



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE FARMACIA

**BIOTRANSFORMACIÓN Y/O DEGRADACIÓN DE
DICLOFENACO POR HONGOS CON ACTIVIDAD
LIGNOLÍTICA**



POR

CARLA CATALINA LOBOS VARGAS

Trabajo de Fin de Carrera presentado a la Facultad de Farmacia de
la Universidad de Concepción para optar al título profesional de
Química Farmacéutica

Profesor Guía: Dr. José
Becerra Allende
Facultad de Ciencias
Naturales y Oceanográficas

Mayo, 2020

Concepción, Chile

**Profesora
Patrocinante:** Dr.
Berta Schulz Bañares
Facultad de Farmacia

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento. © 2020, Carla Lobos Vargas.



Tabla de contenidos

1. Índice de tablas.....	- 1 -
2. Índice de ilustraciones	- 2 -
3. Resumen	- 3 -
4. Introducción	- 6 -
4.1 Contaminación de aguas	- 6 -
4.2 Fármacos como contaminantes	- 8 -
5. Marco teórico	- 13 -
5.1. Ciclo del medicamento en el medio ambiente.....	- 13 -
5.2 Metabolización de fármacos en el cuerpo humano	- 17 -
5.3 Analgésicos	- 18 -
5.3.1 Diclofenaco	- 18 -
5.4. Bioremediación.....	- 21 -
5.4.1. Hongos con actividad lignolítica	- 22 -
6. Hipótesis.....	- 32 -
7. Objetivo	- 32 -
7.1. Objetivo general	- 32 -
7.2. Objetivos específicos.....	- 32 -
8. Metodología	- 33 -
8.1. Recolección de las especies de <i>Trametes</i>	- 33 -
8.2. Obtención de micelio y cultivo en laboratorio.....	- 33 -
8.2.1 Medios de cultivos en agar	- 35 -
8.2.2 Procedimiento de preparación de medio sólido	- 36 -

8.2.3 Determinación del medio líquido óptimo para trabajar	- 36 -
8.2.4. Traspaso de medio solido a medio liquido.....	- 37 -
8.3. Preparación de la muestra de diclofenaco	- 38 -
8.3.1 Experimentación con diclofenaco	- 38 -
8.4. Tratamiento de muestra.....	- 39 -
8.5. Análisis de muestra por HPLC	- 40 -
8.5.1. Curva de calibración.....	- 40 -
8.5.2 Inyección de las muestras	- 41 -
8.6 Validación del método analítico	- 41 -
8.7. Análisis cromatogramas	- 44 -
9. Resultados y discusión	- 45 -
9.1 Determinación del medio más adecuado para cultivo líquido	- 45 -
9.2 Validación del método analítico	- 47 -
9.3 Curva de calibración y ecuación de la recta de diclofenaco.	- 48 -
9.4 Detección de diclofenaco en medio de cultivo con <i>Trametes</i>	- 49 -
9.5 Determinación del porcentaje de degradación	- 51 -
10. Conclusión	- 55 -
11. Glosario	- 56 -
12. Bibliografía.....	- 58 -
Anexo 1: Tratamiento de aguas residuales y Normativa chilena de agua	- 63 -
Anexo 2: Purificación de la muestra mediante extracción en fase sólida	- 65 -

1. Índice de tablas

Tabla 5.1 Características fisicoquímicas de la sustancia.....-19-

Tabla 9.1 Tabla de medios de cultivos ensayados.....-45-

Tabla 9.2 Valores de diclofenaco detectados y porcentaje de degradación..-52-



2. Índice de ilustraciones

Figura 5.1: Esquema ciclo de medicamentos en el ambiente. Extraído y modificado de Barceló L. López M. (2008).....	- 16 -
Figura 5.2:Estructura de diclofenaco y sus principales metabolitos. Extraído de Wei Tang 2003	- 21 -
Figura 5.3: Ciclo sexual de hongos basidiomicetos (Kuhan F. 2013)	- 25 -
Figura 5.4: Estructura química de lignina.....	- 26 -
Figura 5.5: Ciclo catalítico de lacasa (Wesenberg, 2003)	- 27 -
Figura 5.6: Ciclo catalítico de peroxidasa (Wesenberg, 2003)	- 28 -
Figura 5.7: Imágenes de Trametes versicolor	- 30 -
Figura 5.8: Molécula de diclofenaco y los productos de degradación identificados por RMN. (Extraido de Marco-Urrea 2008)	- 31 -
Figura 8.9: Crecimiento de cultivo en placa a los 7 y 25 días respectivamente-	34
-	
Figura 9.1: Curva de calibración de diclofenaco	- 48 -
Figura 9.2:Detección del diclofenaco por acción de hongos, donde Tv corresponde a Trametes versicolor y Th a Trametes hirsuta.	- 49 -

3.Resumen

Cada día es más preocupante la contaminación del agua, debido a la escasez que existe actualmente de este elemento esencial para la vida. Los contaminantes emergentes son moléculas que llegan al medio ambiente producto de la actividad diaria del humano. En este grupo se encuentra una variada cantidad de moléculas entre las cuales se incluyen los fármacos. Estos llegan a las aguas residuales al ser eliminados del organismo luego de ser administrados o desechados y como residuos de su uso a nivel industrial. Si bien la OMS indica que las concentraciones son tan bajas que no presentarían riesgo alguno para la salud humana, existen estudios que han demostrado que a bajas concentraciones causan alteraciones en animales acuáticos y no acuáticos, llevando incluso a la muerte de algunas especies. Dentro de las posibles soluciones de este invisible pero gran problema se encuentra la bioremediación. Ésta es una tecnología donde se utilizan organismos biológicos completos o partes de ellos para disminuir los contaminantes de un medio. Se ha demostrado que hongos con enzimas capaces de degradar la lignina de la madera pueden degradar diversos contaminantes incluyendo medicamentos. En este estudio se analiza la actividad de dos hongos, *Trametes hirsuta* y *Trametes versicolor* para degradar diclofenaco de un medio acuoso que contenía 0.1 mg/L. Se extrajeron muestras a las 6 y después de las 48 horas de la administración del fármaco en el medio con el hongo. La determinación se realizó por HPLC utilizando un patrón de diclofenaco como estándar. Los resultados obtenidos demostraron que, si bien

Trametes hirsuta presenta actividad para degradar el fármaco, ésta no fue mayor que la de *Trametes versicolor*, lográndose en este último una degradación del 64,7% % a las 48 horas.

Abstract

Water contamination concerns are ever growing due to the current lack of this life-essential element. The emerging contaminants are molecules released to the environment due to daily human activity. These contaminants include a wide variety of molecules, among which pharmaceuticals are found. They reach wastewater when excreted from the organism after being administered and when released as industrial waste. Although the WHO indicates that its concentrations are so low that it would not involve any risk whatsoever for human health, several studies have proven that at low concentrations it could cause alterations in aquatic and non-aquatic animals, resulting even in the death of some species. Among the possible solutions to this invisible but major problem, bioremediation is found. This technology uses whole living organisms or parts of them to reduce the amount of contaminants from a medium. It has been revealed that fungi with enzymes capable of degrading lignin from wood can degrade many contaminants, as drugs. This study shows the activity of two fungi, *Trametes hirsuta* and *Trametes versicolor*, in order to degrade diclofenac in an aqueous medium containing 0,1 mg/L. Samples were extracted after 6 and 48 hours of administering the pharmaceutical in the medium with fungi. The measurement was made by HPLC

using a diclofenac pattern as a standard. The results suggest that, even though *Trametes hirsuta* shows degrading activity, this was not higher than that of *Trametes versicolor*, which reached degradations of 64,7% after 48 hours.



4. Introducción

4.1 Contaminación de aguas

Hoy en día el agua es una preocupación mundial debido a la escasez que existe de este recurso. Esto se debe a diversas causas como las sequias, el fenómeno del cambio climático, el uso indiscriminado de aguas por parte de industrias y empresas de producción a gran escala; además de la gran contaminación que afecta a este recurso fundamental para la vida (ACENUR). Se define como agua contaminada la presencia de sustancias químicas que no pertenecen a su composición original (Raffino M.s,f), dejándola inutilizable para fines agrícolas, recreativos o de consumo humano, debido al posible daño que podría causar en la salud.

La contaminación del agua puede producirse de forma natural o antropogénica, esto significa que es a causa de la actividad humana. El desarrollo industrial, como la industria de refinamiento de petróleo, industrias metalúrgicas, industria papelera, textil y de curtido, genera gran cantidad de residuos al igual que las industrias químicas y farmacéuticas que producen residuos químicos y biológicos (J.P. Rodríguez, 2009). Otras causas de contaminación humana son los vertimientos de la explotación ganadera (estiércol, orina, patógenos, nitrógenos, fosfatos y medicamentos de uso veterinario), las aguas residuales agrícolas que contienen pesticidas, diversos plaguicidas, herbicidas y fertilizantes

inorgánicos, y por último las aguas residuales urbanas como son las aguas servidas.

Existen también contaminantes que se encuentran presentes en el medio ambiente en muy baja concentración, pero no por esto son menos dañinos. Estos contaminantes se conocen como contaminantes emergentes. Son moléculas que antes no se consideraban como contaminantes por su poca presencia en el medio ambiente. Sin embargo, actualmente son de preocupación debido a que son incorporados al medio ambiente producto de la actividad humana diaria. Dentro de esta clasificación, se incluye un gran número de sustancias de diversas características, que causan alteraciones a diferentes organismos en el ecosistema (Barceló, 2008). Entre ellos se encuentran los fármacos y sustancias de productos de cuidado personal como desodorantes, champú y pastas dentales; aditivos industriales, surfactantes, esteroides y hormonas, y también los subproductos de artículos desinfectantes. Estos contaminantes se caracterizan por presentar una alta tasa de transformación y remoción, pero, a su vez, existe una continua reincorporación a las aguas debido a la actividad diaria. Gracias a los nuevos métodos de análisis, se ha podido determinar con mayor exactitud su presencia y su bioacumulación en el ambiente en múltiples fuentes de agua alrededor de todo el mundo.

4.2 Fármacos como contaminantes

El estudio y desarrollo de fármacos siempre busca mejorar la salud y la calidad de vida de las personas. No obstante, hoy en día los medicamentos se han convertido en un problema para el medio ambiente, debido a su presencia en fuentes de aguas residuales, superficiales y subterráneas (Montague, 2006). La primera detección de medicamentos en agua fue realizada en los años 70, pero no fue hasta principio de los 90 cuando se dio real importancia al tema, luego de que se publicaron diversos estudios donde se demostraban concentraciones de fármacos en diversos lugares del mundo (Barceló, 2008).

La gran cantidad de personas que utilizan medicamentos, sumado al amplio uso de fármacos en industrias ganaderas y acuícolas, van incorporando diariamente medicamentos al agua. Además, los procesos de eliminación por parte de las plantas de tratamiento de agua no son eficientes en la remoción de estos compuestos (Doménech, 2007), convirtiendo así a los medicamentos en contaminantes emergentes.

Los grupos terapéuticos detectados con mayor frecuencia en ambiente acuático son los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), antibióticos, diuréticos, antiepilépticos, beta-bloqueadores, reguladores lipídicos, anticonceptivos orales, esteroides y broncodilatadores (Hernando *et al*, 2006). Estos fármacos coinciden con los de mayor venta y uso sin prescripción médica

por la población, como los analgésicos, y los más utilizados en industrias ganaderas y acuícolas como lo son los antibióticos.

Dentro de los fármacos con mayor detección en el mundo, se encuentra, en primer lugar, el diclofenaco, un analgésico detectado en el medio acuático en 50 países del mundo; en segundo lugar, la carbamazepina, un antiepiléptico detectado en 48 países; y, en tercer lugar, el sulfametoxazol e ibuprofeno, antibiótico y AINE respectivamente, detectados en 47 países del mundo (Weber,2014). También se han detectado concentraciones de fármacos en las aguas potables como el ibuprofeno, el diclofenaco, la carbamazepina y el ácido clofíbrico. (Bedner y Maccrehan, 2006).

En Chile existen dos estudios en los cuales se detectaron medicamentos en corrientes de agua. El primero fue realizado en la cuenca del río Bio Bio el año 2012, en el cual se detectaron 17 diferentes fármacos que incluyen AINEs, antibióticos, antiepilépticos, reguladores lipídicos, betabloqueadores y antidepresivos. Las muestras fueron tomadas a lo largo del río en afluentes y efluentes cercanos a las urbes y sus respectivas plantas de tratamiento. Lo más preocupante de este estudio es que se detectaron concentraciones de Sertralina y Paroxetina en la entrada de plantas de tratamientos de agua para consumo humano (Henrriquez D. 2012). El segundo y más reciente estudio fue publicado el año 2019, donde se obtuvieron muestra de agua de grifo, río y pozo de la ciudad de San Antonio, y también muestras de afluentes y efluentes de plantas

de tratamiento de agua en la ciudad de Santiago. Los resultados arrojaron la presencia de seis AINEs, un antibacteriano y una hormona sintética. Este estudio se realizó para implementar un sistema de determinación simultánea de contaminantes emergentes de diferentes clases desde una matriz compleja (Arizmendi D. 2019). Esto demostraría que, al igual que en todo el mundo, las aguas de nuestro país también presentan concentraciones de medicamentos, solo que no se han realizado los estudios pertinentes para proporcionar más datos.

Si bien las concentraciones de fármacos detectadas son bajas, del orden de los microgramos (μg) y nanogramos (ng), se han observado efectos perjudiciales para la salud de diversas especies que se han visto expuestas continuamente a medicamentos. Algunos reportes incluyen fallas importantes en el organismo de animales que pueden llevar a la muerte de la especie como ocurre con el efecto del diclofenaco en buitres. Según el relato de Achucarro Lindon, N. (2017) sería el diclofenaco el responsable del 97% de las muertes de buitres en Asia al causar una falla renal aguda. Esto ocurre porque las aves presentan una lenta eliminación del fármaco y las dosis normales para mamíferos, son mortales para ellas.

Otro caso observado y muy preocupante, es el de la presencia en aguas superficiales de 17α -etinilestradiol, una hormona sintética utilizada ampliamente como anticonceptivo oral. Fármaco que también fue reportado en aguas en el

último estudio realizado en Chile. Se ha observado que la exposición permanente de peces a este estrógeno sintético, inclusive a dosis muy bajas, causa alteraciones en sus órganos reproductivos. Se encontró que a concentraciones de $4 \mu\text{gL}^{-1}$ en peces machos se producen características intersexuales y reducción de la fertilidad, y entre 5 y $6 \mu\text{gL}^{-1}$ se observa el colapso de la población de peces (Gilbert, 2012), esto se explica en una disminución de la población debido a la interrupción de la reproducción de los peces. Se ha logrado determinar que estos son algunos de los efectos causados por la exposición continua de fármacos en el medio ambiente acuático, no descartando otras posibles alteraciones en especies vegetales y animales presentes en el mismo medio y también en el resto del ecosistema.

Una de las posibles soluciones es el uso de bioremediadores, que se basa en la utilización de elementos biológicos para la eliminación de contaminantes del ambiente. Dentro del ecosistema los hongos se caracterizan por ser grandes descomponedores. Ellos presentan enzimas que utilizan para degradar compuestos de la naturaleza y, al no ser enzimas muy selectivas, pueden también degradar una amplia gama de moléculas, incluyendo contaminantes como los medicamentos (Garbisu C. 2002)

En el presente trabajo se buscó medir la degradación y/o la biotransformación del fármaco diclofenaco por hongos con actividad lignolítica. Se estudió la actividad enzimática de dos especies de *Trametes*, ambas

encontradas en Chile. Mediante análisis de HPLC se midió la degradación o transformación del diclofenaco al agregarlo al medio de cultivo del hongo.



5. Marco teórico

5.1. Ciclo del medicamento en el medio ambiente

Son diversas las formas en las cuales llega un medicamento al medio ambiente. Uno de los primeros puntos que se pueden identificar como lugar de eliminación de fármacos es desde su producción, donde se generan residuos que posteriormente son eliminados.

Los fármacos pueden ser para uso veterinario o uso humano. Se realiza esta división para identificar los lugares a los cuales son finalmente distribuidos los medicamentos una vez producidos. En la distribución podemos destacar rubros empresariales que utilizan una gran cantidad de medicamentos de uso veterinario, del orden de toneladas anualmente. Ejemplos de esto son las industrias de la ganadería y la acuicultura, donde el uso de fármacos se utiliza tanto para el tratamiento de enfermedades, de forma preventiva, y también como promotores del crecimiento animal. Para este fin se utilizan principalmente antibióticos, lo que podría estar ayudando a la generación de resistencia microbiana (Torres, 2002). Luego de la utilización del medicamento, muchos son eliminados por la orina y fecas de los animales. En el caso de la acuicultura, los medicamentos que son administrados mediante pellet de alimentación, que no son comidos por los peces, caen directamente a las aguas generando un cambio directo en el ecosistema del fondo marino que se encuentra bajo las piscinas de aguas abiertas como lagunas, ríos o en el mar. En cuanto a la salmonicultura, en

Chile, los datos son aún más impactantes debido a que se utilizan 700 veces más antibióticos por tonelada de salmón que en Noruega y Canadá, dejando a Chile como el país que más antibióticos usa a nivel global en la industria acuícola (Velásquez, F., 2018).

En cuanto a los medicamentos de uso humano, estos son distribuidos a servicios de salud y establecimientos de venta como las farmacias, donde son despachados a la población. Con respecto a la eliminación de forma segura de los medicamentos vencidos o no utilizados a nivel doméstico, actualmente no existe claridad ni información sobre cómo se debe realizar. En los servicios de salud como hospitales y centros de salud familiar (CESFAM), existe un protocolo de eliminación para medicamentos vencidos que se utiliza en establecimientos de salud. Esto se detalla en la circular B35/38 del Ministerio de Salud, promulgada el 15 de noviembre del 2012, llamada “Imparten instrucciones para el adecuado proceso de eliminación de residuos de medicamentos en mal estado y vencidos generados de establecimientos de salud, así como los originados de fármacos decomisados de lugares no autorizados”. En esta circular se enlistan las sustancias consideradas como peligrosas, además de especificar que, según el D.S. N°35/ 10, en su artículo 135°, se identifican fármacos altamente activos como lo son las hormonas, citoestáticos, betalactámicos, radiofármacos e inmunosupresores. Estos se clasifican como peligrosos por lo que se deben de eliminar mediante lo establecido en el “Reglamento sobre manejos de residuos de establecimientos de atención de salud” (D.S N°6/09 MINSAL) y el

“Reglamento sanitario sobre manejo de residuos peligrosos” (D.S. N°148/03 del MINSAL), donde se explica que los residuos deberán ser eliminados en una instalación de eliminación de residuos peligrosos que se encuentre con autorización de funcionamiento por las autoridades sanitarias.

En cuanto al resto de medicamento no mencionados anteriormente, se especifica que: “la organización mundial de la salud, en el estudio sobre fármacos en agua potable concluye que la concentración de medicamentos que se han detectado en fuentes de agua potable no revisten riesgo para la salud de la población, por lo que no recomienda desviar recursos profesionales y financieros a la eliminación de dicha sustancia por lugares distintos al alcantarillado”.

Las prácticas realizadas por los establecimientos de salud estarían aportando gran cantidad de medicamentos al sistema de aguas servidas, a los que se debe de agregar el porcentaje de medicamentos que son eliminados por las personas luego de la administración. Cuando una persona se administra un medicamento, el organismo elimina gran parte de él por la orina, la que llega al alcantarillado, pero esto no asegura su eliminación del agua. De hecho, en la “Normativa de agua chilena” no se menciona el retiro de este tipo de contaminantes de las aguas. En el Anexo 1 se presenta con mayor detalle la normativa de agua chilena.

Todo estos procesos y actividades humanas van incorporando medicamentos al ecosistema por diferentes vías (Figura 5.1). Generando un ciclo en el cual los medicamentos no son eliminados ni transformados, lo que genera una acumulación y reincorporación en el ambiente (Barceló L y López M 2008).

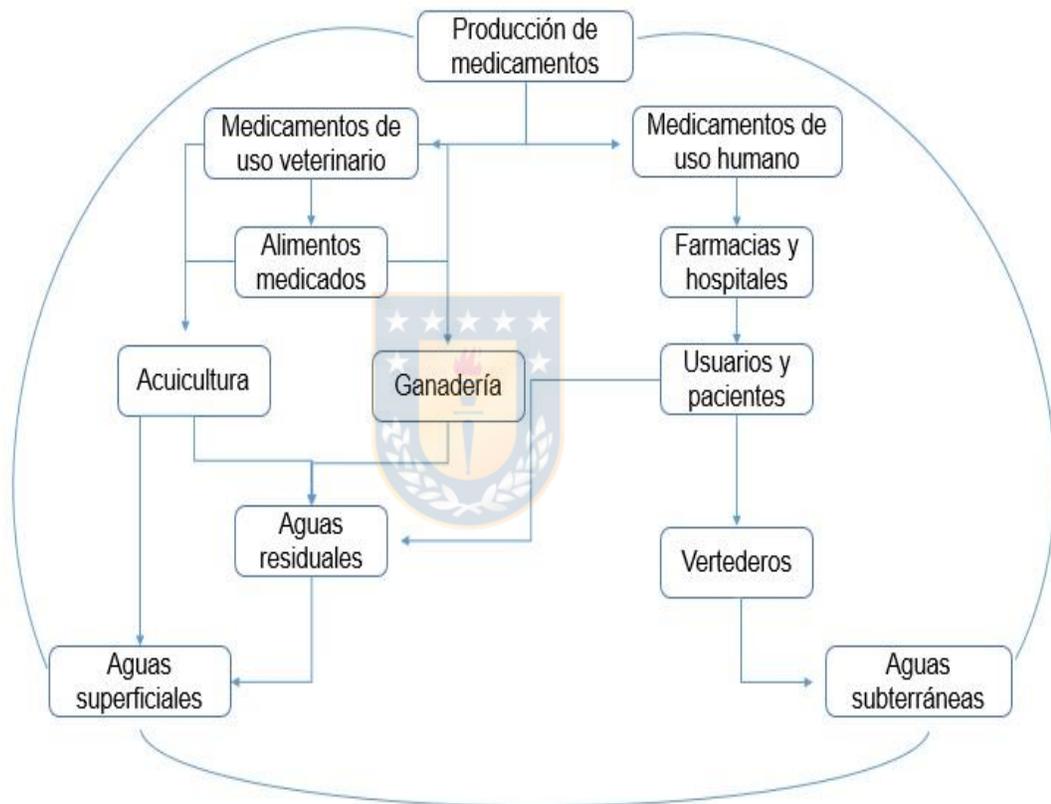


Figura 5.1: Esquema ciclo de medicamentos en el ambiente. Extraído y modificado de Barceló L. López M. (2008)

5.2 Metabolización de fármacos en el cuerpo humano

Al administrarse un medicamento en el cuerpo humano, este pasa por diversos procesos dentro del organismo. En farmacología es conocido como farmacocinética, que en simples palabras se refiere a lo que el organismo le hace al fármaco. Donde se define cuatro procesos principales de la administración de un fármaco los cuales son la absorción, distribución, metabolización y eliminación. La metabolización de los fármacos se produce principalmente en el hígado. El primer paso del medicamento por el hígado es conocido como efecto de primer paso. Es la primera metabolización de los medicamentos en el hígado donde diversas reacciones químicas y enzimáticas, ya sea de oxidación, reducción o conjugación, modifican las moléculas y disminuyen su biodisponibilidad (Flórez, 1997). Estas reacciones son facilitadas por la participación de diversas enzimas, las que actúan como catalizadores. Una de las enzimas más estudiadas y abundantes en el cuerpo es el Citocromo P450 (CYP 450), este es un gran complejo enzimático que utiliza como sustrato a los xenobioticos (sustancias externas al organismo). Esta enzima transforma los xenobioticos en moléculas más hidrosolubles para facilitar su excreción. La mayoría de los fármacos son excretados vía renal y eliminados finalmente por la orina (Guengerich, 2012).

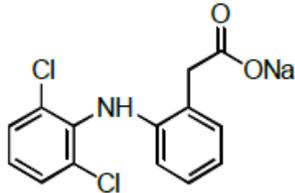
5.3 Analgésicos

Los analgésicos son unos de los fármacos más utilizados por las personas a nivel mundial, ya que estos no requieren de prescripción médica para su venta, por lo que la gente los usa muchas veces innecesariamente. El principal uso de estos fármacos es aliviar molestias y dolores menores, ya sea de cabeza, músculos o articulaciones. La mayoría de estos fármacos pertenecen al grupo de los AINEs, grupo farmacológico que comparte el mecanismo de acción al igual que alguno de sus efectos adversos. Estos fármacos actúan mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (Cox) impidiendo la transformación del ácido araquidónico a prostaglandina y tromboxanos. No obstante, la inhibición de estas enzimas también acarrea como consecuencia la interrupción de las prostaglandinas encargadas de la protección estomacal, por lo que el uso prolongado de estos medicamentos atrae consigo úlceras estomacales (Loza, E.2011).

5.3.1 Diclofenaco

El diclofenaco sódico es uno de los AINEs más utilizados en todo el mundo. Está recomendado para enfermedades reumáticas dolorosas e inflamatorias crónicas y en algunas no reumáticas. Se encuentra disponible para la administración por vía oral, vía rectal e intramuscular y tiene un buen perfil de seguridad. Presenta mayor tolerancia que otros AINEs, porque rara vez produce úlceras gástricas u otro efecto adverso (Todd, P., Sorkin, E., 1988). Sus principales características fisicoquímicas se presentan a continuación (Tabla 5.1)

Tabla 5.1. Características fisicoquímicas de la sustancia.

Estructura Química	
Nombre IUPAC	Sodio [2-(2,6-dicloroanilino)fenil]acetato
Descripción	Polvo o cristales blancos o amarillo claros, higroscópico
Solubilidad	Fácilmente soluble en metanol, soluble en etanol, ligeramente soluble en agua, casi insoluble en cloroformo y éter dietílico (USP 40)
pKa	4,2
Coeficiente de reparto LogP (<i>n</i> -octanol/agua)	13,4 lo que indica que presenta afinidad por las membranas lipídicas (Sandoval, 2015)

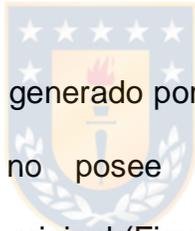
El diclofenaco es un fármaco que se absorbe rápidamente después de su administración. En formulaciones de comprimidos con recubrimiento entérico, se alcanza una concentración plasmática máxima después de 1,5 a 2,5 horas, pero se puede retrasar por los alimentos de 2,5 hasta 12 horas. El diclofenaco sufre un importante metabolismo de primer paso donde solo el 60% del fármaco alcanza la circulación sistémica sin cambios después de la administración oral.

Su eliminación se inicia con su metabolización mayoritariamente por el hígado y, posteriormente, es excretado por vía urinaria y biliar. La mayor cantidad

es excretada por la orina. Por vía intravenosa, el 60% de la dosis es excretada por la orina. Según estudios en voluntarios sanos, el clearance plasmático medio de diclofenaco es de 16 L/h (Todd, P., Sorkin, E., 1988).

La metabolización del diclofenaco en el cuerpo humano se genera principalmente por la glucoronidación y la hidroxilación. La actividad de la hidroxilasa genera una hidroxilación aromática para dar origen al 4-hidroxiclofenaco y 5-hidroxiclofenaco. Estas reacciones son catalizadas por la enzima Citocromo P450 (CYP 450), específicamente por CYP 2C9 y CYP 3A4 (Wei Tang, 2003).

El principal metabolito generado por la metabolización en humanos es el 4'-hidroxiclofenaco, que no posee una actividad antiinflamatoria en comparación con la molécula original (Figura 5.2) (Todd, P. Sorkin, E. 1988).



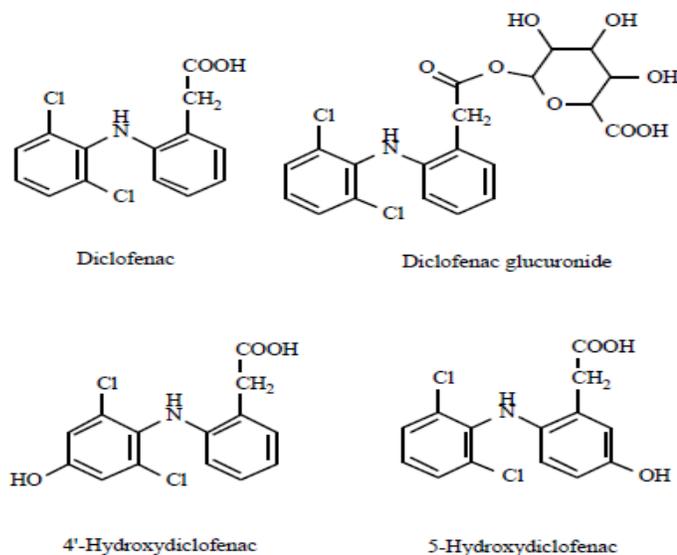


Figura 5.2: Estructura de diclofenaco y sus principales metabolitos. Extraído de Wei Tang 2003

5.4. Bioremediación

Desde hace algunos años las investigaciones se han enfocado en buscar diversos métodos o medidas de remediación que aceleren la eliminación de contaminantes del medio ambiente. Si bien los ecosistemas presentan un nivel de depuración, estos se ven superados por la cantidad de descargas de residuos que reciben a diario. Uno de los procesos que se ha estudiado es la biorremediación, la cual es una tecnología que utiliza elementos biológicos para eliminar contaminantes mediante las habilidades catalíticas de los organismos (Maroto, 2002). Los principales microorganismos utilizados son las bacterias, pero también se han desarrollado estudios en otro tipo de organismos como plantas y hongos, que son capaces de metabolizar los compuestos tóxicos

transformándolos en moléculas más pequeñas que no causen daño o que sean menos tóxicas para los ecosistemas en el ambiente (Garbisu, C 2002).

Alguno de los ejemplos de microorganismos que se pueden mencionar como bioremediadores son hongos como *Coriolus versicolor* e *Hypholoma fasciculare* y bacterias del género *Lactobacillus* (*L. bulgaricus*, *L. paracasei* y *L. plantarum*) que son capaces de disminuir el grado de toxicidad de compuestos organofosforados utilizados ampliamente en la agricultura como pesticida (Hernández-Ruiz, 2017). También se ha logrado la remoción de metales pesados como cobalto, cadmio, plomo y cobre desde suelos utilizando hongos *Pleurotus ostreatus*, gracias a la actividad de sus enzimas externas (Coello, 2012). Esta última especie de hongo mencionada pertenece a un grupo ampliamente estudiado por sus capacidades de degradación de contaminantes, los hongos de pudrición blanca, también llamados hongos lignolíticos. Estudios han demostrado que estos hongos son capaces de remover diversas especies de fármacos desde aguas residuales (Vasiliadou, 2016).

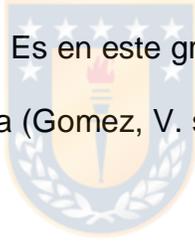
5.4.1. Hongos con actividad lignolítica

Los hongos son organismos pertenecientes al reino fungi. Se pueden encontrar de diversas formas, tamaños, colores y composición, desde organismos unicelulares como son las levaduras, hasta hongos más complejos en estructuras que forman zetas o cuerpos fructíferos. Sin embargo, el verdadero cuerpo del hongo es el micelio, este no se puede ver a simple vista puesto que

se encuentra inserto en el sustrato donde crece el hongo (kuhar, Castiglia 2013). Los micelios son estructuras compuestas por largos filamentos llamados hifas, estas son estructuras cilíndricas que constituyen el cuerpo de los hongos multicelulares. Las hifas tienen múltiples propósitos para el hongo, desde la nutrición y el crecimiento hasta la reproducción. Todos los hongos son heterótrofos y presentan enzimas que ayudan a descomponer polímeros complejos para luego absorberlos como nutrientes simples (Hanson, 2008).

Dentro del reino fungi, se encuentra la división de los Basidiomycotas que incluye los hongos que forman basidios y producen basidiosporas uninucleadas y haploides. El basidiocarpio es el cuerpo fructífero de los basidiomycetes. La morfología del basidiocarpio es totalmente variada en cuanto a su textura, puesto que pueden ser desde leñosas a gelatinosas y, respecto a su tamaño, pueden ser microscópicos o medir hasta un metro de diámetro. En el basidiocarpio se encuentran los basidios, que son estructuras celulares que darán paso a la producción de las esporas, las cuales serán liberadas por el hongo una vez que haya llegado a la maduración. Esto sería parte de la reproducción sexual del hongo, donde en el interior de la basidioespora se fusionan núcleos compatibles que luego darán origen a un nuevo micelio primario al llegar a un sustrato adecuado para el hongo. La reproducción asexual ocurre por gemación, fragmentación de micelio y formación de conidios. Por esto, presenta reproducción tanto asexual como sexual (Figura 5.3) (Menéndez J.L). Su nutrición es heterótrofa, donde se pueden encontrar grupos parásitos, simbioses

y saprófitos. Dentro de los bacidiomicetos, los parásitos son abundantes y son los causantes de muchas enfermedades en plantas y animales. En las relaciones simbióticas se pueden encontrar asociaciones mutualistas entre el hongo y las plantas. La asociación simbiótica entre las hifas del hongo y las raíces de las plantas y árboles se denomina micorriza. En el caso de los bacidiomicetos, la formación es externa por lo que se denominan extomicorrizas. Estas son de gran valor económico y ecológico, puesto que se encuentran las setas comestibles como los champiñones, *Agaricus bisporicus*, y alucinógenos como las *Amanitas muscaria*. Los saprofitos obtienen sus nutrientes de la descomposición de materia orgánica del bosque. Es en este grupo donde se encuentran los hongos descomponedores de madera (Gomez, V. s.f).



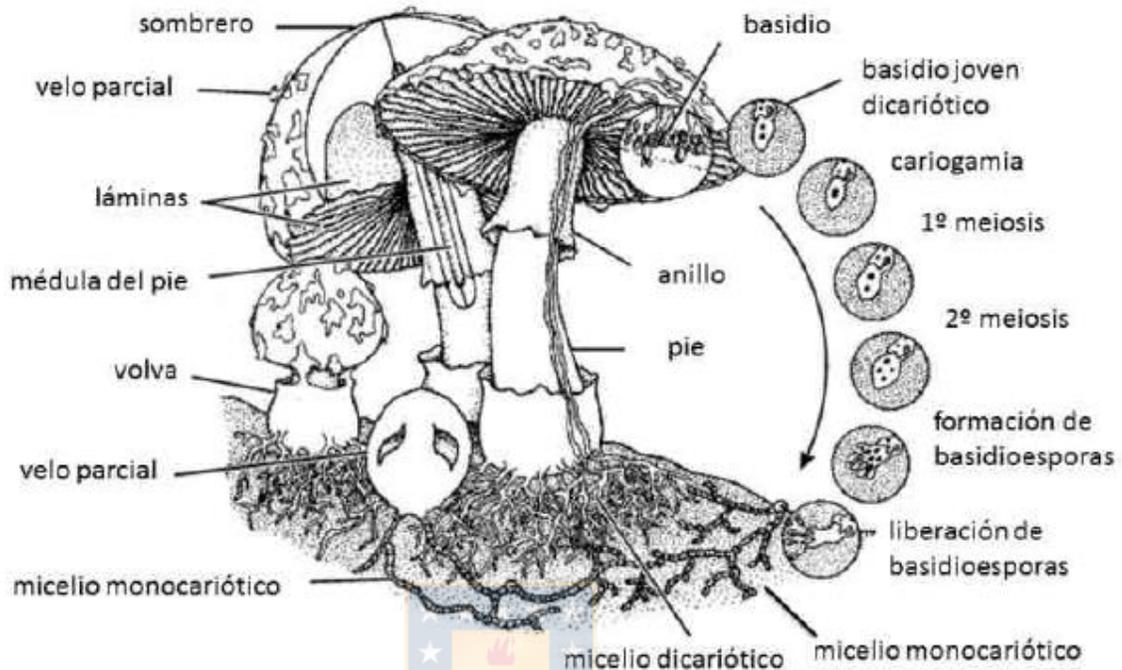


Figura 5.3: Ciclo sexual de hongos basidiomicetos (Kuhan F. 2013)

Los descomponedores de madera, pertenecientes a los saprofitos, se pueden clasificar en tres grupos dependiendo de su patrón de degradación lignocelulítico. Los hongos de pudrición blanda afectan a la celulosa secundaria, especialmente cuando se dan condiciones de elevada humedad. Los hongos de pudrición parda degradan la celulosa y parcialmente la lignina. Los hongos de pudrición blanca degradan la lignina y no la celulosa. A estos últimos también se les llama hongos lignolíticos, porque poseen enzimas lignolíticas que son las que les otorgan la capacidad para degradar la lignina de la madera. Estas enzimas son producto del metabolismo secundario del hongo, ya que la oxidación de la lignina no genera energía para el hongo y se producen bajo un proceso estrictamente

aerobio. La síntesis de estas enzimas se ve favorecida bajo condiciones de estrés como lo son bajos niveles de pH y disminución de nutrientes como nitrógeno, azufre o carbono (Ortiz, 2009).

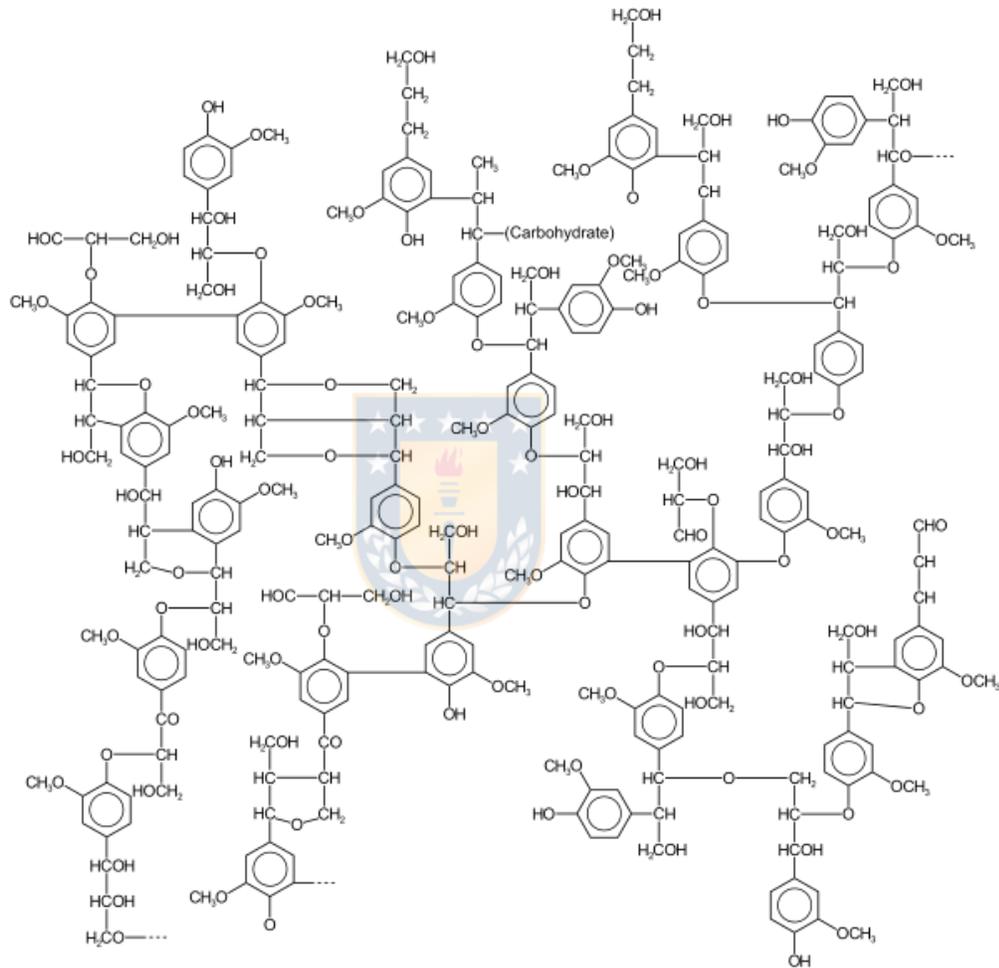


Figura 5.4. Estructura química de lignina

El sistema enzimático que presentan estos hongos incluye las enzimas que modifican la lignina (Figura 5.4), que son oxidorreductasas extracelulares y que contienen metales, principalmente lacasas (Figura 5.5) y peroxidasas (Figura

5.6). Las lacasas son producidas por casi todos los basidiomicetos. Este grupo de enzimas contiene cuatro átomos de carbono en el sitio activo que se distribuyen en sus diferentes sitios de unión. Las lacasas catalizan la oxidación de una gran variedad de donantes de hidrógeno aromático y, a la vez, genera la reducción de oxígeno al agua (Figura 5.5). Además, las lacasas también descarboxilan y desmetilan (Wesenberg, 2003).

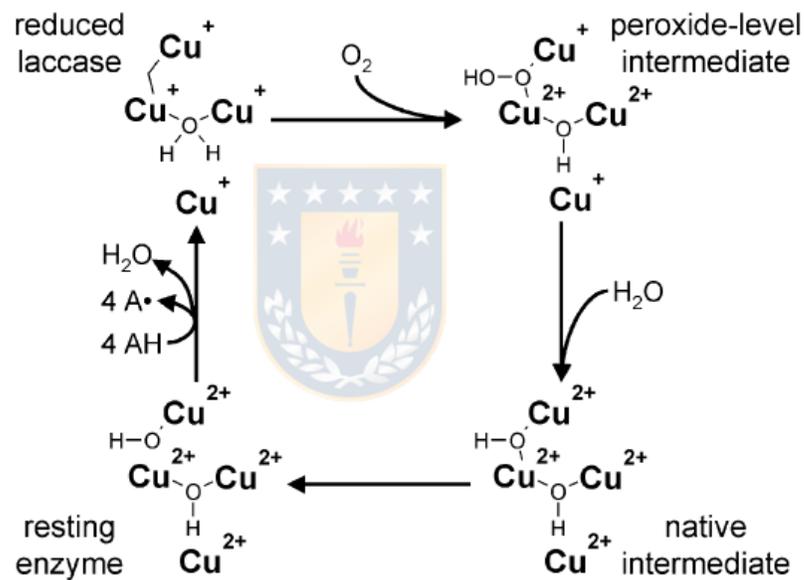


Figura 5.5: Ciclo catalítico de lacasa (Wesenberg, 2003)

Las ligninas peroxidadas son catalizadoras de la oxidación de los restos de lignina aromática no fenólica y catalizan diversas oxidaciones de las cadenas laterales. Estas enzimas no son esenciales para la descomposición de la lignina, puesto que degradan los restos de moléculas liberadas o desprendidas por la acción de manganeso peroxidasa.

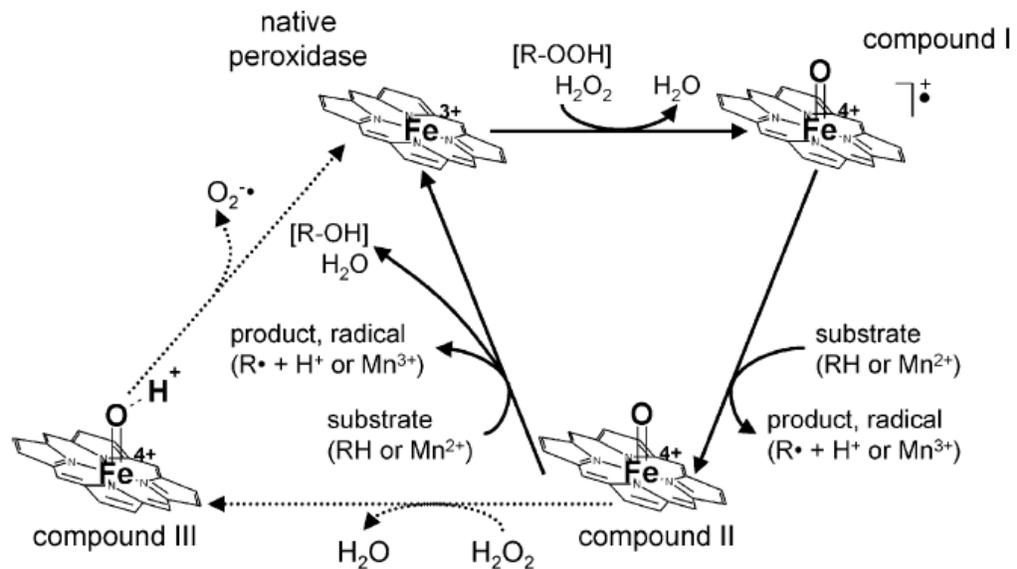


Figura 5.6. Ciclo catalítico de peroxidasa (Wesenberg, 2003)

Las enzimas de estos hongos presentan una baja especificidad. Los hongos lignolíticos pueden degradar un amplio espectro de compuestos orgánicos que contienen esqueletos similares a los que presenta la lignina, tales como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (Rojas, 2013).

El metabolismo enzimático de los hongos es explicado por Quintero el 2011:

Se conocen tres principales mecanismos enzimáticos que son empleados por los hongos de la pudrición blanca de la madera para degradar contaminantes ambientales, dos de tipo oxidativo y uno reductivo: i) sistema de degradación de la lignina, que realiza ataques oxidativos a moléculas orgánicas por medio de radicales libres generados por las enzimas ligninolíticas peroxidadas; ii) fase

I del metabolismo, mecanismo oxidativo en que intervienen las enzimas citocromo P-450 monooxigenasas y iii) fase II del metabolismo donde un conjunto de enzimas cataliza reacciones de conjugación reduciendo los contaminantes. Estos mecanismos degradan o modifican los contaminantes sin ser empleados como sustratos para su crecimiento, es decir, la degradación se hace por co-metabolismo. Aún no se han desarrollado trabajos para evaluar si algunos compuestos intermediarios de la degradación de xenobióticos son empleados como sustratos.

Uno de los hongos lignolíticos estudiados por su capacidad de degradación de diferentes compuestos es el hongo *Trametes versicolor*, también llamado *Coriolus versicolor*. Comúnmente conocido como Cola de pavo por presenta diversos colores entre anaranjados, cafés, negros rojizos y azulados (Figura 5.7). Es un hongo cosmopolita que utiliza como sustrato troncos y restos de madera. Su crecimiento es en forma de terraza. Tiene un gran potencial farmacológico debido a que presenta glicoproteínas con alta actividad estimuladora del sistema inmune. También presenta actividad anticancerígena, antiviral y antimicrobiana.



Figura 5.7. Imágenes de *Trametes versicolor*

En un estudio realizado por Marcos-Urrea (2008) se utilizó a *Trametes versicolor* para degradar diclofenaco. Mediante el análisis de Resonancia Nuclear magnética (RNM), se pudo determinar los metabolitos generados a partir de la degradación del fármaco por el hongo. Se logró identificar 3 metabolitos, de los cuales 4'-OH-diclofenaco y 5-OH-diclofenaco (metabolitos 2 y 3, respectivamente) también son generados por la metabolización del diclofenaco en el hígado humano (Figura 5.8).

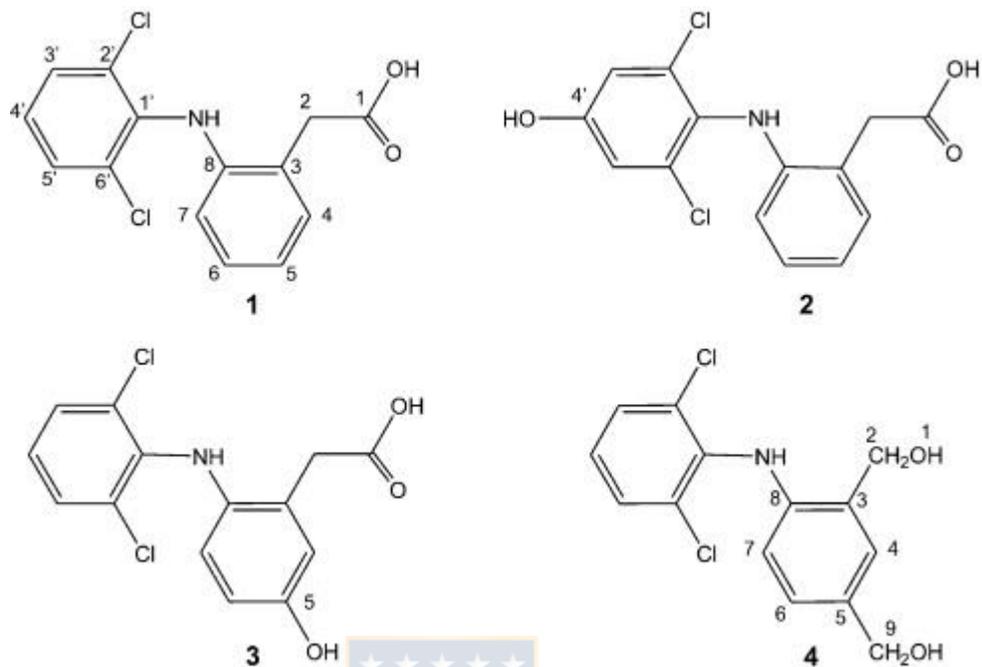


Figura 5.8. Molécula de diclofenaco y los productos de degradación identificados por RMN. (Extraído de Marco-Urrea 2008)

En el mismo estudio, con la utilización de pellet de *T. versicolor* se logró degradar el diclofenaco en concentraciones de $\mu\text{g/L}$ a mg/L en un medio líquido. Luego de 24 horas de exposición al pellet de hongos, no fue detectado ni el diclofenaco ni sus metabolitos.

6. Hipótesis

El hongo *Trametes hirsuta* degrada y/o transforma medicamentos al igual que *Trametes versicolor*.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

- Detectar la degradación de diclofenaco producto de la actividad de los hongos lignolíticos; *Trametes hirsuta* y *Trametes versicolor*.

7.2. Objetivos específicos

- Optimizar el Medio de cultivo ideal para el crecimiento del micelio y la disolución del diclofenaco.
- Validar un método analítico para la determinación de diclofenaco en medio de cultivo.
- Determinar el porcentaje de biotransformación o degradación de diclofenaco utilizando micelio de *Trametes versicolor* y *Trametes hirsuta*.
- Determinar que hongo presenta mayor actividad de biodegradación o transformación del diclofenaco.

8. Metodología

Para el desarrollo de este trabajo se recibió la ayuda del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia y el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

8.1. Recolección de las especies de *Trametes*

La recolección se realizó directamente de hongos silvestres, recogidos en el cerro Caracol, Concepción, en octubre del año 2018. Luego se identificaron por parte del experto en taxonomía fúngica de la universidad de concepción, Dr. Götz Pafner perteneciente a la Facultad de Ciencias naturales y oceánicas.

8.2. Obtención de micelio y cultivo en laboratorio

El aislamiento de la sepa se realizó mediante la obtención de tejido directamente del hongo recolectado en estado silvestre. Lo cual se ejecutó en una cámara de flujo laminar con material esterilizado para evitar la contaminación del cultivo. Esta técnica es muy sencilla y se basa en la extracción de tejido del hongo recolectado mediante el uso de un bisturí esterilizado en flama. El hongo debe estar en buen estado, sin tierra ni insectos que puedan contaminar la muestra. El hongo se cortó en forma longitudinal y con la ayuda de una pinza previamente esterilizada en flama y enfriada, se extrajo un trozo del tejido del

basidiocarpo y se colocó en la placa de Petri que contenía el medio de cultivo en agar.

Luego de este proceso las placas se sellaron con papel Parafilm y guardadas en una incubadora a 25 °C por 5 días, en oscuridad. Transcurrido este tiempo se pudo comenzar a observar el crecimiento del micelio en el agar. El micelio formado crece en forma algodonosa, son filamentos blancos o amarillentos muy delgados y entrelazados que forman una capa sobre la superficie del agar, lo que indica que el cultivo se realizó exitosamente (Figura 8.9). De las placas cultivadas se seleccionaron las con mejor apariencia y fueron replicadas nuevamente en nuevas placas de agar. (Gaitán-Hernández. R. 2006)



Figura 8.9. Crecimiento de cultivo en placa a los 7 y 25 días respectivamente.

Para mantener viables los micelios de los hongos, se realizaron réplicas de las placas periódicamente, cada un mes o un mes y medio. Estas también se llevaron a cabo en la cámara de flujo laminar donde se obtenía un trozo de micelio y se colocan en una nueva placa de agar. Se dejó nuevamente incubando a 25°C en la cámara de incubación en oscuridad.

8.2.1 Medios de cultivos en agar

Se realizaron los cultivos del hongo en un medio sólido que le entregará los nutrientes necesarios para su crecimiento. Para esto se realizaron dos tipos de medios de cultivos sólidos en placas de Petri, un medio de agar YMG y otro medio de extracto de papa, que se describen a continuación:

Medio YMG

- Levadura 5 g
- Malta 10 g
- Glucosa 15 g
- Agar agar 19 g
- Completar volumen de un litro con Agua Milli Q

Medio de papa

Medio listo para preparar de la marca BD Difco™ que contiene:

- Agar 15 g
- Dextrosa 20 g

- Infusión de papa 4 g
- Se agrega agua Milli Q suficiente para completar un volumen de un litro.

8.2.2 Procedimiento de preparación de medio sólido

Para preparar el medio de cultivo se utilizó un frasco con tapa autoclavable, estilo Schott. Luego se pesaron los ingredientes del medio de cultivo a realizar. Se agregaron al frasco autoclavable y se completaron a volumen con agua Milli Q para la cantidad de medio que se deseaba preparar. Se agitó la mezcla hasta que se disolvieron todos los componentes. Luego se llevó a la autoclave a una temperatura de 121°C por 20 min y a una presión de 100 KPa. Luego de este proceso y mientras el agar se encontraba caliente y en estado líquido, se llevaron a una cámara estéril donde se rellenaron las placas de Petri, previamente esterilizadas, con el agar completando solo hasta la mitad de la placa. Luego se dejaron enfriar y solidificar.

8.2.3 Determinación del medio líquido óptimo para trabajar

Se realizaron diferentes medios de cultivos para identificar en cuál de estos era más efectivo el crecimiento del hongo y la disolución del diclofenaco. Para esto se estudiaron 6 distintos medios de cultivo los cuales se presentan a continuación.

- YMG: Levadura, malta, glucosa (pH 5,7)
- YMG +Buffer: Levadura, Malta, Glucosa, Buffer de Fosfato. (pH 4,5)
- YMG + N: Levadura, Malta, Glucosa, Tartrato de amonio (pH 5,3)

- MG: Malta, Glucosa (pH 4,5)
- Papa dextrosa: Extracto de Papa, Dextrosa (pH:4,5)
- Marco-Urrea Modificado.: Glucosa, Tartrato de amonio, Buffer de fosfato, (pH: 5)

Para determinar la eficiencia del medio se midieron dos parámetros, primero el crecimiento del hongo y segundo la solubilidad del diclofenaco en el medio.

Todos los medios fueron mantenidos en las mismas condiciones. Se mantuvieron en matraces por 5 días sobre agitador orbital con temperatura controlada alrededor de los 25 °C y en oscuridad.

8.2.4. Traspaso de medio solido a medio liquido

Cuando el cultivo de la placa de agar creció hasta cubrir toda la superficie (15 días en promedio), ya estaba lista para pasar los cultivos a un medio líquido. Para esto se realizó medio de cultivo en un matraz Erlenmeyer de medio litro con 150 ml de medio de cultivo líquido autoclavado. En una cámara estéril de flujo laminar, se extrajo con la ayuda de un bisturí estéril, 4 tapones de 1 x 1 cm de agar con crecimiento micelial desde las placas de Petri cultivadas previamente. Estos tapones se agregaron a los matraces con medio líquido, teniendo cuidado de no contaminar las muestras. Luego de agregar el micelio se dejó por 7 días sobre un agitador orbital Os-20 Boeco ® a 125 rpm a una temperatura de 25°C aproximadamente y protegidos de la luz.

8.2.4.1 Cultivo líquido secundario

Posterior al crecimiento del micelio por 7 días se tomaron los micelios formados y se trituraron con ULTRA-TURRAX® hasta dejar una mezcla homogénea de micelio y medio de cultivo. De esta mezcla se retiraron 2 mL y se agregaron a matraces de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo. Estos fueron dejados sobre el agitador orbital a 125 rpm por 5 días. Los gránulos de micelios que se formaron fueron de tamaño uniforme.

8.3. Preparación de la muestra de diclofenaco

Esta se realizó a partir de lo descrito en farmacopea USP 40. Se realizó una solución madre de diclofenaco con una concentración de 75 mg/mL en metanol. Para esto se utilizó un patrón de diclofenaco sódico 98% de la marca Merck.

8.3.1 Experimentación con diclofenaco

Se hicieron medios de cultivo en matraces de 250 mL donde se agregaron 100 mL de medio de cultivo al cual se le agregó diclofenaco para obtener una concentración en el medio de 0,1 mg/mL.

La experimentación se realizó con tres matraces a los cuales se les agregó el diclofenaco. Uno de control el cual contenía medio de cultivo más diclofenaco. El segundo con medio de cultivo, con micelio de *Trametes versicolor* más diclofenaco. Un tercer matraz con medio de cultivo más micelio de *Trametes hirsuta* y diclofenaco. Todos los matraces fueron dejados en oscuridad y además

cubiertos con papel de aluminio para protegerlos de la luz y evitar la degradación del diclofenaco. Se tomaron muestras de 2 ml con pipetas de vidrio de 2 ml, autoclavadas, desde los matraces a las 6 y 48 horas.

Los matraces se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura, humedad y sobre una placa rotatoria a 125 rpm.

8.4. Tratamiento de muestra

Para el tratamiento de las muestras se utilizó la extracción en fase sólida. La cual se explica con mayor detalle en el Anexo 2. Se requirió como equipamiento una cámara de vacío de vidrio y una bomba para vacío. Se utilizaron cartuchos de C18 C18 Water Sep-pak Vac 6cc para realizar la extracción.

Para la metodología de extracción en fase sólida del diclofenaco se realizó según lo indicado por el proveedor de Water para fármacos de naturaleza apolar:

- Activación: 2mL MeOH
- Acondicionamiento: 2 mL H₂O
- Carga: 2 mL de muestra
- Lavado: 2mL de solución de MeOH / H₂O al 5%
- Elución: 2 mL de MeOH

8.5. Análisis de muestra por HPLC

Para el análisis se utilizó un equipo HPLC de la marca Young Lin Instrument modelo YL9111s Binary pump, acoplado a un detector de diodo de la misma marca, modelo YL9160 PDA detector. La columna cromatográfica que se utilizó fue una columna marca Kromasil 100-5 C-18 4.6 x 150 mm. El volumen de muestra inyectado fue de 30 μ L y la longitud de onda de la lectura fue de 275 nm.

La determinación de las mejores condiciones de análisis se basó en el estudio validado realizado por Correa y asociados (2014) donde se busca las condiciones más adecuadas para la detección del diclofenaco con la utilización de HPLC. Se concluyó que lo más adecuado es utilizar una fase móvil de acetonitrilo:agua, 60:40 v/v. En cuanto al flujo se recomienda en 1 ml/min pero se modificó para comodidad del paso de las muestras a 1,1 ml/min. Se determinó un máximo de detección a los 275 nm.

8.5.1. Curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración se puede dividir en dos pasos, una es la preparación de una concentración patrón, y la obtención de señales. Se realizó una curva de calibración con 5 concentraciones conocidas de diclofenaco (0,01, 0,025, 0,05, 0,10 y 0,20 mg/mL) a partir de una solución madre de una concentración de 75 mg/mL realizada según la farmacopea USP 40. Con las señales analíticas obtenidas en el equipo se realizó una tabla de Excel donde se obtuvo la ecuación de la recta para posteriormente determinar las

concentraciones obtenidas de las muestras de diclofenaco con concentración desconocida.

8.5.2 Inyección de las muestras

Las muestras fueron inyectadas manualmente en el HPLC y se realizaban muestras que solo contenía metanol (blancos), para verificar que la columna no contuviera ningún residuo, esto también se realizaba cada cierto tiempo para asegurar que no existiera acumulación de diclofenaco en la columna. Las inyecciones se realizaron por triplicados. Las muestras fueron mantenidas a baja temperatura y en frascos sellados color ámbar para proteger de la luz.

8.6 Validación del método analítico

La validación del método analítico es necesaria para demostrar que el procedimiento analítico es el adecuado para el análisis que se está realizando. Esto se realiza mediante estudios de laboratorio, cumpliendo las características y los requisitos para la aplicación analítica prevista. De esta forma se puede validar que la metodología utilizada es confiable y reproducible (USP 31).

Para la validación se utilizó la Guía ICH Q2 “Validación de métodos analíticos” (1995). Se trabajó con esta guía ya que hace mención a líquidos biológicos, y si bien el medio de la muestra no es una muestra biológica humana, está compuesta por organismos vivos como los son los hongos con lo que se trabajó. Para la experimentación se utilizó la metodología para detección de diclofenaco

descrita de farmacopea USP 40, por lo que se puede hablar de una validación parcial en la cual se midieron los siguientes parámetros:

- Selectividad: es la capacidad de detectar de forma certera el analito que se desea analizar. Ésta se puede demostrar mediante la resolución de dos componentes cercanos que eluyan en la muestra que puede ser alguna impureza o metabolito que se detecte en la medición. La resolución se puede determinar con la ecuación 8.1:

$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

Ecuación 8.1: Selectividad

Donde (t_R): tiempo de retención del pico cromatográfico.

W: el ancho de la base del pico cromatográfico.

- Linealidad: se debe de evaluar la linealidad mediante la realización grafica de la concentración en función de las señales. Se debe incluir el coeficiente de correlación la intersección con el eje y, la pendiente de línea de regresión y la suma residual de los cuadrados. Se recomienda a lo menos cinco mediciones para establecer la linealidad.
- Límite de detección (LOD): es la menor concentración del analito que se puede detectar con el método analítico, pero no necesariamente cuantificable. LD se puede cuantificar mediante la curva de calibración y la desviación estándar con la ecuación 8.2:

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \sigma}{m}$$

Ecuación 8.2: Límite de detección (LOD)

Donde σ = desviación estándar

m = pendiente de la curva de calibración

- Límite de cuantificación (LOQ): Es la menor concentración del analito que puede ser detectada teniendo una precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones experimentales determinadas. Ésta también puede ser calculada utilizando la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar como lo muestra la ecuación 8.3:


$$\text{LOQ} = \frac{10 \sigma}{m}$$

Ecuación 8.3: Límite de cuantificación (LOQ)

Donde σ = desviación estándar

m = pendiente de la curva de calibración

Se realizó también, el cálculo de la desviación estándar con 20 mediciones de blancos tomadas en diferentes días durante el proceso de detección de las muestras. Para esto se utilizó la fórmula (ecuación 8.4) extraída del libro Principios de análisis instrumental de Skoog (1991)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

Ecuación 8.4: desviación estándar extraída de Skoog (1991)

Donde s= desviación estándar

X_i = valor i de las muestras

\bar{X} = Promedio de los valores

N= número total de datos

8.7. Análisis cromatogramas

Los cromatogramas se obtuvieron mediante la utilización del software Clarity para equipos HPLC. Las primeras muestras se dejaron pasar por 30 min para descartar la detección de otros analitos que pudieran aparecer en el cromatograma. Al no observarse otros picos, el tiempo de corrida de cada muestra fue de 6 minutos ya que el pico cromatográfico del diclofenaco se encuentra en el minuto 5.

9. Resultados y discusión

9.1 Determinación del medio más adecuado para cultivo líquido

Luego de mantener los 6 diferentes medios de cultivos líquidos creciendo por 5 días bajo condiciones de temperatura y agitación controladas se pudieron obtener los siguientes resultados (Tabla 9.1):

Tabla 9.1- Tabla de medios de cultivos ensayados

Medio de Cultivo	Crecimiento del hongo	Disolución de Diclofenaco
YMG	Se observa crecimiento muy bueno	Si
YMG + buffer	Se observa crecimiento bueno	Formación de precipitado
YMG + Nitrógeno	No se observa crecimiento	Si
MG	Se observa crecimiento	Si
Papa dextrosa	Se observa crecimiento bueno	Formación de precipitado
Marco-urrea modificado	No se observó crecimiento	Si

En el primer medio realizado (YMG) no presentó ningún problema con la disolución de diclofenaco. El crecimiento se ve favorecido debido a que el hongo se encontraba en cultivo sólido de agar YMG, esto otorga una adaptación previa y no genera mayor cambio al pasar el micelio a medio líquido. En el segundo medio de YMG más buffer de fosfato se generó un precipitado probablemente por la disminución del pH, lo que disminuyó la disolución del diclofenaco. Al agregar nitrógeno al medio YMG no se observó crecimiento del micelio en el tiempo determinado, lo que no descarta que pudiera existir crecimiento en un tiempo más prolongado. El medio realizado solo con malta y glucosa (MG) se observa crecimiento, pero no es superior al medio YMG, esto también se debe al tiempo de adaptación del hongo, al pasar de un medio sólido con levadura a uno líquido sin levadura.

En medio de papa dextrosa el micelio del hongo presentó un buen crecimiento, pero la disolución de diclofenaco no fue buena por la formación de precipitado. Esto se genera debido a que la dextrosa tiende a formar precipitados de especies ácidas, como es en este caso del diclofenaco (Martínez, 1995)

El medio de cultivo extraído de Marco-urrea (2008) fue modificado debido a que no se contaba con todos los nutrientes necesario. Este medio de cultivo presentaba glucosa, nitrógeno como tartrato de amonio y una solución de macro y micronutrientes a la cual no se pudo acceder. Debido a esto, se realizó el medio

de cultivo solo con glucosa y tartrato de amonio lo cual no fue suficiente para el crecimiento del micelio.

Dado los resultados presentados, se continuó el trabajo utilizando el medio de cultivo a base de levadura, malta y glucosa (YMG), por ser el que presentaba mejor crecimiento del hongo y estabilidad de diclofenaco.

9.2 Validación del método analítico

Los datos se obtuvieron siguiendo lo indicado en la ICH Q2(R1) (1995)

- Rango de trabajo: el rango a utilizar fue de una concentración entre 0,01 a 0,1 mg/mL. Este rango se obtuvo por bibliografía para determinación de diclofenaco por HPLC y para garantizar la actividad del hongo frente a estas concentraciones.
- Selectividad: esta se realizó determinando la resolución, este valor debe ser mayor a 1,5 y el calculado con los datos de la experimentación fue de 2,5. Esto nos indica que tiene una selectividad aceptada para el análisis.
- Linealidad: Esta puede ser determinada por el coeficiente de relación que se obtuvo de la ecuación de la recta de la curva de calibración. El valor de r es de 0,9985 siendo aceptado ya que para que se considere una linealidad debe ser mayor a 0,995.
- Límite de detección (LOD): este se calculó utilizando la ecuación indicada anteriormente, la que nos dio un valor de detección de $4,21 \times 10^{-9}$ mg/mL, lo que también se puede expresar en $4,2062 \times 10^{-3}$ μ g/L, siendo un método

apto para la determinación de concentraciones aún más bajas de diclofenaco que con las trabajadas.

- Límite de cuantificación (LOQ): al igual que el límite de detección se calculó utilizando la desviación estándar y la pendiente de la ecuación de la recta. Obteniendo un valor de $1,27 \times 10^{-8}$ mg/mL o $1,27 \times 10^{-2}$ µg/L.

La desviación estándar fue calculada con la utilización de 20 blancos obtenidos en diferentes días y distintas etapas de la experimentación para asegurar la validez de los datos. Se obtuvo un valor de $1,23 \times 10^{-4}$.

9.3 Curva de calibración y ecuación de la recta de diclofenaco.

Las concentraciones de diclofenaco utilizadas fueron de 0,01, 0,025, 0,05, 0,10 y 0,20 mg/mL, obteniendo la siguiente gráfica:

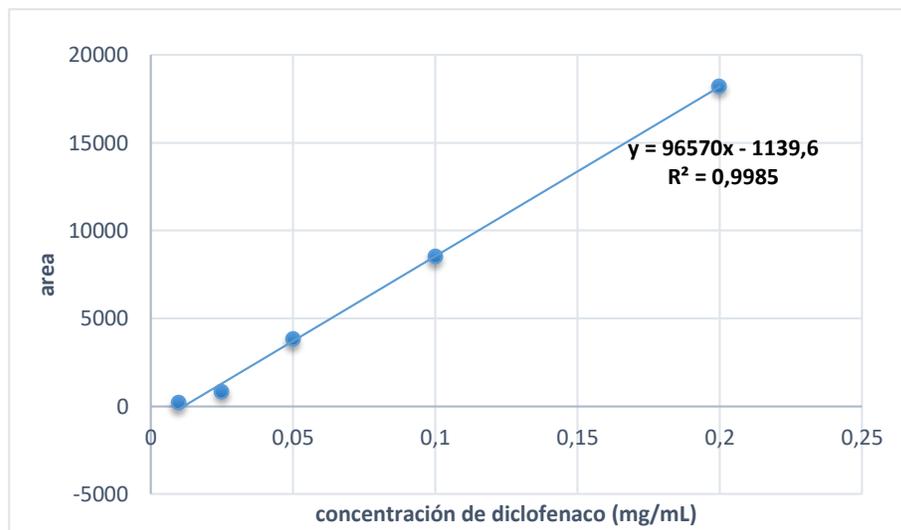


Figura 9.1: Curva de calibración de diclofenaco

Se puede observar que la curva de calibración presenta una buena linealidad dentro del rango a trabajar y entrega un valor de confianza adecuado, cercano a 1 (Figura 9.1).

9.4 Detección de diclofenaco en medio de cultivo con *Trametes*

Se añadió una concentración de 0,1 mg/mL de diclofenaco a tres matraces con medio de cultivo de los cuales solo en dos presentaba hongo *Trametes*, se tomaron muestras del medio y analizaron. Las muestras obtenidas y analizadas se muestran en el siguiente gráfico (Figura 9.2):

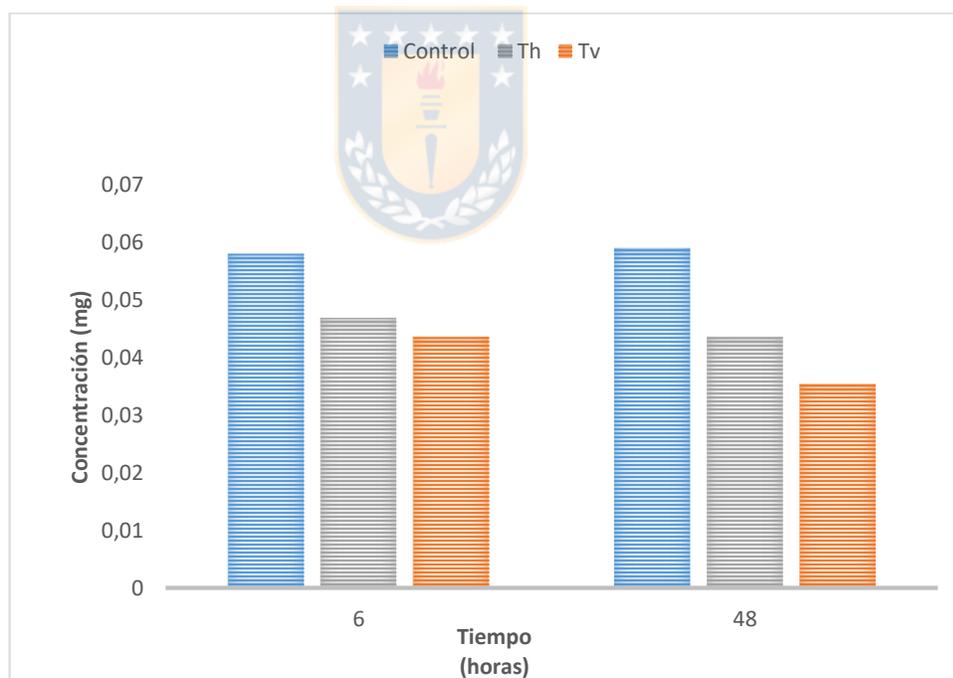


Figura 9.2: Detección del diclofenaco por acción de hongos, donde Tv corresponde a *Trametes versicolor* y Th a *Trametes hirsuta*.

Como se puede observar, de una concentración inicial de 0,1 mg /mL, en el medio de control también hubo una degradación del diclofenaco, esto se podría atribuir a la degradación en sí del diclofenaco o por el medio de cultivo que contenía levaduras. Se puede descartar la degradación por efectos de la luz ya que los cultivos fueron mantenidos en oscuridad y además cubiertos con papel de aluminio.

En cuanto a la disminución de diclofenaco en los medios que contenían micelio de hongo se demuestra que, si bien son del mismo género, *Trametes*, al ser de distinta especie cambia su actividad de degradación de diclofenaco. El medio que presenta micelio de *Trametes versicolor* (Tv) muestra mayor actividad para la degradación de diclofenaco que *Trametes hirsuta* (Th).

Se comparan los resultados obtenidos con el estudio realizado por Marco-Urrea (2008), la degradación obtenida fue mucho menor, puesto que en su estudio no se detectó diclofenaco luego de las 4 horas en el medio que contenía micelio de *Trametes versicolor*. Esto puede deberse a una diferencia importante en cuanto a la producción de enzima debido a la cantidad de micelio que se agrega a los matraces que contienen el diclofenaco. En este trabajo se utilizó un volumen de 2 mL de micelio, lo que equivale a 5 g de micelio húmedo aproximadamente, mientras que en el estudio de Marco-Urrea para la degradación de diclofenaco fueron utilizados 20 g de pellets húmedos de *Trametes versicolor*, lo que nos indica que una mayor cantidad de hongo estaría

produciendo mayor cantidad de enzimas degradadoras y por lo tanto produce una degradación total del diclofenaco en un menor tiempo.

9.5 Determinación del porcentaje de degradación

Para determinar la degradación y/o transformación del diclofenaco por la actividad de los hongos *Trametes* se realizaron dos ecuaciones (Ecuación 9.1 y 9.2), con las que se calcularon la degradación del total inicial de diclofenaco y la degradación del diclofenaco que se atribuye exclusivamente a la actividad enzimática de los hongos estudiados. Estas ecuaciones se presentan a continuación:

- Ecuación 9.1: Porcentaje de degradación total

$$D_T \% = \frac{(C_i - C_x) \times 100}{C_i}$$

Donde C_i : concentración inicial (0.1mg/mL)

C_x : concentración detectada

- Ecuación 9.2: Porcentaje de la degradación exclusiva del hongo

$$D_h \% = \frac{(C_c - H) \times 100}{C_c}$$

Donde C_c : Concentración del control

H : Concentración del medio con micelios de hongo

En la siguiente tabla se presentan los valores y porcentajes obtenidos con los datos obtenidos a las 6 y 48 horas (Tabla 9.2).

Tabla 9.2.- Valores de diclofenaco detectados y porcentaje de degradación.

	6 horas (mg/mL)	Dt% a las 6 horas	Dh% a las 6 horas	48 horas (mg/mL)	Dt% a las 48 hrs	Dh% a las 48 hrs
Control	0,0581	41,9%		0,0590	41%	
Th	0,0469	53,1%	19,3%	0,0436	56,4 %	26,1%
Tv	0,0435	56,5%	25,1%	0,0353	64,7%	40,2%

Th: *Trametes hirsutas* Tv: *Trametes versicolor*

Los datos demuestran que existe un 41% del diclofenaco que se degrada en la muestra Control. Esta muestra no contiene el micelio del hongo, sino que solo el medio de cultivo y diclofenaco. Lo que sugiere que el medio de cultivo genera una degradación o una transformación del diclofenaco por lo cual no fue detectado en la medición por HPLC. Una de las posibilidades es que esta actividad de degradación sea de algún componente presente en el medio de cultivo, que en este caso sería la presencia de levaduras, que, siendo un hongo, puede presentar actividad para degradar el diclofenaco. Esta degradación del diclofenaco en el medio de control también se observa en otras investigaciones realizadas en la misma línea, por Fuad Ale y colaboradores (2015) donde se estudió la correlación entre la actividad enzimática de Lacasa y Manganeso peroxidasa, con la remoción de fármacos, siendo uno de ellos el diclofenaco. En

este estudio en el medio de control, que presentaba levadura, hubo degradación del diclofenaco, pero fue menor a la degradación presentada en el medio que contenía las enzimas de hongos.

El hongo *Trametes hirsuta* mostró actividad para metabolizar el diclofenaco, el cual logró un porcentaje de degradación de un 56,4% a las 48 horas. Este hongo no presentaba estudios con respecto a su actividad de degradación sobre medicamentos. Si bien, presenta una buena actividad enzimática no supera el porcentaje de degradación de los micelios de *Trametes versicolor*.

Con respecto a *Trametes versicolor*, se obtuvo un porcentaje de degradación de un 64,7 % a las 48 horas. Este hongo ya contaba con estudios previos realizados (Marco-urrea, 2008) donde se demuestra su actividad de degradación del diclofenaco. Comparando los resultados obtenidos con los datos encontrados en bibliografía, la actividad de degradación fue menor que la demostrada en el estudio realizado por Marco-Urrea, en el cual no se detectó diclofenaco luego de las 4 horas de la exposición al hongo. Esto puede deberse a que se trabajó con una cantidad menor de micelio del hongo y con un medio de cultivo distinto. La influencia del medio de cultivo se debe a que las enzimas que participan en la degradación del fármaco, son producidas por el metabolismo secundario del hongo, las cuales se pueden ver aumentadas o disminuidas según la presencia o ausencia de compuestos en el medio.

Al comparar el porcentaje de degradación del diclofenaco por *Trametes versicolor* del presente estudio con los porcentajes de degradación obtenidos por Fuas Ale y colaboradores (2015) utilizando *Trametes máxima* y *Pleuretus spp*, *Trametes versicolor* muestra una mayor actividad al alcanzar una degradación de un 64,7% en 48 horas, mientras que *Trametes máxima* un 90% y *Pleuretus spp* un 89 % de degradación del diclofenaco, utilizando enzimas producidas en 9 días.

Las futuras proyecciones de esta investigación son variadas, puesto que las enzimas que presentan la actividad de degradación no son específicas, se pueden utilizar en una amplia gama de moléculas que cuenten con una estructura con base a anillos de carbono. Es muy factible el uso de estos hongos como bioremediadores para degradar contaminantes como pesticidas, derivados de hidrocarburos y otra clase de fármacos, pero se debe de continuar las investigaciones para asegurar que se realice una degradación y/o biotransformación de los contaminantes. Se debe ahondar más en el estudio de las moléculas generadas por la actividad enzimática del hongo, ya que no se puede asegurar que los compuestos generados por la metabolización del hongo, no presenten ningún riesgo para el ambiente sin estudios de toxicidad y la clara identificación de las moléculas producidas.

10. Conclusión

Luego de la experimentación se puede concluir que el hongo *Trametes hirsuta*, presentó actividad enzimática para degradar diclofenaco, al igual que *Trametes versicolor*.

El medio de cultivo óptimo para el crecimiento del hongo y para el trabajo con diclofenaco fue el medio YMG, el cual demostró tener un crecimiento mucho mayor y más rápido que el resto de los medios de cultivos probados.

El porcentaje de degradación de los hongos *Trametes* fue mayor en la especie *versicolor* quien degradó en un 64,7% el diclofenaco a las 48 horas de exposición mientras que *Trametes hirsuta* lo hizo solo en un 56,4% a la misma hora.

La bioremediación y el trabajo con enzimas lignolíticas presenta una gran oportunidad de avance tecnológico para la purificación de aguas, porque al igual que estos hongos fueron capaces de transformar o degradar el diclofenaco, pueden hacerlo con diversas moléculas que se encuentran presentes como contaminantes.

11. Glosario

Aguas residuales: El concepto de aguas residuales designa a aquel tipo de agua que se halla contaminada especialmente con materia fecal y orina de seres humanos o de animales.

Esporas: designa un cuerpo microscópico unicelular o pluricelular que se forma con fines de dispersión y supervivencia por largo tiempo en condiciones adversas, y que generalmente es una célula haploide.

Basidios: Órgano globoso y cilíndrico que produce esporas de los hongos basidiomicetos.

Catalizadores: en biología un catalizador es aquel que permite acelerar los procesos metabólicos de los seres vivos.

Conidios: esporas de origen asexual, no flageladas, carente de pared esporangial.

Cosmopolita: que tiene una distribución global, que se puede encuentra en muchos países.

Hifas: Filamento, ramificado o no, de tamaño microscópico, que reunido con otros filamentos forma el cuerpo vegetativo de los hongos, el micelio

Hormonas: Las hormonas son sustancias segregadas por células especializadas, localizadas en glándulas endocrinas, o también por células epiteliales e intersticiales cuyo fin es el de influir en la función de otras células.

Micelio: Aparato vegetativo de los hongos que le sirve para nutrirse y está constituido por hifas.

Profarmaco: fármacos que luego de ser metabolizados por el organismo presentan actividad farmacológica.

Saprotitos: es un organismo heterótrofo que obtiene su energía de materia orgánica muerta o de los detritos desechados por otros seres vivos, de los cuales extrae los compuestos orgánicos que requiere como nutrientes.

Surfactantes: elemento que actúa como detergente, emulsionante o humectante y que permite reducir la tensión superficial que existe en un fluido.

Sustrato: es la superficie en que desarrollan su vida los seres vivos, principalmente del reino vegetal, pero en este caso se refiere al reino fungi.

Xenobiotico: es una sustancia química que se encuentra dentro de un organismo que no se produce naturalmente o se espera que no esté presente dentro del organismo.

12. Bibliografía

- Escasez de agua en el mundo, causas y consecuencias. (febrero 2019) ACNUR
Recuperado de https://eacnur.org/blog/escasez-agua-en-el-mundo-tc_alt45664n_o_pstn_o_pst/
- Arismendi D. (2019) Simultaneous determination of multiresidue and multiclass emerging contaminants in waters by rotating-disk sorptive extraction-derivatization- cromatografía de gases / massspectrom. *Talanta* Volumen 201, 480-489
- Baraño, P., y Tapia, L. (2004). tratamiento de las aguas servidas: situación en Chile. *Ciencia y Trabajo*, 6 (13), 111-117.
- Barceló L. y López M. (2008) *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*. Barcelona, España.
- Bedner M. y Mac Crehan W. 2006. Transformation of Acetaminophen by Chlorination Produces the Toxicants 1,4-Benzoquinone and N-Acetyl-p-benzoquinone Imine. *Environ Sci.seTechnol*, Volumen 40. 516–52240.
- Coello, J. M., & Burgos, F. (2012). *Aplicación del hongo Pleurotus ostreatus como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados*. Escuela superior politécnica del litoral. Guayaquil, Ecuador.
- Correa O., Ruiz A. y Restrepo M. (2014) Estandarización de un método por HPLC para cuantificar diclofenaco en muestras de microdiálisis mediante fotoderivatización precolumna, *Revista Cubana de Farmacia*. Volumen 48, Pág 23-33.
- Cruz-Morato C., Ferrando-Climent L., Rodriguez-Mozaz S. & Marco-Urrea E. (2013) Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water resersh*. 47. 5200-5210.

- Deménech, J. L. (2007). Huella ecológica y desarrollo sostenible. Recuperado de <https://www.tysmagazine.com/libro-gratuito-huella-ecologica-desarrollo-sostenible/>-Gaitán-Hernández. R. (2006) Manual práctico del cultivo de zetas, aislamiento, siembra y producción. *Ecología AC.28*, 9-10.
- Garbisu, C., Amézaga, I., & Alkorta, I. (2002). Biorremediación y ecología. *Revista Ecosistemas*. Volumen 11. 2-3.
- Godoy G., de Diego M. y Godoy R. (s.f) *Análisis de medicamentos, cromatografía Departamento de Farmacia*. Facultad de Farmacia. Universidad de Concepción.
- Gomez, V. (s.f) *Basidiomicetos: características, nutrición, hábitat y reproducción*. Liferder. Extraído de <https://www.liferder.com/basidiomicetos/>
- Henriquez V.D (2012) *Presencia de contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema. Estudio de caso: productos farmacéuticos en la cuenca del río Bio bío, región del Bio bío, Chile*. Universidad de Chile, Santiago de Chile.
- Hernández-Ruiz, G. M., Álvarez-Orozco, N. A. y Ríos-Osorio, L. A. (2017). Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: revisión sistemática. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. Volumen 18. 138-159.
- Hernando M, Heath E, Petrovic M, y Barcelo D. (2006) Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Volume 385. 985-991
- Hanson, J.R. (2008) *The Chemistry of Fungi*. Royal Society of Chemistry, Cambridge
- La contaminación emergente del medio fluvial (20 de junio de 2013). <http://www.iagua.es/blogs/gaiaema/la-contaminacion-emergente-delmedio-fluvial>
- ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (1995) Extraído de <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific->

[guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf](#)

- Kuhan F., Castiglia V. y Papunitti L. (2013) Reino fungi; morfología y estructura de los hongos. *Boletín biológica*. N° 28. 11-18. Recuperado de: <https://core.ac.uk/download/pdf/52479411.pdf>

- Loza, E. (2011). AINEs en la práctica clínica: lo que hay que saber. *Inf Ter Sist Nac Salud*, 35(3), 88-95.

-Marco-Urrea E. Pérez-Trujillo M. y Vicent T. (2008) Caminal ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*, *Chemosphere*, 74 , 765-772.

-Martínez M.J (1995) Estabilidad y preparación de mezclas totales para nutrición parenteral, *Editorial técnica*, 231. Extraído de https://www.sefh.es/revistas/vol19/n4/229_232.PDF

-Menéndez, J. L.(s.f) Basidiomicetes. Características generales. *asturnatura.com* Num.206. Recuperado de <https://www.asturnatura.com/articulos/hongos/basidiomicetes.php> ISSN1881-5068

-Montague, P. (2006). *Drugs in the Water*. Rachel's Env. Health Weekly 614: 15-22

-Ortiz, M.: (2009) Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina, *Orinoquia* 13 (2): 137-144, Colombia.

-Papinutti L. (2013) Reino fungi: morfología y estructura de los hongos. *Revista boletín biológica*. Volume 28, 11.

-Raffino María Estela Contaminación del Agua. Recuperado de en: <https://concepto.de/contaminacion-del-agua/#ixzz6GLEmixWo>

- Rodríguez, J. P. (2010). Contaminación del agua. *Contaminación ambiental*. Fundación en causa por el desarrollo humano. Bogotá. Colombia 255-300
- Rojas Ramírez, Lena (2013) Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisorio con impacto en la agricultura. *Fitosanidad*, vol. 17 (1) 49-55
- Sandoval, P. A., Rajabi-Siahboomi, A., & D'León, L. F. P. (2015). Análisis comparativo de la cinética de liberación de diclofenaco sódico a partir de matrices hidrofílicas en medios de disolución convencionales y biorrelevantes. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 44(3), 282-310.
- Small, R. E. (1989). Diclofenac sodium. *Clinical pharmacy*, 8(8), 545-558.
- Torres, Carmen, & Zarazaga, Miriam. (2002). Antibióticos como promotores del crecimiento en animales: ¿Vamos por el buen camino? *Gaceta Sanitaria*, 16(2), 109-112. Recuperado en http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112002000200002&lng=es&tlng=es.
- Todd, P. A., & Sorkin, E. M. (1988). *Diclofenac sodium*. *Drugs*, 35(3), 244-285.
- USP 31–NF 26, Capítulo General <1225> Validación de métodos farmacopéicos
- Velásquez F, 25 de julio 2018, Industria salmonera y cómo destruye el fondo marino del sur de Chile, radio U de Chile. Chile. Recuperado de <https://radio.uchile.cl/2018/07/25/industria-salmonera-como-destruye-el-fondo-marino-del-sur-de-chile/>
- Wei T. (2003) The Metabolism of Diclofenac - Enzymology and Toxicology Perspectives. *Current Drug Metabolism*. 4. 319. Recuperado de <https://doi.org/10.2174/1389200033489398>
- Wesenberg D., Kyriakides I., & Spiros N. (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22 161–187.

-Weber F. (2014): Pharmaceuticals in the environment: Occurrence, effects, and potential cooperative action under SAICM funded by the German Federal Environment Agency (UBA). *The Environmental Research* Plan No. 3712 65 408.

https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/p_harmaceuticals_in_the_environment_0.pdf



Anexo 1: Tratamiento de aguas residuales y Normativa chilena de agua

En Chile existen diferentes sistemas de saneamiento de aguas, estos varían principalmente según la zona geográfica en la que se encuentren como, por ejemplo, en la parte norte de Chile, se utilizan lagunas como sistema de tratamiento secundario, mientras que en el sur de Chile se utiliza el sistema de lodos activados.

En las plantas de tratamiento de gran tamaño, incorporan un tratamiento primario donde se retira la materia orgánica y sólidos suspendidos en el agua. El tratamiento secundario es donde se remueve las partículas orgánicas disueltas, la cual es vista como la parte más importante de las plantas de tratamiento. Las principales técnicas utilizadas en Chile son los lodos activados, lagunas, sistema de medio fijo y lombrifiltros, siendo la de lodos activados la más común, utilizadas en el 61 % de las Plantas de tratamiento de agua servidas (PTAS). (Baraño P. 2004) El 90% de las plantas de tratamiento cuentan con una desinfección de las aguas, la cual la realizan con el método de cloración, el 76% y un 24 % lo realizan a través del método de UV. Esto se realiza para cumplir con la normativa de la remoción de organismos patógenos para el ser humano utilizando como indicador el número de coliforme fecales en 100 ml de agua, cuya norma de emisión no debe superar los 1000, quedando dentro de la normativa de agua para uso recreacionales.

En la “NORMA CHILENA NCH N°1333 DE 1978 MODIFICADA EN 1987. REQUISITOS DE CALIDAD DE AGUA PARA DIFERENTES USOS” se habla de los requisitos para el uso de agua para vida acuática donde solo se regulan las siguientes sustancias con sus respectivos factores de seguridad:

Tabla sobre los factores de seguridad extraída de la Norma Chilena de agua:

Tóxico	Factor de seguridad
Pesticidas	1/100 de la LTm96
Metales pesados	1/100 de la LTm96
Cianuros	1/10 de la LTm96
Tóxico no acumulativo	1/10 de la LTm96
Tóxico acumulativo y persistente	1/100 de la LTm96
Detergentes	1/10 de la LTm96

Como se puede observar la Normativa de agua chilena no habla del retiro de contaminantes como medicamentos desde las aguas residuales. Las plantas de PTAS no tienen la obligación de realizar tratamientos adicionales al agua para eliminar contaminantes emergentes, por lo que este tipo de residuos terminan llegando al medio acuático.

Anexo 2: Purificación de la muestra mediante extracción en fase sólida

Para el tratamiento de las muestras, previo al análisis, se realizó una extracción, el cual es un proceso de separación donde una o más sustancias se distribuyen en dos fases, según su afinidad. Esto se realiza principalmente para concentrar o separar un analito de interés de una muestra compleja y así eliminar interferente facilitándonos nuestro posterior análisis.

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica que se utiliza para limpiar la muestra previa la cuantificación y/o para futura concentración del analito que está presente en la muestra. El término “extracción en fase sólida” es debido a que el material de soporte utilizado es un sólido, a través del cual pasa un líquido o un gas. Los analitos son absorbidos en el soporte y luego eluidos de acuerdo a sus diferentes afinidades entre el material absorbente y la fase móvil utilizada.¹

Una columna de SPE consiste en dos discos porosos que mantienen entre ellos un espacio absorbente de partículas gruesas en un tubo desechable muy parecido al de una jeringa. Al pasar la muestra por el cartucho, quedan retenidos los compuestos en él, los que posteriormente se van eluyendo según su afinidad por los solventes que se utilizan (fase móvil).

La SPE cuenta con 5 etapas (*en algunos casos solo 4)

1.- Activación: donde se utiliza un solvente para humidificar la fase sólida.

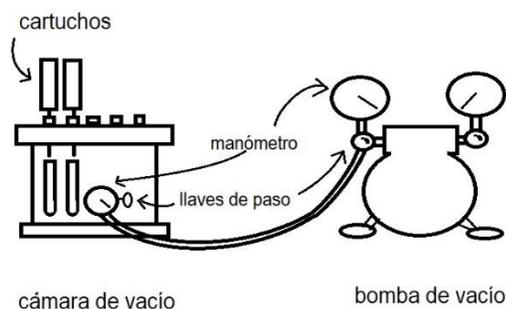
2.- Acondicionamiento: la fase estacionaria se acondiciona con el mismo solvente de la matriz de nuestra muestra, por ejemplo, si nuestra muestra está en agua, se acondiciona con agua. Esto facilita la interacción entre los analitos de nuestra muestra y la fase estacionaria.

3.- Carga de la muestra: se hace pasar la muestra por el cartucho.

4.- Lavado: Se eliminan interferentes utilizando un solvente donde el compuesto a analizar no sea miscible, pero si el resto de compuestos de nuestra muestra.

5.- Elución: se utiliza el solvente donde el analito de interés sea miscible y de esta forma se eluye a través del cartucho y se recibe en un recolecto.

Para el tratamiento de las muestras se utilizó la extracción en fase sólida. Para esto se requirió como equipamiento de una cámara de vacío de vidrio con válvula de presión, manómetro y llave de paso, unida a una bomba para vacío. Se utilizaron cartuchos de C18 C18 Water Sep-pak Vac 6cc.



Fuente: <http://www.teknokroma.es/UserFiles/Filtracion/682.pdf>