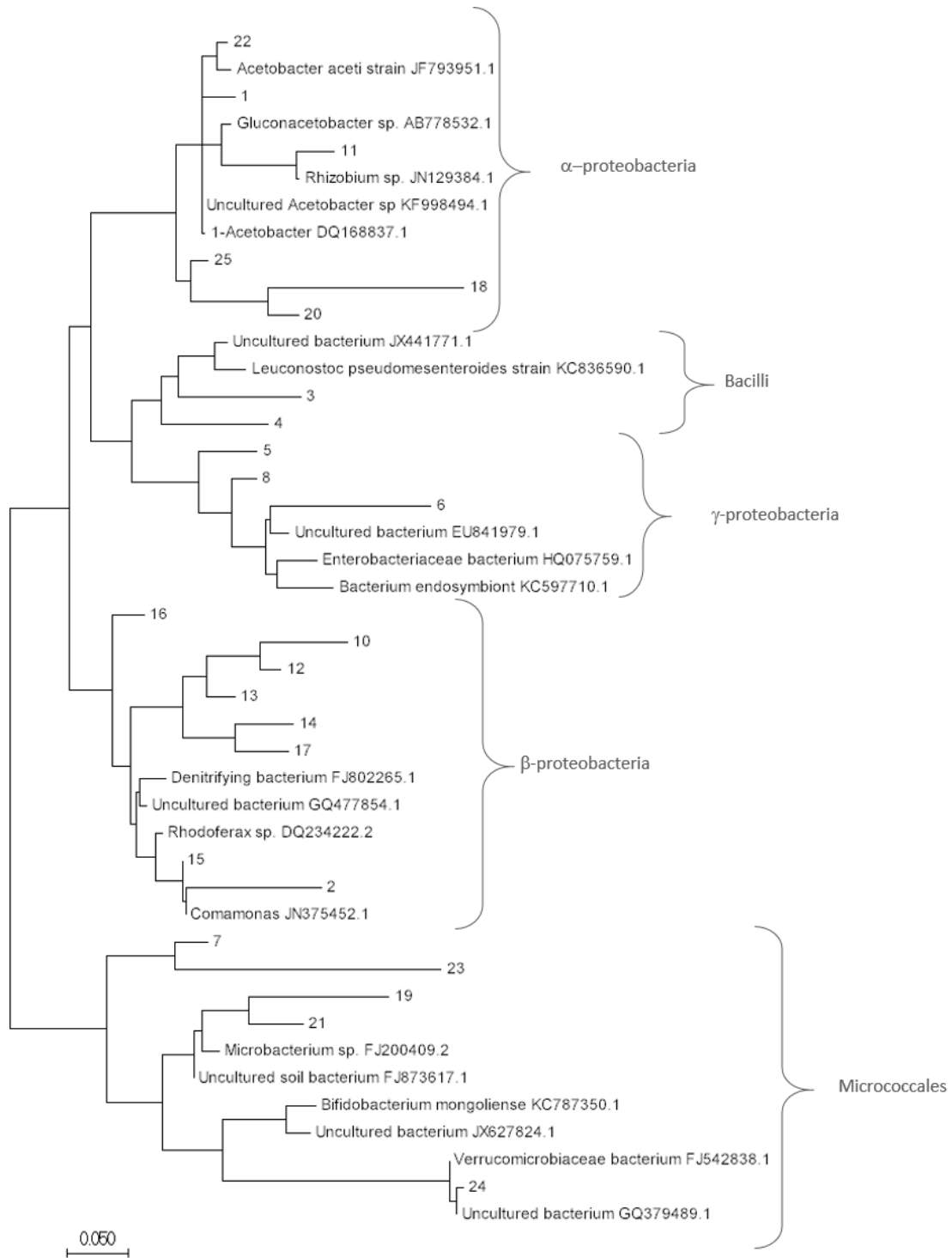


Figura 26. Reconstrucción filogenética de las secuencias del gen 16SrRNA de los reactores R1 (ARS), R2 (ARS+BGIS) y R3 (ARS+BGIS previamente tratados con el producto comercial Biolite)

Conclusiones de la evaluación de la degradación de fármacos por un sistema combinado enzimático-lodos activados y efecto del pre-tratamiento de lodos activados sobre los lodos activados

El pre-tratamiento enzimático no degradó significativamente los fármacos evaluados y tampoco modificó la concentración de la MOB. El producto comercial Biolite® contrarrestó el efecto negativo de los fármacos sobre el desempeño de los lodos activados en la remoción de la MOB, producción de lodos activados y en la degradación del fármaco sulfametoxazol, sugiriendo que es factible acoplar el proceso enzimático- lodos activados en la degradación simultánea de los fármacos y MOB. Además, la presencia de fármacos afecta significativamente la diversidad microbiana de los lodos activados al tener diferencias entre 55% y 48 % con respecto al reactor control, de los reactor R2 y R3 respectivamente, donde probablemente especies del género *Acetobacter* se vieron afectadas por los presencia de fármacos. La remoción de fármacos por el sistema de lodos activados resultó ser eficiente, excepto para el compuesto sulfametoxazol que sólo tuvo una eficiencia de remoción en el reactor R2, el cual puede ser principal agente que inhibe la actividad microbiana afectando el desempeño del reactor.

CAPÍTULO VI.

EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE FÁRMACOS POR ENZIMAS LIGNOLÍTICAS PRODUCIDAS POR HONGOS BASIDOMICETOS

Degradación de fármacos por enzimas peroxidasas producidas por los hongos

Trametes maxima, *Pleurotus sp.* y *Pycnoporus sanguineus*

Para complementar el estudio en la degradación de fármacos por enzimas oxidasas y peroxidasas, adicionalmente se evaluó la capacidad de las enzimas manganeso peroxidasas y lacasas producida por los hongos *Trametes máxima*, *Pleurotos sp* y *Pycnoporus sanguineus* en la degradación de bezafibrato, gemfibrozil, indometacina, sulfametoxazol y se agregó el fármaco diclofenaco, además se evaluó la correlación entre las actividades enzimáticas y la remoción de los fármacos.

Metodología para la evaluación de la degradación de fármacos por enzimas peroxidasas

Los hongos macroscópicos: *Trametes maxima*, *Pleurotus sp.* y *Pycnoporus sanguineus* fueron colectados en estado de Veracruz -México e identificados previamente por Chan-Cupul *et al.* (2014). En matraces de 250 mL, conteniendo 125 mL de medio de cultivo líquido Sivakumar *et al.* (2010) modificado (Tabla 15), previamente esterilizado, se inocularon separadamente y por triplicado los hongos *Trametes maxima*, *Pleurotus sp.* y *Pycnoporus sanguineus*, se incubaron durante 9 días (25°C, 120 rpm). La inoculación se llevó a cabo adicionando cuatro discos de micelio agar (papa-dextrosa agar) del cultivo específico de cada hongo en los matraces correspondientes. Se elaboraron dos blancos con medio de cultivo líquido sin inoculación de hongos.

Tabla 15. Composición del medio de cultivo Sivakumar *et al.* (2010) modificado

Componente del medio de cultivo	Concentración (mg L ⁻¹)
D-glucosa (anhidro) granulado	20000
Extracto de levadura	2500
KH ₂ PO ₄	1000
(NH ₄) ₂ SO ₄	50
CaCl ₂	10
MgSO ₄	500
FeSO ₄	10
MnSO ₄	1
ZnSO ₄	1
CuSO ₄	2

Después de los nueve días de incubación, para retirar la biomasa, el medio de cultivo se filtró con membranas de fibra de vidrio con 0.22 μm de tamaño de poro, el filtrado contiene las enzimas producidas por los hongos. A 100 mL del filtrado se agregaron los fármacos bezafibrato, diclofenaco, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol para tener una concentración final de 2 mg L^{-1} de cada fármaco; se estableció un tiempo de reacción de 1h a una temperatura de 23-25°C. Para calcular la degradación se preparó un blanco con los fármacos en el medio de cultivo sin hongos.

Se realizó la purificación de los fármacos mediante extracción en fase sólida (fase reversa) con cartuchos C_{18} conforme al método EPA 1694 (U.S. Environmental Protection Agency, 2007). La técnica de electroforesis capilar de zona fue utilizada para la cuantificación de bezafibrato, diclofenaco, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol. Se utilizó un equipo de la marca Beckman Coulter modelo MDQ, con una columna de sílice fundida de 50 cm de longitud, con un diámetro interno de 75 μm , el electrolito soporte fue una solución buffer de fosfatos (30 mM a pH 8). Se inyectó la muestra durante 5 s a una presión de 0.5 psi. Para el análisis de la remoción de los fármacos, se consideró el área obtenida de los picos obtenidos en los electroferogramas para cada fármaco.

Las actividades enzimáticas fueron determinadas por triplicado a temperatura de 25-27°C y se midieron con espectrofotómetro marca HACH modelo DR5000. La actividad de la enzima lacasa se determinó mediante ensayos utilizando 0.5 mM de ABTS como sustrato (100 μL) a 420nm ($\epsilon=3.6 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) con buffer de acetatos 100 mM (800 μL – pH 4.5) y el extracto enzimático (100 μL) en una mezcla de reacción de 1 mL y 5 minutos de monitoreo. Una unidad de actividad de lacasa fue definida como 1 μmol de ABTS oxidado por minuto por mg de proteína bajo las condiciones del ensayo enzimático (Chan-Cupul *et al.* 2014). La actividad de MnP fue determinada a 610 nm ($\epsilon=4460 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), la mezcla de reacción contuvo: extracto enzimático (700 μL), rojo fenol 0.2% (50 μL), lactato de sodio 0.5 mM (50 μL), albúmina de huevo 0.1%, sulfato de manganeso (II) 2 mM (50 μL) y peróxido de hidrógeno 2 mM (50 μL). La reacción se llevó a cabo en buffer de succinato de sodio 20 mM a pH 4.5 (50 μL) durante 5 min y se detuvo adicionando 2N NaOH (50 μL). Una unidad de actividad de manganeso peroxidasa fue definida como 1 μmol de producto

formado por minuto por mg de proteína bajo las condiciones del ensayo enzimático (Chan-Cupul *et al.* 2014).

Resultados de degradación de fármacos con enzimas lignolíticas producidas por hongos basidiomicetos

Los hongos evaluados se dejaron crecer en medio Sivakumar modificado (2010) por un periodo de nueve días, después de este tiempo se midieron las actividades enzimáticas de lacasa y manganeso peroxidasa en el medio de cultivo previamente filtrado. En la figura 27 muestra que *Trametes máxima* presentó mayor actividad tanto para lacasa (1985.7 ± 67.4 UA mg^{-1} de proteína) como MnP (387.6 ± 67.4 UA mg^{-1} de proteína), seguido por *Pleurotus sp.* con mayor actividad de manganeso peroxidasa (55.9 ± 8.5 UA mg^{-1} de proteína) pero fue quien obtuvo menor actividad de lacasa (106.5 ± 20.8 UA mg^{-1} de proteína); mientras que *Pycnoporus sanguineus* obtuvo mayor actividad con lacasa con respecto a *Pleurotus sp.* (346.8 ± 16.8 UA mg^{-1} de proteína) pero esta especie generó la menor actividad de MnP (18 ± 1.3 UA mg^{-1} de proteína).

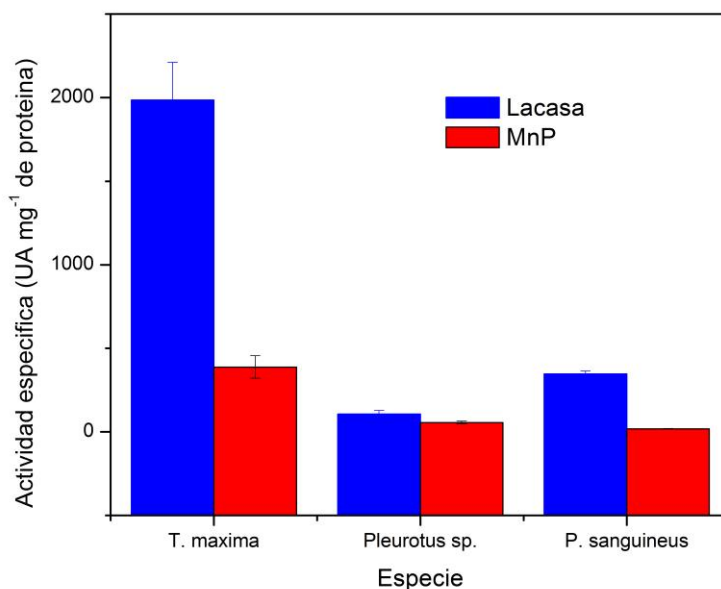


Figura 27. Actividades enzimáticas específicas de lacasa y MnP determinadas después de 9 días de cultivo de los hongos en medio Sivakumar modificado (2010).

En la figura 28 se muestra el promedio de las áreas obtenidas en los electroferogramas de los

fármacos, provenientes de extracto enzimático producido por el hongo *Pleurotus* sp. con respecto al tratamiento blanco (medio de cultivo adicionado con fármacos sin inóculo); de la misma manera, en la figura 29 se muestran los resultados con *Pycnoporus sanguineus* y en la figura 30 los resultados obtenidos utilizando el hongo *Trametes maxima*. A partir de las áreas obtenidas en los electroferogramas, se obtuvo la remoción (%) de los fármacos con respecto al blanco para cada extracto enzimático, correspondiente a cada especie de hongo (Tabla 16).

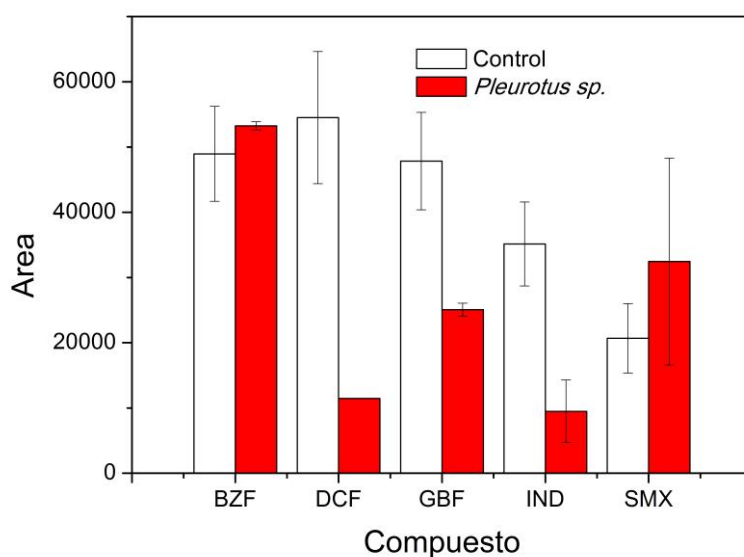


Figura 28. Áreas de los fármacos (BZF, bezafibrato; DCF, diclofenaco; GBF, gemfibrozil; IND, indometacina; SMX, sulfametoxazol), obtenidas para los tratamientos control (sin hongo) y con *Pleurotus* sp.

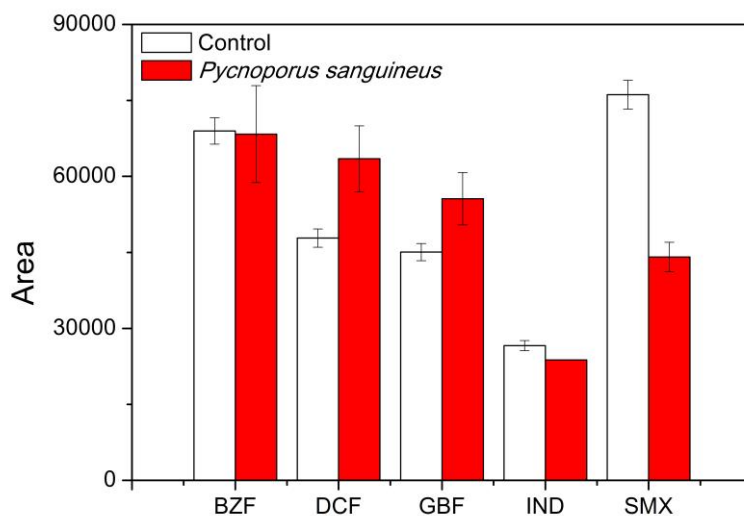


Figura 29. Áreas de los fármacos (BZF, bezafibrato; DCF, diclofenaco; GBF, gemfibrozil; IND, indometacina; SMX, sulfametoxazol) obtenidas para los tratamientos control (sin hongo) y *Pycnoporus sanguineus*

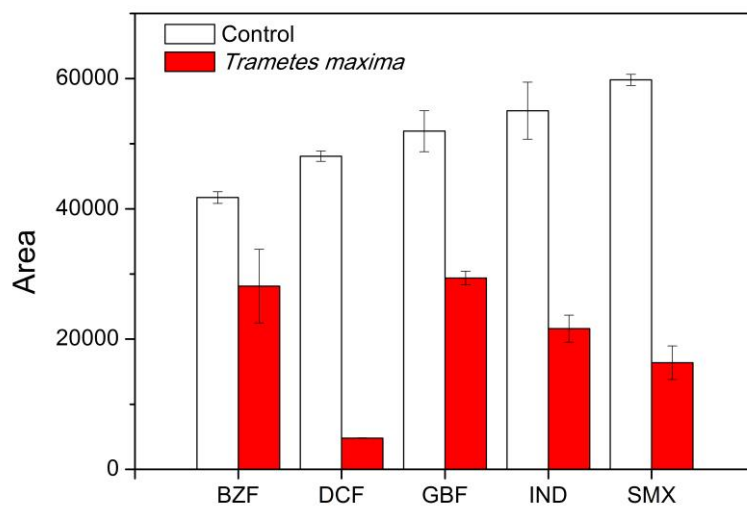


Figura 30. Áreas de fármacos (BZF, bezafibrato; DCF, diclofenaco; GBF, gemfibrozil; IND, indometacina; SMX, sulfametoxazol) obtenidas para los tratamientos control (sin hongo) y *Trametes máxima*

Tabla 16. Remoción de los fármacos por el extracto enzimático de cada hongo estudiado

	Remoción de fármacos (%)		
	<i>Pleurotus</i> sp.	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Trametes maxima</i>
Bezafibrato	0.00	0.00	32.59
Diclofenaco	89.47	0.00	90.20
Gemfibrozil	47.61	0.00	43.39
Indometacina	73.00	10.59	60.76
Sulfametoxazol	0.00	42.08	72.62

Trametes maxima presentó resultados sobresalientes en la remoción de todos los fármacos (las enzimas producidas con este hongo lograron degradar en más del 60% cuatro de los cinco fármacos utilizados); mientras que con *Pleurotus* sp. se obtuvieron remociones importantes en los fármacos diclofenaco, indometacina y gemfibrozil. En el caso de *Pycnoporus sanguineus* sólo se obtuvo remoción en los fármacos indometacina y sulfametoxazol. En estudios previos (Chan-Cupul *et al.* 2014) muestran que *Trametes maxima* tiene alta actividad enzimática. El género *Trametes* ha resultado ser importante productor de enzimas lignolíticas para degradar diferentes compuestos orgánicos, *Trametes versicolor* por ejemplo ha mostrado una alta capacidad en degradar diferentes fármacos, como naproxeno (Marco-Urrea *et al.* 2009).

Las actividades enzimáticas de manganeso peroxidasa reportadas en figura 27, muestran que *Trametes maxima* es un organismo capaz de producir el extracto enzimático con mayor actividad enzimática de MnP de los tres hongos (387.6 U/mg), seguido por *Pleurotus* sp. (55.9 U/mg) y después por *P. sanguineus* (18 U/mg); esto sugiere que la degradación de los fármacos es debido a MnP en lugar de lacasa, pues existe una correlación en la actividad de esta enzima y la degradación de los fármacos como se muestra en la figura 31, comportamiento que no pasa con la enzima lacasa. Se ha mostrado que la enzima MnP tiene baja especificidad sobre un sustrato en particular (Chan-Cupul *et al.* 2014), lo que probablemente favoreció la degradación de los fármacos. La enzima MnP cataliza la reacción entre Mn^{2+} y H_2O_2 para formar Mn (III), el cual oxida inespecíficamente los compuestos aromáticos, mediante el complejo Mn (III)- ácido orgánico, formado durante la oxidación de las moléculas orgánicas en el medio de cultivo, (Hofrichter, 2002; Mester y Tien, 2000), sugiriendo que éste tiene una mayor potencial de óxido reducción en comparación con el sitio activo de la lacasa.

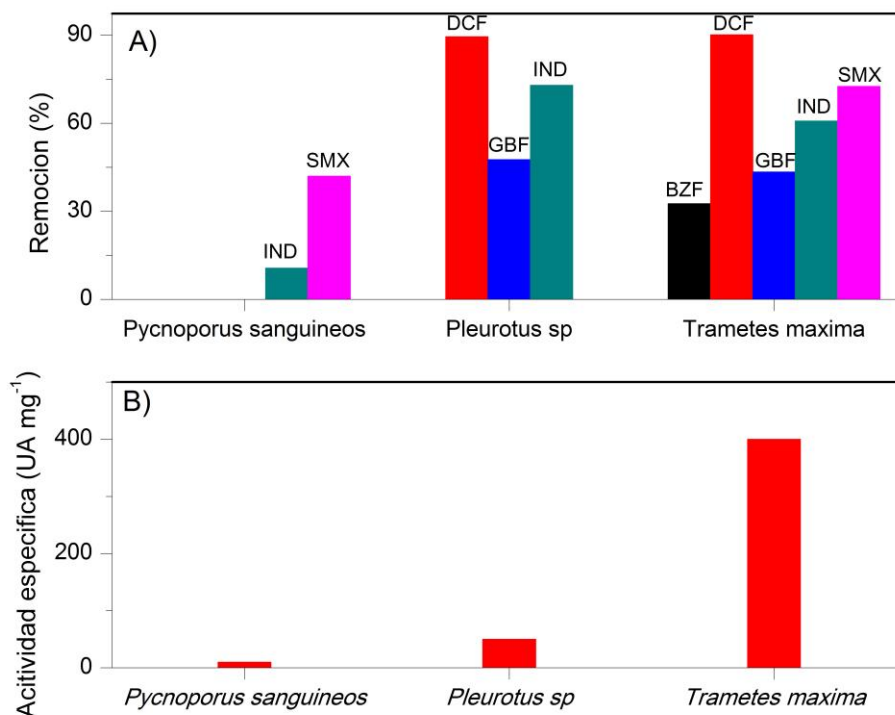


Figura 31. Relación entre el porcentaje de degradación de los fármacos (A): bezafibrato (BZF),diclofenaco (DCF),gemfibrozil (GBF),indometacina (IND), y sulfametoxazol (SMX) y la actividad enzimática específica de MnP (B)

La actividad de la enzima MnP se depende la producción de H₂O₂. *Trametes maxima* produce $7.7 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$, *Pleurotus sp*. $2.7 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ y *Pycnoporus sanguineus* $2.9 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ (figura 32). La mayor producción de este compuesto coincide con *Trametes maxima* que fue el hongo con mayor actividad enzimática de MnP y mayor % de remoción de los fármacos.

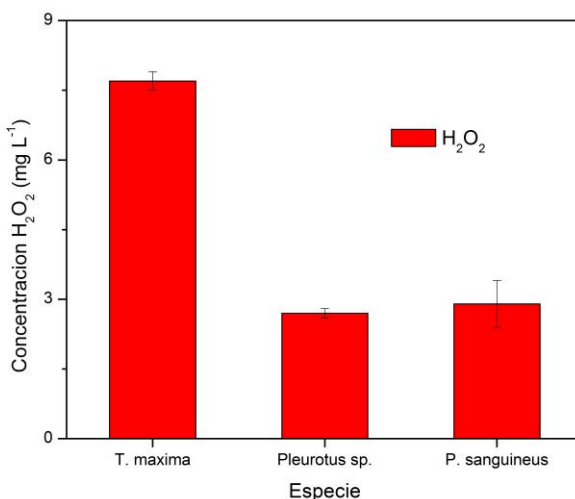


Figura 32. Producción de H₂O₂ por los hongos *Trametes máxima*, *Pleurotus* sp. y *Pycnoporus sanguineus* a los 9 días de cultivo

Para comprobar la hipótesis que la degradación fue debido a MnP, se diseñó un experimento para evaluar la degradación de los fármacos con la enzima lacasa, para realizarlo, se adquirió enzima lacasa purificada de la marca Sigma Aldrich con una actividad de 0.5 U mg⁻¹. El experimento se llevó a cabo con una cantidad de enzima lacasa comercial necesaria para tener una actividad enzimática igual a la obtenida por el hongo *Trametes máxima* (1112 U L⁻¹), por 24 horas. Se realizó por triplicado en medio Sivakumar modificado (2010) sin agregar glucosa ni extracto de levadura, de igual manera para calcular la degradación se realizó con respecto al blanco, el cual no contenía la enzima lacasa. De los cinco fármacos estudiados, sólo el diclofenaco mostró degradación por enzima lacasa en un periodo de 16 horas (figura 33). Este resultado refuerza la hipótesis de que la degradación de los fármacos estudiados es por la enzima MnP y no por lacasa. Algunos estudios previos han reportado degradación de diclofenaco por lacasa (Marco Urrea *et al.* 2010) y Lloret *et al.* (2013) encontraron que la enzima lacasa con una actividad de 20000 U L⁻¹ degrada este mismo compuesto con una eficiencia de remoción del 100% en cuatro horas; fármacos como carbamezapina, cafeína, bezafibrato, ifosfamida, ciclofosfamida, atenolol, trimetropina, oxoflacin muestran poca degradación (<40%) por lacasa producida por *Trametes hirsuta* (Haroune *et al.* 2014). De los pocos trabajos que han reportado la degradación de fármacos por MnP se encuentra el realizado Golan-Rozen *et al.* (2011), en donde se evaluó la degradación del fármaco carbamezapina junto con el citocromo P450, la degradación alcanzó un 98% de eficiencia

en un periodo de 8 días, con una concentración inicial del fármaco de 1 mg L⁻¹.

Adicionalmente, puede haber diferentes cofactores, inductores y mediadores redox que aumenten la capacidad de la degradación de los fármacos por enzimas lignolíticas; por ejemplo, Suda et al. (2012) degradaron completamente cuatro antibióticos al agregar el mediador redox 1-hidroxibenzotriazol al medio de cultivo. Estos inductores y mediadores, pueden producirse en un medio de cultivo como en el que se ensayó en el presente trabajo.

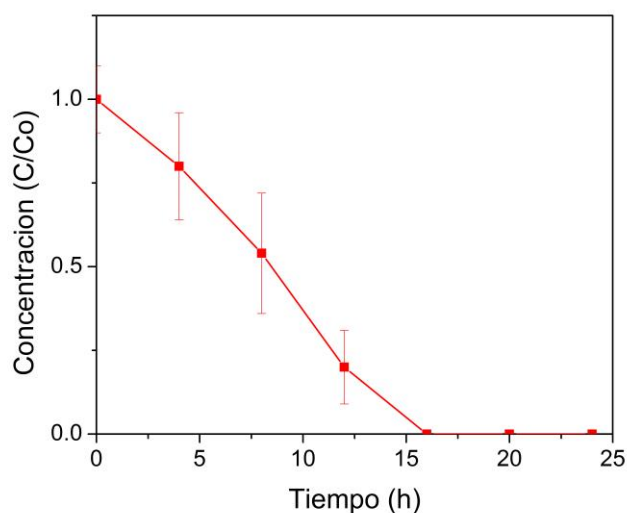


Figura 33. Degradación de diclofenaco (2mg L⁻¹) utilizando lacasa comercial con una actividad 1112 U L⁻¹ en medio de cultivo Sivakumar modificado (sin glucosa, ni extracto de levadura).

Conclusiones

Comúnmente se ha estudiado la degradación de compuestos orgánicos utilizando la enzima lacasa, mientras que hay pocos reportes que utilizan otras enzimas peroxidasas producidas por hongos basidiomicetos, ejemplo MnP. En este trabajo, se evaluó la degradación, por extractos enzimáticos producidos por tres hongos basidiomicetos *Trametes maxima*, *Pycnoporus sanguineus* y *Pleurotus* sp, de los fármacos que son persistentes en el tratamiento de aguas residuales y además muestran un efecto tóxico sobre especies bioindicadoras. Se encontró que el extracto enzimático *Trametes maxima* produjo una mayor degradación de bezafibrato, diclofenaco, gemfibrozil, indometacina, y sulfametoxazol. La remoción de los fármacos se atribuye a la enzima MnP. El bezafibrato y gemfibrozil, muestran mayor

recalcitrancia en la oxidación por enzimas lignolíticas. Además, en congruencia con otros trabajos realizados, se encontró que la enzima lacasa de los cinco fármacos estudiados sólo degrada el diclofenaco.

CAPÍTULO VII

DEGRADACIÓN DE FÁRMACOS MEDIANTE UN SISTEMA COMBINADO DE OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA Y BIOLÓGICO

Degradación de fármacos mediante un sistema combinado de oxidación electroquímica y biológico

En este capítulo se evaluó una oxidación electroquímica indirecta como tratamiento previo mediante el control del potencial aplicado, con los siguientes objetivos: oxidar los fármacos en agua residual sintética, sin oxidación significativamente la cantidad de materia orgánica presente y; controlar la producción de cloro, para por un lado no afectar el desempeño del proceso biológico aerobio de lodos activados en la degradación de la materia orgánica en un reactor en continuo y, por otro, producir la cantidad de cloro para evitar el bulking. Las condiciones experimentales utilizadas en el reactor electroquímico para la oxidación electroquímica con BDD fueron establecidas a través de pruebas de microelectrólisis. Los fármacos considerados en este estudio por ser comúnmente usados por los humanos, ser recalcitrantes en plantas de tratamiento de aguas residuales, además de tener efectos tóxicos sobre especies indicadoras, son los fármacos BGIS (Quinn *et al.* 2008; Raldúa *et al.* 2008; López-Doval *et al.* 2012; Kosma *et al.* 2014; Leeder *et al.* 1991)

El reactor FM01-LC se ha utilizado ampliamente para eliminar varios compuestos; se puede escalar fácilmente debido a que la geometría, la hidrodinámica y transporte de masa se mantienen constantes provocando velocidades de reacción sin modificación. En este trabajo, el agua residual sintética que contiene BGIS fue tratada previamente electroquímicamente para su posterior alimentación a un reactor en continuo de los lodos activados con el objetivo de eliminar los fármacos presentes en agua residual sin modificar significativamente la materia orgánica biodegradable, para que ésta última sea removida por los lodos activados. Para evaluar el efecto del pre-tratamiento electroquímico sobre los lodos activados se realizó el análisis metagenómico mediante DGGE reamplificando la región variable V6-V8 del gen 16SrRNA de los reactores operados que se explican más adelante.

Metodología para evaluación de sistema combinado electroquímico biológico en la remoción de fármacos

Todas las soluciones se prepararon a partir de reactivos de grado USP y agua desionizada con $18 \text{ M}\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ de resistividad producida con un equipo SymplicityTM.

El ARS se preparó conforme a la norma ASTM (1998) para tener una composición similar a las aguas residuales generadas por el ser humano. Por la naturaleza de este trabajo, es

importante mencionar que las concentraciones de los iones Cl^- y SO_4^{2-} (490 y 85 mgL^{-1} , respectivamente) fueron relevantes, ya que estos iones pueden actuar como parte del electrolito soporte en el proceso de electrooxidación. El ion sulfato promueve la formación de los radicales libres OH^\bullet en el ánodo de BDD, el cual oxida a los compuestos orgánicos, incluso de los que son fácilmente degradados por lodos activados. La cantidad de cerveza que se adicionó al ARS fue modificada para tener una concentración final de 580 mg DQO L^{-1} , la harina no se agregó para tener un medio libre de sólidos suspendidos de naturaleza orgánica que puedan interferir en el estudio, adicionalmente se añadieron NH_4Cl y NaHCO_3 con el fin de tener 1 mg L^{-1} y 1 g L^{-1} respectivamente, para amortiguar el medio y favorecer el crecimiento microbiológico, el pH se ajustó a 7 con 1M NaCl o HCl . Los fármacos bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol se adquirieron de Sigma-Aldrich. Se preparó una solución madre de 200 mg L^{-1} de BGIS para adicionar 1 mL por litro de ARS para lograr una concentración final de 200 μgL^{-1} de cada fármaco. Los fármacos bezafibrato, gemfibrozil e indometacina se disolvieron previamente en 10 mL de metanol para preparar la solución madre, mientras que el sulfametoxazol se disolvió en agua; ambas soluciones se mezclaron y se aforaron con agua a 100 mL, finalmente se añadieron 100 μL de NH_4OH al 30% para eliminar el precipitado formado. Esta solución se conservó a 4 ° C.

Los BGIS se purificaron del ARS mediante extracción en fase sólida reversa con cartuchos C_{18} de acuerdo con el método EPA 1694 (U.S. Agencia de Protección Ambiental, 2007). La cuantificación BGIS, se realizó a través de electroforesis capilar con un equipo de la marca Beckman modelo MDQTM, además se utilizó una columna de sílice fundida de 75 μm de diámetro interno y una longitud de 60 cm, los fármacos se leyeron a una longitud de onda de 219 nm y el buffer usado fue de fosfatos 30 mM a un pH de 7; las condiciones del método fueron de 18kV, tiempo de inyección de 5 segundos a una presión de 0.5 psi.

El desempeño del reactor en continuo de lodos activados, se evaluó a través de los parámetros de DQOs, SSVLM e índice volumétrico de lodos (IVL). La determinación de la DQOs y SSVLM se midieron conforme a los métodos descritos en APHA methods (APHA, 1998), para la determinación de la DQOs se utilizó un espectrofotómetro marca Hach modelo DR 5000 y termorreactor marca ThermoScientific modelo Orion COD165. El IVL se calculó usando la siguiente ecuación:

$$IVL = \frac{SS}{SSVLM}$$

En donde,

SS = Sólidos sedimentables (mL L^{-1}) y

SSV = Sólidos suspendidos volátiles en el licor de mezcla (mg L^{-1})

Un potencióstato-galvanostato, marca Bio-Logic, modelo VMP3 y software EC-Lab v. 10.18 TM 20 se utilizaron para experimentos de voltamperometría, para los experimentos del reactor electroquímico FM01-LC se utilizó un booster de 20 A.

Experimentos microelectrólisis

Para las pruebas de microelectrólisis se ocupó una celda de 10 mL de la marca pyrex con la configuración típica de tres electrodos (figura 34). Como electrodo de trabajo se utilizó BDD (1cm^2), contra-electrodo una barra de grafito y los potenciales se midieron utilizando el electrodo de referencia de Calomel (Radiometer XR110). El electrodo de BDD se regeneró con 5 ppm H_2SO_4 durante 20 min y una corriente de 20 mA. Se construyó curvas de densidad de corriente muestreado mediante la aplicación de pulsos de potencial en el agua residuales sintética con y sin BGIS dentro del intervalo de $0,5 \text{ V} \leq E \leq 3 \text{ V}$ con respecto al potencial de circuito abierto (E-OCP), la lectura de respuesta de corriente se obtuvo en régimen estacionario (aprox. 40 s). En experimento se utilizó un cilindro rotatorio a 100 y 1300 rpm con el fin de evaluar el efecto de la turbulencia en el proceso de electro-oxidación.



Figura 34. Celda típica de tres electrodos: BBD como electrodo de trabajo, barra de grafito como contra electrodo y electrodo de calomel como de referencia, para llevar a cabo las pruebas de microelectrólisis en agua residual sintética con y sin los fármacos BGIS

Operación del reactor electroquímico

Los experimentos de macroelectrólisis se realizaron en el reactor electroquímico FM01-LC (figura 35) cuyas dimensiones y características fueron descritas anteriormente (Nava *et al.* 2007). El electrodo de trabajo fue de BDD y se utilizó acero inoxidable como un contraelectrodo. Las condiciones de operación del reactor fueron las siguientes: 1.2 L min^{-1} de ARS con BGIS fue utilizado como electrolito a 25°C y pH 7, mientras que la densidad se eligió a partir de la curva de corriente muestreada obtenida en las pruebas de microelectrólisis (E-OCP), con el objetivo de tener una condición experimental que produzca una cantidad de radicales libres OH^\bullet o cloro activo que oxiden parcialmente los BGIS, sin producción significativa de cloro libre, ni consumo de DQO. El efluente de este otro tratamiento (después de 20 min la electrólisis) se ajustó a pH 7 y se alimenta al reactor en continuo de lodos activados.



Figura 35. Reactor electroquímico FM01-LC, usado para llevar el pre-tratamiento del ARS+BGIS que posteriormente fue alimentada en el reactor de lodos activados.

Experimentos biológicos

Para evaluar la degradación de los fármacos en el sistema combinado reactor electroquímico-lodos activados; tres reactores (1 L) tipo Eckenfelder fueron operados; los reactores se inocularon con lodos activados obtenidos del proceso biológico de lodos activados de una PTAR de refinería de petróleo, previamente acondicionado al ARS. El primer reactor se alimentó sólo con ARS (R1), el segundo (R2) se alimentó con ARS + BGIS y el último reactor (R3) con ARS+ BGIS previamente electrolizada. Los reactores en continuo fueron operados con un tiempo de residencia de 1.3 días, el pH se ajustó a 7 en todos los casos, la temperatura se mantuvo a $27 \text{ }^\circ \pm 2$ y oxígeno disuelto a $2 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$; la materia orgánica se cuantificó mediante DQOs, el IVL se evaluó como un indicador de crecimiento de microorganismos filamentosos, causantes de bulking y los BGIS fueron monitoreados en influente y efluente.

Evaluación de la estructura de la comunidad microbiana

De cada uno de los reactores se obtuvo una muestra de lodos activados al final de la operación de los reactores, las muestras se congelaron para posteriormente realizar la evaluación del efecto de los fármacos y el pre-tratamiento electroquímico sobre la composición de las comunidades microbianas. Este análisis se realizó mediante la amplificación del gen 16S rRNA en sus regiones variables V6- V8 de los consorcios microbianos de los lodos activados de cada uno de los reactores. Posteriormente por DGGE se realizó el análisis de comunidad microbiana y se evaluaron las diferencias y similitudes entre los perfiles obtenidos para cada uno de los tratamientos por el método de agrupamiento UPGMA.

Para llevar a cabo este análisis, primero se realizó la extracción del DNA de los lodos activados mediante el kit de extracción de DNA WIZARD de Promega, la metodología detallada se describe en el anexo (2). Posteriormente se realizó la amplificación del DNA por PCR en la región V6- V8 del gen 16S rRNA, después la técnica de DGGE con un intervalo de gradiente desnaturante 36-54%, permitió obtener perfiles genéticos de los consorcios. Estos patrones de bandas se analizaron con el propósito de obtener el comparativo de poblaciones de los lodos activados de los reactores R1, R2 y R3.

Resultados y discusión

Con el fin de analizar la viabilidad de los procesos combinados (oxidación anódica y el reactor biológico) en la degradación de compuestos farmacéuticos (BGIS) y materia orgánica biodegradable (BOM) en las aguas residuales, la siguiente estrategia fue llevada a cabo: en primer lugar, a través de pruebas de microelectrólisis, se estableció las condiciones de densidad de corriente para el proceso de oxidación de fármacos en agua residual sintética. Posteriormente las condiciones seleccionadas se utilizaron en la operación del reactor electroquímico FM01-LC para la evaluación de degradación de BGIS presentes en aguas residuales y producción de cloro activo. Después, se evaluó el desempeño del reactor en continuo de lodos activados alimentado con ARS+ BGIS tratado por el reactor FM01-LC (R3) con respecto al reactor de lodos activados solo con ARS (R1) y alimentado con ARS + BGIS (R2). Finalmente, se evaluó el efecto de los fármacos presentes en agua residual con y sin pre-tratamiento del reactor electroquímico con fármacos, sobre la estructura de la comunidad

Degradación de fármacos mediante un sistema combinado de oxidación electroquímica y biológico
microbiana de los lodos activados utilizando técnicas de biología molecular.

De las pruebas de microelectrólisis realizadas en agua residual, la figura 36 muestra las curvas de polarización construidas a partir de las corrientes transientes (obtenidas a potencial impuesto) correspondientes a diferentes tiempos de muestreo ($20 \leq t_s \leq 40$ s) para BDD en ARS con o sin BGIS; los valores de polarización corresponden a la diferencia entre el potencial impuesto y potencial de circuito abierto (OCP). Esta estrategia permitió la identificación de los fenómenos como adsorción que se producen durante el proceso electroquímico a diferentes constantes de tiempos, lo que no es posible utilizando voltamperometría cíclica clásica (Rodríguez *et al.* 2013). En todos los experimentos dentro de 0.5 -2.2 V intervalos, la densidad de corriente no aumentó significativamente, esta zona de potencial corresponde a un comportamiento capacitivo. Para la polarización más positiva que 2.2 V vs SCE, la densidad de corriente mostró un fuerte incremento asociado a los procesos faradaicos, principalmente la oxidación del agua para formar radicales hidroxilo y oxidar los cloruros en cloro activo (Fabianka *et al.* 2014). En la figura 36 a, se muestra la curva a 100 rpm de agitación en donde la presencia de BGIS modifica la tendencia densidad de corriente con respecto a la curva solo con ARS; esta tendencia se desvanece a 1200 rpm (Fig. 36 b), este comportamiento sugiere un proceso de adsorción BGIS a baja rpm. Este proceso podría tener un efecto positivo sobre la degradación BGIS debido a que la presencia de fármacos retrasa el proceso de oxidación a potenciales más positivos, lo que podría retrasar la formación de radical OH^\bullet , y evitar la degradación de la materia orgánica biodegradable; por lo tanto la condición de agitación de 100 rpm ($\text{Re} = 760$) fue considerada para el funcionamiento del reactor FM01-LC, esta condición de turbulencia equivale a un flujo de 1.2 L s^{-1} .

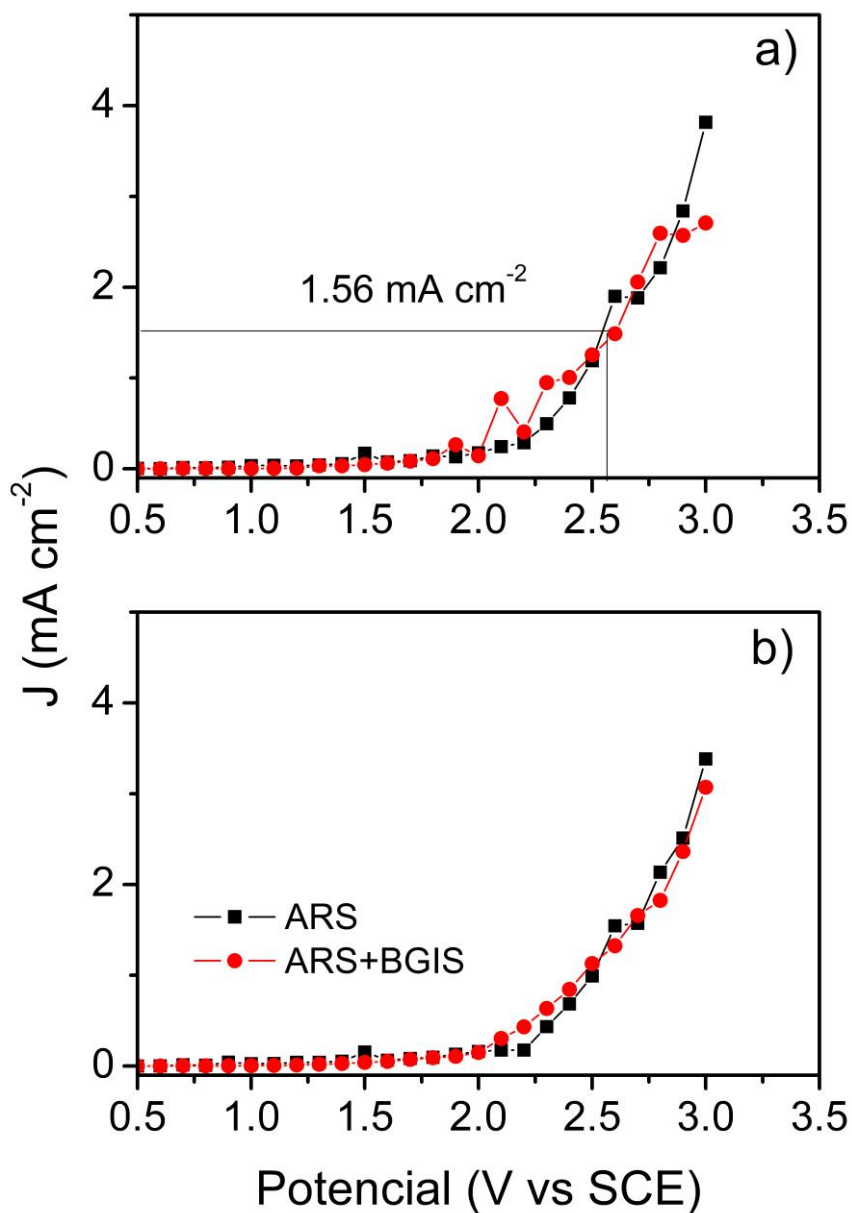


Figura 36. Curvas de la corriente muestreada contra sobrepotencial (E-OCP), construidas a partir de las curvas de corriente transiente correspondientes, obtenidas en la placa BDD (1cm^2) en ARS con / sin BGIS a dos velocidades de agitación de la solución: (a) 100 rpm y (b) 1300 rpm.

La corriente elegida para pruebas de macroelectrólisis en el reactor FM01-LC se indican en la figura 36 a) con el fin de producir una baja cantidad a radicales hidroxilo evitando la degradación de la materia orgánica, la densidad de corriente elegida fue de 1.56 mA cm^{-2} , esta densidad de corriente está asociada al potencial de 2.6 V.

Degradación de fármacos mediante un sistema combinado de oxidación electroquímica y biológico

Los diferentes fármacos bezafibrato, gemfibrozil, indometacina y sulfametoxazol, se adicionaron simultáneamente en ARS para obtener una concentración final de $200\mu\text{g L}^{-1}$, durante la electrólisis fueron cuantificados cada uno. Debido a la complejidad de la composición del ARS y baja concentración de los fármacos, la cuantificación de estos representó un reto durante la electrólisis, para cual fue necesario realizar una purificación de los fármacos presentes en agua residual a través de extracción en fase sólida para poder cuantificarlos por electroforesis capilar, logrando una buena resolución de los picos (figura 37).

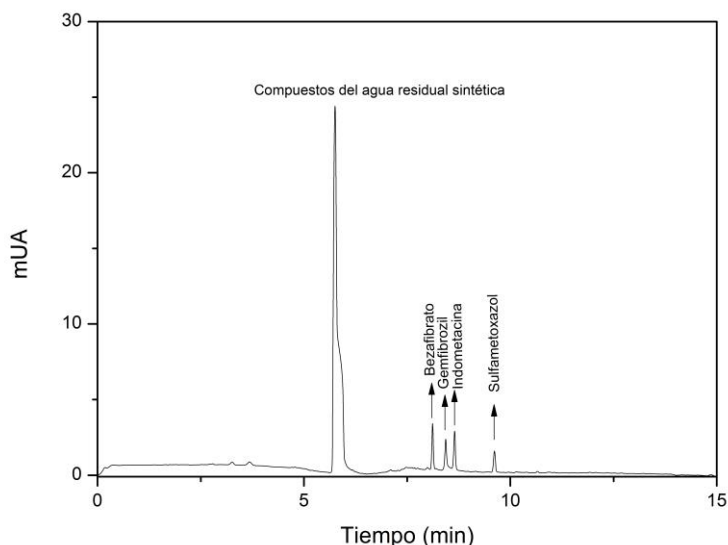


Figura 37. Electroferograma típico obtenido mediante electroforesis capilar de zona de los BGIS previamente purificados del ARS por extracción en fase sólida utilizando cartucho C-18

Durante la electrólisis de ARS + BGIS en el reactor FM01-LC, la DQOs se cuantificó durante 180 min; los radicales OH^\bullet y el cloro activo formados durante el proceso de oxidación en BDD no degradaron la materia orgánica cuando se aplicó 1.56 mA cm^{-2} , (Figura 38). Este efecto puede estar asociado con la presencia de cloruros en las aguas residuales. De acuerdo con Guzman-Duque *et al.* (2014), reportaron poca degradación del colorante cristal violeta utilizando BDD como ánodo en la presencia de cloruros, lo que podría estar asociada con la pobre producción de radicales hidroxilo en presencia de cloruros. Esto es relevante para el

presente trabajo, ya que se ha logrado oxidar a los fármacos sin degradar la materia orgánica a través del control del potencial

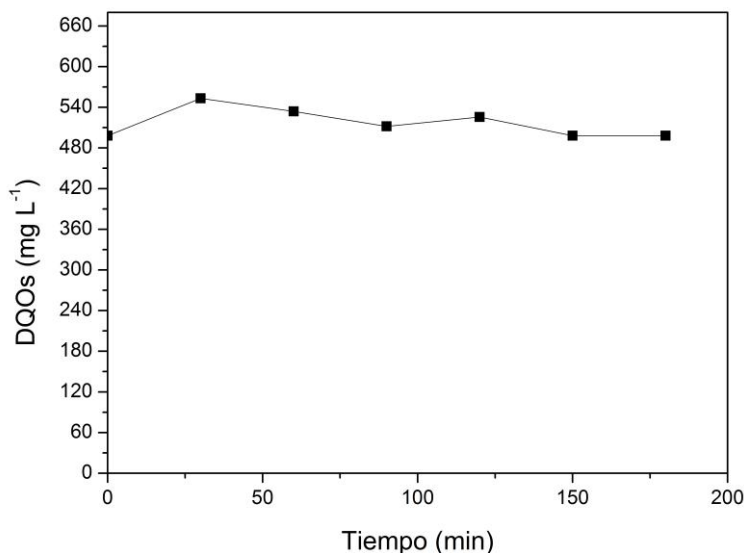


Figura 38. Remoción de DQO en el reactor FM01-LC utilizando como ánodo BDD (64 cm²) durante la electrólisis con una concentración inicial de 200 µg L⁻¹ de cada fármaco, (flujo= 1.2 L min⁻¹) a la densidad de corriente de 1.56 mA cm⁻².

La condición de densidad de corriente de 1.56 mA cm⁻² en el reactor FM01-LC utilizando BDD como ánodo no degradó la materia orgánica presente en el ARS. Bajo esta misma condición de corriente, se cuantificó la degradación de BGIS y la producción de cloro activo (Figura 39). La cuantificación de BGIS se realizó por triplicado por extracción en fase sólida C₁₈, razón por lo cual sólo se obtuvieron seis puntos, los cuales fueron suficientes para observar la tendencia de degradación. Adicionalmente se evaluó la adsorción de los fármacos en el reactor electroquímico, encontrando este fenómeno es despreciable en la cuantificación de los fármacos durante la electrólisis. Con respecto a la degradación de los fármacos, en la figura 39 se muestra que después de 20 min de electrólisis, se logró una eliminación de los fármacos mayor al 50% (Figura 39 a- d), y una desaparición total de los BGIS a los 40 a 50 minutos. Adicionalmente, durante los primeros 20 minutos de la electrólisis, el cloro no se detectó (Figura 39e). Cuando la velocidad de degradación BGIS cambió, empezó acumularse el cloro en seno de líquido, el cual aumentó con el tiempo de electrólisis, con una pendiente lineal de acumulación hasta llegar a una concentración de 0.6 mg L⁻¹ en 50 min. Este

comportamiento podría estar asociada con el efecto simultáneo del cloro activo y radicales OH^\bullet formados durante la electrólisis.

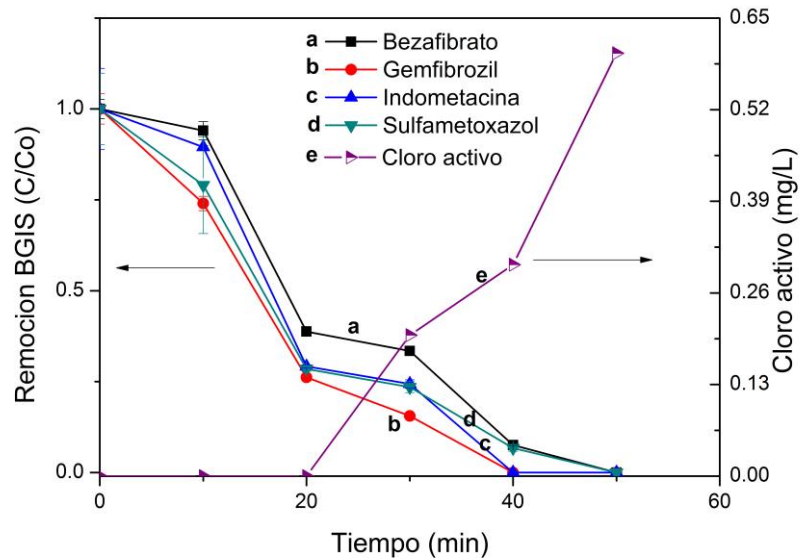


Figura 39. Remoción de BGIS y (e) producción de cloro activo durante la electrólisis a 1.56 mA cm^{-2} en ARS con una concentración inicial de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada fármaco, a un flujo de 1.2 L min^{-1} en el reactor FM01-LC. Cada fármaco fue evaluada por electroforesis capilar: (a) bezafibrato, (b) gemfibrozil, (c) indometacina y (d) sulfametoxazol

Los resultados muestran que con el pre-tratamiento con el reactor electroquímico a una densidad de corriente de 1.56 mA cm^{-2} , con un flujo de 1.2 L s^{-1} durante 20 min del ARS+BGIS, se lograron altas eficiencias en la remoción de los fármacos sin detección de cloro activo. El efluente del reactor (ARS electrolizada) fue colectado para alimentar al proceso biológico de lodos activados aeróbicos. Tres reactores aeróbicos de lodos activados previamente acondicionados a las condiciones experimentales fueron operados para evaluar el desempeño en la degradación de los fármacos con y sin pre-tratamiento electroquímico, el primer reactor sólo fue alimentado por ARS (R1), el segundo reactor se alimentó con ARS+BGIS (R2) y el último reactor fue alimentado con ARS + ABGIS previamente electrolizada por el reactor FM01-LC (R3). Los tres reactores fueron monitoreados durante 51 días, cuantificando pH, DQOs, IVL y fármacos con el objetivo de evaluar el desempeño de los reactores sobre la degradación de los fármacos y la MOB. En la tabla 17, se muestra las condiciones de operación del reactor.

Tabla 17. Condiciones de operación de los reactores de lodos activados, los cuales se operaron a pH 7 y concentración de oxígeno disuelto de 2 ± 0.5 mg L⁻¹

No. Reactor	Alimentación	TRH (días)	SSVLM (mg L ⁻¹)
R1	ARS	1.38	130.04
R2	ARS+BGIS	1.29	135.87
R3	ARS+ BGIS electrolizada	1.33	132.83

La figura 40, muestra los valores de la DQOs en influentes y efluentes de los tres reactores de lodos activados operados. Para verificar si existen diferencias significativas entre los tres reactores operados en lo que se refiere a los valores de DQOs en el influente y efluente, se realizó una prueba de comparación múltiple de Turkey-Kramer. En la tabla 18 se muestran los valores promedio con desviación estándar obtenidos de DQO, de la prueba estadística se obtuvo que no hay diferencia significativa entre los reactores R2 y R3 en los valores de influente, pero si con R1, esta diferencia es debido a que utilizó metanol para disolver bezafibrato, gemfibrozil y la indometacina; mientras que el efluente de este mismo reactor mostró una mejor eficiencia en la eliminación de DQO (86%) y seguido por el R3 (83%), el R2 tuvo la menor eficiencia (78%) (Tabla 18). De igual manera estos resultados de concentración de DQOs en el efluente fueron verificados por el análisis de las diferencias significativas, encontrando que los efluentes de R1 y R3 no mostraron diferencias significativas, teniendo una mayor eficiencia de eliminación de la materia orgánica con respecto al reactor R2, lo que sugiere que los fármacos tienen un efecto negativo sobre los lodos activados en la degradación de la materia orgánica, probablemente debido a la presencia del antibiótico sulfametoxazol. Los resultados obtenidos muestran que durante los 51 días que se monitorearon los tres reactores de lodos activados, la presencia de fármacos en las aguas residuales, afecta ligeramente la eliminación de la materia orgánica. Además, el pre tratamiento electroquímico utilizando BDD como ánodo, no afectó a la eliminación de la materia orgánica por lodos activados o bien, indica que el agua residual sintética previamente tratada con el reactor electroquímico FM01-LC no tiene efectos tóxicos sobre los lodos activados.

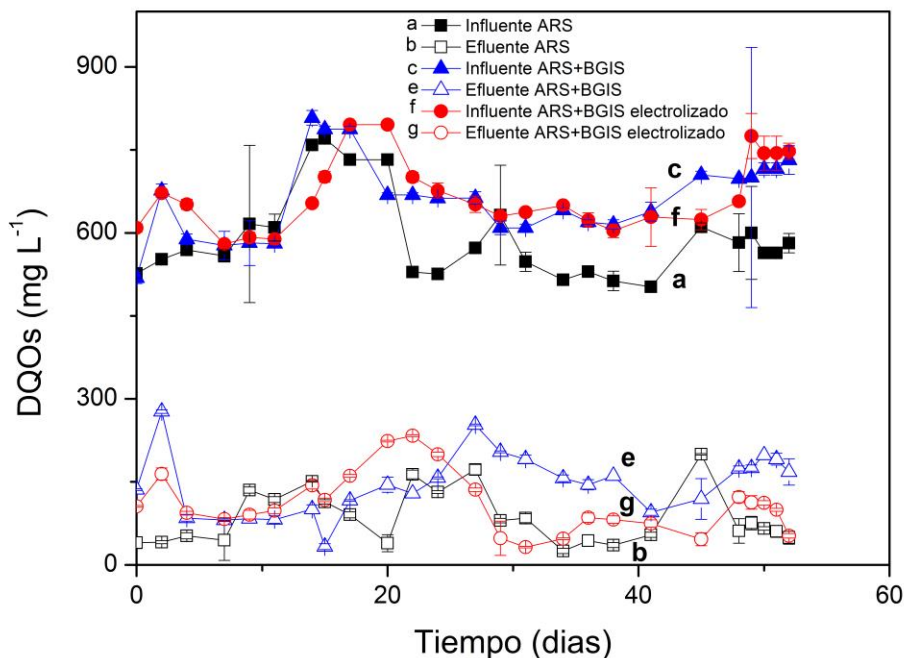


Figura 40. Variación de la DQO de los influentes (figuras rellenas) y efluentes (figuras vacías) durante la operación de los reactores de lodos activados con 1.3 días de residencia hidráulica. R1(a, b); R2(c, e) y R3 (f,g)

Durante la operación de los reactores de lodos activados, la degradación de fármacos fue evaluada en los tres reactores. En el reactor R3, que recibió un influente en el que más del 50% de los fármacos se degradaron previamente por el reactor electroquímico FM01-LC, y el efluente de este reactor mostró una total degradación de los fármacos BGIS (tabla 18). Por el contrario, el reactor R2 alimentado con ARS + BGIS mostró la presencia de los fármacos en el efluente (Figura 41); durante los primeros 16 días disminuyó la eliminación BGIS (en todos los medicamentos), sugiriendo un proceso de adsorción en bioflóculos del lodo activado. Después, la eficiencia de eliminación aumentó a valores cercanos del 40% en todos los casos (Figura 41). Estos resultados son consistentes con los valores reportados, en los que las plantas de tratamiento de aguas residuales mostraron persistencia de estos compuestos (Santos *et al.* 2010), en promedio los fármacos reportados, se tiene que en plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales, la remociones reportadas son para bezafibrato 66%, indometacina en 50%, gemfibrozil 65% y sulfametoxazol en 60%.

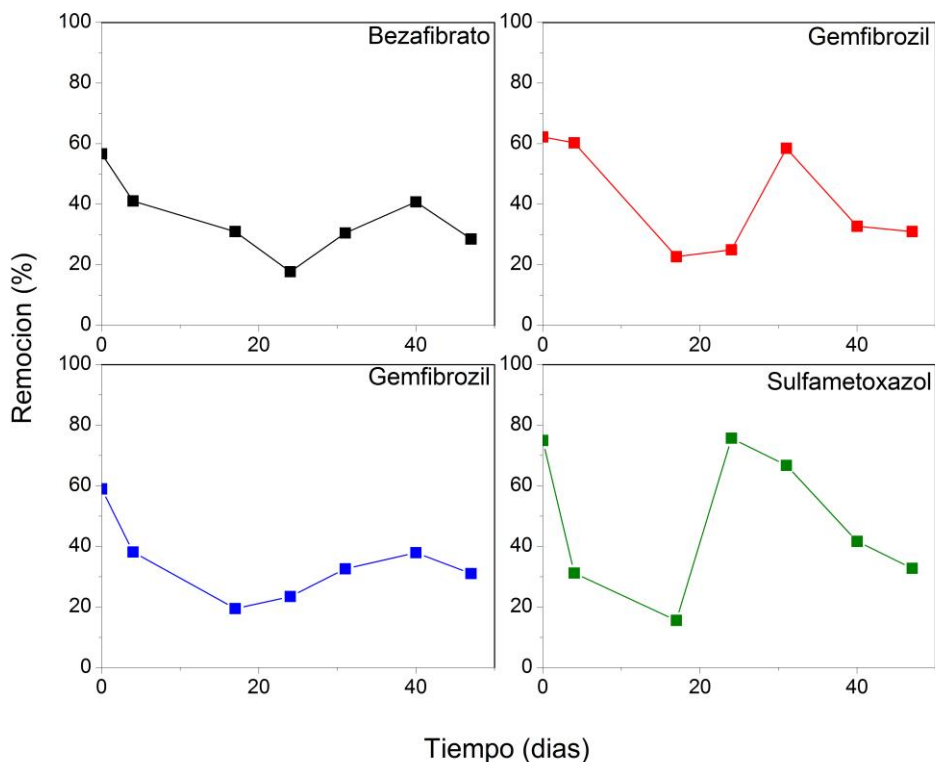


Figura 41. Remoción de los fármacos BGIS por los lodos activados del reactor R2 alimentado con ARS+BGIS

Adicionalmente, se cuantificó el índice volumétrico de lodos para evaluar el efecto de los fármacos y del pre-tratamiento electroquímico sobre la formación del bulking. Durante la primera etapa de funcionamiento del reactor, el IVL fue de aproximadamente 280 ml gSSV^{-1} en los tres reactores (figura 42); después de 12 días, los valores de IVL fueron diferentes: 57.42 ± 16.99 y $87.68 \pm 41.56 \text{ ml gSSV}^{-1}$, se obtuvieron para R1 y R3, respectivamente; mientras que $466.51 \pm 30.02 \text{ mL gSSV}^{-1}$ se obtuvo para el reactor R2. Para una buena sedimentación se sabe que los valores de IVL deben estar entre 50 y 185 ml gSSV^{-1} (Palm *et al.*, 1980). Por lo tanto, en el presente trabajo se encontró que los BGIS afectan a la comunidad microbiana promoviendo el crecimiento de microorganismo filamentos (figuras 43 b y c), mientras que el influente electrolizada no causó este fenómeno (figura 43 d) debido a la presencia de cloro y baja concentración BGIS. Aunque, en nuestro conocimiento, no existen reportes en donde los fármacos producen bulking, se propone que estas sustancias promueven el crecimiento de estos microorganismos. Levantesi *et al.* (2004) encontraron la presencia de una α -Proteobacteria filamentososa en aguas residuales industriales con presencia

de compuestos recalcitrantes.

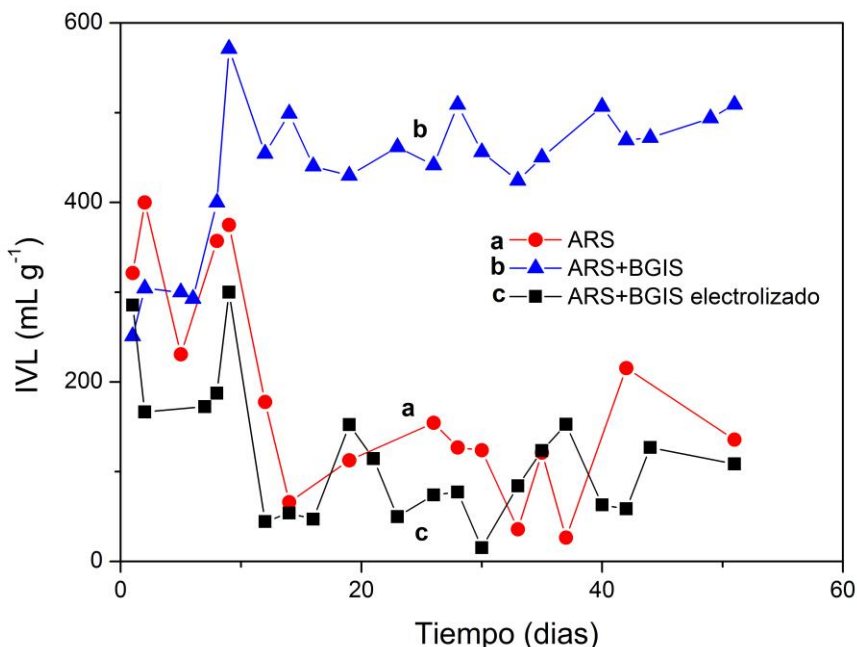


Figura 42. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el índice volumétrico de lodos en los reactores de lodos activados aeróbicos. Los reactores se alimentaron con: (a) ARS; (b) ARS + BGIS y (c) ARS+ BGIS previamente electrolizada.

Los resultados de los reactores aerobios de lodos activados se resumen en la tabla 18. Estos resultados muestran la factibilidad de acoplar un proceso de electro-oxidación con un sistema biológico en la remoción de fármacos recalcitrantes y materia orgánica, obteniendo altas eficiencias en la eliminación de ambos componentes al final del tratamiento, sin afectar el desempeño de los lodos activados. Estos resultados confirman lo obtenido por otros autores (Fontmorin *et al.* 2013; Han *et al.* 2008; Mansour, *et al.* 2014), quienes propusieron sistemas de oxidación anódica acoplados a procesos biológicos para remover compuestos recalcitrantes. Además, es importante resaltar que en el presente trabajo fue utilizada agua residual sintética con características similares a las aguas residuales municipales, con baja concentración de fármacos y similar concentración de materia orgánica.

El proceso electroquímico muestra ventajas en cuanto a los costos de operación, en el presente trabajo, el consumo de energía requerida para transformar los BGIS fue de 0.055 kW-h m⁻³, lo que equivale a un costo de \$0.08 pesos m⁻³ de agua residual tratada, que se debe de adicionar a los gastos de operación de una PCTAR. Este consumo de energía fue obtenido

mediante la siguiente expresión:

$$E_c = \frac{ItE_{cel}}{3600V}$$

En donde:

E_c = potencia requerida por unidad de volumen (kW-h m³)

E_{cel} = potencial de celda (V)

I = es la corriente suministrado durante la electrólisis (Amp)

t = tiempo de electrólisis (s)

V = Volumen de la solución (L)

Tabla 18. Resumen de los resultados obtenidos en los reactores biológicos

No. Reactor*	DQO (mg L ⁻¹)		% remoción DQO	IVL (mL g ⁻¹)	% Remoción de fármacos**			
	influyente	efluente			B	G	I	S
R1	592±78	85±49	86	117±56	NA	NA	NA	NA
R2	663±72	146±56	78	467±30	35±12	41±18	35±12	48±23
R3	669±64	111±53	83	88±40	≈100			

*B=Bezafibrato, G=Gemfibrozil, I=Indomethacina, S=Sulfametoxazol

** R1= ARS, R2=ARS+BGIS, R3=ARS+BGIS electrolizada

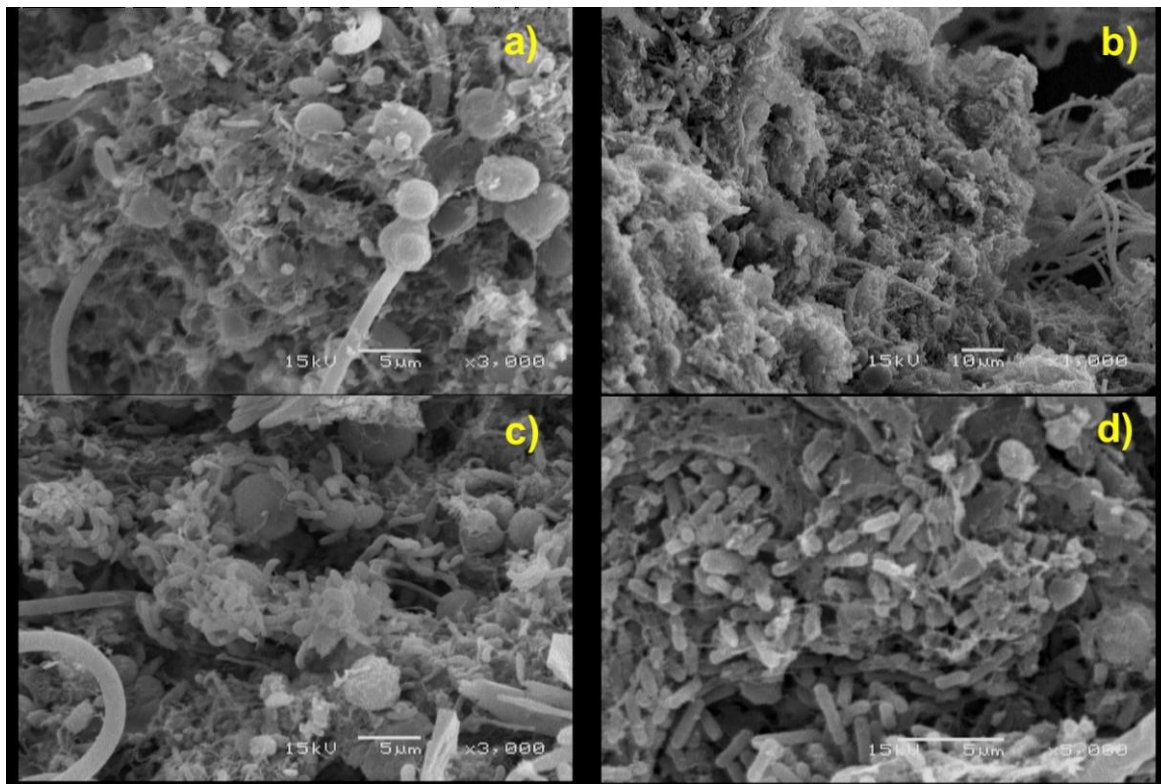


Figura 43. Imágenes de SEM obtenidas de los bioflóculos de los lodos activados después de 51 días de operación en los reactores de tipo Eckenfelder con TRH=2 días. La imágenes corresponden a bioflóculos de los siguientes reactores: (a) R1-ARS; (b, c) R2-ARS+ BGIS y (d) R3-ARS+ BGIS electrolizada.

Degradación de fármacos mediante un sistema combinado de oxidación electroquímica y biológico

El efecto del pre- tratamiento de electrooxidación sobre la comunidad microbiana del lodo activado, se llevó a cabo del % de similitud obtenidas a partir DGGE (figura 44) obteniendo el dendrograma (figura 45), en donde se encontró que el reactor R1 tiene un 55 % de similitud con respecto a los reactores R2 y R3, estos dos últimos reactores tienen 67 % de similitud entre ellos, indicando que tanto fármacos y el aguas residual con fármacos previamente tratada electroquímicamente tienen un efecto sobre las poblaciones microbianas con respecto a los lodos activados tratados, disminuyendo la diversidad microbiana y modificando la estructura poblacional.

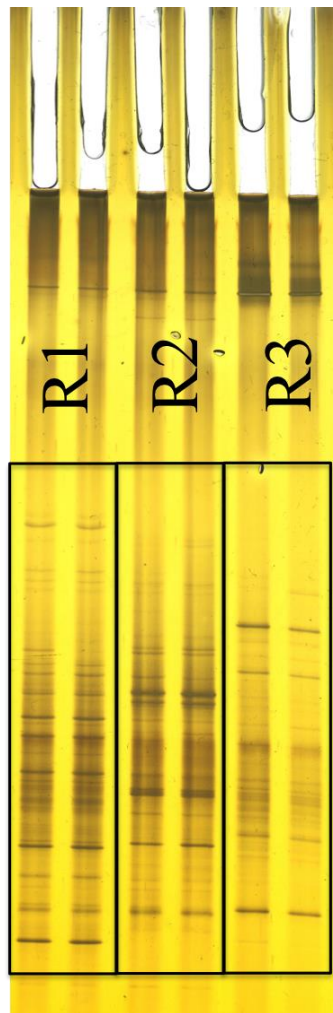


Figura 44. Perfil de las bandas obtenidas por DGGE con un gradiente de desnaturalización del 30-56% de los reactores R1, R2 y R3 al final de la operación

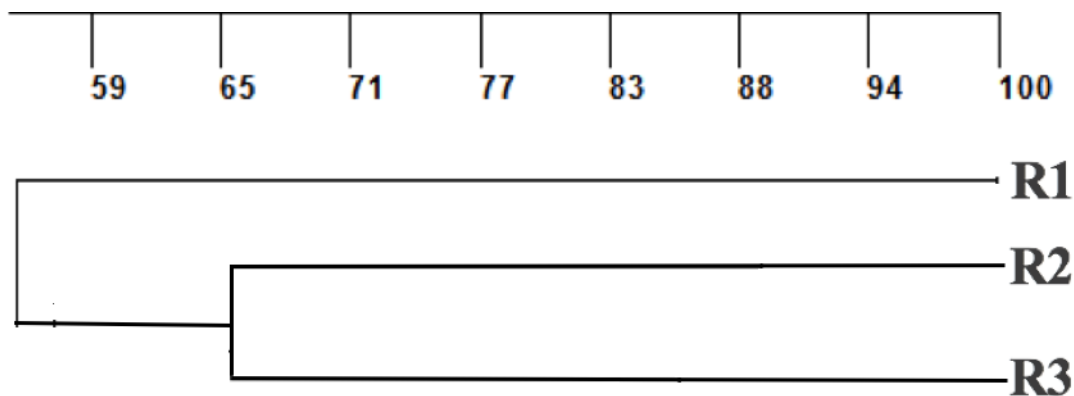


Figura 45. Dendrograma de análisis de similitud de las comunidades microbianas presentes en los lodos activados de los reactores R1, R2 y R3, al final de la operación.

Conclusiones

Hasta este momento se sabe que este es el primer estudio en donde se eliminaron simultáneamente diferentes fármacos en aguas residuales por un proceso de oxidación anódica y lodos activados sin necesidad de modificar la composición química de la solución resultante del pre-tratamiento electroquímico. El proceso combinado fue capaz de eliminar BGIS ($200 \mu\text{gL}^{-1}$) y materia orgánica presentes en el agua residual sintética ($\text{DQO } 669,5 \text{ mg L}^{-1}$). Las condiciones de operación del reactor FM01-LC utilizando BDD como ánodo ($1,2 \text{ L s}^{-1}$ y una densidad de corriente de $1,52 \text{ mA cm}^{-2}$), fueron determinadas a través de experimentos de micro electrolisis para eliminar fármacos contenidos en las aguas residuales sin producción significativa de cloro y sin modificar la concentración de materia orgánica. A los 20 min de la electrólisis, la eliminación de los fármacos en fase líquida fue superior al 50% sin eliminar la materia orgánica. Además, la producción de cloro activo se controló a través del potencial para evitar afectar el desempeño de los microorganismos que conforman el lodo activado sobre el consumo de materia orgánica presente en agua residual. Del efluente del reactor electroquímico, se alimentó al reactor de lodos activados, en donde 100% de los fármacos y 83% de la materia orgánica como demanda química de oxígeno. Aunque el desempeño de los reactores no se vio afectado significativamente en la degradación de materia orgánica, el sistema electroquímico si tuvo efecto sobre la estructura de la comunidad microbiana con respecto a los lodos activados que fueron alimentados por agua residual sintética y con presencia de fármacos.

CAPÍTULO VIII

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PROCESOS DE OXIDACIÓN EVALUADOS EN LA DEGRADACIÓN DE FÁRMACOS

En este capítulo se realiza un análisis comparativo de los procesos evaluados en el presente trabajo en la degradación de los fármacos, en lo que respecta a los procesos combinados de pre-tratamientos enzimático y electroquímico acoplados a lodos activados; se hará énfasis en la degradación de fármacos debido a que cada uno de ellos se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones experimentales (Tabla 19), tales como concentración de materia orgánica y tipo de alimentación. También se compara el desempeño global de ambos procesos combinados sobre la degradación de fármacos, materia orgánica biodegradable y efecto sobre las comunidades bacterianas de los lodos. Finalmente, se propone una perspectiva de las aplicaciones de estos procesos combinados en el tratamiento de aguas residuales y de los tratamientos enzimáticos con base en los resultados obtenidos por los tres hongos basidiomicetos *Trametes maxima*, *Pleurotus sp* y *Pycnoporus sanguineus*.

Análisis comparativo de los procesos combinados

Los procesos combinados consistieron en evaluar el efecto de dos pre-tratamientos, uno enzimático y otro de oxidación electroquímica, sobre la remoción por lodos activados de los fármacos y MOB. En el tercer proceso, se evaluó la degradación de los fármacos bezafibrato, gemfibrozil, indometacina, diclofenaco y sulfametoxazol por enzimas lignolíticas producidas por tres hongos basidiomicetos, *Trametes maxima*, *Pleurotus sp* y *Pycnoporus sanguineus* en medio Sivakumar modificado (2010).

Tabla 19. Condiciones experimentales de los pre-tratamientos evaluados para el estudio de la degradación de los fármacos

Proceso evaluado	Tipo de medio	Tipo de alimentación	Concentración de materia orgánica (mg DQOs L ⁻¹)	pH	Fármacos utilizados
P1	Agua residual sintética	Batch	4,180.41	7	BGIS
P2	Agua residual sintética	Continua	641	7	BGIS

P1 Pre-tratamiento enzimático

P2-Pre-tratamiento electroquímico

El objetivo de proponer un sistema combinado es llevar a cabo una remoción más eficiente de los fármacos y MOB, por lodos activados. De esta manera se compara el desempeño de los dos pre-tratamientos aquí considerados (Tabla 20). En cuanto a las eficiencias de remoción de los fármacos, en la tabla 20 se muestran las concentraciones iniciales de fármacos, los tiempos de reacción y % de remoción para ambos pre-tratamientos. En el pre-tratamiento enzimático se obtuvo muy baja degradación de los fármacos, esto fue debido a la baja actividad enzimática que presentaba el producto comercial Biolite® en el agua residual sintética; en cambio, el pre-tratamiento electroquímico obtuvo mayores eficiencias de remoción en todos los fármacos en un periodo de 20 minutos de electrólisis, debido a la producción de los agentes oxidantes como OH• y cloro activo. Es importante hacer notar que en ambos pre-tratamientos la DQO no se modificó, cumpliendo la principal hipótesis de este trabajo, que es la degradar sólo los BGIS con el procesos más costoso (pre-tratamiento), evitando la mineralización de la BOM, para que ésta sea degradada posteriormente por el proceso biológico.

Tabla 20. Desempeño de los pre-tratamientos sobre la remoción de los fármacos contenidos en agua residual sintética*.

	Concentración inicial de fármacos ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tiempo de reacción (min)	% de remoción			
			BZF	GFB	IND	SMX
P1	200	60	25	1.5	0.29	4.92
P2	200	20	61.3	73.9	70.8	71.5

* El DQO en ambos pre-tratamiento no se modificó

El comportamiento fue diferente en los procesos globales de ambos tratamientos (pre-tratamiento-lodos activados). En lo que se refiere a la degradación de la materia orgánica, los reactores de los lodos activados utilizados para la evaluación del efecto del pre-tratamiento electroquímico, los tres reactores tuvieron mayores eficiencias de remoción de la DQO (77.92-85.59 %) en comparación con el sistema enzimático-lodos activados (68.28-74.60) (Tabla 21), esto fue debido a la diferencia de concentración de DQO que se alimentó en ambos sistemas y a la diferencia de tiempos de residencia hidráulica (Tabla 21). En el proceso P1-Lodos activados (P1-LA), se suministró una alimentación inicial de DQO 6 veces mayor

que en el proceso P2-Lodos activados (P2-LA) y; además, con un tiempo de residencia hidráulica menor; no obstante la presencia de fármacos disminuye la eficiencia de la remoción del DQO por los lodos activados, aun sin pre-tratamiento (reactores R2), tabla 21; además, estos lodos son capaces de degradar un porcentaje pequeño de los fármacos (Tabla 21). Los fármacos fueron eliminados completamente por los lodos activados cuando cada proceso microbiano fue alimentado con sus respectivas ARS pre-tratadas; para el proceso P2-LA al contrario del proceso P1-LA, se evaluó la posible adsorción de los fármacos por el lodos activado, no observando tal fenómeno, por lo que se puede concluir que los fármacos fueron eliminados principalmente por vía metabólica. En estudios en donde se ha evaluado la degradación de fármacos, los porcentajes coinciden con los resultados obtenidos en el proceso P2-LA (Santos *et al.*, 2010), sugiriendo que las altas eficiencias obtenidas en el proceso P1-LA están asociadas a la degradación vía microbiana y a la adsorción simultánea de los fármacos en el lodo activado.

Tabla 21. Comparación del desempeño de los lodos activados alimentados por agua residual sintética tratada previamente por los pre-tratamientos enzimático (P1) y electroquímico (P2)

Pre-tratamiento		TRH (hrs)	DQOs influente (mg L ⁻¹)	DQOS efluente (mg L ⁻¹)	% Remoción DQOs	% Remoción fármacos			
						BZF	GFB	IND	SMX
P1	R1	12	4,070	1,063	73.87	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	R2		4,156	1,318	68.28	100*	100*	100*	42*
	R3		4,314	1,096	74.60	100*	100*	100*	100*
P2	R1	31.2	592	85	85.59	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	R2		663	146	77.92	35.18	41.76	34.52	48.38
	R3		669	111	83.45	100	100	100	100

Los reactores fueron alimentados con R1: ARS; R2: ARS + BGIS; R3: (ARS+BGIS) pretratado

*Los datos de remoción, en este caso, no distinguen entre adsorción y degradación

Considerando los resultados obtenidos por ambos procesos combinados en la remoción de los fármacos y MOB, los dos procesos son eficientes. Para seleccionar un proceso, además, es importante considerar los costos de operación; en el caso del proceso P1-LA se debe considerar el costo de la enzima, por cada metro cúbico de agua tratada, el costo es de \$36.00 pesos; para el proceso electroquímico, con las condiciones de operación seleccionadas para

remover fármacos, sin verse afectado el proceso microbiano por la producción de cloro activo, fue \$0.08 pesos por metro cúbico. De esta manera el pre-tratamiento electroquímico –lodos activados resulta ser más atractivo.

El análisis comparativo del efecto de los pre-tratamientos sobre las comunidades microbianas se realizó mediante método de agrupamiento por UPGMA de los perfiles de las comunidades, al término de la operación de los reactores en donde operaban en régimen estacionario, cada proceso tuvo diferentes efectos sobre las comunidades microbianas. En el proceso P1-LA las comunidades microbianas tuvieron bajos % de similitud con respecto al reactor blanco R1, 55% de similitud con R2 y 51% con R3; mientras que en el proceso P2-LA, los reactores R2 y R3 tuvieron un 66 % de similitud entre ellos, ambos sólo tuvieron un 55% de similitud con respecto al reactor blanco R1. En conclusión tanto la alimentación con fármacos, como el pre-tratamiento afectan las comunidades microbianas; no obstante, las comunidades microbianas alimentadas con los pre-tratamientos pudieron eliminar los fármacos sin verse afectado la eliminación de la MOB con respecto a los reactores controles R1, al contrario de los reactores R2 que fueron alimentados con ARS+BGIS en donde la eficiencia de eliminación de la materia orgánica se vio ligeramente afectada.

Perspectivas de los tratamientos enzimáticos y combinados en la degradación de fármacos

En este trabajo se decidió trabajar con hongos basidiomicetos productores de enzimas lignolíticas, debido a que se tiene evidencia de la degradación de fármacos por estas enzimas (Touahar *et al.*, 2014; Urrea *et al.*, 2009), además de complementar la investigación de la degradación de los fármacos por el producto comercial Biolite®. En este experimento, se obtuvieron importantes % de degradación de los fármacos, considerando que la concentración inicial de los fármacos fue de 2 mg L⁻¹ en un tiempo de reacción de una hora (tabla 22). La oxidación de los fármacos, se asoció principalmente a la actividad catalítica de la enzima MnP debido a la correlación obtenida entre la actividad específica de esta enzima y la magnitud del % de remoción de los fármacos.

Tabla 22. Relación entre actividades y % de remoción de los fármacos por los hongos *Trametes máxima*, *Pleurotus* sp. y *Pycnoporus sanguineus* cultivado en medio Sivakumar (2010).

	Actividad específica de MnP (UA mg ⁻¹)	Actividad específica de Lacasa (UA mg ⁻¹)	% de Remoción				
			BZF	GFB	IND	DCF	SMX
Oxidación por <i>Trametes maxima</i>	387.6	1986	32.59	43.39	60.76	90.2	72.62
Oxidación por <i>Pleurotus</i> sp.	55.9	106	0	89.47	47.61	73.00	0
Oxidación por <i>Pycnoporus sanguineus</i>	18.0	347	0	0	0	10.6	42.08

Considerando que en este estudio se utilizó un medio de cultivo, el cual favorece el crecimiento de los hongos, es importante implementar una estrategia para la degradación de estos fármacos contenidos en aguas residuales; por los resultados obtenidos con el producto comercial Biolite® y las enzimas producidas por los hongos basidiomicetos, es necesario desarrollar una tecnología que permita tener altas concentraciones de enzima para degradar

fármacos, en específico será importante probar con la enzima MnP. Una estrategia sería inmovilizar esta enzima y como es una enzima dependiente de la presencia del H_2O_2 para tener su actividad catalítica, este último compuesto puede producirse electroquímicamente, por lo que se propondría de igual manera un sistema combinado enzima inmovilizada-electroquímico operando simultáneamente.

Para el proceso combinado electroquímico-lodos activados, es importante continuar con estudios en aguas residuales reales, puede implementarse un sistema de tratamiento en efluentes hospitalarios en donde la presencia de fármacos es común. El reto del estudio propuesto es degradar completamente los fármacos antes de que sean alimentados al proceso biológico, pues en aguas residuales, la concentración de fármacos es mucho menor que la concentración trabajada de fármacos en el presente estudio. Adicionalmente otra alternativa de estudio, es utilizar al tratamiento electroquímico como tratamiento terciario, para degradar fármacos persistentes en plantas de tratamiento de aguas residuales además de producir cloro activo sustituyendo la etapa de cloración en el proceso de tratamiento de aguas residuales.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*(215), 403-410.
- APHA. (1998). Standard Methods for Examination of Water & Wastewater. (A. E. Lenore S. Clescerl, Ed.)
- ASTM International. (1998). D 5905-98. *Standard Practice for the preparation of Substitute Wastewater*.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Adams, C., Tyagu, R., Noguerol, R., & Piña, B. (2008). Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from municipal wastewater: Efficiency of horseadish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 70(3), 445-452.
- B.A.Boxall, A. (2004). The environmental side effects. *EMBO reports*, 1110-1112.
- Bellagamba, R., Michaud, P., Comninellis Ch., & Vatistas, N. (2002). Electro-combustion of polyacrylates with boron-doped diamond anodes,. *Electrochemistry Communications*, 4, 171-176.
- Beltrán, F. J., Aguinaco, A., García-Araya, J. F., & Oropesa, A. (2008). Ozone and photocatalytic processes to remove the antibiotic sulfamethoxazole from water. *Water Research*, 42, 3799-3808.
- Brillas, E., García, S. S., Skoumal, M., & Arias, C. (2010). Electrochemical incineration of diclofenac in neutral aqueous medium by anodic oxidation using Pt and boron-doped diamond anodes. *Chemosphere*, 79, 605-612.
- Brillas, E., Thiam, A., & García-Segura, S. (2016). Incineration of acidic aqueous solutions of dopamine by electrochemical advanced oxidation processes with Pt and BDD anodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 775, 189-197.
- Brinzila C.I., P. M. (2012). Electrodegradation of tetracycline on BDD anode. *Chemical Engineering Journal*, 209, 54–61.
- Brion, F., Tyler, C., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J. M., Garric, J., & Flammarion, P. (2004, 06 24). Impacts of 17 β -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 68(3), 193-217.
- Butrón E, J. M. (2007). Electrochemical incineration of indigo textile dye in filter-press-type FM01-LC electrochemical cell using BDD electrodes. *Electrochim Acta*, 52(24), 6888–6894.
- Cabana, H., Habib Jiwan, J.-L., Rozenberg, R., Elisashvili, V., Penninckx, M., Agathos, S. N., & Jones, J. P. (2007). Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. *Chemosphere*, 67, 770-778.
- Cañizares, M., Nicholson, L., & Lomonosoff, G. (2005). Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunol Cell Biol*(83), 263-70.
- Cañizares, P., Sáez, C., Lobato, J., & Rodrigo, M. (2004). Electrochemical treatment of 2,4-dinitrophenol aqueous wastes using boron-doped diamond anodes. *Electrochimica Acta*, 49, 4641-4650.
- Cañizarez, P., Gradi, A., Lobato, J., Nars, B., Paz, R., Rodrigo, M. A., & Saez, C. (2006). Electrochemical Oxidation of Azoic Dyes with Conductive-Diamond Anodes.

- Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(10), 3468-3473.
- Ch., C. (1192). Electrochemical treatment of wastewater. In *Gas Wasser Abwasser* (Vol. 72, pp. 792-797).
- Chan Capul, W., Heredia Abarca, G., Martínez Carrera, D., & Rodríguez Vazquez, R. (2014). Enhancement of ligninolytic enzyme activities in a *Trametes maxima*-*Paecilomyces carneus* co-culture: Key factors revealed after screening using a Plackett-Burman experimental design. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(3), 114-121.
- Chan Cupul, W., Hereida Abarca, G. P., & Rodríguez-Vázquez, R. (2016). AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LIGNINOLÍTICA DE MACROMICETOS DEL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 32(3), 339-351.
- Chen Y.F., N. W. (1994). Performance of upflow anaerobic biofilter process in pharmaceutical wastewater treatment. *Resources, Conservation and Recycling*, 11, 83-91.
- Chen, X., Chen, G., & Yue, P. L. (2003). Anodic oxidation of dyes at novel Ti/B-diamond electrodes. *Chemical Engineering Science*, 58(3-6), 995-1001.
- Clara M., S. B. (2005). Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and. *Water Research*, 4797-4798.
- Comisión Nacional del Agua. (2015). *Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en Operación*. (D. y. Subdirección General de Agua Potable, Ed.)
- Comninellis, Christos;. (1994). Electrocatalysis in the electrochemical conversion/combustion of organic pollutants for waste water treatment. *Electrochimica Acta*, 39(11-12), 1857-1862.
- Cossu F, P. A. (1998). Electrochemical Treatment of Landfill Leachate: Oxidation at Ti/PbO₂ and Ti/SnO₂ Anodes. *Environ. Sci. Technol*, 32(22), 3570–3573.
- D. Gandini, E. M. (2000). Oxidation of carboxylic acids at boron-doped diamond electrodes for wastewater treatment. *Journal of Applied Electrochemistry*, 30, 1345–1350.
- Dedeyan B, K. A. (2000). Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 66(3), 925-929.
- Doğan D, T. H. (2005). Electrochemical oxidation of textile dye indigo. *J Chem Technol Biotechnol*, 80(8), 916–923.
- Dogan, D., & Turkdemir, H. (2005). Electrochemical oxidation of textile dye indigo. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(8), 916-923.
- Domínguez J.R., G. T.-M. (2010). Anodic oxidation of ketoprofen on boron-doped diamond (BDD) electrodes. Role of operative parameters. *Chemical Engineering Journal*, 162(3), 1012–1018.
- Drugbank, D. (n.d.). *Drugbank*. Retrieved diciembre 13, 2016, from Benzafibrate: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01393>
- Durán, N., Rosa, M., Annibale, D., & Gianfreda, L. (2002). Applicatio of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 907-931.
- Eloy, J.-R. (2008). *Estudio electroquímico y biotecnológico para el tratamiento de aguas de desecho de la industria textil de Tlaxcala*. Tlaxcala: Tesis CIBA-IPN.
- Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care. (2004). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113-115.
- Fabianka, A., Bialk-Bielinska, A., Stepnowski, P., Stolte, S., & Siedlecka, E. M. (2014).

- Electrochemical degradation of sulfonamides at BDD electrode: Kinetics, reaction pathway and eco-toxicity evaluation. *Journal of Hazardous Materials*, 280, 579-587.
- Feng J, H. L. (1995). Electrocatalysis of anodic oxygen-transfer reactions: the electrochemical incineration of benzoquinone. *J. Electrochem. Soc*, 142(11), 3626–3631.
- Feng, L., van Hullebusch, E. D., Rodrigo, M. A., Esposito, G., & Oturan, M. A. (2013). Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. *Chemical Engineering Journal*, 228, 944-964.
- Fontmorin, J.-M., Fourcade, F., Geneste, F., Floner, D., Huguet, S., & Amrane, A. (2013). Combined process for 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid treatment- Coupling of an electrochemical system with a biological treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 70, 17-22.
- Fryda M., H. D. (1999). Properties of diamond electrodes for wastewater treatment. *New Diamond and Frontier Carbon Technology*, 9(3), 229–240.
- Gandini, D., Comninellis, C., Perret, A., & Haenni, W. (1999). Anodic oxidation of organics on synthetic diamond thin-film electrodes. *Institution of Chemical Engineers Symposium Series*, 145, 181-190.
- Gandini, D., Mahé, E., Michaud, P., Haenni, W., Perret, A., & Comninellis, C. (2000). Oxidation of Carboxylic Acid at Boron-Doped Diamond Electrodes. *Oxidation of Carboxylic Acid at Boron-Doped Diamond Electrodes*, 30(12), 1345-1350.
- Ganzenko, O., Huguenot, D., van Hullebusch, E. D., Esposito, G., & Oturan, M. A. (2014). Electrochemical advanced oxidation and biological processes for wastewater treatment: a review of the combined approaches. *Environ Sci Pollut Res*, 21, 8493-8524.
- Gao, S., Zhao, Z., Xu, Y., Tian, J., & Qi, H. (2014). Oxidation of sulfamethoxazole (SMX) by chlorine, ozone and permanganate-A comparative study. *Journal of hazardous Materials*, 274, 258-269.
- García-Montoya M.F., G.-G. S.-O.-H. (2015). Application of electrochemical/BDD process for the treatment wastewater effluents containing pharmaceutical compounds. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 31, 238–243.
- Golan-Rozen, N., Chefetz, B., Ben-Ari, J., Geva, J., & Hadar, Y. (2011). Transformation of the Recalcitrant Pharmaceutical Compound Carbamazepine by *Pleurotus ostreatus*: Role of Cytochrome P450 Monooxygenase and Manganese Peroxidase. *Environmental Science and Technology*, 45, 6800-6805.
- Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., García-Medina, S., & SanJuan-Reyes, N. (2014). DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 21-26.
- González, O., Sans, C., & Esplugas, S. (2007). Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton Toxicity, inhibition and biodegradability assesment of intermediates. *Journal of Hazardous Materials*, 146, 459-464.
- González, T., Domínguez, J. R., Palo, P., Sánchez-Martín, J., & Cuerda-Correa, E. (2011). Development and optimization of the BDD-electrochemical oxidation of the antibiotic trimethoprim in aqueous solution. *Desalination*, 280, 197-202.
- Goodguide. (n.d.). *Scorecard- The pollution information site*. Retrieved 12 01, 2016, from Scorecard: <http://scorecard.goodguide.com/>
- Guzmán-Duque, F. L., Palma-Goyes, R. E., González, I., Peñuela, G., & Torres-Palma, R.

- A. (2014). Relationship between anode material, supporting electrolyte and current density during electrochemical degradation of organic compounds in water. *Journal of Hazardous Material*(278), 221-226.
- Han, W.-Q., Wang, L.-J., Sun, X.-Y., & Li, J.-S. (2008). Treatment of bactericide wastewater by combined process chemical coagulation, electrochemical oxidation and membrane bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 151, 306-315.
- Haroune, L., Saibi, S., Bllenger, J.-P., & Cabana, H. (2014). Evaluation of the efficiency of *Trametes hirsuta* for the removal of multiple pharmaceutical compounds under low concentrations relevant to the environment. *Bioresource Technology*, 171, 199-202.
- Hatakka, A. (2001). Biodegradation of lignin. *Biopolymers*, 129-180.
- Heberer, T. (2002, May 10). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131(1-2), 5-17.
- Hernández, F., Ibáñez, M., Bade, R., Bijlsma, L., & Snacho, J. V. (2014). Investigations of pharmaceuticals and illicit drugs in water by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry,. *Trends in Analytical Chemistry*, <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.trac.2014.08.003>. .
- Hijosa-Valsero, M., Matamoros, V., Villacortas, M., Bécares, E., & Beyona, J. (2010). Assessment of full-scale natural systems for the removal of PPCPs from wastewater in small communities. *Water Res*(44), 1429-39.
- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbiology Technology*, 30, 454-466.
- Hong, H., Kim, H., Park, K., Lee, S., & Gu, M. (2007). Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) usin real-time PCR. *Chemosfere*, 67, 2115-2121.
- Iniesta, V., Gómez-Nieto, L., & Corraliza, I. (2001). The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-l-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med*(193), 777-84.
- Jara C.C., F. D. (2007). Electrochemical removal of antibiotics from wastewaters. *Applied Catalysis B: Environmental*, 70, 479–487.
- Joss, A., Zabczynski, S., Gobel, A., Hoffmann, B., Loffler, D., McArdell, C. S., . . . Siegrist, H. (2006, May). Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Research*, 40(8), 1686-1696.
- Kimura, K. I. (2009). Influence of residual organic macromolecules produced in biological wastewater treatment processes on removal of pharmaceuticals by NF/RO membranes. *Water Research*, 43, 3751–3758.
- Kirki D.W, S. H. (1985). Anodic oxidation of aniline for waste water treatment. *J. Appl. Electrochem*, 15(2), 285–292.
- Klavarioti, M., Mantzavinos, D., & Kassinos, D. (2009). Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environ Int*(35), 402-17.
- Kosma C.I., L. D. (2014). Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment. *Science of The Total Environment*, 466–467, 421–438.
- Kötz, R., Stucki, S., & Carcer, B. (1991). Electrochemical wastewater treatment using high overvoltage anodes. Part I, Physical and electrochemical propoerties of SnO₂ anodes. *Journal of Applied Electrochem.*, 21, 14-20.

- Kraigher, B., Kosjek, T., Heath, E., Kompare, B., & Mandic-Mulec, I. (2008, November 17). Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. *Water Research*, 42(17), 4578-4588.
- Kunamneni, A., Ballesteros, A., Plou, F. J., & Alcalde, M. (2007). Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 233-245.
- Langford, K. H., & Thomas, K. V. (2009, July). Determination of pharmaceuticals compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment work. *Environment International*, 35(5), 766-770.
- Leeder, J. S., Dosch, H.-M., & Spielberg, S. (1991). Cellular toxicity of sulfamethoxazole reactive metabolites—I: Inhibition of intracellular esterase activity prior to cell death. *Biochemical Pharmacology*, 41(4), 567-574.
- Levantesi C, B. C. (2004). Filamentous Alphaproteobacteria associated with bulking in industrial wastewater treatment plants. *Syst Appl Microbiol*, 27(6), 716-27.
- Lindqvist, N., Tuhkanen, T., & Kronberg, L. (2005, June). Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Research*, 39(11), 2219-2228.
- Lishman, L., Smyth, S., Sarafin, k., Kleywegt, S., Toito, S., Lee, B., . . . Seto, D. (2006). Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Sci Total Environ*(367), 544-58.
- Lloret, L., Eibes, G., Moreira, M. T., Feijoo, G., & Lema, J. M. (2013). On the use of a high-redox potential laccase as an alternative for the transformation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 97, 233-242.
- López-Doval, J. C., Kukkonen, J. V., Rodrigo, P., & Muñoz, I. (2012). Effects of indomethacin and propranolol on *Chironomus riparius* and *Physella* (*Costatella*) *acuta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 110-115.
- Majeau Joséé-Anne, B. S. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, 2332-2339.
- Mansour, D., Fourcade, F., Huguet, S., Soutrel, I., Bellakhal, N., Dachraoui, M., . . . Amrane, A. (2014). Improvement of the activated sludge treatment by its combination with electro Fenton for the mineralization of sulfamethazine. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 29-36.
- Mansour, M., Hendawy, A., & Zeitoun, M. (2016). Effect of mastitis on luteal function and pregnancy rates in buffaloes. *Theriogenology*(86), 1189-94.
- Marco-Urrea, E., Perez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Carminal, G., & Vicent, T. (2009). White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR. *Chemosphere*(78), 474-81.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morato C., Caminal, G., & Vicent, T. (2010). Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3), 836-842.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, V. M., & Caminal, G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 74, 465-772.

- Martínez-Gómez M.A, C.-A. M.-C.-H. (2007). Characterization of antihistamine–human serum protein interactions by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1147(2), 261–269.
- Mascolo G., B. L. (2010). Biodegradability of pharmaceutical industrial wastewater and formation of recalcitrant organic compounds during aerobic biological treatment. *Bioresource Technology*, 101(8), 2585–2591.
- Matamoros Víctor, H. M. (2009). Assessment of the pharmaceutical active compounds removal in wastewater. *Chemosphere*, 75(2), 200-205.
- Méndez Hernández, J. E. (2014). Biodegradación del azul ácido 74 mediante un tratamiento secuencial enzimas oxidativas-digestión anaerobia. Tesis-Universidad Autónoma Metropolitana.
- Mester, T., & Tien, M. (2000). Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46, 51-29.
- Michaud, P. A., Panizza, M., Ouattara, L., Diaco, T., Foti, G., & Comninellis, C. (2003). Electrochemical oxidation of water on synthetic boron-doped diamond thin film anodes. *Journal of Applied Electrochemistry*, 33(2), 151-154.
- Miège, C., Choubert, J., Ribeiro, L., Esusèbe, M., & Coquery, M. (2009). Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. *Environmental Pollution*, 157(5), 1721-1726.
- Montilla, F., Michaud, P. A., Morallón, E., Vázquez, J. L., & Comninellis, C. (2002). Electrochemical oxidation of benzoic acid at boron-doped diamond electrodes. *Electrochimica Acta*, 47, 3509-3513.
- Murugananthan, M., Latha, S., Bhaskar Raju, G., & Yoshihara, S. (2011). Role of electrolyte on anodic mineralization of atenolol at boron doped diamond and Pt electrodes. *Separation and Purification Technology*(79), 56-62.
- Muter, O., Perkons, I., Selga, T., Berzins, A., Gudra, D., Radovica-Spalvina, I., . . . Bartkevics, V. (2017). Removal of pharmaceuticals from municipal wastewaters at laboratory scale by treatment with activated sludge and biostimulation. *Science of The Total Environment*, In Press.
- Nakada, N., Shinohara, H., Murata, A., Kiri, K., Managaki, S., Sato, N., & Takada, H. (2007). Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Research*, 41(19), 4373-4382.
- Nars, B., Hsen, T., & Abdellatif, G. (2009). Electrochemical treatment of aqueous wastes containing pyrogallol by BDD-anodic oxidation. *Journal of Environmental Management*, 90(1), 523-530.
- Nasuhoglu, D., Yargeau, V., & Berk, D. (2011). Photo-removal of sulfamethoxazole (SMX) by photolytic and photocatalytic processes in a batch reactor under UV-C radiation ($\lambda_{max}=254$ nm). *Journal of Hazardous Materials*, 186, 67-75.
- Nava, J., Núñez, F., & González, I. (2007). Electrochemical incineration of p-cresol and o-cresol in the filter-press-type FM01-LC electrochemical cell using BDD electrodes in sulfate media at pH 0. *Electrochimica Acta*, 52(9), 3229-3235.
- Niladevi, K. (2009). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (Vol. 22). (A. P. Poonam Singh nee' Nigam, Ed.) Springer.
- Niladevi, K., Jacob, N., & Prema, P. (2008). Evidence for halotolerant-alkaline laccase in

- Sttrptomycetes psammoticus: Purification and characterization. *Process Biochemistry*, 43, 654-660.
- NMX-034-SCFI-2001-Determinación de Sólidos y Sales Disueltas en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas- Método de Prueba. (2001). *Norma Técnica*. Secretaría de Economía.
- Norma Oficial Mexicana. (n.d.). NOM-001-SEMARNAT-1996. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 23 de abril de 2003.
- OCDE. (2007). *Esquema Regulatorio de Medicamentos en México: Oportunidades y Retos*. COFEPRIS. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Oller, I., Malato, S., & Sánchez-Pérez, J. A. (2011). Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination- A review. *Science of the Total Environment*, 409, 4141-4166.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2014). *Competition issues in the distribution of pharmaceuticals Contribution from Mexico*.
- Owen, R., & Jobling, S. (2012). Environmental science: The hidden costs of flexible fertility. *Nature*, 485, 7399.
- Palm, J., Jenkins, D., & Parker, D. S. (1980). Relationship between organic loading, dissolved oxygen concentration and sludge settleability in completely-activated sludge process. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 52(10), 2484-2506.
- Panizza, M., & Cerisola, G. (2005). Application of Diamond Electrodes to Electrochemical Processes. *Electrochimica Acta*, 51(2), 191-199.
- Panizza, M., Michaud, P. A., Cerisola, G., & Comninellis, C. (2001). Anodic oxidation of 2-naphthol at boron-doped diamond electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 507, 206-214.
- Perret, A., Haenni, W., Skinner, N., Tang, X., Gangini, D., Comninellis, C., . . . Foti, G. (1999). Electrochemical behavior of synthetic diamond thin film electrodes. *Diamond and Related Materials*, 8(2-5), 820-823.
- Polcaro A.M, P. S. (1999). On the performance of Ti/SnO₂ anodes in electrochemical degradation of 2-chlorophenol for wastewater treatment. *J. Appl. Electrochem*, 29(2), 147-151.
- PROFECO. (2010). *Procuraduría Federal del Consumidor*. Retrieved 2016, from Sondeo en línea sobre hábitos de consumo de medicamentos: http://www.profeco.gob.mx/encuesta/mirador/2010/cons_med_2010.pdf
- Quinn, B., Gagné, F., & Blaise, C. (2008, January 25). An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of The Total Environment*, 389(2-3), 306-314.
- Raldúa, D., André, M., & Babin, P. J. (2008). Clofibrate and gemfibrozil induce an embryonic malabsorption syndrome in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 228, 301-314.
- Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and. (4798). *Water research*, 2005.
- Rodayan, A., Roy, R., & Yargeau, V. (2010). oxidation products of sulfamethocazole in ozonated secondary effluent. *Journal of hazardous Materials*, 177, 237-243.
- Rodrigo, M. A., Michaud, P.-A., Panizza, M., Cerisola, G., & Comninellis, C. (2001). Oxidation of 4-Chlorophenol at Boron-Doped Diamond Electrode for Wastewater Treatment. *Journal of The Electrochemical Society*, 148(5), 60-64.
- Rodríguez, F. A., Mateo, M. N., Aceves, J. M., Rivero, E. P., & González, I. (2013).

- Electrochemical oxidation of bio-refractory dye in a simulated textile industry effluent using DS electrodes in a filter-press type FM01-LC reactor. *Environmental Technology*, 34(5), 573-583.
- Rodríguez, O., Gutierrez, A., & Coño, J. (2015). Environmental systems. *Journal of Hazardous Materials*, 2(1), 3-6.
- Rodríguez, s., & Toca, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24, 500-513.
- Rodríguez-Rodríguez, C. E., Jelíc, A., Llorca, M., Farré, M., Caminal, G., Petrovic, M., . . . Vicent, T. (2011, May). Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge. *Bioresource Technology*, 102(10), 5602-5608.
- Rodríguez-Rodríguez, C. E., Marco-Urrea, E., & Caminal, G. (2010). Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. *Bioresource Technology*, 101, 2259-2566.
- Santos, L. H., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. C. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175, 45-95.
- SEMARNAT. (1996). *Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.* (S. d. Naturales, Ed.)
- SEMARNAT. (1996). *Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNATA-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminación en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes de la nación.* (S. d. naturales, Ed.)
- Shariati F.P., M. M. (2010). Membrane bioreactor for treatment of pharmaceutical wastewater containing acetaminophen. *Desalination*, 250(2), 798-800.
- Sim, W., Lee, J., & Oh, J. (2010). Occurrence and fate of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and rivers in Korea. *Environmental Pollution*, 158(5), 1938-1947.
- Sirés, I., & Enric, B. (2012). Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A review. *Environment International*, 40, 212-229.
- Sivakumar, S., Palsamy, P., & Subramanian, S. (2010). Impact of D-pinitol on the attenuation of proinflammatory cytokines, hyperglycemia-mediated oxidative stress and protection of kidney tissue ultrastructure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact.*, 188(1), 237-45.
- Stucki, S., Kotz, R., Carce, B., & Suter, W. J. (1999). Electrochemical wastewater treatment using high overvoltage anodes. *Applied Electrochemical*, 21, 99-104.
- Suda T., H. T. (2012). Treatment of tetracycline antibiotics by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Bioresource Technology*, 103(1), 498-501.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12), 2725-2729.
- Teel, A. L. (2001). Comparison of mineral and soluble iron Fenton catalysts for the treatment of trichloroethylene. *Water Research*, 35, 977.
- Touahar, I. L. (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.
- Trovó, A. G., Nogueira, R. F., Agüera, A., Fernandez-Alba, A. R., Sirtori, C., & Malato, S.

- (2009). Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation. *Water Research*, 3922-3931.
- U.S. Environmental Protection Agency. (2007). Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS.
- Venter, J., Adams, M., Myers, E., LiP.W., & et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304-1351.
- Watkinson A. J., M. E. (2007). Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Res*, 41, 4164–4176.
- Yoshida, H. (1883). Chemistry of Lacquer part 1. *J Chem*, 43, 472-486.
- Zhang, Y., & Geißen, S. (2010). In vitro degradation of carbamazepine and diclofenac by crude lignin peroxidase. *Journal of Hazardous Materials*, 176, 1089-1092.
- Zhou, J. L., Zhang, Z. L., Banks, E., Grover, D., & Jiang, J. Q. (2009, July 30). Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2-3), 655-661.

ANEXOS

ANEXO 1. MARCO CONCEPTUAL

Enzimas lignolíticas

Una de las alternativas para el tratamiento de compuestos de difícil degradación es el uso de enzimas, las cuales transforman los compuestos orgánicos a intermediarios, que pueden ser tratados por métodos convencionales como el de lodos activados. Un grupo de enzimas utilizadas para el tratamiento de efluentes industriales de difícil degradación son las enzimas lignolíticas, las cuales tienen la capacidad de degradar los polímeros de la lignina. La lignina peroxidasa (LIP), manganeso peroxidasa (MNP) y lacasa son enzimas peroxidadas que se encuentran dentro de las enzimas lignolíticas. La demanda de estas enzimas se ha incrementado en los últimos años debido a sus aplicaciones potenciales en diversas áreas de la biotecnología. Estas enzimas son ampliamente utilizadas en la eliminación de contaminantes, especialmente en el tratamiento de efluentes industriales que contiene compuestos tales como colorantes, fenoles y otros xenobióticos (Niladevi, 2009).

Entre las enzimas que juegan un papel importante en la despolimerización de la lignina, se incluyen dos peroxidadas extracelulares: la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (MnP) generando así H_2O_2 en el sistema. Por otra parte, existen hongos que secretan una combinación de peroxidadas y oxidadas. Dentro de las oxidadas que se producen en estos hongos se encuentran las lacasas que no necesitan de H_2O_2 para su acción.

Lacasa

Yoshida (1883) descubrió la lacasa en el latex del árbol japonés de la laca (*Toxicodendron vernicifuum*). Actualmente, se han aislado de plantas, hongos, procariotas y artrópodos. En los hongos las lacasas están involucradas en la esporulación, producción de pigmentos, formación de cuerpos fructíferos y en la degradación de la lignina. En los hongos de la pudrición blanca se sabe que las lacasas contribuyen en la degradación y transformación de la lignina, celulosa y hemicelulosa.

Las lacasas son oxidasas glicosidasas que contienen cuatro moléculas de cobre, las cuales les confiere un color azul en su estructura tridimensional, presentan un peso molecular entre 60 y 80 kDa, su estructura molecular es observada a 2.2 Å aproximadamente. Existen tres tipos diferentes de lacasa (I, II Y III) cada una presenta una oxidación diferente respecto a un sustrato, así como diferente potencial rédox. Las lacasas actúan a un óptimo pH de 3.0 y 5.7, sin embargo, para algunas lacasas de basidiomicetos el óptimo pH es de 7.0. El intervalo térmico de enzima es de 25-55 °C, sin embargo algunas lacasas son termotolerantes hasta 75 °C, como es el caso de las sintetizadas por *Marasmiusquercophilus*, especie degradadora de hojarasca (Dedeyan, 2000).

En el mecanismo de acción de la enzima están involucrados tres pasos principales (Figura 46). Inicialmente el Cu tipo I es reducido por la acción de sustrato reductor, el cual se oxida posteriormente. Después, el electrón se transfiere internamente de Cu tipo I a más de 13 Å a través de una vía tri-nuclear Cys-His formado por los átomos Cu tipo II y Cu tipo III. La molécula de oxígeno se une al centro trinuclear para una activación asimétrica a través del sitio de unión al sustrato situado cerca del ligando His del centro del Cu tipo I. Durante el estado estacionario del proceso, no se detecta H₂O₂ fuera de la enzima, lo que indica que la reducción de los cuatro electrones del oxígeno molecular (O₂) a agua (H₂O) ha ocurrido. En el mecanismo de reacción de las lacasas, es común oxidar el compuesto fenólico, dando lugar a un radical ariloxi, esta especie activa puede ser convertida en quinona, en una segunda etapa de oxidación. La quinona, así como el producto de radicales libres sufren reacciones de acoplamiento no enzimática que pueden conducir a la polimerización (Kunamneni *et al.*, 2007).

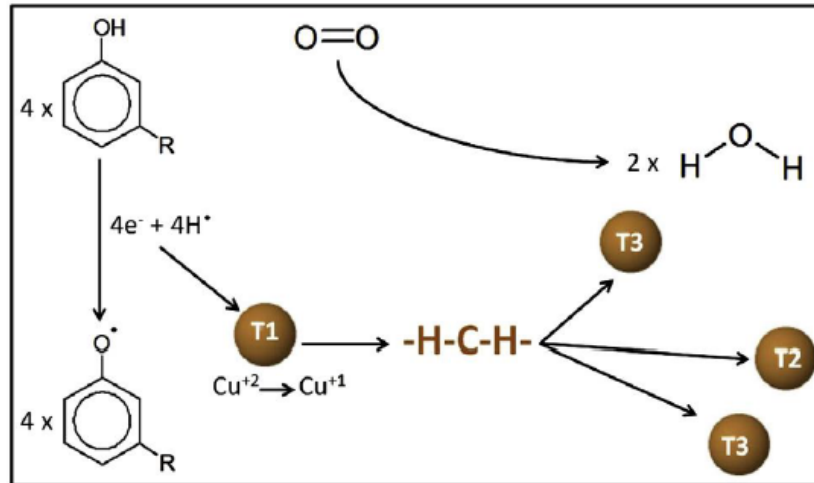


Figura 46. Mecanismo de oxidación de la enzima lacasa

Majeau et al (2010) y Durán et al (2002), describieron las características de las enzimas lacasas que han sido utilizadas en diferentes estudios de investigación; así mismo se describen sus aplicaciones, condiciones de cultivo y factores que afectan la actividad entre otras cosas.

La enzima lacasa está ampliamente distribuidas en plantas, hongos y en algunas cepas bacterianas como *Azospirillum lipoferum* y *Alteromonas sp.* Entre las especies de *basidiomicetes*, *Trametes sp.* es por mucho la especie más estudiada en la producción de lacasa, con *Trametes versicolor* como organismo modelo. Así mismo, otras especies que se han utilizado para el estudio de la lacasas son: *Trametes pubescens*, *T. troglil*, *T. hirsuta*, *Pycoporus cinnabarinus*, *P. sanguineus* y *Pestalotiopsis sp*, las cuales se han producido en medios sintéticos; también se tienen especies que se ha producido en aguas residuales y residuos sólidos, entre estos se tienen: *Pyconoporus sanguineus*, *Pleurotus dryinus*, *Trametes hirsuta*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus sajorcaju*, *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor*, *Panus tigrinus*, *Fomes sclerodermus*, *Ganoderma adspersum*, *fellinus robustus* y *Pleurotus pulmonarius*.

La estabilidad de las lacasas es usualmente alta a un pH ácido, pero la temperatura óptima varía considerablemente entre enzimas, cuando se tienen diferentes fuentes de carbono y

medios. Los valores típicos de punto isoeléctrico, temperatura óptima y pH son de 3.9 55°C y 3, respectivamente. Adicionalmente, otro factor que modifica la actividad es la concentración de O₂; así mismo, la concentración de enzima puede cambiar las propiedades del sitio activo, por ejemplo que todos los átomos de cobre estén completamente reducidos Cu (I).

Se caracterizan por tener baja especificidad por el sustrato, provocando una amplia capacidad catalítica para diferentes tipos de sustratos; dentro de los sustratos más comunes para la enzima son:

- Difenoles
- Hidroquinonas
- Catecol
- Guayacol
- 2.,6 dimetoxifenol
- Polifenoles sustituidos
- Aminas aromáticas.
-

La mayoría de las lacasas son relativamente estables a través del tiempo; sin embargo, para aplicaciones industriales es necesario mejorar la estabilidad; la proporción de diferentes isomorfos de lacasas que se producen dependen de la edad del cultivo y tipo de sustrato. Puede haber combinaciones de isoenzimas que se expresan en medios con diferente composición en presencia o ausencia de inductores.

La actividad catalítica es medida con sustratos relativamente susceptibles a la acción de la lacasa, tales como 3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico (ABTS) ,2.6-dimetoxifenol, siringaldazina o guayacol. ABTS es, con mucho, el sustrato más utilizado, ya que no forman quinonas y no es dependiente del pH; por esta razón este compuesto se utiliza internacionalmente para calcular la actividad de la lacasa.

El intervalo de potencial estándar de óxido-reducción para la actividad de las lacasas está usualmente entre 0.5-0.8 V, los cuáles no son lo suficientemente altos para la oxidación de varios compuestos xenobióticos. El uso de mediadores sirve para aumentar la reactividad de la lacasa para otros compuestos orgánicos de difícil degradación. Los mediadores son moléculas pequeñas fácilmente oxidables que actúan como intermediarios redox entre el sitio activo de la enzima y el sustrato no fenólico, haciendo interesante el uso de mediadores para la disminución de la toxicidad de efluentes industriales. Los alcoholes bencílicos o moléculas con alto potencial de óxido-reducción o estéricamente afectados, son buenos candidatos para actuar como mediadores para las lacasas.

Dentro de los compuestos que sirven como fuente de carbono, por dar a la lacasa una actividad alta, los más comunes son glucosa, manitol y celobiosa; en comparación con celulosa y lactosa que asimilan lentamente. Sin embargo, dependiendo de la especie y condiciones de experimentación, la actividad de la lacasa puede variar con respecto a la concentración y tipo de sustrato. En algunos casos la actividad aumenta con respecto al aumento de la concentración, pero puede haber inhibición por sustrato a concentraciones mayores a 10/l para *T. versicolor*. También se ha observado que si encuentra la especie estresada por baja concentración de sustrato (glucosa principalmente) pueden mantener e incluso aumentar la producción de lacasa.

Para la producción de lacasa, el nitrógeno como fuente de carbono es muy importante, donde una alta concentración favorece la producción de lacasa; dentro de los compuestos utilizados como fuente de nitrógeno se encuentra la triptona y peptona.

Dentro de la experiencia del uso de la lacasa para sistemas de tratamiento de aguas residuales, se ha utilizado para compuestos fenólicos y algunos xenobióticos, los cuales son: 1) enzima libre purificada, 2) Enzima purificada inmovilizada, 3) enzima obtenida directamente de caldos de cultivo y 4) remoción de compuestos mediante reactores utilizando enzimas libre o inmovilizadas.

El compuesto más común presente en aguas residuales que inhiben la actividad de la lacasa, es el Hg^{2+} el cual provoca una desactivación irreversible; el cobre y hierro también pueden provocar inhibición si las concentraciones son elevadas.

Los tratamientos convencionales para remoción de contaminantes en aguas residuales, han sido diseñado para eliminar contaminantes comunes; esta eliminación se evalúa a partir de parámetros: como DBO_5 , DQO, nitrógeno total, fósforo total, sólidos suspendidos, grasas y aceites y metales pesados. Sin embargo el tren de plantas de tratamiento convencional, no considera compuestos orgánicos refractarios que son de difícil degradación microbológica.

Manganeso Peroxidasa

El Manganeso peroxidasa es una hemoproteína glicosilada producidas por hongos basidiomicetos principalmente y requiere H_2O_2 para su actividad, fue descubierta en *P. chrysosporium* hace más de 20 años. Hasta la fecha se ha encontrados que los hongos de pudrición blanca y otros basidiomicetos lignolíticos son los únicos organismos capaces de producir MnP. Su peso molecular oscila entre 38 y 62 KDa, actualmente se han descrito once isocoras de MnP, estas isocoras pueden encontrarse en la misma especie fúngica, como es el caso de *Ceriporiopsis subvermispora* (Chan Cupul, 2014). El potencial redox de la MnP es menor que la LiP y normalmente no oxidan modelos de lignina no fenólico. MnP muestra una fuerte preferencia por Mn (III) como su sustrato reducido.

El ciclo catalítico de MnP (Figura 47) es iniciado por la adición del H_2O_2 a la enzima férrica formando un complejo ion-peróxido. Posteriormente, ocurre un acoplamiento con un enlace oxígeno-oxígeno que requiere transferir dos electrones hemo, resultando así la formación del complejo MnP I, el cual es un complejo Fe^{4+} -oxoporfirina-radical. Después, la unión dióxigeno se rompe heterolíticamente y una molécula de agua es expulsada. La posterior reducción procede a través del complejo MnP II. Un ion monoquelado Mn^{2+} actúa como un electrón donador para esa profirina intermediaria y lo oxida Mn^{3+} . La reducción del complejo II pasa por una vía similar y otro Mn^{3+} es reducido a Mn^{2+} , lo que conduce a la generación nativa de la enzima y la liberación de otra molécula de agua (Hatakka, 2001).

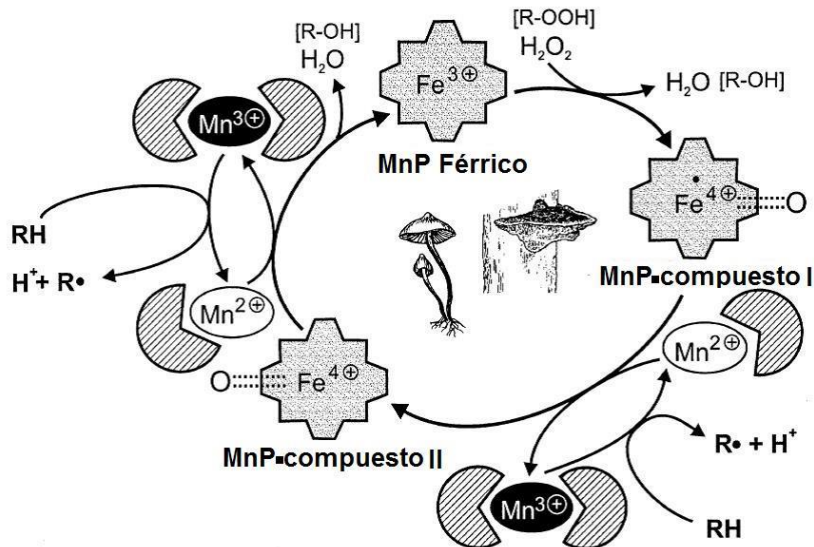


Figura 47. Ciclo catalítico de MnP

Lignina Peroxidasa

La lignina peroxidasa (LiP), es una de las enzimas más importante implicada en la degradación de la lignina. Fue descubierta desde 1983. Desde entonces, esta enzima se ha encontrada en una amplia variedad de organismos, incluidos los hongos de la podredumbre parda, hongos de pudrición blanda y bacterias filamentosas. La LiP es una oligomanosa del tipo glicoproteína con un peso molecular en el intervalo de 38 kDa a 43 kDa (Schmidt *et al.* 1990). El potencial redox de la LiP es relativamente alto, por lo que los compuestos con alto potencial redox que no se oxidan por otras enzimas también se oxidan por LiP. Es esta particularidad que hace que sea una enzima importante en la degradación de la lignina. Esta enzima puede oxidar tanto compuestos fenólicos como no fenólicos.

Esta hemoperoxidasa, requiere H_2O_2 (Figura 48). La enzima es oxidada por el H_2O_2 y genera el compuesto I como radical libre. El compuesto I puede oxidar a otra molécula y reduce la forma el radica libre compuesto II. El compuesto II oxida nuevamente otra molécula orgánica regresando a la LiP a su forma nativa. Cuando hay un exceso de H_2O_2 , la LiP en su forma compuesto II, produce un complejo (compuesto III), que es una forma inactiva de la enzima. En muchos casos, los sustratos no son directamente accesibles a LiP y la oxidación del

sustrato no se produce de este modo directo. En tales casos, la participación de mediador redox juega un papel importante. Alcohol veratrílico es un excelente sustrato la LiP y que actúa como el mediador redox para la oxidación indirecta de otros sustratos. Alcohol veratrílico estimula la oxidación evitando la inactivación de la enzima

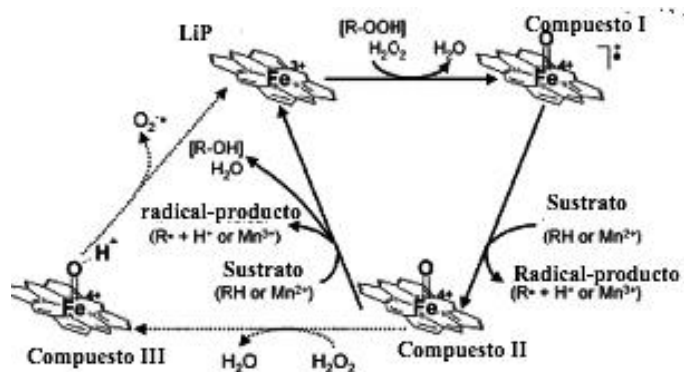


Figura 48. Mecanismo de oxidación de la enzima LiP

Procesos de Oxidación Avanzada

Los POA se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los compuestos recalcitrantes. Para mineralizar la materia orgánica, estos procesos involucran la generación y uso de especies altamente oxidantes como el radical hidroxilo (OH[•]); en algunos casos, recurren a otros compuestos químicos para mineralizar la materia orgánica (p.ej. persulfatos, cloratos). El radical (OH[•]) cuenta con un alto potencial redox estándar, lo que favorece termodinámicamente la oxidación de compuestos orgánicos en comparación con otros agentes oxidantes tales como oxígeno u ozono. En la tabla 23 se muestran los potenciales estándares de oxidación de oxidantes químicos comúnmente utilizados en la industria.

Tabla 23. Potenciales redox de algunos agentes oxidantes

Especie	E ₀ (V, 25 °C)
Fluor	3.03
Radicales Hidroxilo	2.80
Oxígeno atómico	2.42
Ozono	2.07
Peróxido de Hidrógeno	1.78
Radical perhidróxilo	1.70
Permanganato	1.68
Dióxido de cloro	1.57
Acido hipocloroso	1.49
Cloro	1.36
Bromo	1.09
Yodo	0.54

La especie OH[•] posee propiedades adecuadas para atacar todos los compuestos orgánicos, reaccionando más rápido que los oxidantes alternativos, como el O₃. A continuación se presenta una tabla (tabla 24) comparativa de la velocidad con que se logra la oxidación de diferentes compuestos, en presencia del ion hidroxilo y de ozono. Estos compuestos según las referencias antes mencionadas están presentes en los efluentes de la industria farmacéutica.

Tabla 24. Constantes de velocidad de remoción (k en L mol⁻¹ s⁻¹) del radical hidroxilo en comparación con el ozono para algunos compuestos orgánicos (Teel *et al.* 2001).

Compuesto	HO [•]	O ₃
Alquenos clorados	10 ⁹ - 10 ¹¹	10 ¹ -10 ³
Fenoles	10 ⁹ -10 ¹⁰	10 ¹ -10 ³
Aromáticos	10 ⁸ -10 ¹⁰	10 ³
Cetonas	10 ⁹ -10 ¹⁰	1-10 ²
Alcoholes	10 ⁸ -10 ⁹	10 ⁻² -1
Alcanos	10 ⁶ -10 ⁹	10 ⁻²

Dentro de las ventajas que menciona Juárez (2008) que tienen las TAOs, se encuentran:

- Transformación del contaminante, sin generar residuos peligrosos que necesitan confinamiento.

- Mineralización completa
- Usualmente no generan lodos, que al igual que los residuos necesitan una disposición correcta.
- Útiles para compuestos refractarios que persisten en tratamientos biológicos.
- Tratan contaminantes presentes en aguas residuales a bajas concentraciones (ppb).
- No se forman subproductos de reacción.
- Comúnmente mejoran las propiedades organolépticas del agua.
- Bajo consumo de energía
- Transforman parcialmente los compuestos recalcitrantes a compuestos de fácil asimilación microbológica.
- Eliminan efectos sobre la salud de desinfectantes y oxidantes residuales como el cloro.

Incineración Electroquímica

Como se mencionó anteriormente, la oxidación electroquímica es una POA que degrada la materia orgánica mediante la generación de especies químicas oxidantes como: OH^\cdot , ClO^\cdot ; H_2O_2 . Este mecanismo de oxidación, se conoce también como incineración electroquímica, el cual consiste en aplicar una corriente utilizando un electrodo en específico, en el cual se generará el compuesto oxidante. En la tabla 25 se muestra los diferentes tipos de electrodos utilizados en diferentes investigaciones, ventajas y desventajas.

Tabla 25. Ventajas y desventajas de reactores electroquímicos con diferentes materiales de electrodos

Tipo	Usos	Ventajas	Desventajas	Referencia
Pt	Tratamiento de aguas que contienen colorantes	Eficaz en la oxidación de colorantes	Vida útil corta	Dogan y Turkdemir, (2005)
IrO₂	Tratamiento de aguas Oxidación de ácido fórmico.	Mineraliza ácido fórmico	La oxidación es selectiva	Comninellis (1994) (Eloy, 2008)ku
PbO₂	Tratamiento de aguas que contienen fenoles	Permite la oxidación de fenoles	Libera iones tóxicos	Correa <i>et al.</i> (1997), Kirk <i>et al.</i> (1985), Feng <i>et al.</i> (1995), Polcaro <i>et al.</i> (1999)
SnO₂	Tratamiento de aguas que contienen fenoles. Tratamiento de aguas que contienen colorantes	Es un mejor electrodo que los de Pt, grafito y PbO ₂ . Su eficiencia es aproximadamente 5 veces mayor que la del electrodo de Pt.	Vida útil limitada. Alta resistividad a temperatura ambiente. No es eficiente con varios colorantes.	Correa <i>et al.</i> (1997), Cossu <i>et al.</i> (1998), Kotz <i>et al.</i> (1991), Stucki <i>et al.</i> (1999), Comninellis <i>et al.</i> (1992)
Ánodo BDD	Contaminantes orgánicos Compuestos aromáticos Ac. carboxílicos Herbicidas Poli acrilatos Surfactantes Ácido Benzoico Naftol Hidrofenol Colorantes y Acido fórmico	Alta estabilidad electroquímica. Largo tiempo de vida útil. Alta eficiencia faradaica. Alta eficiencia de remoción. Favorecen la formación de radicales OH.	Costo elevado	Gandini <i>et al.</i> (2000), Gandini <i>et al.</i> (1999), Comninellis (1992), Bellagamba <i>et al.</i> (2002), Perret <i>et al.</i> (1999), Panizza <i>et al.</i> (2001), Montilla <i>et al.</i> (2002), Canizares <i>et al.</i> (2004), Butrón <i>et al.</i> (2007)

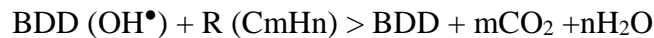
Los electrodos del tipo BDD han mostrado que al aplicar una corriente continua, tienen un mejor desempeño en la incineración electroquímica de contaminantes (Michaud *et al.* 2003), debido a que la mineralización es inducida por grandes cantidades de radicales hidroxilo (OH•). Los radicales OH• tienen propiedades únicas y permiten oxidar a los contaminantes hasta CO₂ sin utilización de reactivos químicos ni generación de lodos.

Dentro de las ventajas del electrodo BDD, con respecto a otros electrodos se tienen (Panizza y Cerisola, 2005; Nars et al, 2009):

- Puede operar en un intervalo amplio de valor de potencial en medios acuosos y no acuosos. La evolución del hidrógeno (-1.25 V) y la del oxígeno (2.3 V) se llevan a cabo a potenciales tales que se disminuye la formación de impurezas
- Estable a la corrosión en medios agresivos.
- Superficie inerte con baja capacidad de adsorción.
- Resistente a la desactivación de sus propiedades.
- Baja capacitancia de la doble capa en la interface hasta un orden de magnitud menor con respecto a la de carbón vítreo.
- Exhiben un alta estabilidad mecánica y química
- Es una nueva tecnología avanzada de oxidación el cual tiene ventajas con respecto a las otras tecnologías incluyendo las fotoquímicas

De los trabajos que se han realizado para el estudio de la degradación de compuestos recalcitrantes, se han identificado características generales tanto de las propiedades de los electrodos de BDD, mecanismos de reacción y metodologías de estudio para caracterizar su eficiencia y eficacia. A continuación se describen estos aspectos reportados por Panizza y Cerisola (2005), Cominellis (2002), Cañizares *et al.* (2005), Buitrón *et al.* (2007).

Cominellis propone un mecanismo para la oxidación de compuestos orgánicos, utilizando electrodos de BDD, el cual asume que la oxidación de los compuestos orgánicos y la evolución del oxígeno suceden simultáneamente, vía generación de radicales OH•:



La mineralización utilizando electrodos BDD se lleva a cabo por difusión de los contaminantes hacia la superficie del electrodo. Se ha observado que la eficiencia de corriente se ve favorecida cuando los coeficientes de transferencia son altos, en concentraciones altas de compuestos orgánicos y baja densidad de corriente.

Para altas concentraciones de materia orgánica y bajas densidades de corriente, la DQO decrece linealmente y la eficiencia de corriente instantánea (ICE) permanece al 100% indicando que el proceso está controlado por la cinética; mientras que a bajas concentraciones de materia orgánica o altas densidades de corriente, la DQO decrece exponencialmente y la ICE empieza a disminuir debido a limitación de transporte de masa y reacción secundaria del oxígeno.

Para describir los fenómenos antes mencionados, Panizza y Cerisola (2005) mencionan el modelo que se ha desarrollado por varios autores que permiten predecir el comportamiento de la DQO y las eficiencias de corriente para combustión electroquímica de compuestos orgánicos utilizando electrodos de BDD; además de poder calcular el consumo de energía eléctrica durante el proceso. La siguiente relación fue establecida con base a la estimación de la limitación de densidad de corriente de los valores de DQO:

$$i_{lim} = 4Fk_n DQO$$

Donde

i_{lin} = densidad de corriente límite (A/m^2) en el tiempo t

4 = número de electrones transferidos por mol de oxígeno

F = constante de Faraday (96,484.55 Coulomb / mol)

k_n = Coeficiente de transporte promedio en la celda electroquímica (m/s)

DQO = Demanda química de oxígeno (mol de oxígeno/ m^3) al tiempo t

Dependiendo de la densidad de corriente aplicada (i_{appl}) con respecto a la densidad de corriente límite, la cual decrece durante el tratamiento, se identifican dos tipos de régimen de operación:

- $i_{appl} < i_{lin}$, la concentración de compuestos orgánicos es suficiente y la electrólisis está bajo la corriente límite de control, la eficiencia de corriente es de 100% y la DQO decrece linealmente en el tiempo.
- $i_{appl} > i_{lin}$, la electrólisis se lleva a cabo por arriba de la corriente límite de control, la reacciones secundarias comienzan con la evolución del oxígeno, provocando un decremento en la eficiencia de la corriente.

Adicionalmente, a la mineralización a partir de la generación de radicales OH^\bullet , se pueden oxidar compuestos orgánicos por los mismos intermediarios electrogenerados en el ánodo de BDD. Para considerar la oxidación por este mecanismo, Panizza y Cerisola (2005) describen los modelos propuestos, los cuales consisten en dividir el reactor electroquímico en dos zonas. La primera zona, cercana a la superficie del ánodo, con un espesor equivalente a la capa de difusión de Nernst, donde las reacciones de oxidación por radicales hidroxilo son las que se llevan a cabo; y la segunda zona es el resto del reactor (seno del líquido) donde la oxidación está mediada por compuestos inorgánicos producidos en el ánodo.

Para obtener altas eficiencias faradaicas, es importante la tasa de transferencia de masa del reactante hacia la superficie del electrodo, los datos típicos para obtener eficiencias faradaicas del 100%, son un coeficiente de transferencia de masa del orden 10^{-4} m/s y una densidad de corriente de 15 mA/cm².

Cañizares *et al.* (2005) utilizan el método de DQO para determinar la eficiencia de corriente promedio.

$$ACE = \frac{[DQO_i - DQO_t]FV}{8It}$$

Donde:

ACE= Eficiencia de corriente promedio

DQOi =concentración inicial de DQO (g/dm³)

DQOt= concentración de DQO al tiempo t

F = constante de Faraday

V= volumen de reacción (dm³)

8= factor adimensional para consistencia de unidades (3g de Oxígeno/4 moles de electrones)

I=intensidad de corriente (A)

t= tiempo

Otros autores manejan esta expresión como eficiencia de corriente integral (Butrón et al, 2007), en estudios de desaparición de color.

$$\varphi = \frac{4FV[DQO_i - DQO_t]}{It}$$

Así mismo, la eficiencia de corriente instantánea (ICE) utilizan la siguiente expresión

$$ICE = \frac{[DQO_t - DQO_{t+\Delta t}]FV}{8I\Delta t}$$

DQOt= concentración de DQO al tiempo t

DQO_{t+Δt} = concentración de DQO a la medición posterior de t

Δt = tiempo transcurrido entre cada medición de DQO

Para la fase uno de oxidación se obtiene con el siguiente ejemplo:

Si DQO_t es mayor que la DQO_{limtm} , entonces el ICE (t) es igual a uno, donde DQO_{limtm} es el la DQO del límite de transferencia de masa

Si $DQO(t)$ es mucho menor que la DQO_{limtm} , entonces el ICE (t) es igual al $DQO(t)$ entre DQO_{limtm} , donde la DQO_{limtm} es igual a J_{apl} entre $4Fk_m$.

Para un sistema típico, el balance de masa del sistema de reacción se puede obtener por la siguiente expresión

$$V_r \frac{dC}{dt} = -\frac{i}{4F} ICE(t)$$

Para modelar la oxidación electroquímica por compuestos generados en el ánodo de BDD, se utilizan ecuaciones de primer orden, en donde se incluye la contribución de los otros compuestos inorgánicos (incluida en el parámetro empírico $DQO_{efect\ limit}$), tales como persulfatos, peróxido de hidrógeno; por lo que será necesario considerar la velocidad volumétrica global de reacción de degradación de los compuestos orgánicos considerada por la siguiente expresión:

$$r = kDQO(t)$$

Donde k es la constante de oxidación química.

El parámetro $DQO_{efect\ limit}$ puede ser calculado mediante el procedimiento de ajuste matemático y no del coeficiente de transferencia de masa. Este significado físico es el valor efectivo de DQO al cual el ICE disminuye linealmente con la DQO.

Cuando la eficiencia de corriente no está fuertemente influenciada por la densidad de corriente en el intervalo estudiado y puede haber parámetros que afectan el desarrollo del proceso, el perfil de ICE contra DQO muestra que a diferentes densidades de corriente existe una oxidación significativa por compuestos inorgánicos y es en mayor proporción que los mecanismos de oxidación directa.

En la oxidación química, la tasa de oxidación máxima es fijada por la corriente, y la cantidad de oxidantes generados deben depender de estos parámetros, así como la eficiencia de oxidación del compuesto oxidable principal.

Para calcular el consumo de energía por la electrólisis se obtiene con la siguiente expresión (Butrón et al, 2007).

$$E_c = \frac{4FE_{cell}}{\varphi V} * \frac{1}{3.6}$$

Donde:

E_{cell} = El potencial de la celda en watts

V = volumen molar (ml/mol)

3.6= factor de corrección de E_c a unidad de KWh/m³

Otro parámetro a considerar para la degradación de compuestos recalcitrantes es la turbulencia, Nava et al (2007), observaron que al aumentar el número de Reynolds en reactores aumenta la remoción en compuestos orgánicos; no obstante, la dependencia de la degradación con respecto a la turbulencia es diferente para cada tipo de compuesto orgánico a degradar.

Se han realizado diversos estudios de electro incineración, para remover contaminantes recalcitrantes con diferentes tipos de electrodos, obteniendo altos % de remoción y bajos tiempos de retención hidráulica; en algunos casos se han logrado 100% de eliminación de DQO, es decir una mineralización completa de estos compuestos. Sin embargo, esta tecnología presenta una desventaja cuando existe presencia del ion cloruro; ya que se produce hipoclorito, el cual es muy oxidante y puede dañar la flora y fauna nativa de un cuerpo de agua. En la tabla 26, se muestra un cuadro comparativo de diversos estudios realizados degradar varios compuestos mediante electro incineración.

Tabla 26. Estudios de remoción de compuestos recalcitrantes mediante reactores electroquímicos con diferentes electrodos

Contaminante	Electrodo	η (%)	Eficiencia Faradaica	Referencia
colorante azul índigo	BDD	100	>100	Butrón <i>et al.</i> 2007
	Pt	60	No se reporta	Dogan y Turkdemir, 2005.
Fenol	Ti/SnO ₂ -Sb ₂ O ₅	71	58	Comninellis,1992.
	BDD	90-97	18.9 -47.7	Fryda <i>et al.</i> 1999 Iniesta <i>et al.</i> 2001 Cañizares <i>et al.</i> 2005
Nitrato de amonio	BDD	90	>50	Tenne <i>et al.</i> 1999.
Cianuro	BDD	No se indica	>50	Perret <i>et al.</i> 1999.
Ac. carboxílicos	BDD	100	>50	Gandini <i>et al.</i> 2000
3-metilpiridina	BDD	No se indica	>50	Montilla <i>et al.</i> 2002
2-naftol	BDD	No se indica	>50	Panizza <i>et al.</i> 2001.
4-clorofenol	BDD	No se indica	>50	Rodrigo <i>et al.</i> 2001.
Acido benzoico	BDD	No se indica	>50	Montilla <i>et al.</i> 2002
Poliacrilatos	BDD	No se indica	>50	Bellagamba <i>et al.</i> 2002.
Colorantes	BDD	80-98	>50	Chen et al, 2003. Cañizares <i>et al.</i> 2006.
2,4-dinitrofenol	BDD	100	No se reporta	Cañizares <i>et al.</i> 2004.

ANEXO 2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Soluciones para DQO

Solución de dicromato de potasio

Se pesó en una balanza analítica (Precisa XR305A) 10,216 g de dicromato de potasio Grado USP, Sigma, USA) que previamente fue secado a 103°C por 2 horas en una estufa (Rorstshaw-16M), se añadió a 500 mL de agua y se adicionó 167 mL de ácido sulfúrico concentrado (Grado reactivo, JT Baker, USA) junto a 33,3g de sulfato mercúrico Grado USP, Sigma, USA). Se disolvió y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Por último se aforó a 1 L con agua.

Solución de sulfato de plata en ácido sulfúrico.

Se pesó en una balanza analítica (Precisa XR305A) 15 g de sulfato de plata (Grado reactivo, JT Baker, USA) y se disolvió en 1 L de ácido sulfúrico concentrado (Grado reactivo, JT Baker, USA) y se dejó reposar durante dos días para su completa disolución en la oscuridad.

Determinación de la DQO. (El procedimiento se realizó conforme al procedimiento descrito en la norma NMX-AA-030-SCFI-2001)

Se Tomó cuidadosamente 2,5 ml de muestra previamente homogenizada dentro de los tubos de reacción, después se añadió cuidadosamente 1.5 de la solución de dicromato de potasio para DQO y se adicionó 3,5 ml de la solución de ácido sulfúrico para DQO, se taparon los tubos reactivos y se agitaron hasta homogenizar; una vez homogenizados se colocaron los tubos en el digestor (Lab-lineinstrument-179130) durante dos horas previamente calentado a 150 °C y. Finalmente se retiraron los tubos del digestor y se esperó a que enfriaran a temperatura ambiente; posteriormente se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (HACH-BR-500).

Sólidos suspendidos volátiles. (Se determinaron conforme a la norma NMX-AA-034/2008)

Se Puso a peso constante los crisoles tipo gooch con un filtro de 0.24 mm. Se tomó una alícuota de 5 ml de los efluentes del reactor y se filtró al vacío con el crisol.; se colocaron los crisoles en una estufa (Rorstshaw-16M) a 105 °C durante 2 horas, después de las 2 horas colocaron los crisoles en un desecador y se pesaron; una vez pesados los crisoles se colocaron en una mufla (Fornace-62700) a 550 °C durante 40 min, se colocaron los crisoles nuevamente en el desecador y se pesaron.

ANEXO 3. ANÁLISIS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

La extracción de DNA de las cepas que se aislaron de los diferentes reactores de lodos activados, permitiendo tipificar a los microorganismos de los tres reactores mediante la secuenciación del gen 16SrRNA en su región variable V6-V8, que fueron sometidos a tres diferentes condiciones de alimentación:

R1= Alimentado con ARS (reactor de referencia)

R2= alimentado con ARS+ fármacos y

R3= alimentado con ARS+fármacos previamente tratado con enzima comercial Biolite

La extracción del DNA de las cepas aisladas se llevó a cabo con el kit de extracción de DNA WIZARD de Promega en los siguientes pasos como lo indica el manual de extracción del kit.

- Se adicionó 1 mL de muestra de lodos activados a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL
- Se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante
- Se re suspendieron el lodo activado en 480 µl de solución EDTA al 50 mM

-
- Se adicionó 60 μl de solución de lisozima a 10 mg mL^{-1} y se mezcló vigorosamente
 - Se incubó la muestra a 37° C durante 45 min, se centrifugó por 2 min a 13,000 rpm y se removió el sobrenadante.
 - Se adicionó 600 μl de solución de lisis nuclear, se agita la muestra.
 - Posteriormente se incubó a 80 ° C por 5 min, y se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente.
 - Después se adicionó 3 μl de solución de RNAasa (4 mg mL^{-1}), al lisado celular mezclar invirtiendo el tubo
 - Se Incubó a 37° C durante 45 min y se enfrió a temperatura ambiente.
 - Se adicionó 200 μl de solución de precipitación de proteínas a la solución que contiene el lisado celular con la RNAasa, se mezcló vigorosamente a alta velocidad durante 20 seg.
 - Posteriormente, se incubó la muestra en hielo durante 5 min.
 - A continuación se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min.
 - En seguida se transfirió el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL que contenga 600 μl de isopropanol.
 - Después la muestra se mezcló, hasta la aparición de la masa visible de DNA.
 - El DNA se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min.
 - Se decantó el sobrenadante y se adicionó 600 μl de etanol al 70 % a temperatura ambiente y se mezcló invirtiendo el tubo para lavar el DNA
 - Nuevamente se centrifugó la muestra a 13,000 rpm durante 2 min y se retiró el etanol.
 - Después de secó el tubo con papel absorbente y dejar secar el DNA en una corriente de aire durante 15 min
 - Y a continuación se adicionó 100 μl de solución de rehidratación de DNA, se

dejó incubar a 65 ° C la muestra por una noche a 4° C.

- Finalmente, se comprobó la presencia de DNA mediante la visualización en gel de agarosa al 1 %.

El procedimiento inició con el pesado de 0.25 g de agarosa y se adicionó 25 mL de solución TAE, para obtener una concentración del 1% p/v, se calentó en microondas hasta disolución de la agarosa, se dejó enfriar y se adiciono 1 µl de solución de bromuro de etidio (10 mg/ml), que se homogenizó antes de vaciar en el recipiente el gel, se colocó el peine en el gel y se esperaron 20 min. hasta que solidificó el gel y se retiró el peine. En la cámara de electroforesis se adicionó amortiguador TAE (1x) hasta que el gel quedó cubierto. Para depositar las muestras en el gel se mezclaron 1 µl de amortiguador de carga y 5 µl de la muestra, y se pusieron dentro del carril en el gel. Para determinar el tamaño de las muestras se colocó 3 µl del marcador de peso molecular más 1 µl del amortiguador de carga. Finalmente para el corrimiento de las muestras se conectó la fuente de poder ajustada a 100 V por 15 min y se visualizó el gel con un transiluminador de UV.

La amplificación exponencial del DNA por PCR, permitió obtener una cantidad suficiente de muestra para poder llevar a cabo los análisis subsecuentes. Para la amplificación fue del gen del 16S rRNA en su región variable V6-V8, se utilizaron los siguientes iniciadores de reacción (primers):

8 for 5' AGACTTTGATCMTGGCTCAG 3'

1492 rev 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

La mezcla de reacción se llevó a cabo en viables de 100 µL, con un volumen de reacción neto de 25 µl, la concentración final utilizada de la enzima *Taq* polimerasa fue de 1 U µl⁻¹, los volúmenes ocupados para cada reactivo se muestran en la siguiente tabla.

Componentes de la reacción	Concentración final	Para 25 μ l de reacción
Agua MQ	Variable	17.30 μ l
Amortiguador 10x	1 x	2.50 μ l
MgCl ₂	1.5 mM	1.50 μ l
dNTP's	10 mM de cada dNTP	0.5 μ l
Iniciador 8 for	6.6 pmol μ l ⁻¹	1.0 μ l
Iniciador 1492 rev	6.6 pmol μ l ⁻¹	1.0 μ l
<i>Taq</i> polimerasa 5 U/ μ l	1 U μ l ⁻¹	0.2 μ l
DNA molde	0.25 mg/reacción	1 μ l

Se verificaron que las muestras reamplificaran correctamente mediante análisis de imagen con gel de agarosa 1%. Posteriormente, las muestras se llevaron a amplificación por PCR del gen 16SrRNA mediante un termocilador bajo las condiciones mencionadas en la siguiente tabla:

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	30 seg
Alineamiento	52°C	20 seg
Alargamiento	68°C	40 s 35 ciclos del paso 2 al 4
Alargamiento final	68°C	7 min

La técnica de DGGE permitió obtener geles de poliacrilamida con bandas representativas de la región V6-V8 del gen 16S rRNA de los consorcios, asociadas cada una a un

microorganismo diferente en especie y grupo, estos patrones de bandas se analizaron para obtener un estimado de la dinámica de poblaciones en los lodos activados aerobios expuestos a diferentes condiciones de alimentación para evaluar el efecto de los fármacos.

Para llevar a cabo la técnica de DGGE, fue necesario preparar los siguientes reactivos:

1. Amortiguador TAE 50x

Pesar 242 g de Tris base, agregar aproximadamente 500 mL de agua destilada, 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M a pH 8 y aforar con agua destilada a 1 L.

2. Solución desnaturalizante 0 %

Mezclar 50 mL de solución acrilamida-bisacrilamida al 40 %, agregar 2.5 mL de amortiguador TAE 50x, adicionar 5 mL de glicerol y aforar a 250 mL de agua destilada.

3. Solución desnaturalizante 100 %

Pesar 105.4 g de urea, agregar 50 mL de solución de acrilamida-bisacrilamida (37.5:1), adicionar 100 mL de formamida y mezclar hasta que se disuelva la urea, agregar 5 mL de amortiguador TAE 50 x, adicionar 5 mL de glicerol y aforar con agua destilada hasta 250 mL.

4. Solución de Carlos 8x para fijar.

Mezclar 200 mL de etanol al 96 %, con 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua destilada.

5. Solución de Carlos de preservación.

Mezclar 50 mL de etanol 96 % con 20 mL de glicerol y 130 mL de agua destilada.

6. Solución para fijar

Se toma 50 mL de solución de Carlos 8x y agregar 350 mL de agua destilada.

7. Solución para la tinción de plata.

Pesar 0.4 g de nitrato de plata y se disuelve en 200 mL de solución para fijar

8. Solución de revelado

Pesar 10 mg de NaBH₄ y adicionar 200 mL de NaOH al 1.5 %, disolver y agregar 750 µl de formaldehído.

9. Solución de persulfato de amonio (APS) al 10 %

10. Amortiguador TAE 1x

Se toman 20 mL de solución TAE 50x y se diluye a 1000 mL con agua destilada

El equipo de DGGE es marca Bio-RAD D. Code (Universal Mutational Detection System)

A continuación se presenta la tabla de los rangos de los porcentajes de desnaturalización, con la cual se hicieron varios geles para probar el rango en el cual visualizábamos la mayor cantidad de bandas posibles, el porcentaje utilizado en este trabajo fue de 42-50%.

% Desnaturalizante	Volumen Final mL	Solución Desnaturalizante 0 % mL	Solución Desnaturalizante 100 % mL	Temed µl	APS µl
0	6	6	-----	6	18
36	12			12	38
38	12			12	38
40	12	7.20	4.8	12	38
42	12	6.95	5.05	12	38
44	12	6.70	5.30	12	38
46	12	6.50	5.50	12	38
48	12	6.25	5.75	12	38
50	12	6.00	6.00	12	38
52	12	5.75	6.25	12	38
54	12	5.50	6.50	12	38
56	12	5.30	6.70	12	38
58	12			12	38

El procedimiento para la preparación del gel se describe a continuación, el proceso involucra la preparación del gel de poliacrilamida con el gradiente desnaturalizante y la carga en los pozos del gel con las muestras.

Para comenzar se limpiaron los vidrios (160 mm de largo y 1 mm de espesor) y los espaciadores con etanol 96 % y agua bidestilada, al concluir la limpieza se pusieron unas gotas de agua bidestilada al gel bond para determinar el lado hidrofóbico, en este lado las gotas corren libremente, este lado se pega al vidrio con agua bidestilada, la parte inferior del gel bond se ajustó a la orilla inferior del vidrio. Se eliminó el exceso de agua que quedó entre el vidrio y el gel bond.

Los espaciadores se colocaron junto con el vidrio pequeño, una vez concluido esto se colocaron los broches de cada lado de los vidrios, se alinearon los vidrios y se puso vaselina en la parte baja de los vidrios y en la banda de goma, los broches se ajustaron con las perillas a la base. Se colocó la manguera de llenado con la aguja en la parte media de los vidrios.

Se prepararon las soluciones de acrilamida-biscarilamida, la solución 0 %, la baja y la alta una vez que las soluciones estuvieron preparadas se colocaron en tubos con hielo, se adicionó y mezcló el Temed (N, N, N, N', N'- tetrametil-etilenodiamonio), mezclándose. Una vez concluido este punto se adicionaron 38 μ l de APS (Persulfato de amonio al 10 %) a la solución alta, se mezcló y se colocó en el primer compartimiento de la cámara de mezclado, asegurándose que las llaves de ambos compartimentos estuvieran cerradas y que la bomba peristáltica estuviera apagada. Lo mismo se repitió para la solución baja adicionándose 38 μ l de APS a la solución baja, se mezcló y se colocó en el segundo compartimiento.

A continuación se prendió la bomba peristáltica y ajustándose a una velocidad baja para evitar un vaciado disparado del gel, las llaves de los dos compartimentos se abrieron al mismo tiempo para tener un mezclado uniforme y formar adecuadamente el gradiente deseado. Cuando los compartimentos se vaciaron se cerraron las llaves se limpió el exceso de gel en la cámara de alta y se colocó la solución 0% adicionándose previamente a esta 18 μ l de APS. Nuevamente se prendió la bomba peristáltica en velocidad baja. Al finalizar la adición de esta solución se colocó el peine, dejando solidificar por 2 horas. Se preparó el amortiguador TAE 1x y se llenó el recipiente del DGGE, se encendió el aparato de DGGE alrededor de 2 horas antes de utilizarlo para alcanzar la temperatura de 60° C.

Las muestras de productos de amplificación de la región de V6-V8 del gen 16S rRNA se prepararon mezclándose con el amortiguador de carga. Por último se colocaron los vidrios con el gel de acrilamida en el recipiente del DGGE, poniendo las muestras preparadas en los carriles del gel y ajustando la fuente de poder a 200V durante 5 min y posteriormente a 85V por 16 horas.

Después del corrimiento de los geles de DGGE se realizó la tinción de los geles para

observar los patrones de bandas invisibles hasta ese momento. La metodología que se utilizó se describe a continuación.

Se retiraron los broches y los vidrios, desprendiendo el gel del vidrio con cuidado de no dañarlo quedando el gel de acrilamida unido al gel bond se colocó el gel en una charola metálica y se agregaron 200 mL de “solución para fijar”, agitándose a 26 rpm durante 3 min, se retiró la solución de fijado almacenándose para su posterior utilización. Al terminar esto se adicionó la “solución de plata” 200 mL y se agitó por 10 min a 26 rpm. El gel y la charola se lavaron con agua bidestilada, se agitó el gel a 26 rpm durante 2 min con agua bidestilada desechando el exceso de plata.

Se colocó el gel en la charola de revelación, adicionándose unos 20 mL de solución de revelación, se enjuagó el gel y se desechó la solución de revelación. Se adicionó el resto de la “solución de revelación” y se agitó a 26 rpm, el tiempo de agitación se prolongó hasta tener una buena observación de las bandas de DNA, desechando la solución de revelación al concluir este tiempo. La solución de fijado recuperada se adicionó, se agitó por 5 min a 26 rpm, al concluir este paso se desechó la solución de fijado y se enjuagó el gel con agua bidestilada por 3 min, se retiró el agua y se colocó la solución de preservación al gel agitándose a 26 rpm por 7 min.

Una vez concluido lo anterior se retiró el gel de la charola y se colocó sobre un vidrio de soporte. Para una mejor preservación se le colocó una hoja de celofán humedecida con la solución de preservación, finalmente se secó el gel a 35 °C por 12 horas.

Finalmente, se realizaron cortes de las bandas representativas de cada tratamiento de los lodos activados en diferentes tiempos de operación, se reamplificó nuevamente con PCR, mediante el procedimiento anteriormente descrito. Las muestras fueron purificadas mediante el procedimiento marcado por el kit Promega. Se verifica presencia y concentración de DNA mediante gel de agarosa al 1%. Las muestras se mandaron a secuenciar a la empresa coreana Macrogen. Los electroferogramas obtenidos a partir de la secuenciación, se compararon con bases de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI) con las cuales se compararon las secuencias obtenidas en la secuenciación. Posteriormente, las secuencias obtenidas de las muestras

de lodos activados se alinearon con las obtenidas con la base de datos con ayuda del software bioinformático, con el software Clustalx se editaron las secuencias para que finalmente con el software MEGA 5.2.2, se obtuvo el dendrograma de las especies presentes en los lodos activados.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00184

Matrícula: 210380771

EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE FÁRMACOS PRESENTES EN AGUA RESIDUAL MEDIANTE DOS PROCESOS COMBINADOS: OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA-LODOS ACTIVADOS Y OXIDACIÓN ENZIMÁTICA-LODOS ACTIVADOS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 11 del mes de mayo del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. OSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO
- DRA. MARIA MAURA MARGARITA TEUTLI LEON
- DR. GERMAN BUITRON MENDEZ
- DR. HUGO CESAR RAMIREZ SAAD



CELESTINO ODIN RODRIGUEZ NAVA
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: CELESTINO ODIN RODRIGUEZ NAVA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. OSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO

VOCAL

DRA. MARIA MAURA MARGARITA TEUTLI LEON

VOCAL

DR. GERMAN BUITRON MENDEZ

SECRETARIO

DR. HUGO CESAR RAMIREZ SAAD