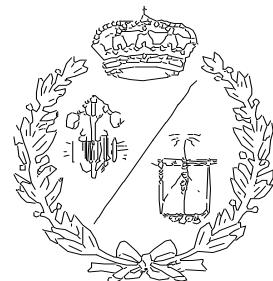


**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN**

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Trabajo Fin de Carrera

**Estudio de sistemas enzimáticos para la
degradación de oxitetraciclina y
eritromicina**

**(Study of enzymatic systems for the removal
of oxytetracycline and erythromycin)**

Para acceder al Título de
INGENIERO QUÍMICO

Autor: Luis Sanz Cortázar

Febrero - 2015



UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Estudio de sistemas enzimáticos para la degradación de oxitetraciclina y eritromicina

**(Study of enzymatic systems for the removal
of oxytetracycline and erythromycin)**

Autor: Luis Sanz Cortázar

Orientadora: Lucía Lloret Caulonga

Santiago de Chile, 16 de enero de 2015

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente proyecto:

A mi tutora Lucía Lloret, por su esfuerzo y dedicación, pero sobre todo por la confianza depositada en mí.

A María Victoria Riquelme y Andrea Carvajal, por su paciencia y ayuda en el laboratorio, así como a todos los integrantes del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental.

A mis compañeros de la Universidad Técnica Federico Santa María, especialmente a Álvaro, por su gran amistad y apoyo.

A mis compañeros de la Universidad de Cantabria, por estos increíbles cinco años.

A mi familia y amigos, muy especialmente a mis padres, a los que siempre estaré eternamente agradecido por su apoyo incondicional, sacrificio y esfuerzo.

A la Dirección General de Investigación y Postgrado de la Universidad Técnica Federico Santa María, por su financiación en el proyecto 271472.

Gracias de corazón.

Luis

RESUMEN

Durante los últimos años, la salmonicultura ha experimentado un considerable auge a nivel mundial, convirtiéndose en Chile en una de las industrias más rentables del país. Sin embargo, el uso desmedido de antibióticos en este tipo de actividades, orientado a prevenir infecciones en los cultivos y aumentar así su producción, ha originado una serie de repercusiones negativas sobre el medioambiente.

Uno de los mayores problemas asociados a esta práctica es la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, que pueden proliferar más allá del entorno acuático y generar potenciales problemas de salud en seres humanos y animales terrestres. Surge, por tanto, la necesidad de desarrollar métodos de degradación eficaces para evitar la presencia de estos compuestos en el medio.

En el presente estudio, se decide investigar la aplicación de sistemas enzimáticos como alternativa para la eliminación de los principales antibióticos presentes en estas aguas. En concreto, se evalúan las condiciones de degradación de oxitetraciclina y eritromicina mediante la enzima lacasa de *Trametes versicolor* y se estudia el efecto del pH sobre el sistema, así como la incorporación del mediador siringaldehído.

Palabras clave: lacasa, oxitetraciclina, eritromicina, siringaldehído, biodegradación.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. SALMONICULTURA EN CHILE	2
1.2. USO DE ANTIBIÓTICOS	4
1.2.1. Oxitetraciclina	5
1.2.2. Eritromicina.....	5
1.2.3. Impacto ambiental	6
1.3. APLICACIÓN DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS.....	8
1.3.1. Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	8
1.3.2. Siringaldehído	9
1.4. OBJETIVOS.....	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. REACTIVOS	13
2.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	15
2.3. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA ENZIMA.....	16
2.4. EVALUACIÓN DE LA ENZIMA PARA LA ELIMINACIÓN DE OXITETRACICLINA Y ERITROMICINA	17
2.4.1. Efecto del pH y del mediador.....	17
2.4.2. Análisis HPLC	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
3.1. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA ENZIMA.....	21
3.2. EVALUACIÓN DE LA ENZIMA PARA LA ELIMINACIÓN DE OXITETRACICLINA Y ERITROMICINA	22
3.2.1. Efecto del pH y del mediador.....	22
3.2.2. Determinación de modelos cinéticos de estabilidad	25
3.2.3. Efectos sobre el rendimiento de eliminación	26
4. CONCLUSIONES.....	28
5. REFERENCIAS	30

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SALMONICULTURA EN CHILE

La acuicultura se ha convertido en una importante industria proveedora de alimentos de alto valor nutricional y generadora de empleo e ingresos. No sorprende, por tanto, que se trate de uno de los sectores productivos que ha manifestado un mayor crecimiento en los últimos años.

En Chile, la introducción de la salmonicultura ha tenido un gran éxito debido a las favorables condiciones medioambientales que posee el país. Sus ríos profundos, islas, fiordos y bahías facilitan la instalación de zonas de cultivos protegidas. Además, se trata de agua pura y libre de contaminación, que cuenta con temperaturas idóneas para esta práctica. Otros factores que han favorecido el desarrollo de esta industria son el fácil acceso a las materias primas necesarias para la producción de alimentos para peces, la mano de obra estable y capacitada y la iniciativa de inversionistas chilenos y extranjeros.

Este país ha experimentado un importante crecimiento en salmonicultura durante los últimos años. De hecho, se ha consolidado como el segundo productor de salmón a nivel mundial, antecedido por Noruega y seguido por Reino Unido y Canadá. En la **Figura 1.1** se evidencia el claro dominio que atesoran Chile y Noruega en este sector, representando el 79% de la producción mundial.

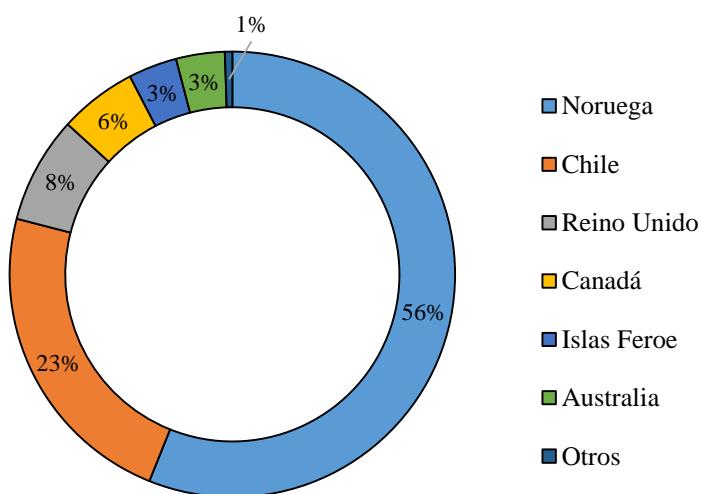


Figura 1.1. Producción mundial de salmón de cultivo en el año 2013 [1].

La salmonicultura, como cualquier otra industria, no está exenta de problemas, ya que las enfermedades que actúan sobre sus cultivos ocasionan anualmente numerosas pérdidas económicas. Esta desfavorable situación tuvo lugar en Chile entre los años 2009 y 2011, tal y como se observa en la **Figura 1.2**. Con el objetivo de mantener bajo control a los patógenos responsables de estas enfermedades, la industria farmacéutica ha desarrollado productos químicos biológicamente activos destinados a su eliminación y/o inactivación. Entre todos estos fármacos, destaca el uso masivo de antibióticos.

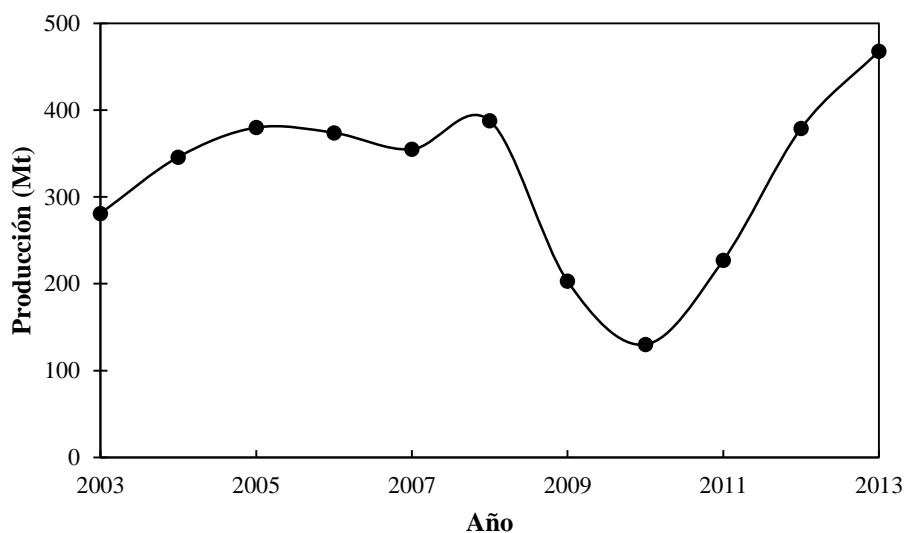


Figura 1.2. Evolución de la producción de salmón de cultivo en Chile [1].

1.2. USO DE ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son fármacos, de origen natural o sintético, que tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de ciertas clases de microorganismos, generalmente bacterias. Su uso descontrolado en salmonicultura genera una serie de repercusiones que escapan de los confines geográficos y económicos de esta actividad, pudiendo influenciar negativamente sobre la salud humana y animal [2].

Se ha constatado que el uso de antibióticos en Chile excede ampliamente las cantidades utilizadas en otros países como Noruega, convirtiéndose a día de hoy en un importante motivo de preocupación. Como ejemplo, la industria chilena utiliza, para producir una tonelada de salmón, aproximadamente 75 veces más antibióticos que la industria noruega [3].

Otro de los grandes problemas asociados a esta práctica reside en la utilización de un amplio espectro de antibióticos para la producción de estos peces. Además, existe una gran cantidad de compuestos que se utilizan tanto en agua dulce como en entornos marinos. La **Figura 1.3** muestra los datos más recientes sobre el uso de los diferentes tipos de antibióticos en Chile.

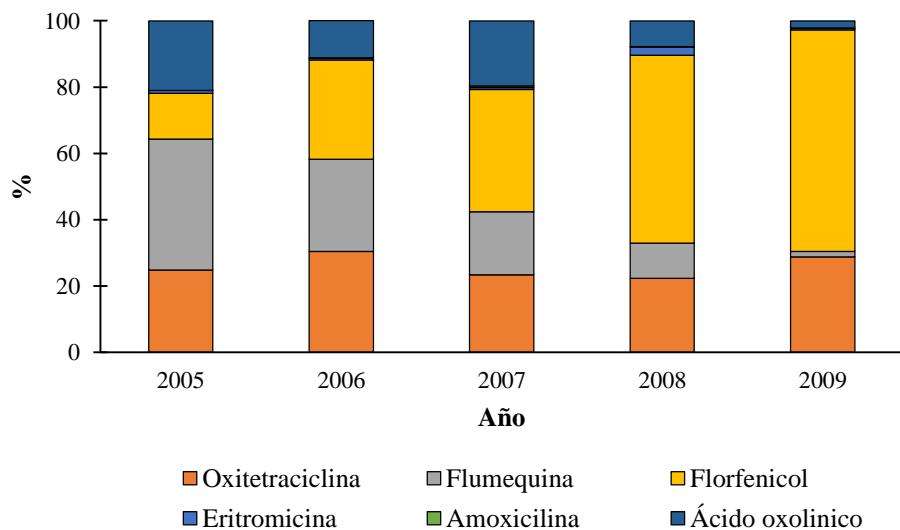


Figura 1.3. Antibióticos más utilizados en salmonicultura en Chile [4].

Debido a su elevada utilización y alta toxicidad, y con el objetivo de considerar compuestos pertenecientes a diferentes clases de antibióticos, se prestará especial atención a la oxitetraciclina y a la eritromicina.

1.2.1. Oxitetraciclina

La oxitetraciclina es un antibacteriano sistémico cuyo mecanismo de acción es inhibir la síntesis de las proteínas bacterianas. Pertenece al grupo de las tetraciclinas, las cuales derivan de cultivos de actinomiceto *Streptomyces rimosus*. Su actividad antibacteriana y propiedades farmacocinéticas están influenciadas por la quelación de iones metálicos [5].

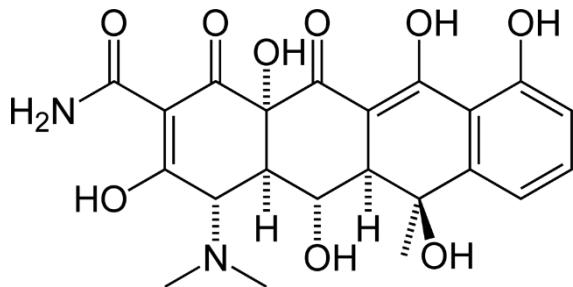


Figura 1.4. Molécula de oxitetraciclina.

Posee un amplio espectro de actividad antimicrobrial. Sin embargo, algunas cepas de bacterias han desarrollado resistencia a este antibiótico, reduciendo su eficacia en el tratamiento de algunos tipos de infecciones. A pesar de ello, se trata de un fármaco antibacteriano de muy bajo coste, por lo que se ha convertido en uno de los antibióticos más empleados en acuicultura.

1.2.2. Eritromicina

La eritromicina es un antibiótico, perteneciente al grupo de los macrólidos, que ha sido utilizado con éxito en el tratamiento de varias infecciones bacterianas. Su mecanismo

de acción consiste en impedir la elongación de la cadena peptídica durante la síntesis proteica.

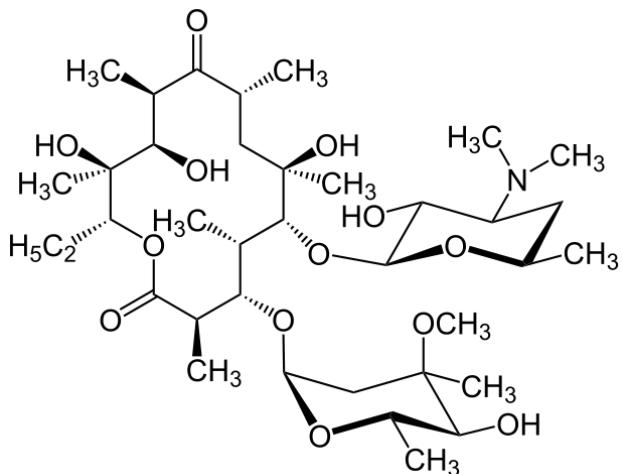


Figura 1.5. Molécula de eritromicina.

Se trata de un antibiótico de espectro antibacteriano moderadamente amplio, con acción más marcada sobre bacterias Gram positivas, aunque también es activo frente a algunas Gram negativas, actinomicetos, treponemas, micoplasmas, clamidias y rickettsias [5].

1.2.3. Impacto ambiental

El uso excesivo de antibióticos conlleva efectos ambientales más allá de los propios recintos de salmonicultura, viéndose involucradas especies silvestres que habitan cerca de estas zonas [2]. Asimismo, puede causar nuevos factores de resistencia y la posterior propagación de agentes patógenos, así como afectar a la diversidad biológica del fitoplancton y a las comunidades de zooplancton [6].

Algunas de estas sustancias son excretadas sin haber sido metabolizadas o liberadas como metabolitos activos, persistiendo en el entorno durante largos períodos de tiempo. De hecho, se ha evidenciado la presencia de antibióticos en el ambiente durante varias semanas, incluso a cientos de metros del lugar donde fueron suministrados [7].

La aparición de estos factores de resistencia en bacterias, además de ser un problema biológico, ha desencadenado alertas sobre el consumo de estos productos. Existen estudios que aseguran que el desmesurado empleo de estos compuestos favorece la infección de bacterias patógenas en seres humanos y animales terrestres [3].

Por todo ello, se hace necesario desarrollar métodos de eliminación de antibióticos con el objetivo de reducir su impacto sobre el medioambiente y así poder alcanzar una sostenibilidad global.

1.3. APLICACIÓN DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS

Actualmente, existen diferentes técnicas orientadas a erradicar la alarmante presencia de antibióticos en el medio acuático. Algunos de estos métodos comenzaron a desarrollarse hace mucho tiempo, por lo que han adquirido una importante popularidad a día de hoy.

Un claro ejemplo son los procesos de oxidación avanzada (POA), entre los que destacan la ozonización, procesos electroquímicos, procesos Fenton, radiación ultravioleta y fotocatálisis. El proceso se basa en una oxidación química mediante radicales hidroxilo (OH^-) en condiciones suaves de presión y temperatura. Estas técnicas proporcionan elevados índices de eliminación y con tiempos de reacción muy cortos, pero conllevan altos costes y la formación de subproductos tóxicos [8].

Existen también métodos más ecológicos y respetuosos con el medioambiente, aunque menos eficientes. Los tratamientos físicos, como la sorción y la separación con membranas, requieren grandes cantidades de energía y únicamente suelen ser eficaces en aguas relativamente limpias [9]. Por otro lado, los métodos de eliminación con bacterias y algas aportan eficacias parciales de transformación [8].

Sin embargo, una de las alternativas más innovadoras es la utilización de sistemas enzimáticos, cuya aplicación en la biorremediación de aguas está relacionada con un consumo reducido de energía, así como de productos químicos [10]. Asimismo, las reacciones catalizadas por enzimas generalmente implican tiempos de reacción reducidos, medios de reacción sencillos y operaciones fáciles de controlar.

1.3.1. Lacasa de *Trametes versicolor*

Las enzimas son biocatalizadores de naturaleza proteica que actúan en la degradación del material orgánico. Una de las más ampliamente distribuidas es la lacasa, una enzima oxidoreductasa que oxida una amplia gama de compuestos aromáticos y cuya utilización logra reducir la formación de oxígeno molecular, su único subproducto, en el agua [11].

Por ese motivo, se trata de una buena alternativa para la degradación de antibióticos en acuicultura. Además, este proceso es sostenible y respetuoso con el medio ambiente, viéndose incrementado su interés en los últimos años debido a su destacada aplicabilidad biotecnológica [12]. Estudios recientes han evidenciado su capacidad para eliminar tetraciclinas [13], sulfonamidas [14-15] y antiinflamatorios [16], entre otros.



Figura 1.6. *Trametes versicolor*.

El potencial redox de la lacasa depende del organismo de origen, siendo la producida por *Trametes versicolor* una de las que mayor potencial redox posee [17], lo que la convierte en una alternativa apropiada para la biorremediación de aguas contaminadas.

1.3.2. Siringaldehido

La presencia de mediadores se hace necesaria cuando la enzima no es capaz de oxidar por sí misma sustratos complejos. Se trata de compuestos de bajo peso molecular cuya misión es transportar electrones entre la enzima oxidada y el compuesto objetivo [18]. Su incorporación ofrece interesantes posibilidades, ya que aumenta la variedad de compuestos que pueden ser oxidados por la enzima y aporta múltiples modos de ataque al sustrato, lo que se traduce en un mayor rendimiento del proceso [12].

Tal y como se observa en la **Figura 1.7**, la lacasa oxida al mediador en presencia de oxígeno, otorgando a éste un alto potencial de oxidación que le permite oxidar al compuesto de interés, reduciéndose él mismo y regenerándose para posteriores ciclos de oxidación enzimática.

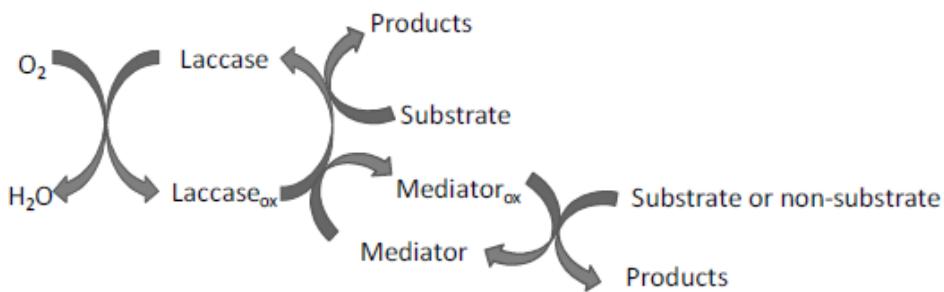


Figura 1.7. Mecanismos de reacción de la lacasa.

El siringaldehído (**Figura 1.8**) es un compuesto aromático cuyo bajo potencial redox le permite ser oxidado más fácilmente por la lacasa, aunque por otra parte, origina menores niveles de oxidación en los sustratos [16]. Además, se ha demostrado que la actividad de la lacasa de *Trametes versicolor* aumenta cuando se incorpora siringaldehído, en comparación con el uso de otros mediadores [19].

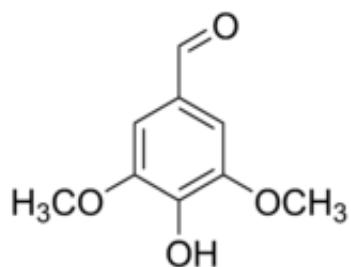


Figura 1.8. Molécula de siringaldehído.

La actividad de la enzima, al igual que su estabilidad, está íntimamente relacionada con las condiciones de pH y temperatura a las que se trabaje, así como con la incorporación de mediadores [20]. Es por ello que surge la necesidad de evaluar el efecto de estas variables durante todo el proceso de degradación.

1.4. OBJETIVOS

Los objetivos que se persiguen con el desarrollo del presente proyecto se enumeran a continuación:

Objetivo general

- Biorremediación de aguas contaminadas por antibióticos empleados en salmonicultura en Chile mediante el uso de la enzima oxidativa lacasa.

Objetivos específicos

- Evaluación de las condiciones de operación para la aplicación de sistemas enzimáticos con el fin de alcanzar eficacias de transformación significativas, minimizando la pérdida de estabilidad de la enzima.
- Estudio del efecto del pH en la eliminación de oxitetraciclina y eritromicina, así como la evaluación del uso de siringaldehído.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. REACTIVOS

Los reactivos empleados en el desarrollo experimental de este estudio se detallan a continuación:

- Oxitetraciclina

- Suministrado por Sigma-Aldrich
- Fórmula molecular: C₂₂H₂₄N₂O₉
- Peso molecular: 460,43 g/mol
- Solución patrón: 500 mg/L en metanol

- Eritromicina

- Suministrado por Sigma-Aldrich
- Fórmula molecular: C₃₇H₆₇NO₁₃
- Peso molecular: 733,93 g/mol
- Solución patrón: 500 mg/L en metanol

- ABTS

- Suministrado por Sigma-Aldrich
- Fórmula molecular: C₁₈H₁₈N₄O₆S₄
- Peso molecular: 514,62 g/mol
- Solución patrón: 10 mM en buffer acetato (100 mM, pH 5)

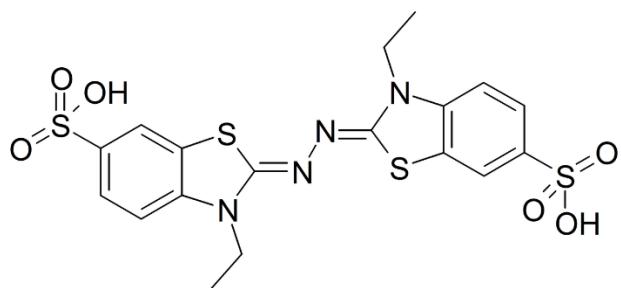


Figura 2.1. Molécula de ABTS.

- Siringaldehído (SA)
 - Suministrado por Sigma-Aldrich
 - Fórmula molecular: C₉H₁₀O₄
 - Peso molecular: 182,18 g/mol
 - Solución patrón: 200 mg/L en metanol
- Lacasa de *Trametes versicolor*
 - Suministrado por Sigma-Aldrich
 - Actividad: 0,5 U/mg
 - Solución patrón: 2,5 g/30 mL en buffer fosfato (100 mM, pH 7)

2.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de la lacasa se determinó utilizando un ensayo colorimétrico a partir de la oxidación de 5 mM de ABTS. Los ensayos se llevaron a cabo en buffer acetato 100 mM a 436 nm ($\epsilon_{436} = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), pH 5 y 30 °C. Se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS Specord 210, comercializado por la compañía Analytik Jena.

Una unidad de actividad (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto, expresándose todas las actividades en U/L.



Figura 2.2. Espectrofotómetro UV-VIS Specord 210.

2.3. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA ENZIMA

El efecto del pH sobre la estabilidad de la lacasa fue evaluado en ausencia de sustrato a pH 4 y pH 7 durante 5 horas a 25 °C. Además, se determinó la actividad enzimática de todas las muestras en condiciones estándar (pH 5 y 30 °C). Las actividades residuales se calcularon como la relación entre la actividad medida en cada tiempo de reacción y el valor teórico inicial (**ec. 1**).

$$act. residual (\%) = \frac{act_{t=t}}{act_{t=0}} \cdot 100 \quad (\text{ec. 1})$$

2.4. EVALUACIÓN DE LA ENZIMA PARA LA ELIMINACIÓN DE OXITETRACICLINA Y ERITROMICINA

2.4.1. Efecto del pH y del mediador

Se estudió la influencia del pH y del mediador tanto en la degradación de los antibióticos como en la estabilidad de la lacasa, evaluándose además la inactivación de la enzima para las diferentes condiciones.

Los ensayos fueron realizados en condiciones máximas de actividad (pH 4) y estabilidad (pH 7), tanto en ausencia como en presencia de siringaldehído (2 mM). Se empleó buffer acetato 100 mM en los experimentos efectuados en medio ácido, mientras que en aquellos realizados a pH neutro, la solución reguladora utilizada fue buffer fosfato 100 mM.

Durante todo el estudio, se trabajó con una actividad inicial de lacasa de 2000 U/L, asegurando así la degradación de los sustratos. Por otro lado, la concentración empleada de oxitetraciclina y eritromicina fue de 5 mg/L, a fin de favorecer su posterior medición.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL, con un volumen total de reacción de 50 mL. Las muestras permanecieron agitadas durante 5 horas a una velocidad constante de 180 rpm y a temperatura ambiente (25 °C).



Figura 2.3. Benchtop incubator shaker.

Además, se tomaron muestras de 50 μ L a diferentes tiempos de reacción (1, 15, 30 minutos y 1, 3, 5 horas) con el objetivo de cuantificar la actividad residual de la enzima.

Para poder realizar un seguimiento del porcentaje de eliminación bajo las diferentes condiciones estudiadas, se tomaron alícuotas de 1 mL a diferentes tiempos de incubación (0, 15, 30 minutos y 1, 3, 5 horas). Las muestras se filtraron (0,45 μ m) con el fin de retener cualquier sólido presente en la disolución que pudiera dificultar su posterior análisis. Además, se acidificaron con ácido clorhídrico para detener la reacción y posteriormente se congelaron. La concentración residual de antibiótico se cuantificó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

También se llevaron a cabo controles en ausencia de lacasa, con y sin mediador. Los resultados evidenciaron que la eliminación de los antibióticos únicamente se ve afectada por la acción enzimática. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

2.4.2. Análisis HPLC

Para determinar la concentración de ambos antibióticos se utilizó un equipo HPLC Agilent Technologies 1260 con bomba cuaternaria, inyector automático y detector de diodos (DAD). La separación se llevó a cabo en una columna Gemini C18 (50mm x 2.0mm; 3 μ m), comercializada por la compañía Phenomenex.



Figura 2.4. HPLC Agilent Technologies 1260.

En el método utilizado para cuantificar la degradación de oxitetraciclina, la temperatura de la columna se mantuvo en 30 °C. La fase móvil utilizada consiste en una mezcla de ácido oxálico 100 mM ajustado a pH 4, acetonitrilo y metanol (70:20:10 v/v/v). La velocidad de flujo fue de 0,2 mL/min, el volumen de inyección de 2 µL y la longitud de onda de 360 nm. Por otro lado, la obtención de los datos de cuantificación de eritromicina está aún en progreso.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA ENZIMA

La **Figura 3.1** muestra los datos de estabilidad de la lacasa a pH 4 y pH 7, evaluados con el objetivo de comparar el efecto que produce la presencia de los antibióticos y del mediador, así como de los posibles productos de transformación. La línea continua representa el ajuste al modelo cinético a pH 4.

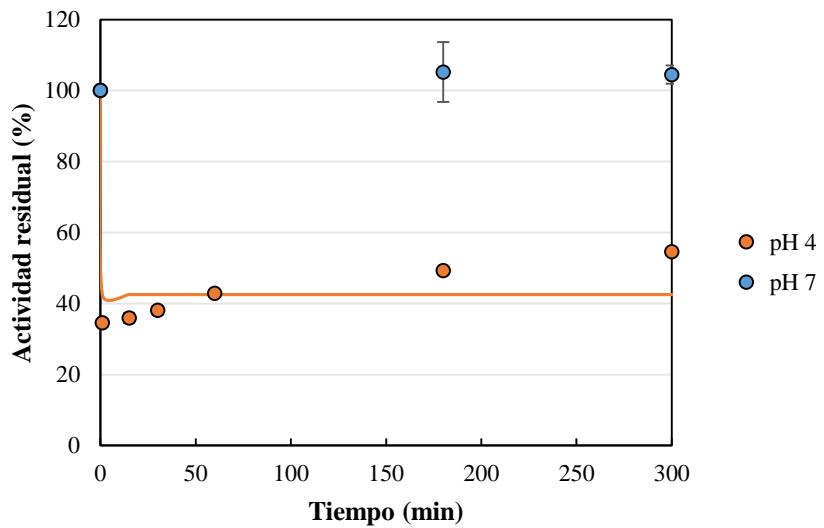


Figura 3.1. Estabilidad de la lacasa en ausencia de sustrato.

La enzima presenta una alta estabilidad a pH 7, aunque también se observa una importante disminución a pH 4, probablemente debida las cadenas laterales ionizables de la enzima en su estructura terciaria, la cual depende en gran medida del pH del medio [21].

3.2. EVALUACIÓN DE LA ENZIMA PARA LA ELIMINACIÓN DE OXITETRACICLINA Y ERITROMICINA

3.2.1. Efecto del pH y del mediador

La degradación de los antibióticos seleccionados se llevó a cabo con el objetivo de evaluar los sistemas lacasa y lacasa-mediador a diferentes valores de pH. Se estudió su influencia no solo sobre el porcentaje de eliminación, sino también sobre la estabilidad de la enzima. Además, se obtuvieron los modelos cinéticos de inactivación de la lacasa a partir de los perfiles de actividad residual y se estimaron sus parámetros minimizando la suma de cuadrados de los residuos.

En la **Figura 3.2** y **Figura 3.3** se muestran los resultados experimentales obtenidos en ausencia y presencia de mediador a pH 4. Las líneas continuas representan los ajustes al modelo cinético, mientras que la línea discontinua corresponde al modelo de estabilidad de la enzima en ausencia de sustrato.

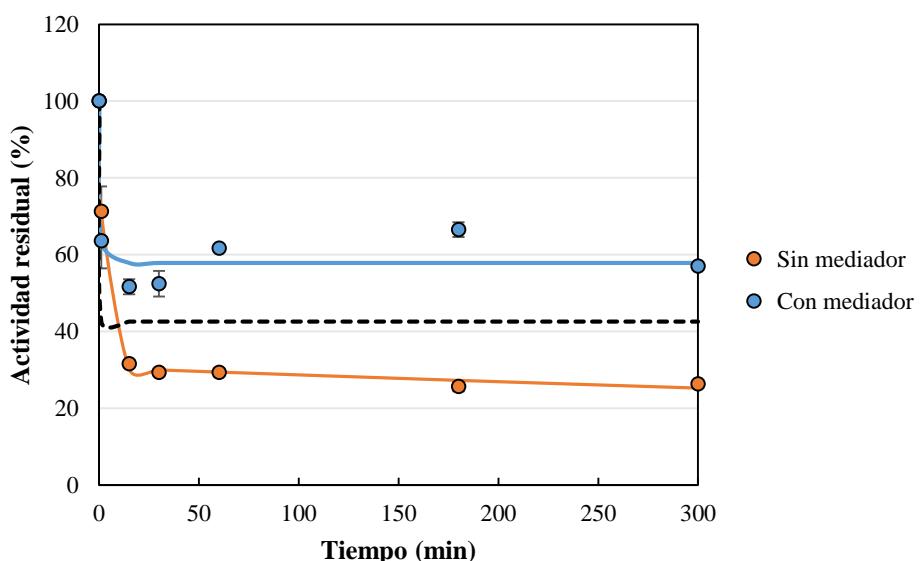


Figura 3.2. Actividad residual de la lacasa durante el tratamiento enzimático de oxitetraciclina a pH 4.

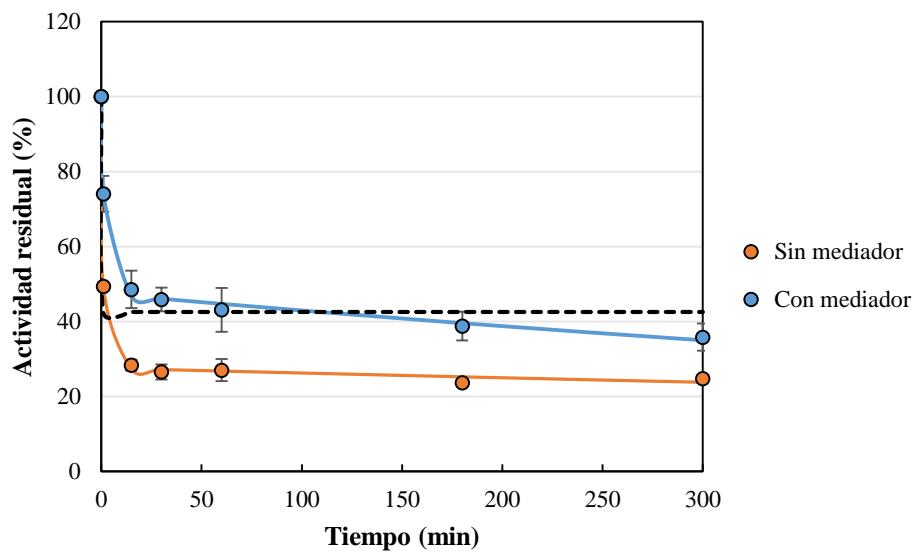


Figura 3.3. Actividad residual de la lacasa durante el tratamiento enzimático de eritromicina a pH 4.

Los ensayos llevados a cabo con oxitetraciclina y en presencia de mediador, presentaron a las 5 horas una actividad residual un 23% mayor que aquellos realizados con eritromicina. La incorporación de siringaldehído aumentó un 15% la actividad enzimática en presencia de oxitetraciclina, mientras que en los ensayos realizados con eritromicina se vio reducida un 8%. Para ambos casos, se observó una ligera inactivación de la enzima en ausencia de mediador.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos a pH 7 (**Figura 3.4** y **Figura 3.5**), se observa una menor inactivación a pH neutro, al igual que ocurría en los ensayos de estabilidad previos (**Figura 3.1**).

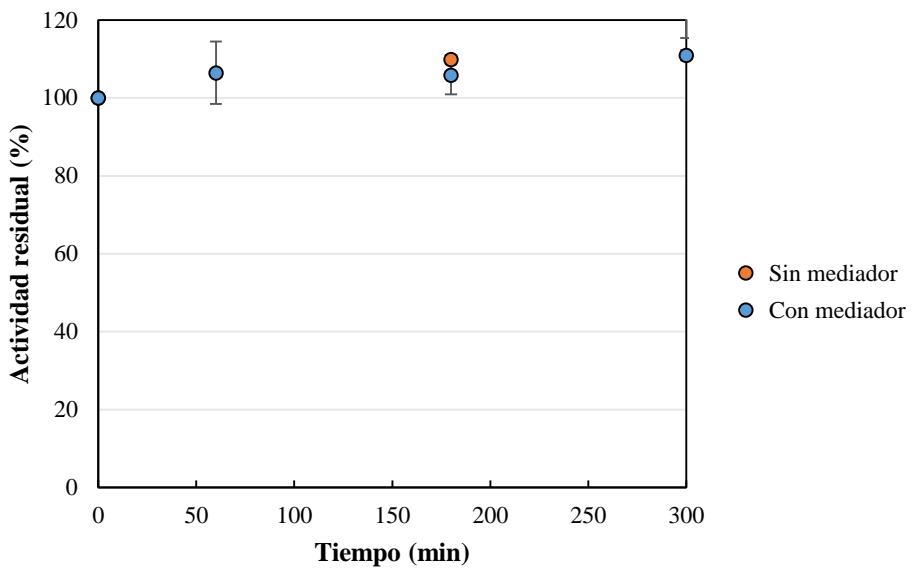


Figura 3.4. Actividad residual de la lacasa durante el tratamiento enzimático de oxitetraciclina a pH 7.

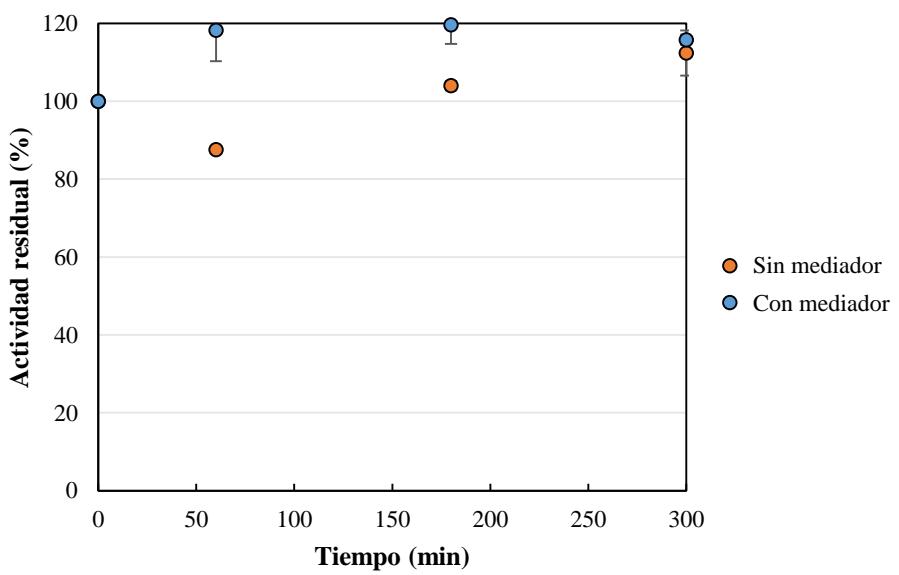


Figura 3.5. Actividad residual de la lacasa durante el tratamiento enzimático de eritromicina a pH 7.

No se evidencian diferencias significativas en los experimentos realizados en presencia de oxitetraciclina o eritromicina a pH 7, aunque bien es cierto que el siringaldehído parece tener un efecto estabilizador sobre la enzima. Tal y como sucedió en los ensayos de estabilidad en ausencia de sustrato, se observó una notable disminución de la actividad residual durante los primeros tiempos de reacción, debida muy probablemente a cambios conformacionales en su estructura que provocaron su momentánea desnaturalización [21].

3.2.2. Determinación de modelos cinéticos de estabilidad

Se obtuvieron los modelos cinéticos de estabilidad a partir de los perfiles de actividad y se estimaron sus parámetros (**Tabla 3.1**) minimizando la suma de cuadrados de los residuos. Los errores obtenidos en la determinación de los parámetros a partir de los duplicados fueron menores a un 3%.

Tabla 3.1. Actividad residual tras 5 horas de ensayo y coeficientes de inactivación obtenidos por ajuste de los datos experimentales.

Antibiótico	pH	Mediador	Actividad residual (%)	a	$k_1 (h^{-1})$	$k_2 (h^{-1})$	R^2
Oxitetraciclina	4	-	26,3	0,306	0,0006	0,533	0,9992
		Siringaldehído	57	0,579	0	2	0,9363
	7	-	121,2 ¹	- ²	-	-	-
		Siringaldehído	111	-	-	-	-
Eritromicina	4	-	24,8	0,276	0,0005	1,2	0,9993
		Siringaldehído	35,8	0,475	0,001	0,68	0,9986
	7	-	112,4	-	-	-	-
		Siringaldehído	115,8	-	-	-	-
Ensayos de estabilidad	4	-	54,5	0,574	14,761	0	0,9479
	7	-	104,5	-	-	-	-

¹ Los valores superiores al 100% fueron debidos a un aumento en la temperatura ambiente.

² Los datos no fueron ajustados a la ecuación, observándose únicamente una inactivación inicial.

Los datos experimentales fueron ajustados a la siguiente expresión de decaimiento exponencial (**ec. 2**), donde ‘x’ es un número adimensional y ‘k₁’ y ‘k₂’ son las constantes de decaimiento [22].

$$\frac{act_i}{act_0} = a \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1 - a) \cdot e^{-k_2 \cdot t} \quad (\text{ec. 2})$$

3.2.3. Efectos sobre el rendimiento de eliminación

Durante los ensayos de degradación de oxitetraciclina llevados a cabo en ausencia de mediador (**Figura 3.6**), la eliminación del antibiótico a las 5 horas fue un 49% mayor a pH 7 que a pH 4. Además, al poseer la enzima mayor estabilidad a pH neutro, se puede afirmar que se lograrían mayores rendimientos para tiempos más largos de reacción. Cabe destacar que los errores obtenidos en el cálculo de porcentajes de degradación a partir de los duplicados fueron menores a un 5%.

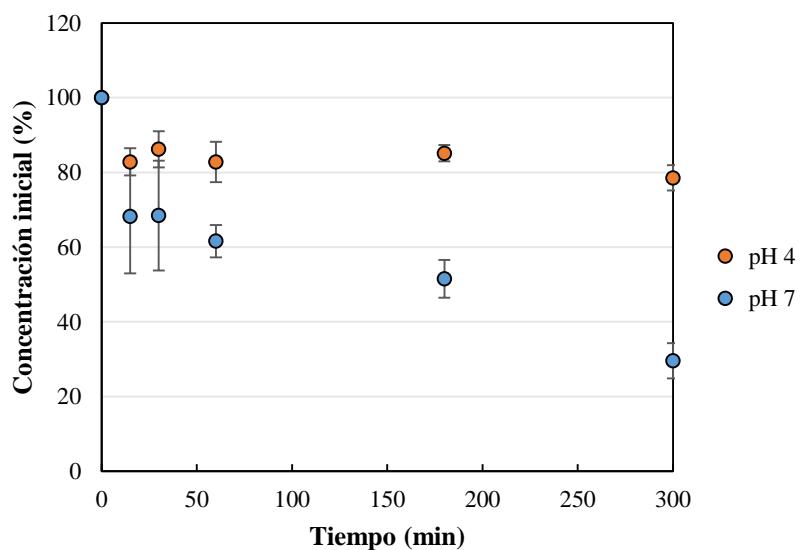


Figura 3.6. Concentración residual de oxitetraciclina en ausencia de siringaldehído.

Por otro lado, en los experimentos realizados en presencia de siringaldehído, no fue posible cuantificar la concentración del antibiótico a partir de los 15 minutos. Es muy posible que la incorporación del mediador provocara su rápida eliminación, situándose la concentración del antibiótico por debajo del límite de cuantificación de la técnica analítica por HPLC (0,3 mg/L). Por tanto, se infiere que la incorporación del mediador originó un porcentaje de remoción mayor al 91% en ambos valores de pH. Tal y como se comentó en anteriores apartados, el método de cuantificación de eritromicina está en proceso de desarrollo.

Tabla 3.2. Eliminación máxima (%) de oxitetraciclina y tiempos a los que se alcanzó.

Antibiótico	pH	Mediador	Tiempo (h)	Eliminación (%)
Oxitetraciclina	4	-	5	21,44
		Siringaldehído	0,25	>92 ³
	7	-	5	70,41
		Siringaldehído	0,25	>91

³ Por debajo del límite de detección mediante HPLC.

4. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que pueden ser extraídas de la presente investigación son las siguientes:

- Se ha llevado a cabo con éxito la degradación enzimática de oxitetraciclina a diferentes valores de pH, viéndose el proceso favorecido por la incorporación de siringaldehído. Este hecho podría contribuir a la aplicación futura de los sistemas lacasa-mediador en la biorremediación de aguas contaminadas por antibióticos.
- La degradación de oxitetraciclina a pH 7 requiere menores tiempos de operación que a pH 4. No obstante, se podrían lograr mayores rendimientos de eliminación aumentando los tiempos de reacción, ya que a ese pH la enzima presenta una baja inactivación.
- La incorporación de siringaldehído aumenta la estabilidad de la enzima cuando se trabaja con oxitetraciclina en condiciones de pH 4.
- La actividad residual de la lacasa de *Trametes versicolor* no se ve prácticamente afectada por el tipo de antibiótico empleado (oxitetraciclina o eritromicina).

5. REFERENCIAS

- [1] Multiexport Foods. “Memoria Anual” [en línea], 2013. [Consulta: 28 diciembre 2014]. Disponible en: <http://www.multiexportfoods.com/>.
- [2] A.H. Buschmann, F. Cabello, K. Young, J. Carvajal, D.A. Varela, L. Henríquez, Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: Analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems, Ocean and Coastal Management 52 (2009) 242-249.
- [3] F. C. Cabello, “Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal” pp. 1001–1006, 2004.
- [4] B.S. Martín N., T. Yatabe R., A. Gallardo L. , P. Medina H., Manual de buenas prácticas en el uso de antibióticos y antiparasitarios en la salmonicultura chilena, Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA), Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, 2010.
- [5] S. Bravo, H. Dolz, M.T. Silva, C. Lagos, A. Millanao, M. Urbina, Informe Final. Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura, Proyecto No. 2003-28, Universidad Austral de Chile, Montt, Chile, 2005.
- [6] C.D. Miranda, C. Kehrenberg, C. Ulep, S. Schwarz, M.C. Roberts, Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47 (2003) 883-888.
- [7] A. Buschmann, “Impacto ambiental de la acuicultura,” *El estado la Investigación en Chile y el Mundo*. no. 56 2, 2001.
- [8] L. Lloret, Enzymatic bioreactors for the oxidation of estrogenic and anti-inflammatory compounds by laccases. PhD Thesis Dissertation, University of Santiago de Compostela, 2013.
- [9] K. Ikehata, N. Jodeiri Naghashkar, and M. Gamal El-Din, “Degradation of Aqueous Pharmaceuticals by Ozonation and Advanced Oxidation Processes: A Review” *Ozone Sci. Eng.*, vol. 28, no. January 2015, pp. 353–414, 2006.
- [10] L. Lloret, G. Eibes, M. T. Moreira, G. Feijoo, and J. M. Lema, “On the use of a high-redox potential laccase as an alternative for the transformation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 97, pp. 233–242, 2013.
- [11] J-A. Majeau, S.K. Brar, R.D. Tyagi, Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants, Bioresource Technology 101 (2010) 2331-2350.
- [12] A. I. Cañas and S. Camarero, “Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 6, pp. 694–705, 2010.

- [13] T. Suda, T. Hata, S. Kawai, H. Okamura, and T. Nishida, “Treatment of tetracycline antibiotics by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole” *Bioresour. Technol.*, vol. 103, pp. 498–501, 2012.
- [14] J. Schwarz, M. O. Aust, and S. Thiele-Bruhn, “Metabolites from fungal laccase-catalysed transformation of sulfonamides” *Chemosphere*, vol. 81, pp. 1469–1476, 2010.
- [15] S.-S. Weng, K.-L. Ku, and H.-T. Lai, “The implication of mediators for enhancement of laccase oxidation of sulfonamide antibiotics” *Bioresour. Technol.*, vol. 113, pp. 259–64, 2012.
- [16] L. Lloret, G. Eibes, T. A. Lú-Chau, M. T. Moreira, G. Feijoo, and J. M. Lema, “Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens” *Biochem. Eng. J.*, vol. 51, pp. 124–131, 2010.
- [17] S. Riva, “Laccases: blue enzymes for green chemistry” *Trends in Biotechnology*, vol. 24, pp. 219–226, 2006.
- [18] M. Fabbrini, C. Galli, and P. Gentili, “Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase” *J. Mol. Catal. - B Enzym.*, vol. 16, pp. 231–240, 2002.
- [19] S. Camarero, D. Ibarra, M. J. Martínez, and Á. T. Martínez, “Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, pp. 1775–1784, 2005.
- [20] S.-S. Weng, S.-M. Liu, and H.-T. Lai, “Application parameters of laccase-mediator systems for treatment of sulfonamide antibiotics” *Bioresour. Technol.*, vol. 141, pp. 152–9, 2013.
- [21] S. Kurniawati and J. A. Nicell, “Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 41, pp. 353–361, 2007.
- [22] C. Aymard and A. Belarbi, “Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 27, no. 8, pp. 612–618, 2000.