



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Boca del Río
Departamento de División de Estudios de Posgrado e Investigación



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BOCA DEL RÍO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“DETERMINACIÓN DE OXITETRACICLINA EN AGUAS SUPERFICIALES DE
ARROYO MORENO”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA

GABRIELA ESTRELLA CÁRDENAS GUEVARA

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARIA DEL REFUGIO CASTAÑEDA CHAVEZ

CO-DIRECTOR

DR. BENIGNO ORTIZ MUÑIZ

ASESOR

DRA. GABYCARMEN NAVARRETE RODRIGUEZ

ASESOR

M.C. ROSA ELENA ZAMUDIO ALEMÁN

22 DE NOVIEMBRE DEL 2021

BOCA DEL RIO, VERACRUZ



Km. 12 Carr. Veracruz-Córdoba, Boca del Río, Ver.
C.P. 94290. Tel. (229) 690 5010 ext. 102
dir01_bdelrio@tecnm.mx
tecnm.mx | bdelrio.tecnm.mx





Boca del Río, Ver **9/NOVIEMBRE/2021**

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

**GABRIELA ESTRELLA CARDENAS GUEVARA
PASANTE DEL PROGRAMA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL
PRESENTE**

De acuerdo con el fallo emitido por los integrantes del Comité Revisor de la **TESIS PARA OBTENCIÓN DE GRADO**, desarrollada por usted cuyo título es:

“DETERMINACIÓN DE OXITETRACICLINA EN AGUAS SUPERFICIALES DE ARROYO MORENO”

Esta División de Estudios de Posgrado e Investigación le concede **AUTORIZACIÓN** para que proceda a su impresión.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Por nuestros mares responderemos

**DR. JUAN DAVID GARAY MARIN
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



c.c.p. Coordinación del Programa MCIAMB
c.c.p. Expediente



Km. 12 Carr. Veracruz-Córdoba, Boca del Río, Ver.
C.P. 94290. Tel. (229) 690 5010 ext. 102
dir01_bdelrio@tecnm.mx
tecnm.mx | bdelrio.tecnm.mx





Instituto Tecnológico de Boca del Río
Departamento de División de Estudios de Posgrado e Investigación

Boca del Río, Ver., **9/NOVIEMBRE/2021**
ASUNTO: SOLICITUD DE FECHA DE
EXAMEN DE GRADO

LIC. ANA OLIVIA AVENDAÑO CHINCOYA
JEFA DEL DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
Presente.

AT ´N.LIC. SONIA CONCEPCIÓN SOLÍS SOLÍS
GESTOR DE TITULACIÓN
Presente.

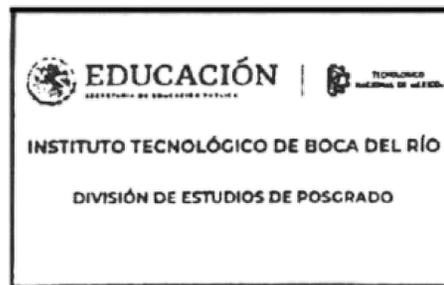
Por este medio me permito informar que el candidato(a) al Grado de **Maestro en Ciencias en Ingeniería Ambiental** que a continuación se indica, fue liberado(a) por su Comité Revisor de Tesis, por lo que le solicito de la manera más atenta tenga a bien apoyarle en los trámites correspondientes a la generación de expediente, y calendarización de fecha para el examen de grado; con la siguiente **fecha sugerida** de examen:

ESTUDIANTE	FECHA DE EXAMEN	COMITÉ DE TESIS
GABRIELA ESTRELLA CARDENAS GUEVARA	22 DE NOVIEMBRE DE 2021 10:00 horas	DIRECTOR DE TESIS DRA.MARIA DEL REFUGIO CASTAÑEDA CHAVEZ CODIRECTOR DR. BENIGNO ORTIZ MUÑIZ ASESOR DRA.GABYCARMEN NAVARRETE RODRIGUEZ ASESOR M.C. ROSA ELENA ZAMUDIO ALEMÁN

Sin otro particular, agradezco de antemano la atención que sirva brindar al presente.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Por nuestros mares responderemos

DR. JUAN DAVID GARAY MARIN
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



c.c.p. Coordinador del Programa MCIAMB
c.c.p. Archivo



Km. 12 Carr. Veracruz-Córdoba, Boca del Río, Ver.
C.P. 94290. Tel. (229) 690 5010 ext. 102
dir01_bdelrio@tecnm.mx
tecnm.mx | bdelrio.tecnm.mx





Instituto Tecnológico de Boca del Río
Departamento de División de Estudios de Posgrado e Investigación

Boca del Río, Ver, **9/NOVIEMBRE/2021**

ASUNTO: AVISO Y FECHA DE REALIZACIÓN
DE EXAMEN DE GRADO

C. INTEGRANTES DEL COMITÉ DE EXAMEN PROFESIONAL

PRESIDENTE	DRA. MARIA DEL REFUGIO CASTAÑEDA CHAVEZ
SECRETARIO	DR. BENIGNO ORTIZ MUÑIZ
VOCAL	DRA. GABYCARMEN ORTIZ MUÑIZ
SUPLENTE	M.C. ROSA ELENA ZAMUDIO ALEMÁN

Por este medio le informo que la **DEFENSA DEL EXAMEN DE TESIS** para la obtención del **GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS** del (la) **C. GABRIELA ESTRELLA CARDENAS GUEVARA** egresado(a) del **INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BOCA DEL RIO**, y candidato a **MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL**, se realizará el día **22 de NOVIEMBRE 2021 a las 10:00 horas** en EL AULA MAGNA “**ING. SERGIO S. GARCÍA MÁRQUEZ**” de este Instituto, por lo que se le extiende una cordial invitación para que participe, y se le agradece de antemano su puntual asistencia.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Por nuestros mares responderemos

DR. JUAN DAVID GARAY MARIN
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



c.c.p. Coordinador del Programa MCIAMB
c.c.p. Archivo



Km. 12 Carr. Veracruz-Córdoba, Boca del Río, Ver.
C.P. 94290. Tel. (229) 690 5010 ext. 102
dir01_bdelrio@tecnm.mx
tecnm.mx | bdelrio.tecnm.mx



Dedicatoria

Primeramente, le agradezco a Dios, por permitirme lograr cada uno de mis objetivos, por orientarme a través de este proyecto, por cuidarme y darme salud. Agradezco a mi madre Elvia Guevara Calles por siempre ser partícipe de todas y cada una de mis decisiones y apoyarme incondicionalmente, a mi padre Gonzalo Cárdenas Mendoza por sus palabras de aliento cuando mis ganas decaían.

Especialmente quiero agradecerle a mi hija Valentina Quintana Cárdenas porque es mi inspiración, mis ganas y mi energía para buscar mi plenitud personal y profesional, gracias mi amor por toda tu paciencia, por todo tu amor, gracias por llegar a mi vida y darle sentido, espero que cuando leas esto te sientas muy orgullosa de mami.

También agradezco a Oswaldo Quintana Sánchez, por siempre apoyarme en todas mis decisiones, así como a las personas que indirectamente han influido en mi para lograr todas y cada una de mis metas.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento otorgado para la realización del proyecto mediante la beca No. 999628, también al Instituto Tecnológico de Boca del Río (ITBOCA) por ser la casa de estudios que me acogió por dos años para la realización del presente proyecto de investigación, así como a los integrantes del Laboratorio de Investigación de Recursos Acuáticos (LIRA) que me acompañaron durante mi estancia del desarrollo experimental, en especial a mi compañero y amigo Octavio Maya Fernandez por su apoyo incondicional.

También agradezco a la Mtra. Rosa Elena Zamudio Aleman por su apoyo y paciencia y especialmente a la Dra. María del Refugio Castañeda Chávez por siempre creer en mi capacidad e inspirarme a siempre dar lo mejor de mí.

“Sé firme en tus actitudes y perseverante en tu ideal. Pero sé paciente, no pretendiendo que todo te llegue de inmediato. Haz tiempo para todo, y todo lo que es tuyo, vendrá a tus manos en el momento oportuno”.

M. Gandhi

RESUMEN

La oxitetraciclina es un antibiótico comúnmente usado en México, debido a que actúa contra una amplia gama de bacterias patógenas, tanto contra bacterias grampositivas como gramnegativas, además de su bajo costo y fácil acceso, al ser considerado un contaminante del tipo emergente no está regulado por la legislación mexicana NOM-127-SSA1-2021 y NOM-001-SEMARNAT-2021, por lo que se introduce constantemente a los cuerpos de agua a través de las aguas residuales y escorrentías superficiales.

El presente trabajo de tesis tuvo el objetivo de determinar la concentración de oxitetraciclina en aguas superficiales en el Área Natural Protegida Arroyo Moreno, esta zona se encuentra altamente impactada por las actividades antropogénicas que se desarrollan a los alrededores, aún cuando el 25 de noviembre de 1992 fue declarada Reserva Ecológica y en el 2008 se reforzó su protección elevando su estatus a Área Natural Protegida.

Mediante el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), se determinó la concentración de oxitetraciclina en diez puntos de muestreo ubicados a lo largo del río Arroyo Moreno, durante nortes, lluvias y secas. El resultado de dicho análisis arrojó concentraciones de entre 0.47 a 6.40 ng/l, lo que deja en evidencia el impacto que la continua descarga de aguas residuales a el río Arroyo Moreno.

PALABRAS CLAVE: oxitetraciclina, contaminante, emergente, ELISA, Arroyo Moreno.

ABSTRACT

Oxytetracycline is an antibiotic commonly used in Mexico, because it acts against a wide range of pathogenic bacteria, both against gram-positive and gram-negative bacteria, in addition to its low cost and easy access, being considered a pollutant of the emergent type is not regulated by Mexican legislation NOM-127-SSA1-2021 and NOM-001-SEMARNAT-2021, so it is constantly introduced to the bodies of water through wastewater and surface runoff.

The present thesis aimed to determine the concentration of oxytetracycline in surface waters in the Arroyo Moreno Natural Protected Area, this area is highly impacted by anthropogenic activities that take place in the surrounding area, even if on 25 November 1992 was declared an Ecological Reserve and in 2008 its protection was strengthened by elevating its status to a Protected Natural Area.

Using the Enzyme-Linked Immunoabsorption Assay (ELISA), oxytetracycline concentration was determined at ten sampling points along the Arroyo Moreno River, during northern, rainy and dry periods. The result of this analysis yielded concentrations between 0.47 and 6.40 ng/l, which leaves in evidence the impact that the continuous discharge of wastewater to the Arroyo Moreno river.

KEYWORDS: oxytetracycline, contaminant, emergent, ELISA, Arroyo Moreno.

INDICE GENERAL

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INDICE GENERAL.....	11
INDICE DE FIGURAS.....	12
INDICE DE TABLAS.....	13
ABREVIATURAS	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES.....	16
3. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL	19
3.1 CONTAMINANTES EMERGENTES.....	19
3.1.1 FARMACOS.....	22
3.1.2 ANTIBIÓTICOS.....	23
3.2.2 TETRACICLINA.....	27
3.2.3 OXITETRACICLINA.....	29
3.3 TECNICAS ANALITICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ANTIBIOTICOS EN AGUA.....	30
3.3.1 ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS.....	32
3.4 RESERVA NATURAL ARROYO MORENO.....	35
4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	43
5. JUSTIFICACIÓN.....	44
6. HIPOTESIS.....	45
7. OBJETIVOS	46
7.1 OBJETIVO GENERAL.....	46
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
8. MATERIALES Y MÉTODOS	47
8.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	47
8.2 IMPLEMENTACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	48
8.2.1 IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE CONTAMINACIÓN.....	48
8.2.2 SELECCIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO.....	48
8.2.3 PERIODICIDAD Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DEL MUESTREO.....	49
8.2.4 PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	49
8.2.5 TRATAMIENTO DE MUESTRAS.....	50
8.2.6 DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE OXITETRACICLINA MEDIANTE ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA).....	51
8.2.7 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS.....	54
9. RESULTADOS Y DISCUSIONES	55
10. CONCLUSIONES.....	67
11. LITERATURA CITADA.....	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Compuestos farmacéuticos más estudiados.....	22
Figura 2. Principales rutas de acceso de los antibióticos al medioambiente. Nota: Barceló y López, 2008).....	24
Figura 3. Mecanismo de acción de la oxitetraciclina. Nota: Perdomo, 2014.....	26
Figura 4. Estructura química de las tetraciclinas y sus derivados. Nota: Mendoza y Campos, 2008.....	27
Figura 5. Estructura de la oxitetraciclina. Nota: Dupuy, 2016.....	29
Figura 6. Evolución de las técnicas analíticas empleadas. QqQ: triple cuadrupolo, QTI: cuadrupolo con trampa de iones, TOF: tiempo de vuelo, QqTOF: cuadrupolo tiempo de vuelo, TLC: cromatografía en capa fina. Nota: Rozo-Nuñez, 2014).....	31
Figura 7. Técnica del Inmunoensayo Ligado a Enzima.....	32
Figura 8. Tipos de ELISA. Nota: Abyntek, 2016.....	34
Figura 9. Representación de la Reserva Natural Estatal Arroyo Moreno mediante el software ArcGis.....	36
Figura 10. Fotografía área de la Reserva Arroyo Moreno. Nota: Peña, 2020.....	38
Figura 11. Desarrollos inmobiliarios a lo largo de Arroyo Moreno.....	39
Figura 12. Representación de la Reserva Natural Estatal Arroyo Moreno mediante el software ArcGis.....	47
Figura 13. Tratamiento previo a las muestras.....	50
Figura 14. Procedimiento analítico ELISA.....	52
Figura 15. Lector de Microplacas EUROFINS.....	53
Figura 16.	53
Figura 17. Lectura de la microplaca.....	53
Figura 18. Software que da lectura a la placa.....	54
Figura 19. Fuentes Puntuales de Contaminación.....	55
Figura 20. Descargas pluviales.....	56
Figura 21. Fuente de contaminación de tipo puntual.....	57
Figura 22. Descarga de canal la “Zamorana”.....	58
Figura 23. Grafico del comportamiento de la concentración de oxitetraciclina en la temporada de “Nortes”.....	60
Figura 24. Grafico del comportamiento de la concentración de oxitetraciclina en la temporada de “Estiaje”.....	61
Figura 25. Grafico del comportamiento de la concentración de oxitetraciclina en la temporada de “Lluvias”.....	62
Figura 26. Principales precipitaciones del ciclo anual 2019-2020.Nota: Conagua:2021.....	63
Figura 27. Gráficas de residuos para la Concentración.....	64
Figura 28. Gráfica de caja de CONCENTRACIÓN (ng/l).....	65
Figura 29. Comportamiento de la concentración de oxitetraciclina por punto de muestreo.....	66

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales contaminantes emergentes. Nota: Adaptado de Arbeláez, 2016. ...	20
Tabla 2. Generaciones de la tetraciclinas.....	28
Tabla 3. Polígono envolvente de delimitar la Reserva Ecológica Arroyo Moreno, Municipios de Boca del Río y Medellín de Bravo, Veracruz.....	35
Tabla 4. Extensión del uso del suelo y vegetación en Arroyo Moreno, Veracruz.	38
Tabla 5. Principales épocas existentes en un ciclo anual en el estado de Veracruz.	40
Tabla 6. Ubicación de los puntos de muestreo.....	49
Tabla 7. Principales épocas existentes en un ciclo anual en el Estado de Veracruz.	49
Tabla 8. Ubicación de las fuentes puntuales de contaminación.	56
Tabla 9. Resultados obtenidos para la temporada climática “Nortes”.....	59
Tabla 10. Resultados de obtenidos para la temporada climática “Estiaje”.....	60
Tabla 11. Resultados de obtenidos para la temporada climática “Lluvias”	61

1. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso vital para la subsistencia de los seres vivos, actualmente uno de los mayores desafíos a nivel mundial es garantizar la calidad de los recursos hídricos, puesto que diariamente se vierten toneladas de contaminantes químicos a los ecosistemas acuáticos. En México, aproximadamente el 54% de las aguas residuales no son tratadas (CONAGUA 2015) y así son utilizadas en el riego agrícola o son vertidas a los cuerpos de agua causando un grave problema de contaminación. (Robledo, 2017)

El crecimiento demográfico y el desarrollo industrial ha incrementado la generación de productos químicos (Reynoso, 2017), por lo que en los últimos años se han identificado en algunas fuentes de abastecimiento de agua diversos grupos de contaminantes, cuya principal característica es la alta persistencia y baja degradación en el ambiente, denominados contaminantes de interés emergente. (Tadeo, *et al.*, 2012)

La agencia para Protección del Medio Ambiente (EPA) define como contaminantes de interés emergente a las sustancias químicas que no son actualmente reguladas por ningún organismo dedicado a la preservación de la salud pública y medioambiental, sin embargo, han sido frecuentemente descubiertos en diferentes matrices ambientales. Los contaminantes de interés emergente no son necesariamente compuestos químicos nuevos y se sabe que desde hace décadas están presentes en el medioambiente, por lo que actualmente se busca determinar los posibles impactos en el corto, mediano y largo plazos. (López y Barceló, 2008; Arbeláez, 2016)

Entre los contaminantes de interés emergente se encuentran los productos farmacéuticos, drogas, plaguicidas, productos de higiene personal, hormonas, edulcorantes, pesticidas, aditivos de gasolina, retardadores de flama, entre otros (Barceló, 2003). Este grupo de contaminantes tiene la particularidad de que no necesitan estar de forma constante en el medioambiente para causar algún impacto negativo, debido a que sus altas tasas de transformación y remoción pueden equilibrarse con su introducción continua en el ambiente. (Reynoso, 2017; Petrovic M *et al.*, 2003)

De los contaminantes de interés emergente, los que probablemente generan mayor preocupación son los productos farmacéuticos y en particular los antibióticos ya que representan un riesgo ambiental por su alta persistencia y distribución en el agua, suelo, en el aire y en los alimentos. Su extenso uso hospitalario, veterinario y domestico aumenta sus descargas y la de

sus metabolitos de transformación en el ambiente. Estos compuestos han sido detectados en aguas superficiales, subterráneas e incluso en agua potable (Dresler, et al.,2008). Entre los antibióticos con mayor reporte en los cuerpos de agua están las tetraciclinas. (Gil, 2012)

La oxitetraciclina (OXT) es un antibiótico de amplio espectro del grupo de las tetraciclinas, usado habitualmente en la medicina humana y medicina veterinaria, ha sido detectado principalmente en aguas residuales, sedimentos y aguas superficiales en cantidades del orden de $\mu\text{g/L}$ y ng/L . Se estima que entre el 30 y 90% de la oxitetraciclina administrada en el sistema ganadero no es metabolizada (Aminov, 2010); los seres humanos eliminan alrededor del 70% de la dosis de este antibiótico, a través de las heces y orina (Butkovskiy et al.,2015). Estos llegan a los ecosistemas naturales (Aminov, 2010) principalmente al ecosistema acuático, a través de las aguas residuales, lo que reduce sus funciones de mineralización y descomposición de la materia y contaminantes orgánicos (Bergeron et al., 2015; Von *et al.*, 2017).

Dado que, la contaminación biológica y química de los sistemas de abastecimiento de agua superficial, se va incrementando frecuentemente, por el aumento de las poblaciones aledañas, es importante el monitoreo constante de la calidad de los cuerpos de agua. (Chicaiza y Ramos,2018)

En la llanura costera central del estado de Veracruz, atravesando los municipios de Medellín de Bravo y Boca del Río, se localiza un afluente del río Jamapa denominado Arroyo Moreno (AM), en sus márgenes se localiza un ecosistema de manglar (Aké *et al.*,2016), desde el 25 de noviembre de 1999 se declaró este lugar como un Área Natural Protegida sujeta a conservación ecológica y en 2008 se cambió a Reserva Ecológica por ajustarse esta figura más a las necesidades del sitio de acuerdo con las autoridades. (Gaceta Oficial, 1999)

Desde hace décadas la urbanización de la zona aledaña a la Reserva Natural Estatal Arroyo Moreno (RNEAM) ha provocado que algunas áreas sean usadas como tiradero de basura a cielo abierto, a lo que se suman las descargas de aguas domésticas e industriales desde el canal de la Zamorana y del dren B, así como de la mayoría de los fraccionamientos colindantes con el afluente (Méndez-Álvarez, 2013).

Por lo anterior expuesto y para conocer si el afluente Arroyo Moreno, está siendo impactado por la presencia de contaminantes emergentes producto de las descargas que continuamente se vierten en él, el objetivo principal de este proyecto es analizar, detectar y cuantificar la concentración de Oxitetraciclina en aguas superficiales de A.M.

2. ANTECEDENTES

Los contaminantes de interés emergente han pasado inadvertidos durante décadas, a pesar de que su presencia en los ecosistemas acuáticos no es nueva, en los últimos años ha crecido el interés por estudiar sus efectos sobre el medio ambiente y la salud humana y con los avances en las técnicas para detectar y cuantificar antibióticos a nivel trazas, ahora pueden ser identificados y cuantificados estos analitos en bajas concentraciones.

Internacionalmente se han publicado diversos estudios, cuyos objetivos son evidenciar la presencia de contaminantes emergentes en el medioambiente acuático, entre ellos se encuentran:

Hanna et al., (2018) identificaron y cuantificaron la concentración de sulfapiridina, sulfametoxazol, ciprofloxacina, enrofloxacina, levofloxacina, norfloxacina, cloranfenicol, florfenicol, doxiciclina y metronidazol, mediante cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS / MS) y determinaron concentraciones que oscilaban entre 0,3 y 3,9 ng/L en agua de río, 1,3 y 12,5 ng/L en aguas residuales, 0,5 y 21,4 ng/L en agua potable, 0,31 y 1,21 µg/kg en sedimento de río , 0,82 y 1,91 µg/kg en estiércol de cerdo, 0,1 y 11,68 µg/kg en sedimento de salida, 0,5 y 2,5 µg/kg en suelo, y 6,3 y 27,2 µg/kg en verduras. Dejando en evidencia la contaminación orgánica en las diferentes matrices ambientales, agua y suelo.

En el 2018 Yao et al. cuantificaron la concentración de 45 productos farmacéuticos en agua superficial de una red de 29 ríos en 31 provincias de China, mediante extracción en fase sólida y LC-MS/MS, entre ellos destaca la oxitetraciclina de la cual se obtuvo una concentración de 230 ng/L, evidenciando las altas concentraciones de antibióticos en las fuentes de abastecimiento.

Asímismo, en España, Biel et al., (2018) evaluaron la distribución de diversos productos farmacéuticos, en diferentes ambientes marinos del Golfo de Cádiz, de los que destacan 2 antibióticos: oxitetraciclina y la tetraciclina. La identificación y cuantificación de antibióticos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), reportaron concentraciones 24.1 ng/L y 63.3 ng/L. Para la detectar las afectaciones que estas concentraciones podrían tener sobre los organismos marinos y la biota acuática, podrían llevarse

a cabo ensayos toxicológicos con bioindicadores ambientales y así tener un conocimiento integral de la situación a la que se enfrenta el sistema.

En México hay pocos estudios que muestren la presencia de antibióticos en ambientes acuáticos y no existen estudios del impacto que causan en estos ambientes, en la búsqueda bibliográfica se encontraron los siguientes trabajos:

Robledo, et al. (2016) con la finalidad de determinar si los actuales métodos de tratamiento de aguas residuales son eficientes, evaluaron la presencia de 22 compuestos de productos farmacéuticos entre los que se encuentran 4 antibióticos (tetraciclina, cefaclor, cefadroxilo y ampicilina), en muestras de agua residuales del influente y del efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Morelia, Michoacán.

El análisis lo llevaron a cabo mediante espectrofotometría de infrarrojo (FT-IR) y espectrometría de masas (ESI-MS-TOF), obtuvieron valores promedios para el influente de 72.7 µg/L, 3.2 µg/L, 5.0 µg/L, 17.1 µg/L, respectivamente y para el efluente 64.9 µg/L, 2.3 µg/L, 4.7 µg/L, 15.5 µg/L. Por lo que se concluye que los tratamientos de aguas residuales son ineficientes para la eliminación de productos farmacéuticos, además proponen el análisis del cuerpo de agua en donde se descarga el efluente tratado.

Avilés et al. (2015) analizaron el efluente de una PTAR en Morelos, las aguas superficiales del río Yautepec y el río Cautla, emplearon cromatografía líquida acoplada a un detector de masas triple cuadrupolo para la cuantificación de fármacos como atenolol, sulfametoxazol, proanolol, naproxeno. Los resultados arrojaron concentraciones de atenolol (6.75-9.10 ng· mL⁻¹), sulfametoxazol (87- 136 ng· mL⁻¹), propanolol (2.85-6.25 ng· mL⁻¹), naproxeno (1.45-1.86 ng·mL⁻¹). En el caso de las fuentes de abastecimiento los fármacos encontrados en mayores concentraciones fueron metoprolol (0.6- 7.2 ng· mL⁻¹), la mayor concentración de sulfametoxazol (3- 204.5 ng· mL⁻¹) en agua de río de Yautepec, Morelos. En agua de río de Cuautla no se detectó la presencia de ningún contaminante emergente. Con esto se comprueba que una de las principales vías de ingreso de estos contaminantes a los ecosistemas acuáticos son las aguas residuales.

Reafirmando la presencia de productos farmacéuticos en el medio ambiente, Cruz et al., (2014) identificaron la presencia de altas concentraciones del orden µgL⁻¹ de Ibuprofeno, Naproxeno, Ketoprofeno, Cafeína, Manileño y Bisfenol en aguas del río Catán, Texcuyupan y en la Laguna Barran de San Simón que es parte de la reserva de la biosfera “La Encrucijada”,

con ello se confirma que los programas de protección ambiental no están cumpliendo sus objetivos.

La escasez de datos ambientales disponibles a nivel nacional sobre contaminación por antibióticos dificulta su regulación a través de las normas mexicanas para el control de la contaminación del agua. Esto es relevante debido a la creciente escasez de agua dulce en diversas zonas del país en donde se buscan alternativas como la reutilización de aguas residuales para la agricultura (CONAGUA, 2015; Robledo,2016).

Debido a que fármacos se encuentran diseminados en el ambiente en muy bajas concentraciones, es necesaria la innovación y mejora de métodos sensibles para la identificación de estos contaminantes, por lo que hay diversos trabajos de investigación buscan cumplir este objetivo.

Peña-Álvarez y Castillo-Analís (2015), desarrollaron y optimizaron un método por Microextracción en Fase Sólida seguido de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (MEFS-CG-EM), para la determinación en aguas residuales de ibuprofeno, naproxeno, clorofenol, triclosán y bisfenol A, catalogados dentro de los contaminantes emergentes. El método desarrollado presentó aceptable linealidad en el intervalo de concentración de 1.0-118.90 pg/mL para el ibuprofeno, 48.0-1488 pg/mL para el naproxeno, 4.40-140.8 pg/mL para el triclosán, 1.0-58.32 pg/mL para el clorofeno y 1.0-59.16 pg/mL para el bisfenol A, con coeficientes de correlación (r) mayores a 0.99.

3. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

3.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

Los contaminantes emergentes son compuestos químicos cuya presencia en el medioambiente no se consideraba representativa, por ello su comportamiento y distribución no estaba siendo monitoreado y a nivel nacional e internacional no existe normatividad que regule los límites máximos permisibles en las diferentes matrices ambientales. (Barceló, 2008; Estevez *et. al.*, 2013)

Este grupo de contaminantes tiene la característica que no necesita estar constantemente en el medioambiente ni en altas concentraciones para causar efectos nocivos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su continua introducción en el ambiente (Gil *et al.*, 2012). Diversos estudios científicos han detectado C.E. en ríos, lagos, mares, aguas subterráneas e incluso en agua potable (Vargas Berrones *et al.*, 2020).

Los C.E. engloban una amplia variedad de compuestos químicos, farmacéuticos, productos de higiene personal, aditivos industriales, tensoactivos, drogas, que no tienen un constante monitoreo y control, debido a esto entran a los cuerpos de agua continuamente. Existe una limitada información respecto a los impactos que estos ejercen sobre el medioambiente y el ser humano, por lo que actualmente existen diversas líneas de investigación dirigidas al estudio de los denominados contaminantes emergentes, a fin de buscar una posible regulación del uso y desecho de estos contaminantes (Campos *et al.*, 2017).

Dentro del término genérico de C.E. se encuentran una gran variedad de productos de diverso origen y naturaleza química, derivados tanto del uso personal como de diversas industrias, los cuales se exponen a continuación (Tabla 1):

Los productos farmacéuticos y de cuidado personal son probablemente el grupo que mayor interés genera debido a que a su alta actividad biológica, baja capacidad de solubilidad y a que no se evaporan en temperaturas o presiones normales, ingresan fácilmente al agua y al suelo, causando efectos nocivos en humanos y animales, tales como, alteraciones del sistema inmunológico y endocrino, daño al sistema nervioso, cáncer y trastornos reproductivos; además, pueden causar daños ecológicos, como retraso en la madurez de peces y disminución de población de algas (Alvaréz *et. al.*, 2021; Balderacchi *et. al.*, 2014; Ohoro *et. al.*, 2019).

Tabla 1. Principales contaminantes emergentes. Nota: Adaptado de Arbeláez, 2016.

Grupo	Subgrupo	Compuestos
Fármacos	Antibióticos	Tetraciclinas, aminoglucósidos, los macrólidos, los betalactámicos y la vancomicina.
	Analgésicos/Antiinflamatorios	Ibuprofeno, paracetamol, diclofenaco.
	Antiepilépticos	Carbamazepina
	β-Bloqueantes	Metoprolol, Propranolol, Timolol
	Reguladores de lípidos	Fibratos, Estatinas, Ezetimiba, Niacina
	Medios de contraste en rayos X	Opromide, Iopamidol, Diatrizoato.
	Hormonas y esteroides	Estrógenos, Estradiol, Estrona, Estriol, Dietilestilbestrol
		Agonistas beta, Anticolinérgicos, Teofilinas.
Drogas ilícitas	Estimulantes	Alprazolam, Loracepam, Diacepam, Cloracepam. Cocaína, Anfetaminas, Tabaco
	Depresoras	Benzodiazepinas, Fenobarbital
	Alucinógenas	LCD, Cannabis, PCV
Productos de higiene personal	Parabenos	Metilparabeno, Etilparabeno, propilparabeno
	Filtros solares	Benzofenonas, Cinamato, Bencilidenos, derivados del alcanfor
	Perfumes	Fragancias nitro, policíclicas y macrocíclicas

Tabla 1.

Continuación.

Grupo	Subgrupo	Compuestos
Compuestos de uso industrial	Retardantes de llama bromados	Tris (cloro isopropil) fosfato (TCPP) y tris (2-cloro etil) fosfato (TCEP), hexabromociclododecano (HBCD) y decabromodifeniletano (DBDFE)
	Compuestos prefluorados	Perfluorooctano sulfonato, Acido perfluorooctanoico
Edulcorantes		Sacarina, Sucralosa, Aspartamo, Ciclamato, Estevia, NHDC
Surfactantes	Agentes tensoactivos	Sulfonato Alquilbenceno lineal (LAS) Alquifenolpolietoxilado (APEO)

3.1.1 FARMACOS

Un fármaco es una sustancia químicamente capaz de alterar la actividad celular en un organismo y por lo tanto produce efectos biológicos, según la dosis estos efectos serán beneficiosos o tóxicos (Urbano, 2011). Los riesgos y/o efectos adversos asociados al uso de medicamentos, habitualmente habían sido evaluados después de la ingesta o aplicación, sin embargo, no se consideraba que, después de su uso, el medicamento será parcialmente excretado y llegará al medioambiente a través de las aguas residuales (Correia y Marcano, 2015).

Entre los compuestos farmacéuticos más estudiados se encuentran los siguientes (Figura 1):

Analgesicos	Antihipertensivos	Antibióticos
<ul style="list-style-type: none">• Constituyen uno de los fármacos de mayor consumo mundial y son considerados los de mayor automedicación.• El diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno y el acetaminofén han sido reportados en aguas residuales y aguas superficiales.	<ul style="list-style-type: none">• En México hasta el año 2020, entre el 20 y 40% de la población padece hipertensión.• Lo anterior conlleva un aumento de la prescripción de estos.	<ul style="list-style-type: none">• Los antibióticos son fármacos de amplio uso en el mundo; su efecto contra microorganismos patógenos en animales y humanos, así como su uso para la preservación de alimentos y piensos, ha incrementado su producción y consumo.

Figura 1. Compuestos farmacéuticos más estudiados.

Según las propiedades fisicoquímicas de los compuestos farmacéuticos y sus metabolitos y productos de degradación (solubilidad, volatilidad, absorción, biodegradación, polaridad y estabilidad) estos factores afectan la eficiencia de los procesos de tratamiento de aguas residuales y por ende el grado de remoción de estos contaminantes que son transportados a las aguas subterráneas, superficiales y acuíferos, o bien acumulan en los suelos afectando al ecosistema y a los seres humanos a través de la cadena trófica. (Barceló y López, 2008; Robledo, 2017)

Las concentraciones a las que se han encontrado en efluentes de plantas de tratamiento varían de 0.0016 a 373 $\mu\text{g/L}$ (Verlicchi *et al.*, 2012), en aguas superficiales o en las aguas subterráneas se sitúan normalmente en el rango de ng/L o $\mu\text{g/L}$, mientras en suelos y sedimentos, en donde pueden persistir durante largos periodos de tiempo alcanzan concentraciones de hasta g/Kg . (Robledo, 2017)

3.1.2 ANTIBIÓTICOS

Un antimicrobiano es una molécula natural, sintética o semisintética, que tiene la función de provocar la muerte o detener el crecimiento de bacterias, virus u hongos, una subclasificación de este son los antibióticos estos ejercen su actividad específicamente sobre las bacterias (Figueras, 2016).

Los antibioticos son un grupo heterogéneo con diferente estructura, naturaleza química, comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, según estas características los diferentes grupos de antibioticos ejercen una acción específica sobre alguna función o estructura del microorganismo, tienen una potencia biológica elevada actuando aún en bajas concentraciones, su toxicidad es selectiva para un microorganismo específico por lo que asegura su uso en seres humanos puesto que la toxicidad para las células humanas es mínima (Perdomo, 2014)

Una de las principales vías de entrada de los contaminantes emergentes a los cuerpos de agua son las aguas residuales que engloban las urbanas, hospitalarias, industriales y las de origen agrícola y ganadero y lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs). Además, los residuos de medicamentos se pueden depositar en el suelo mediante excreción directa (animales) o debido a la reutilización de residuos orgánicos, y posteriormente filtrarse a aguas superficiales y/o profundas). La contaminación proviene no solo de las excreciones, con las que una parte importante del fármaco es eliminado del cuerpo sin metabolizarse, sino que proviene también de la fabricación y disposición inadecuada de los desechos de estos productos. (Barceló y López, 2008)

La detección de antibioticos en agua potable ha manifestado su presencia en la fuente de agua y la incapacidad de los tratamientos de aguas convencionales para reducirlos o eliminarlos (Kleywegt et al, 2011; Silva et al, 2012; Peng et al, 2016; Vergel, Martínez Lozano, Zafra y Tristáncho, 2016).

En la Figura 2 se muestran las posibles fuentes de emisión y destinos de los contaminantes en el medioambiente.

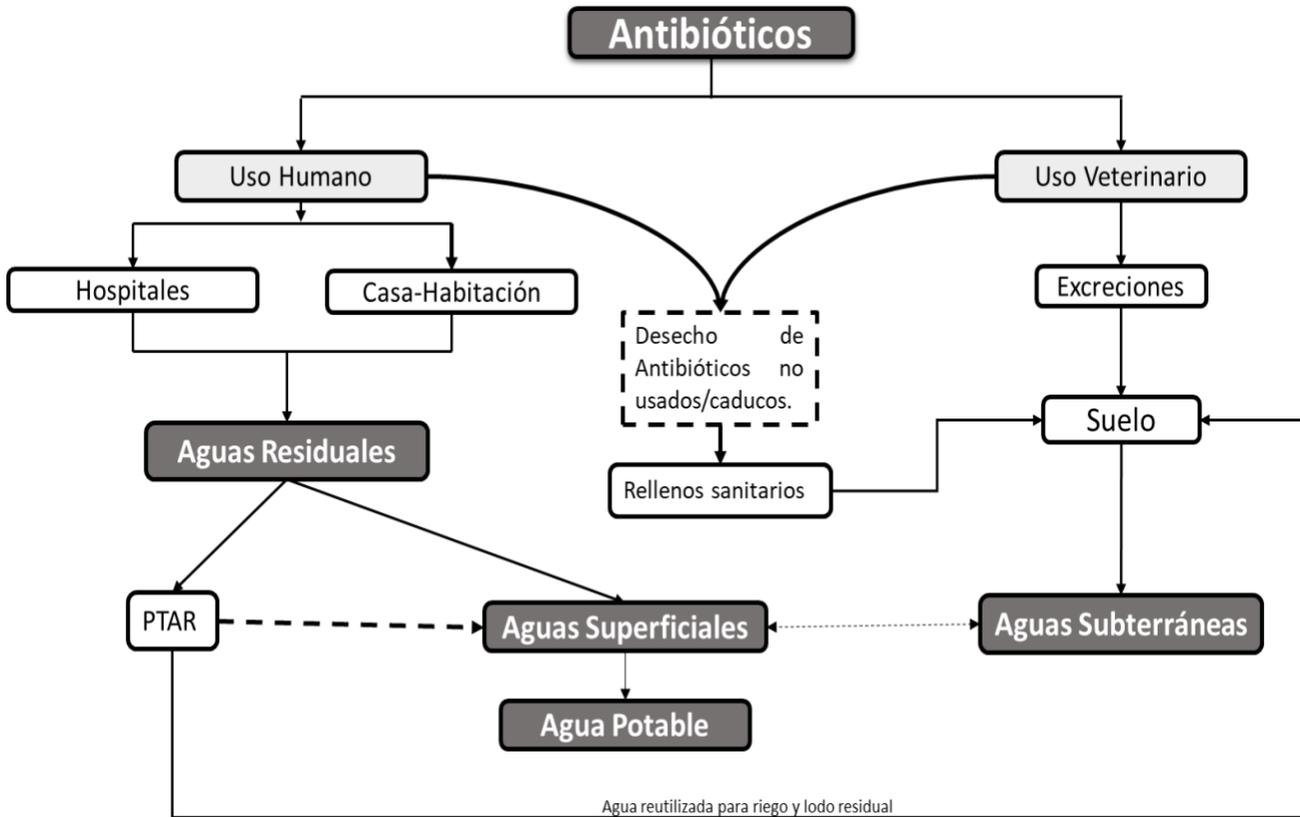


Figura 2. Principales rutas de acceso de los antibióticos al medioambiente. Nota: Barceló y Lopéz, 2008)

3.2.1.1 CLASIFICACIÓN

Clasificación según su origen los antibióticos pueden ser (Figueras, 2016):

- Naturales (Biológicos): Sintetizados por organismos vivos.
- Semisintéticos: Estos son obtenidos por modificación de la estructura química de los antibióticos naturales.
- Sintéticos: Obtenidos mediante síntesis química.

Los antimicrobianos se clasifican según la acción que ejerza sobre las bacterias ante las que actúa, se subdividen en dos grupos, bacteriostáticos y bactericidas (Lorenzo, 2008; Perdomo, 2014):

- Bacteriostáticos: bloquea el desarrollo y multiplicación bacteriana pero no las eliminan, su efecto es reversible, como en el caso de las sulfamidas, trimetopim, cloranfenicol, macrólidos y lincosamidas.

- Bactericidas: su efecto es letal, llevando a la lisis bacteriana, es un proceso irreversible. Entre ellos se encuentran los β -lactámicos, aminoglucósidos, fosfomicina, nitrofurantoínas, polipeptidos, quinolonas, rifampicina y vancomicina.

Los antibióticos también pueden clasificarse atendiendo los siguientes criterios:

CLASIFICACIÓN POR ESPECTRO

El espectro de actividad es indicativo del número de clases o especies bacteriana sobre las que puede actuar un antibiótico, este puede ser amplio, intermedio o reducido (Perdomo, 2014; Seija y Vignoli, 2006):

- De amplio espectro: aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes. Comprende tetraciclinas, el cloranfenicol y algunos β -lactámicos.
- De espectro menos amplio o intermedio. Actúan frente a un número más limitado de especies. Este grupo incluye la mayoría de los antimicrobianos, entre los que destacan los macrólidos y aminoglucósidos.
- De espectro reducido. Sólo tienen un comportamiento eficaz frente a un número limitado de especies, como son los glucopéptidos.

CLASIFICACIÓN POR MECANISMO DE ACCIÓN (Figura 3)

- Inhibidores de la formación de la pared bacteriana:
- Inhibidores de la síntesis proteica.
- Inhibidores de la duplicación del ADN.
- Inhibidores de la membrana citoplasmática.
- Inhibidores de vías metabólicas.

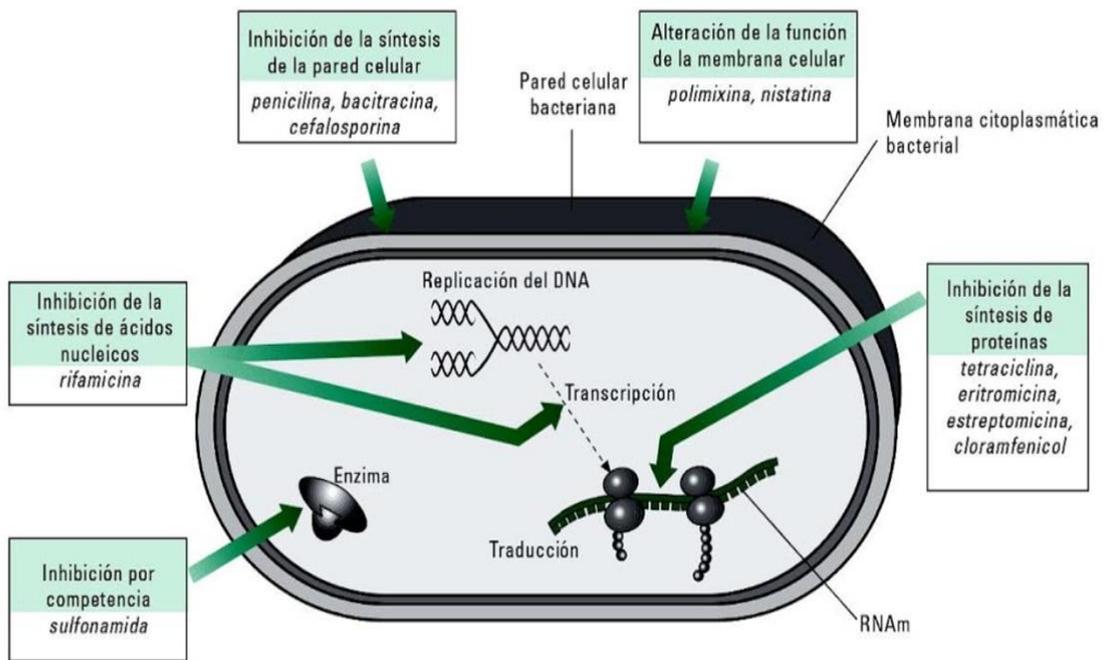


Figura 3. Mecanismo de acción de la oxitetraciclina. Nota: Perdomo, 2014.

3.2.2 TETRACICLINA

Las tetraciclinas naturales, semisintéticas y sintéticas actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas, son generalmente bacteriostáticas a las concentraciones que alcanzan en los tejidos humanos (Vicente y Pérez-Trallero, 2010)

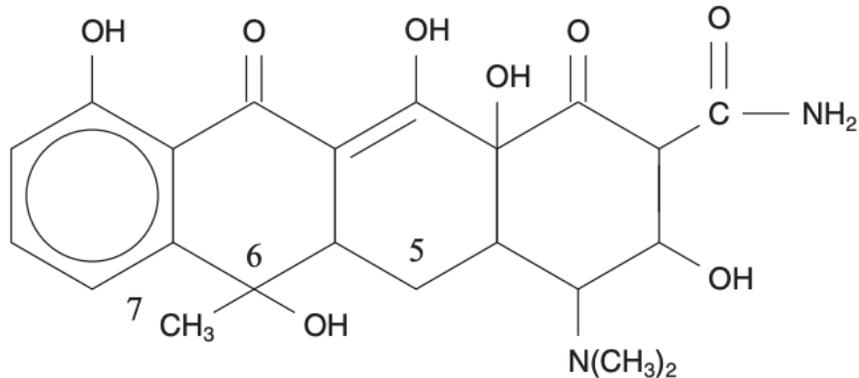


Figura 4. Estructura química de las tetraciclinas y sus derivados. Nota: Mendoza y Campos, 2008.

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos con un núcleo de estructura tetracíclica lineal compuesta de 4 anillos fusionados (Figura 4). Todos forman complejos quelantes con distintos cationes, como calcio, magnesio o hierro, lo que los hace insolubles en agua y dificultan su absorción. De acuerdo a su descubrimiento, propiedades farmacocinéticas y espectro de actividad microbiana, las tetraciclinas se dividen en tres grandes generaciones (Tabla 2). (Perez-Trallero, 2010)

La primer generación la constituyen los agentes más antiguos, tienen la característica de ser menos lipofílicos y menor absorción, el primer compuesto de la generación es la clortetraciclina, la cuál fue aislada del *Streptomyces aureofaciens*, empezó a distribuirse y aplicarse en 1948, en el año 1950 se obtiene la oxitetraciclina a partir de *Streptomyces rimosus*. A partir de la clortetraciclina mediante deshalogenación catalítica se obtiene la tetraciclina, la demeclociclina se obtiene de una cepa mutante de *Streptomyces aureofaciens*, la metaciclina es un derivado semisintético. (Mendoza y Campos, 2008; Vicente, Perez-Trallero, 2010)

Segunda generación presentan una mejor absorción y son hasta 5 veces más lipofílicos que la primera generación. En este grupo se incluyen doxiciclina y minociclina, derivados semisintéticos. (Vicente, Perez-Trallero, 2010)

La tercera generación, la integran las glicilciclinas son semisintéticos obtenidos tras modificar la posición 9 del anillo tetracíclico de los compuestos de las generaciones anteriores. La tigeciclina es el 9-tert-butil-glicilamido derivado de la minociclina y constituye el principal representante de este nuevo grupo. Además de las glicilciclinas, en esta tercera generación se incluyen nuevos compuestos en desarrollo, como las aminometilciclinas, de cuyo grupo ya ha pasado a experimentación humana la PTK 0796. (Vicente, Perez-Trallero, 2010)

Tabla 2. Generaciones de la tetraciclinas.

Generación	Nombre genérico	Obtención
Primera generación (1948-1963)	Clortetraciclina	A partir de 2 diferentes especies de Streptomyces a finales de la década de 1940.
	Oxitetraciclina	Obtenido a partir de Streptomyces en 1950
	Tetraciclina	
	Democlociclina	Derivados semisintéticos
	Rolitetraciclina	caracterizados por ser
	Limeciclina	hidrosolubles
	Metaciclina	
Segunda generación (1965-1972)	Doxiciclina	Derivados semisintéticos de la primera generación
	Minociclina	
Tercer generación	Glicilciclinas (tigeciclina)	Derivado semisintético de la minociclina
	Aminometilciclina (PTK 7906)	En desarrollo experimental

Nota: Vicente, Perez-Trallero, 2010.

3.2.3 OXITETRACICLINA

La Oxitetraciclina (Figura 5), conocida por su nombre comercial como Terramicina, esta integrada dentro de compuestos de la primer generación y se obtiene a partir de *Streptomyces rimosus*. Es una sustancia cristalina ligeramente amarilla, inodora y levemente amarga; anfótera ya que en solución acuosa forman sales, tanto con ácidos como con bases, estable en forma de polvo, pero no en solución acuosa, siendo particularmente inestables a pH superiores a 7,0. Se ionizan con soluciones ácidas de pH inferiores a 2 (Dupuy, 2016). Su nombre químico es: [4S-(4 α ,4a, α ,5 α ,5a, α ,6 β ,12a, α)]-4-(dimetilamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro3,5,6,10,12,12a hexahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-2-naftacenocarboxamida. Su peso molecular es de 460.44 Da. (Torres, 2015).

Al poseer grupos funcionales de oxígeno se puede dar en esta parte de la molécula modificaciones sintéticas que hacen que pierdan actividad biológica, pero si hay esta modificación en la parte superior de la molécula hay una mayor actividad biológica, además puede producir cambios en el tamaño, la forma, carga, densidad electrónica y polaridad. La oxitetraciclina a pH entre 3-5 se epimeriza en el carbono 4 a epioxitetraciclina, que es poco activa como antibiótico, presentando una actividad de entre el 2- 5% de actividad antimicrobiana de la oxitetraciclina. (Ayala, 2018)

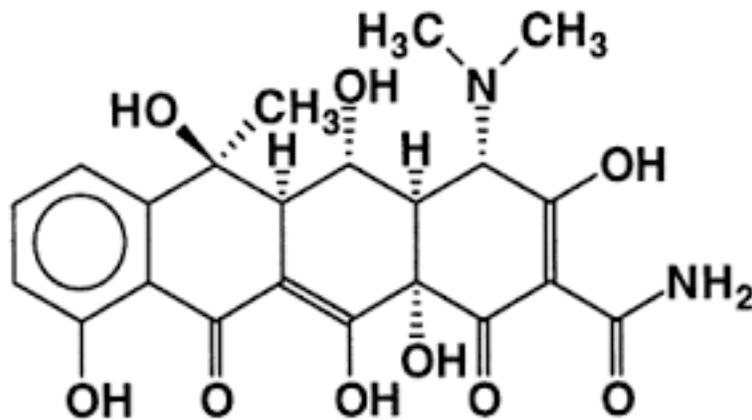


Figura 5. Estructura de la oxitetraciclina. Nota: Dupuy, 2016.

3.3 TECNICAS ANALITICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ANTIBIOTICOS EN AGUA

Durante años, toneladas de sustancias químicas usadas en la agricultura, industria, medicina, etc., han sido vertidas al medio ambiente sin prever sus posibles consecuencias. En los últimos años con el avance y mejora de las técnicas analíticas para su determinación y cuantificación han aumentado el número de compuestos que se han declarado de importancia ambiental, debido a su toxicidad o efectos adversos (Viera-Santana y Santana-Rodríguez, 2015). Los contaminantes emergentes se encuentran en las matrices ambientales en un bajas concentraciones, pero esto es compensado por su continua entrada al medioambiente, la disponibilidad de métodos de análisis nos da una perspectiva amplia del comportamiento de estos en el medioambiente (Barceló, 2003).

Los grupos de compuestos con mayor flujo de investigación por sus efectos adversos sobre los ecosistemas (disrupción endócrina, microorganismos resistentes a antibióticos, metabolitos reactivos) son los productos farmacéuticos y sus metabolitos. La persistencia de estos compuestos en el medio acuático depende de sus propiedades químicas como: solubilidad, volatilidad, absorción, biodegradación, polaridad y estabilidad; estos factores afectan la eficiencia de los procesos de tratamiento de las aguas residuales donde son transportados y, por ende, el grado de remoción de estos contaminantes (Ramírez-Cando *et al.*, 2019). Las concentraciones de productos farmacéuticos detectados en efluentes de PTARs varían de 0.016 a 373 µg/L, esto depende de varios factores como la cantidad de población, ubicación y tipo de TAR al que son sometidas. Estos compuestos fueron intruducidos en el medio ambiente desde hace tiempo, pero no se habían determinado y cuantificado debido a la falta de equipo altamente sensibles. (Verlicchi *et al.*, 2012).

Debido a la necesidad de detectar y cuantificar los residuos de antibióticos en las diferentes matrices ambientales y de origen animal, desde la segunda mitad del siglo veinte son múltiples los métodos analíticos desarrollados ó modificados de los ya existentes, siendo las técnicas cromatográficas las de más amplio alcance (Figura 6). (Talero-Perez, Medina y Rozo-Nuñez, 2014)

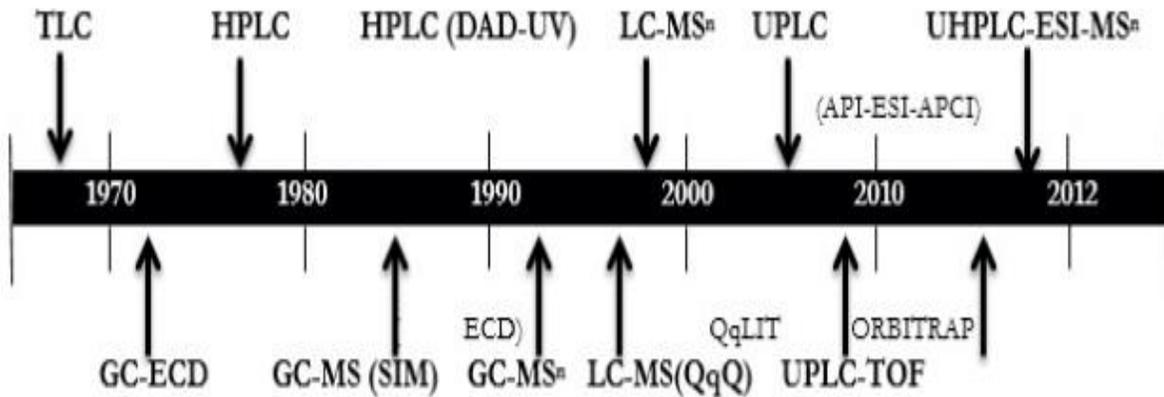


Figura 6. Evolución de las técnicas analíticas empleadas. QqQ: triple cuadrupolo, QTI: cuadrupolo con trampa de iones, TOF: tiempo de vuelo, QqTOF: cuadrupolo tiempo de vuelo, TLC: cromatografía en capa fina. Nota: Rozo-Nuñez, 2014)

Para el análisis de fármacos se han empleado fundamentalmente la cromatografía de gases y la de líquidos con espectrometría de masas, pero la tendencia es a emplear, tanto en una como en otra, la espectrometría de masas en tándem para poder diferenciar entre posibles isómeros. Sin embargo en los últimos años se han desarrollado técnicas más económicas para la determinación de contaminantes emergentes en agua y alimentos como la técnica Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA). (Díaz-Cruz *et al.*, 2003; Petrovic *et al.*, 2005; Petrovic *et al.*, 2002)

3.3.1 ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS

ELISA por sus acrónimo en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (Figura 7) , o lo que es lo mismo, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, esta técnica consiste en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida (pocillo) mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción (por ejemplo colorimétrica) que puede ser medido por espectrofotometría mediante la medición de la longitud de onda para ese antígeno en específico (Seyco, 2021; Guzmán-Vazquéz, 2006).

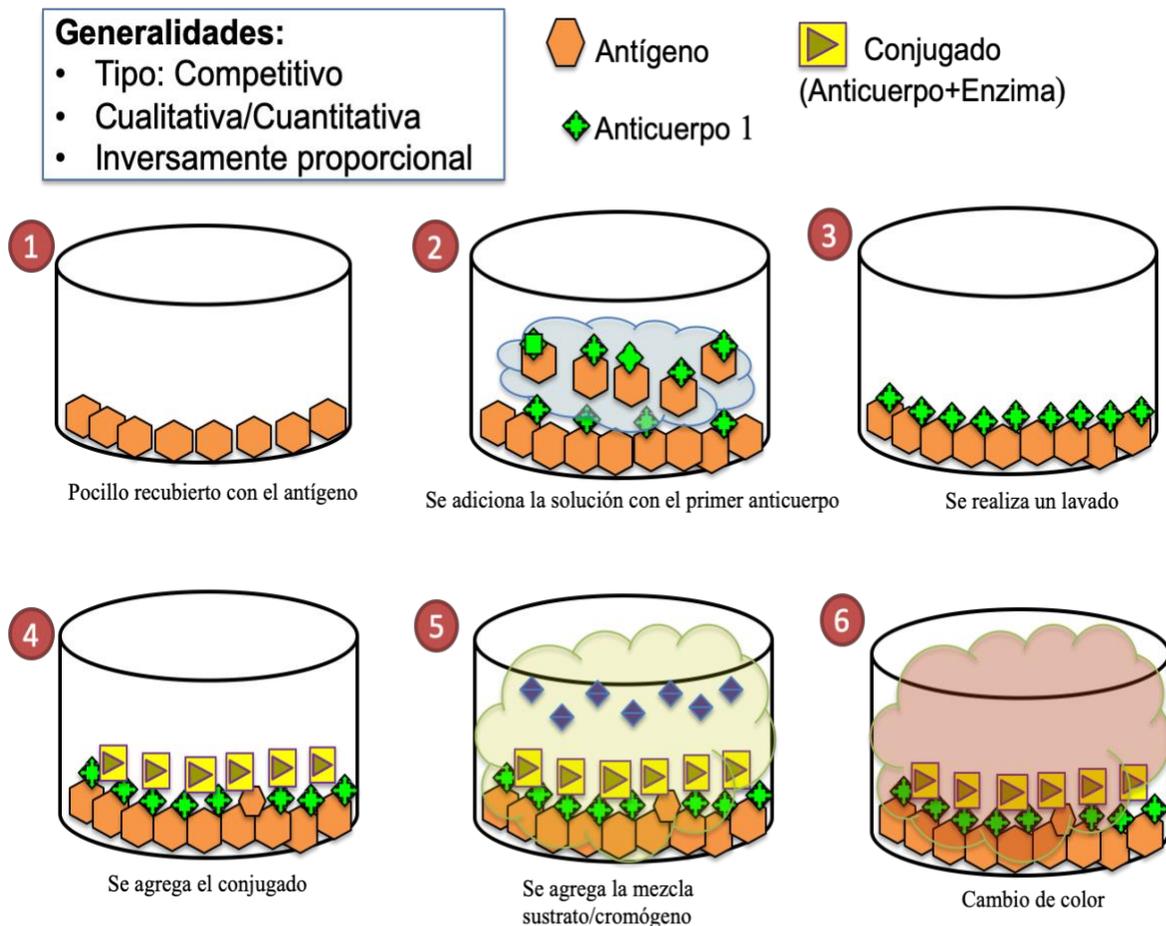


Figura 7. Técnica del Inmunoensayo Ligado a Enzima.

Este ensayo tiene la característica de ser cualitativo y cuantitativo, determina cualitativamente mediante el cambio de coloración la presencia del antígeno problema, además mediante la lectura en un lector de microplacas cuantifica la cantidad de antígeno problema presente en la muestra. El Kit completo 1 microplaca con 96 pocillos que contienen adherido en

el fondo el antígeno problema, estándares para la construcción de la curva de calibración y las sustancias necesarias para la realización de la técnica analítica. (Pelker-Elmer, 2020)

USOS DE LA TÉCNICA ELISA

El ensayo por inmunoadsorción es usado ampliamente en el mundo debido a su especificidad, su bajo costo y su nivel de confianza (Eycos, 2020):

- **Medicina humana**

En medicina humana se utiliza para determinar la presencia de alguna infección o enfermedad autoinmune, enfermedades tales como el cáncer, hepatitis B, Virus de Inmunodeficiencia Humana incluso el virus más reciente COVID-19.

- **Medicina veterinaria**

En el campo de la medicina veterinaria, la técnica ELISA es usada para la detección y diagnóstico de enfermedades que afectan a los animales domesticados como perros y gatos, ganado y aves. Entre las enfermedades y virus que se detectan mediante esta técnica se encuentran la lengua azul, la Brucella, la leucosis enzoótica bovina, la peste porcina, la glicoproteína gE, entre otros.

- **Industria de la alimentación**

La industria alimentaria hace uso ELISA para la detección de alérgenos en alimentos destinados al consumo humano y animal, a la detección de medicamentos (ampliamente usados en la medicina veterinaria como los antibióticos) en algunos alimentos como la miel y la leche.

- **Medioambiente**

Actualmente en el ambiente medioambiental aplica la técnica ELISA para la detección y cuantificación de contaminantes emergentes (pesticidas, fármacos, entre otros) en diversas matrices ambientales como agua, suelo y sedimentos.

TIPOS DE ELISA

En función del tipo de interacción que exista entre el antígeno-anticuerpo existen 4 tipos de ELISA (Figura 8) (BioTech, 2019):

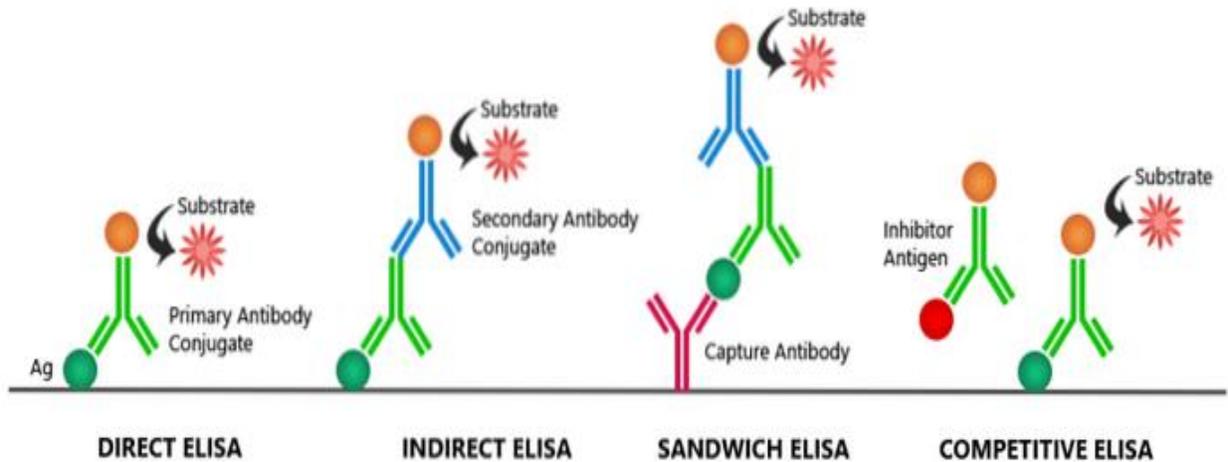


Figura 8. Tipos de ELISA. Nota: Abyntek, 2016.

ELISA directo

El ELISA directo posee la ventaja de ser el más simple y rápido de todos, consiste en que un anticuerpo primario marcado con una enzima se unirá directamente al antígeno problema permitiendo su detección y/o cuantificación mediante la lectura espectrofotométrica.

ELISA indirecto

Este ensayo consiste en dos pasos, lo que permite tener una señal más amplificada, en este caso se hace uso de dos anticuerpos, uno primario y otro secundario siendo este el que se unirá al conjugado a una enzima.

ELISA tipo sándwich

En esta derivación de la técnica ELISA, el antígeno inmovilizado entre dos anticuerpos, uno tiene la función de capturar y otro de detección estos son conocidos como pares de anticuerpo, que unen a dos epítopos distintos de un antígeno específico.

ELISA competitivo

El ELISA de tipo competitivo también conocido como ELISA de inhibición es el más complejo, en este se hace uso de un antígeno de referencia que competirá con el antígeno de la muestra al unirse al anticuerpo primaria.

Se utiliza generalmente para detectar y/o cuantificar antígenos presentes en muy bajas cantidades.

3.4 RESERVA NATURAL ARROYO MORENO

En la zona costera del Golfo de México se encuentra una gran diversidad de hábitat que proporcionan una alta cantidad de servicios ambientales entre los que se encuentran bahías, deltas, lagunas costeras, estuarios, humedales, pastos marinos y arrecifes de coral (Day et al, 2004; Rabalais, 2004) que actúan como sistemas interconectados, tienen una superficie, incluyendo el cuerpo de agua y los humedales costeros de México y Estados Unidos, de aproximadamente de 1,942,500 km² (Secretaría de Desarrollo Social y Medio Ambiente, 2006).

Uno de estos humedales constituye la Reserva Ecológica Arroyo Moreno (Figura 9), el 25 de noviembre de 1999 se decretó como Área Natural Protegida (ANP) sujeta a conservación, posteriormente en 2008 se modificó este decreto, mediante el cual se le asignó la categoría de Reserva Ecológica (Aké, 2016). Se localiza entre los 19° 05' y 19° 08' de latitud norte y los 96° 06' y 96° 09' de longitud oeste, entre los municipios de Boca del Río y Medellín de Bravo Colinda al norte con las colonias Miguel Alemán, Plan de Ayala y UGOCEP, al este con el fraccionamiento La Joya, Colonia El Morro, Graciano Sánchez y al sur con el Fraccionamiento La Tampiquera (Tabla 3) (Ayuntamiento Boca del Río, 2003), es decir, se encuentra rodeado de la mancha urbana. Tiene una extensión actual aproximada de 287 ha, de las 400 que originalmente tenía (Aguilera, 1995; Garibay, 2005).

Tabla 3. Polígono envolvente de delimita la Reserva Ecológica Arroyo Moreno, Municipios de Boca del Río y Medellín de Bravo, Veracruz.

EST	PV	DISTANCIA (M)	RUMBO	COORD Y	COORD X
1	2	157.75	39°20' SW	2114772.00	803450.00
2	3	318.94	76°23' SE	2114650.00	803350.00
3	4	704.91	31°23' NW	2114725.00	803040.00
4	5	681.56	79°15' NW	2115325.00	802670.00

EST	PV	DISTANCIA (M)	RUMBO	COORD Y	COORD X
5	6	908.01	11°15' NW	2115450.00	802000.00
6	7	263.86	9°29' NE	2116340.00	801820.00
7	8	1463.42	86°02' NE	2116600.00	801865.00
8	9	928.03	27°09' SE	2116700.00	803325.00
9	10	418.00	6°31' SE	2115875.00	803750.00
10	11	260.00	81°09' EW	2115460.00	803800.00
11	12	428.51	48°11' SE	2115460.00	803540.00
12	13	450.24	1°32' SE	2115175.00	803860.00
13	14	177.34	21°18' SW	2114725.00	803875.00
14	15	125.29	61°23' SW	2114560.00	803810.00
15	16	213.55	44°37' NW	2114620.00	803700.00
16	1	100.00	89°25' EW	2114772.00	803550.00

Nota: Gobierno del Estado de Veracruz, 1999.

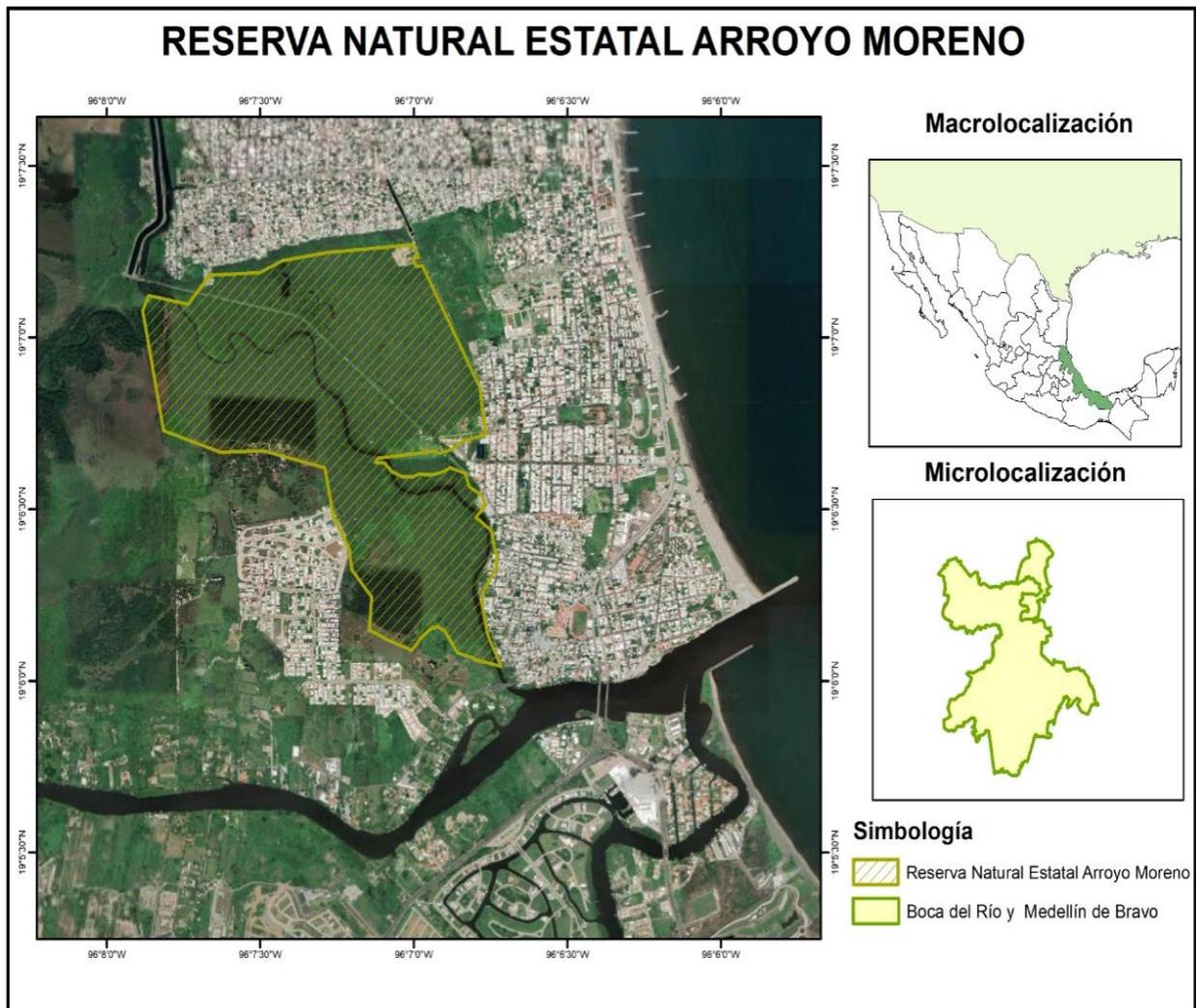


Figura 9. Representación de la Reserva Natural Estatal Arroyo Moreno mediante el software ArcGis.

El Manglar Arroyo Moreno (Figura 10) conserva ecosistemas con una alta riqueza biológica, lo que los hace muy productivos e importantes por la gran cantidad de bienes y servicios medioambientales que estos ofrecen tales como limpieza de agua, regulación de la temperatura, reservorio de pesquerías, etc. Este presenta dos características importantes que lo hacen único en el estado:

- es de tipo “ribereño”, es decir, asociado a un río con intrusión de agua marina
- actualmente se encuentra rodeado por una zona urbana, como resultado del rápido desarrollo inmobiliario (Figura 11).

Esto vuelve muy frágiles a los ecosistemas que se ven altamente afectados por las diferentes actividades humanas, que desarrollan a los alrededores como turismo, pesca, industria y ganadería (García-Contreras, G. y F. Rodríguez-Reynaga, 2008; INECOL A.C., 2006; Gobierno Estatal de Veracruz de Ignacio de la Llave, 1999) lo que ocasiona deforestación y contaminación en los ríos y pérdida de extensión del manglar (Tabla 4) (López-Portillo y Escurra, 2002; Moreno-Casasola et al. 2002; Cruz, 2005)



Figura 10. Fotografía área de la Reserva Arroyo Moreno. Nota: Peña, 2020.

Tabla 4. Extensión del uso del suelo y vegetación en Arroyo Moreno, Veracruz.

Clase	1976		2005		2010		Ganancias- Pérdidas (1976- 2005)	Ganancias- Pérdidas (2005- 2010)
	ha	%	ha	%	ha	%	Netas (+/-)	Netas (+/-)
Desarrollo Antrópico	1417	14	4229	43	4702	47	2812	473
Agrícola-Pecuaria	4852	49	4293	43	3831	39	-568	-462
Otra Vegetación	2405	24	668	7	584	6	-1736	-84
Sin vegetación	59	1	13	0	13	0	-47	0
Manglar	267	3	315	3	308	3	48	-7
Manglar perturbado	0	0	0	0	0	0	0	0
Otros humedales	820	8	268	3	319	3	-553	51
Cuerpos	94	1	138	1	167	2	44	29
Total	9924	100	9924	100	9924	100		

Nota: López-Portillo, J. A., L. R. Gómez-Aguilar y V. Vázquez, 2009.



Figura 11. Desarrollos inmobiliarios a lo largo de Arroyo Moreno.

Servicios Ambientales

Los manglares proporcionan diversos servicios ambientales entre los que se encuentran (CONABIO, 2009):

- Protegen y estabilizan el suelo
- Favorecen la recarga de acuíferos y limpieza del agua
- Constituyen un área de protección para especies en fase larvaria y juvenil
- Funcionan como barrera de contención ante los fuertes vientos que se llegan a presentar en la zona

- Son zonas de protección, alimentación y reproducción de aves, peces, mamíferos, anfibios y reptiles
- Captura de CO² y su fijación en M.O.
- Estabilización de microclimas
- Contienen los efectos de la erosión costera provocada por fuertes vientos y oleaje
- Son hábitat a especies con importancia comercial.

Clima

El clima predominante en la Reserva Ecológica Arroyo Moreno es calido subhumedo, con lluvias en verano, la temperatura media anual es de 25.3 °C, extrema de 33°C y la temperatura media del més en invierno más frio son 18 °C (+/- 3-7 °C). Tiene en promedio 100 días con eventos de nortes entre los meses de septiembre a abril, respecto a la precipitación se clasifica como “abundante”, supera los 1500 mm anuales y las lluvias torrenciales se presentan en de junio a septiembre(Garibay, 2006).

Tabla 5. Principales épocas existentes en un ciclo anual en el estado de Veracruz.

Época	Características	
	Temperatura Ambiental	Precipitación pluvial
Nortes (noviembre-febrero)	Baja	Ocasional
Estiaje (marzo-junio)	Alta	Nula
Lluvias (julio-octubre)	Alta-mediana	Abundante

Nota: Faría, 1991.

Flora

La flora del manglar Arroyo Moreno está constituida mayor mente por asociaciones casi puras de mangle rojo *Rhizophora mangle* (genero *Rhizophoraceae*), que se extiende a lo largo del sendero del río, mangle negro o prieto *Avicennia germinans* (genero *Avicenniaceae*) y en menor proporción el mangle blanco *Laguncularia racemosa* (genero *Combretaceae*) y *Conocarpus erectus* (mangle botoncillo), las especies antes mencionadas se encuentran bajo la categoría de amenazadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. (CONABIO, 2006)

Otras especies localizadas en el manglar son: el helecho mangle *Acrostichum aureum* (genero *Pteridáceae*), el coyol redondo o espinoso *Acrocomia mexicana* (genero *Arecaceae*), palma redonde o apachite *Sabal mexicana*, palma real, *Scheelea liebmannii* (genero *Palmae*) uvero,

Coccoloba barbadensis, (Poligonaceae), orquídeas, Myrmecophylla tibicinis, Oncidium carthagenense y Brassavola nodosa. (Orchidiaceae) guacima o guacimo, Guazuma ulmifolia, chicozapote, Manilkara zapota, apompo, Pachira aquatica (Bombacaceae), jaboncillo, devanador o palo de voladillo, Sapindus saponaria (Sapindaceae), cuachilote, cuajilote o chote, de la Familia Bignoniaceae, Parmentiera aculeata, cocohuite o cocuite, Gliricidia sepium (Fabaceae), cornizuelo, Acacia cornigera, Acacia farnesiana, (Mimosaceae) palo mulato o chaca, Bursera simaruba (Burseraceae), chancarro, guarumo o guarumbo, Cecropia obtusifolia (Moráceae), nopal, Opuntia sp. La vegetación está integrada por 30 Órdenes, 49 Familias y 110 Géneros (Garay, 2006; CONABIO, 2006).

Fauna y especies características

Entre la fauna ubicada en el manglar Arroyo Moreno se encuentra la siguiente (CONABIO, 2006):

- *Bufo marinus* (sapo marino)
- *Lectodactylus melanonotos*
- *Physalemus pustulosos*
- *Centrolenella fleischmanni* (ranas)
- *Staurotypus triporcatus* (tortuga tres lomos)
- *Claudius angustatus* (tortuga chopontil)
- *Kinosternon leucostomum* (chachahua)
- *Crocodylus moreleti* (cocodrilo de pantano)
- *Lepthophis ahaetulla* (culebra bejuquillo)
- *Pelecanus erythrorhynchos* (pelicano blanco)
- *Egretta alba* (garza blanca)
- *Pandion haliaetus* (águila pescadora)
- *Cardisoma guanhumi* (cangrejo azul)

Población

En el año 2005 el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) reportó que el estado de Veracruz tenía 7,110, 214 pobladores y la zona del manglar estaba constituida de la siguiente manera (CONABIO, 2006; INEGI, 2005):

- **Población total**

Población en el área del manglar: 118

Población en el área de influencia: 158,283

- **Numero total de localidades**

Localidades en el área del manglar: 3

Localidades en la zona de influencia:34

Para el año 2020 según la INEGI el estado de Veracruz registró una población de 8 062 579, es decir, aumentó un 1.5% por lo que se asevera que la población aledaña al manglar y en la zona de influencia también aumentó.

4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El incremento desmedido de la población trae consigo el aumento en la demanda de bienes y servicios, reflejándose en el crecimiento de la producción, tanto en desarrollos urbanos, zonas industriales, como en las actividades pecuarias, acuícolas y agrícolas los cuales están ocasionando un visible deterioro en el medio ambiente, debido a que las aguas residuales que genera cada actividad son vertidas directa e indirectamente a los ríos.

El problema radica en que gran porcentaje de dichas aguas no poseen algún tipo de tratamiento previo, que ayude a mitigar el impacto que se está generando. Las descargas de grandes caudales, constituidos de un sin número de compuestos químicos en las aguas superficiales, son las que alteran las características del agua y en muchas ocasiones dañando así la capacidad de autodepuración que tienen los ríos.

Entre los contaminantes que llegan a los mantos acuíferos se encuentran los antibióticos que están dentro de los denominados contaminantes emergentes, para los cuales actualmente en México no existen normas que regulen su uso y desecho, dando pie a su uso irracional y desmedido. Estos contaminantes son desechados sin tratar; ingresan a los cursos de agua y de allí pasan a los suministros de agua potable, desde distintas fuentes: entre ellas los efluentes de tratamiento de aguas residuales y las filtraciones de establecimientos pecuarios y acuícolas.

Todo esto según la literatura existente podría causar graves problemas a la fauna y a la flora acuática, y puede llegar a repercutir hasta en la salud humana.

5. JUSTIFICACIÓN

La Reserva Natural Arroyo Moreno se encuentra rodeada por una zona urbana, resultado del rápido crecimiento demográfico que se vive en el Estado de Veracruz, las actividades que se desarrollan a los alrededores causan impactos negativos en las aguas superficiales por el ingreso continuo de diversos tipos de contaminantes químicos, de acuerdo con una encuesta estructurada dirigida como instrumento de evaluación que se realizó, se identificó el uso frecuente de antibióticos en esta zona de estudio. De la que se destaca que la oxitetraciclina es el antibiótico de uso común en las actividades pecuarias, acuícolas y desarrollo urbano.

Según estudios realizados estos contaminantes alteran el habitat, se bioacumulan en organismos acuáticos y pueden causar efectos en la salud pública como la resistencia microbiana que según la OMS en el año 2050 será la principal causa de muerte.

A nivel mundial se ha identificado la presencia de antibioticos en aguas residuales, aguas superficiales, subterranas e incluso en agua potable, lo que deja en manifiesto que los tratamientos de aguas residuales convencionales no son eficientes para eliminar este tipo de contaminantes.

En México hay pocos estudios que muestren la presencia de antibióticos en ambientes acuáticos y no existen estudios del impacto que causan en estos ambientes. En las normas NOM-127-SSA1-1994 y la NOM-001-SEMARNAT-2021 no contemplan a los antibióticos, y como contaminantes de tipo emergentes no hay legislación para su uso y desecho.

Esta investigación propone determinar la concentración de oxitetraciclina en las aguas superficiales en la Reserva Natural Arroyo Moreno, para fortalecer esta área tematica a nivel nacional.

6. HIPOTESIS

Las concentraciones de oxitetraciclina presente en aguas superficiales de la Reserva Natural Arroyo Moreno, más del 70% están en función de la constante descargas de aguas residuales y al uso irracional y descontrolado de dicho antibiótico en las principales actividades que se realizan a los alrededores.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar las concentraciones de oxitetraciclina en aguas superficiales de la Reserva Arroyo Moreno durante un ciclo anual.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y clasificar las fuentes puntuales de contaminación en la Reserva Arroyo Moreno.
- Determinar la concentración de Oxitetraciclina en aguas superficiales de la Reserva Arroyo Moreno.
- Relacionar las concentraciones de oxitetraciclina con las fuentes de contaminación en la zona de estudio durante las temporadas del ciclo anual.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 ÁREA DE ESTUDIO

Arroyo Moreno (Figura 12) es parte de la cuenca hidrológica del río Jamapa, se origina en deshielos de las laderas nor-orientales del volcán Citlaltépetl a 5610 metros sobre el nivel del mar (msnm). El río Jamapa se origina a 4700 msnm en el límite de los estados de Puebla y Veracruz. A 50 Km de su nacimiento su cauce sigue un rumbo al sureste en zonas de topografía media. Al transcurrir en las zonas de menor pendiente forma numerosos meandros, en las inmediaciones del municipio de Medellín de Bravo fluye en el río Cotaxtla y de esta confluencia, el río Jamapa se orienta hacia el norte desviándose hacia el oriente formando una margen izquierda que define al Arroyo Moreno (Fuentes-Mariles *et al.*, 2014).

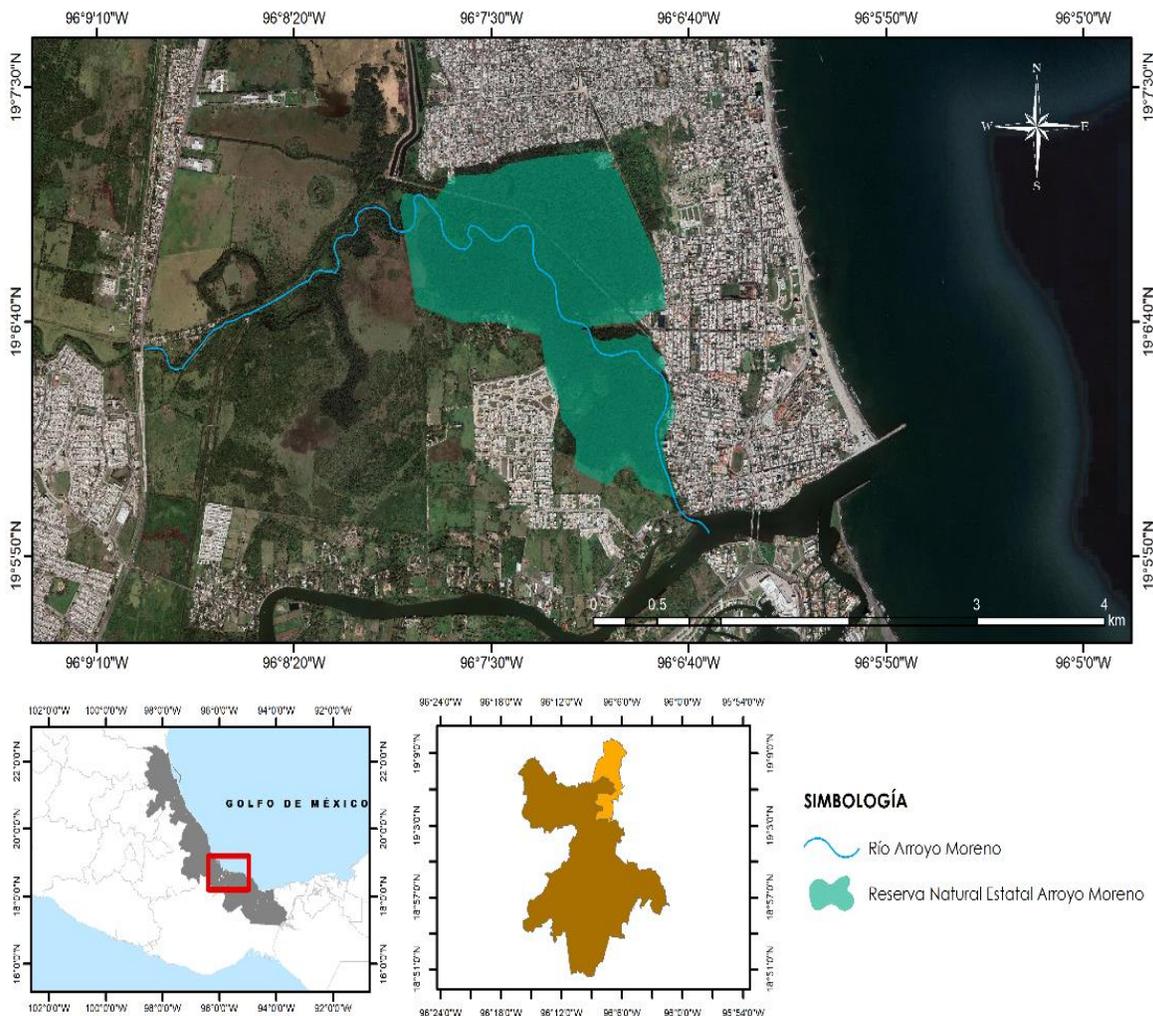


Figura 12. Representación de la Reserva Natural Estatal Arroyo Moreno mediante el software ArcGis.

El Arroyo Moreno esta integrado por ecosistema de manglar; que funciona como una barrera natural de contención y protección contra el efecto del oleaje, marejadas, ciclones, huracanes y tormentas tropicales, además, contribuye a la estabilidad del clima en la costa, mitigando los efectos del cambio climático; cualquier daño ambiental o contaminación es sancionada por la NOM-022-SEMARNAT-2003, ordenamiento que protege al manglar.(INECC, 2018)

8.2 IMPLEMENTACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

8.2.1 IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE CONTAMINACIÓN

Se inició con la identificación de las principales fuentes de contaminación presentes en la Reserva Ecológica Arroyo Moreno, para ello se realizaron dos visitas de prospección, la primera a través del río Arroyo Moreno, para lo cual se utilizó una embarcación menor con motor fuera de borda; la segunda visita fue un recorrido a pie a lo largo del los senderos del río guiada por un colaborador que conoce el área de estudio.

Se identificaron y georreferenciaron las fuentes de contaminación detectadas en ambos recorridos, este fue un factor importante para la determinación de los puntos de muestreos utilizados en este trabajo de investigación, se ubicaron en el mapa mediante un geoposicionador satelital y a través del software ArcGIS se creo el mapa en donde se ilustran las fuentes de contaminación detectadas.

8.2.2 SELECCIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO

Con base a los resultados obtenidos en las dos visitas de prospección realizadas se seleccionaron 10 puntos de muestreo (Tabla 6) en atención a los siguientes criterios:

1. Cercanía a fuentes de contaminación puntuales tales como descargas de efluentes de aguas residuales
2. Asentamientos humanos
3. Vías de acceso.

Tabla 6. Ubicación de los puntos de muestreo.

Clave	Ubicación	
	x	y
M ₁	-96.1116	19.099630
M ₂	-96.1118	19.099900
M ₃	-96.1180	19.099989
M ₄	-96.1121	19.101160
M ₅	-96.1131	19.103500
M ₆	-96.1127	19.105820
M ₇	-96.1220	19.115930
M ₈	-96.1302	19.118640
M ₉	-96.1303	19.118440
M ₁₀	-96.1421	19.111380

8.2.3 PERIODICIDAD Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DEL MUESTREO

Las muestras fueron colectadas con base a las épocas existentes en un ciclo anual en el Estado de Veracruz, las cuales se identifica Faría en 1991: Nortes (N), lluvias (LL) y estiaje (E), entre los meses de octubre 2020 a julio del 2021. La recolección de las muestras de agua superficial se realizó en los diez sitios de muestreo seleccionados, a una profundidad promedio de 30 cm de la superficie y un volumen de 1000 ml, usando un recipiente de polipropileno color ámbar.

Tabla 7. Principales épocas existentes en un ciclo anual en el Estado de Veracruz.

Época	Características	
	Temperatura Ambiental	Precipitación pluvial
Nortes (noviembre-febrero)	Baja	Ocasional
Estiaje (marzo-junio)	Alta	Nula
Lluvias (julio-octubre)	Alta-mediana	Abundante

Nota: Faría, 1991.

8.2.4 PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los recipientes utilizados en la colecta de muestras fueron lavados previamente con agua destilada con el objetivo de disminuir la posible contaminación de la muestra, durante su transporte las muestras se aislaron en una termo-hielera hasta que fueron resguardadas en un refrigerador a 4°C en el Laboratorio de Investigación en Recursos Acuáticos (LIRA), para su posterior procesamiento.

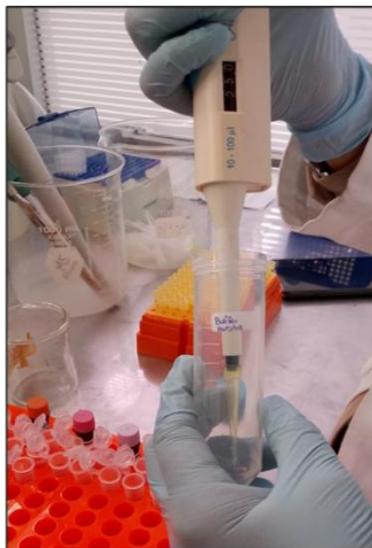
8.2.5 TRATAMIENTO DE MUESTRAS.

Antes de proceder al análisis de las muestras se les dio un tratamiento previo (Figura 13), se filtraron con el objetivo de eliminar las partículas en suspensión, posteriormente si siguieron las indicaciones que proporciona MaxSignal Oxytetracycline ELISA Kit, las cuales se detallan a continuación:

1. A 200 μL de muestra se le adicionaron 25 μL de disolución reguladora.
2. Posteriormente se adicionaron 275 μL de diluyente de la muestra.
3. Se agitó durante 1 minuto.



1. Se filtró la muestra mediante filtración por membrana 0.45 μm .



2. 200 μL de muestra y se adicionaron 25 μL de disolución reguladora.



3. Se adicionan 275 μL de diluyente de la muestra y se agitó por 1 minuto.

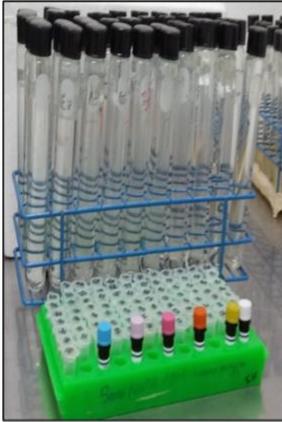
Figura 13. Tratamiento previo a las muestras.

8.2.6 DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE OXITETRACICLINA MEDIANTE ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA).

FASE CUALITATIVA

Para la determinación cualitativa de oxitetraciclina se siguió el siguiente protocolo establecido por MaxSignal Oxytetracycline ELISA Kit (Figura 14):

1. Se adicionaron 75 μ L de cada estándar (4.5 μ L, 1.5 μ L, 0.75 μ L, 0.375 μ L, 0.15 μ L y el control negativo) por duplicado en los pocillos previamente asignados, se utilizó una micropipeta distinta para cada estándar con la finalidad de evitar contaminación cruzada.
2. Se adicionaron 75 μ L de la muestra.
3. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de anticuerpo #1 en cada pocillo.
4. Se agitó la placa sutilmente para homogeneizar la mezcla.
5. Se incubó la placa por 55 minutos a una temperatura controlada (20-25 °C).
6. Después de la incubación se procedió a lavar la placa 3 veces con la solución de lavado que proporcionó el kit, el procedimiento de lavado fue el siguiente:
 - a) Se decantó el líquido contenido en los pocillos.
 - b) Se agregaron a cada pocillo 250 μ L de solución de lavado y se incubó por 15 segundos.
 - c) Se decanta nuevamente el líquido contenido en los pocillos y se repitieron los pasos b y c.
7. Se adicionaron a cada pocillo 150 μ L del conjugado Anticuerpo2-HRP.
8. Se homogeneizó la mezcla y se incubó por 25 minutos a temperatura controlada (20-25 °C).
9. Después de la incubación se procedió a lavar 3 veces la placa con el procedimiento descrito en el paso 6. Después del último lavado se limpió la superficie de la placa con una toalla estéril para eliminar posibles restos de las soluciones utilizadas.
10. Se adicionaron a cada pocillo 100 μ L de sustrato TMB y se agitó la placa sutilmente para homogeneizar la mezcla.
11. Se incubó la placa por 15 minutos a temperatura controlada (20-25 °C) y en ausencia de luz.
12. Posteriormente se adicionaron a cada pocillo 100 μ L de solución de parada para detener la reacción sustrato-cromógeno.



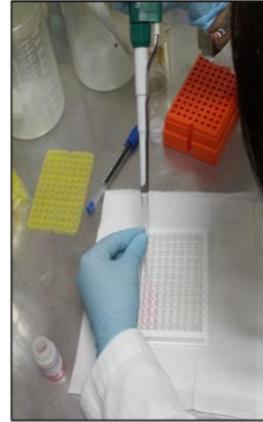
1. Se añadieron 75 μ L de cada estándar por duplicado y 75 μ L de la muestra problema en los pocillos preasignados.



2. Se añadieron 100 μ L del anticuerpo 1 a cada pocillo.



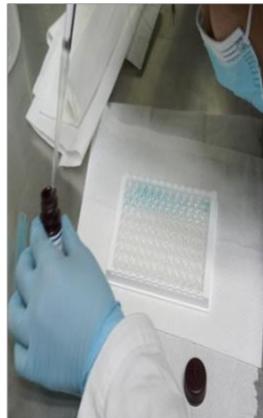
3. Después de incubarse la placa, se hicieron los lavados descritos en la técnica.



4. Se añadió 150 μ L de Anticuerpo 2-HRP a cada pocillo.



6. Se agregaron 100 μ L de solución de parada.



5. Se adicionaron 100 μ L de sustrato TMB a cada pocillo.

Figura 14. Procedimiento analítico ELISA.

FASE CUANTITATIVA

Para obtener los valores de absorbancia y concentración se utilizó un lector de microplacas de 96 pocillos modelo 4303 (Figura 15, 16 y 17), en el cual se creó un ensayo específico para la oxitetraciclina en donde los valores de la longitud de onda para el filtro primario fueron de 450 nm y diferencial de 650 nm, valores indicados por el fabricante de MaxSignal Oxytetracycline ELISA Kit.



Figura 15. Lector de Microplacas EUROFINS.



Figura 17. Lectura de la microplaca.

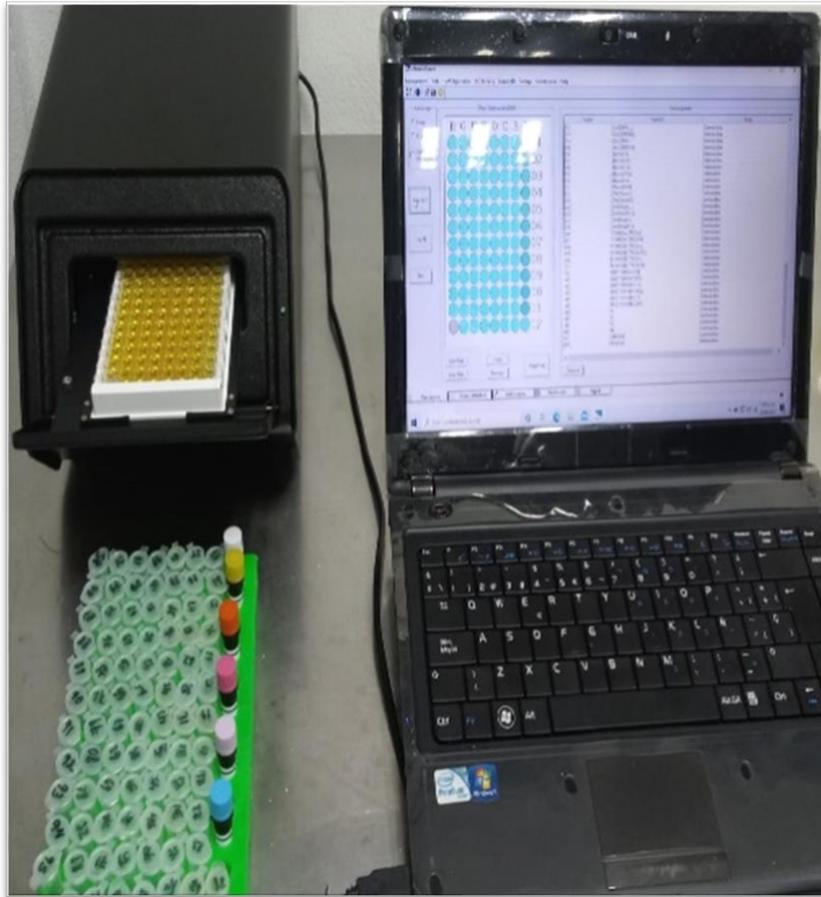


Figura 18. Software que da lectura a la placa.

8.2.7 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos se utilizó el software Minitab 18, primero se comprobó la normalidad de los datos obtenidos, mediante una prueba de normalidad Ryan-Joiner (similar a Shapiro-Wilk). Una vez obtenida esta información se procedió a realizar un análisis de la varianza (ANOVA) en específico un modelo lineal general

9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En cumplimiento de los objetivos particulares planteados en este trabajo de investigación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de ellos:

- Identificar y clasificar las fuentes puntuales de contaminación en la Reserva Arroyo Moreno.

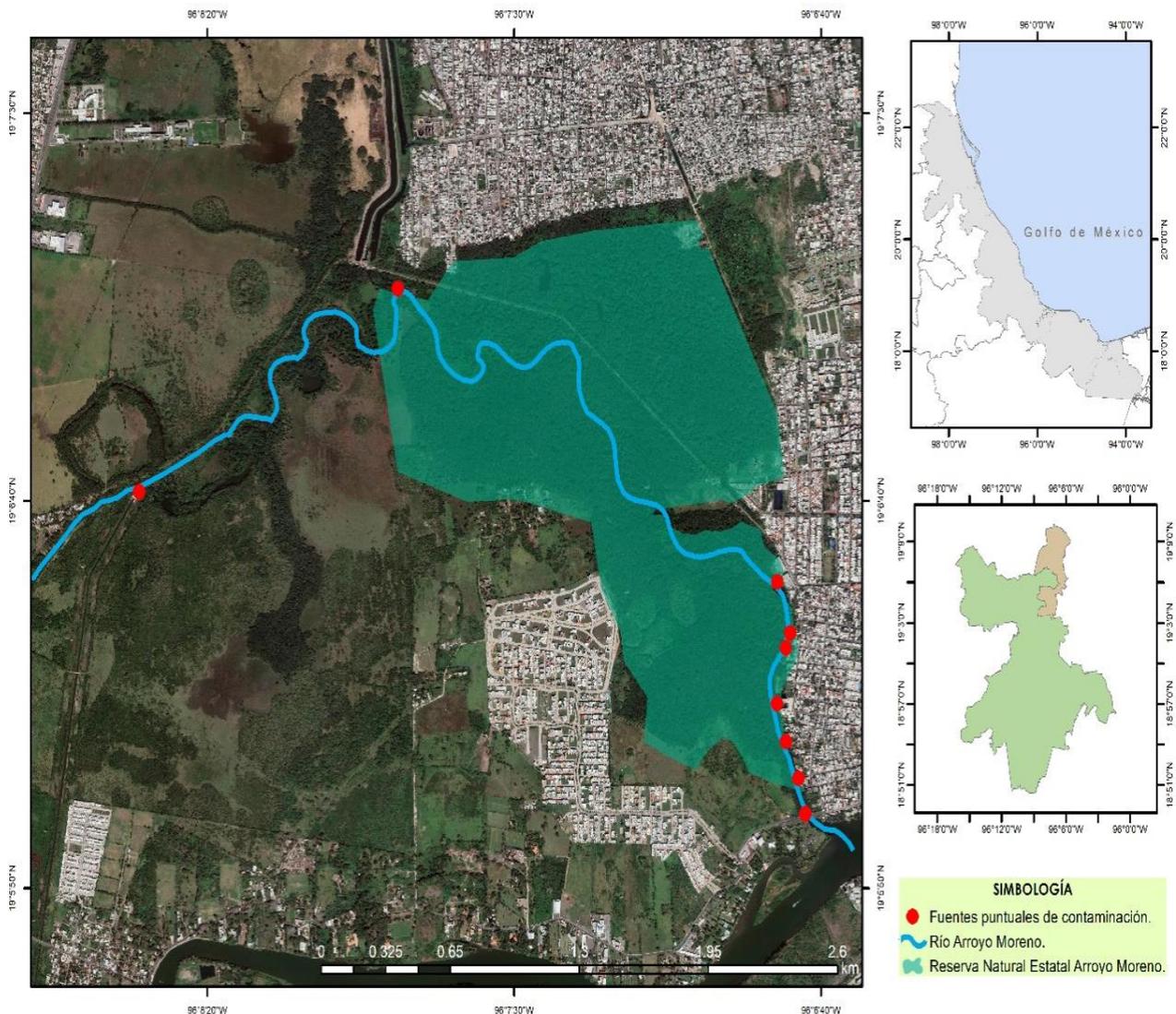


Figura 19. Fuentes Puntuales de Contaminación.

Se identificó un total de 10 fuentes puntuales de contaminación (Figura 18; Tabla 8) a lo largo del sendero del río Arroyo Moreno, las principales fuentes de contaminación identificadas son aparentes descargas de aguas pluviales y aguas residuales de tipo domiciliarias provenientes

de las principales zonas residenciales que rodean la Reserva Natural Arroyo Moreno, cabe destacar que la apariencia y el olor no corresponden a aguas pluviales, tienen amplia similitud con aguas negras/no tratadas (Figura 19 y 20).

Tabla 8. Ubicación de las fuentes puntuales de contaminación.

Clave	Ubicación		Fuente de contaminación
	x	y	
M ₁	-96.1116	19.099630	Descargas de A.R. de distintos asentamientos humanos
M ₂	-96.1118	19.099900	
M ₃	-96.1180	19.099989	
M ₄	-96.1121	19.101160	
M ₅	-96.1131	19.103500	
M ₆	-96.1127	19.105820	
M ₇	-96.1220	19.115930	Descarga canal "La Zamorana"
M ₈	-96.1302	19.118640	Descarga termoeléctrica "Dos Bocas"
M ₉	-96.1303	19.118440	
M ₁₀	-96.1421	19.111380	



Figura 20. Descargas pluviales.



Figura 21. Fuente de contaminación de tipo puntual.

El más grande aporte de aguas negras proviene de el canal de la zamorana (Figura 22) en donde convergen las aguas residuales de alrededor 52 colonias, de las cuales se desconoce si son tratadas, no obstante si son tratadas se ha diversos estudios científicos han demostrado que los tratamientos de aguas residuales convencionales no eliminan los antibióticos, entre ellos se encuentran Robledo *et al.*, en el año 2016 mediante Espectrofotometria de Masas con Ionización por Electronebulización y Detector de Tiempo de Vuelo (ESI-MS-TOF) cuantificaron concentraciones en el influente de 2.2-160.2 $\mu\text{g/L}$ y en el efluente de 2.7-119.4 $\mu\text{g/L}$ en una PTAR determinaron la remoción 13.6% de la concentración de antibióticos en aguas residuales tratadas mediante digestión anaerobia. Martínez-Alcalá y Soto, 2020 Tetraciclina Influyente PTAR 22.2 ng/L Man-Hong *et al.*, 2015 concentraciones de 2.2-160.2 $\mu\text{g/L}$ influente y efluente de 2.7-119.4 $\mu\text{g/L}$, End, Cha y Carlson, 2005 Influyente de una PTAR 0.06 a 0.21.

Esto corrobora que la principal vía de distribución de los antibióticos a las aguas superficiales, son las descargas de aguas residuales provenientes de los residenciales aledaños a la zona de estudio. cabe destacar como ya se mencionó en capítulos anteriores, los tratamientos de aguas residuales convencionales no eliminan los antibióticos presentes en estas aguas y constituyen una base para diseñar futuras investigaciones sobre los problemas ecotoxicológicos que pueden generar estos compuestos en la zona donde se usan estas aguas residuales.



Figura 22. Descarga de canal la “Zamorana”.

- Determinar la concentración de Oxitetraciclina en aguas superficiales de la Reserva Arroyo Moreno.

En las siguientes Tablas se presentan los valores de absorbancia y concentración obtenidos en las diferentes temporadas climáticas, además se presentan graficas donde se observa el comportamiento del contaminante:

Tabla 9. Resultados obtenidos para la temporada climática “Nortes”

No. Muestra	Temporada	Zona de estudio	ID	Absorbancia	Concentración (ng/l)
1			M1-N	0.61	4.88
2			M2-N	0.69	4.65
3			M3-N	0.60	4.91
4			M4-N	0.70	4.62
5	NORTES	ARROYO MORENO	M5-N	0.50	5.20
6			M6-N	0.57	5.01
7			M7-N	0.52	5.14
8			M8-N	0.56	5.03
9			M9-N	0.72	4.57
10			M10-N	0.47	5.30
Promedio				0.59	4.93

En la Tabla 9 y Figura 23 se representan las concentraciones obtenidas por punto de muestreo en la temporada climática “Nortes” se puede observar que la concentración mínima obtenida es de 4.62, mientras que la máxima es de 5.30 con un promedio de 4.913 ng/l.

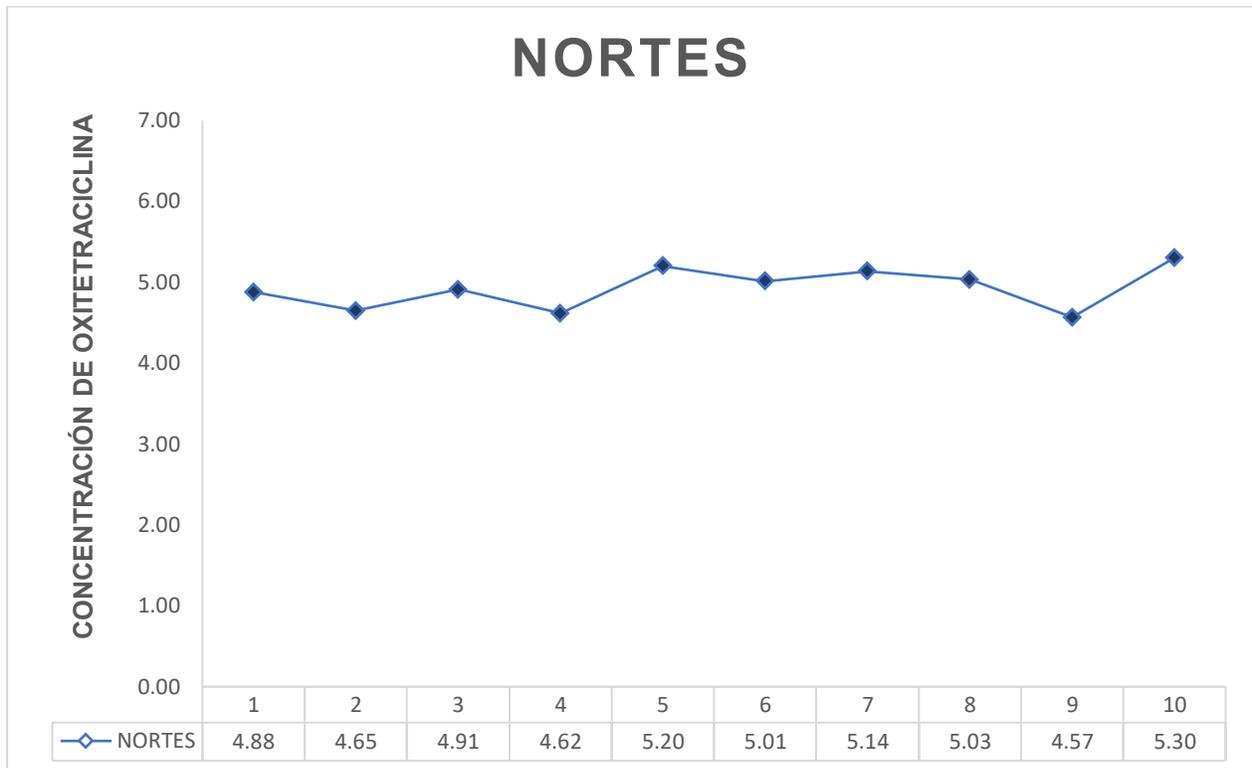


Figura 23. Grafico del comportamiento de la concentración de oxitetraciclina en la temporada de “Nortes”.

En la Tabla 10 y Figura 24 se representan las concentraciones obtenidas por punto de muestreo en la temporada climática “Estiaje” se puede observar que la concentración mínima obtenida es de 4.95, mientras que la máxima es de 5.85 con un promedio de 5.56 ng/l.

Tabla 10. Resultados de obtenidos para la temporada climática “Estiaje”

No. Muestra	Temporada	Zona de estudio	ID	Absorbancia	Concentración (ng/l)
1			M1-E	0.34	5.67
2			M2-E	0.35	5.64
3			M3-E	0.36	5.61
4			M4-E	0.42	5.44
5	ESTIAJE	ARROYO MORENO	M5-E	0.40	5.51
6			M6-E	0.30	5.79
7			M7-E	0.36	5.62
8			M8-E	0.41	5.47
9			M9-E	0.59	4.95
10			M10-E	0.28	5.85
Promedio				0.38	5.56

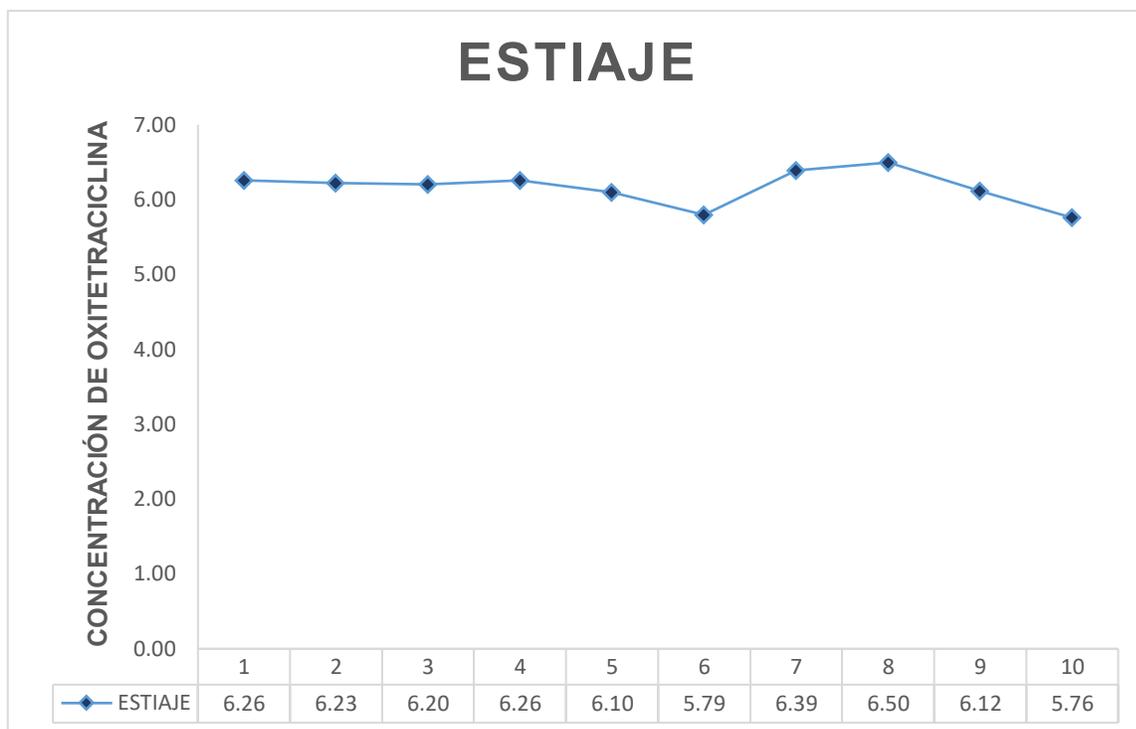


Figura 24. Grafico del comportamiento de la concentración de oxitetraciclina en la temporada de "Estiaje".

En la Tabla 11 y Figura 25 se representan las concentraciones obtenidas por punto de muestreo en la temporada climática "Lluvias" se puede observar que la concentración mínima obtenida es de 3.11, mientras que la máxima es de 4.04 con un promedio de 3.65 ng/l.

Tabla 11. Resultados de obtenidos para la temporada climática "Lluvias"

No. Muestra	Temporada	Zona de estudio	ID	Absorbancia	Concentración (ng/l)
1	LLUVIAS	ARROYO MORENO	M1-LL	1.00	3.74
2			M2-LL	1.10	3.44
3			M3-LL	1.20	3.15
4			M4-LL	1.02	3.68
5			M5-LL	1.02	3.68
6			M6-LL	0.90	4.04
7			M7-LL	0.90	4.02
8			M8-LL	0.94	3.91
9			M9-LL	1.21	3.11
10			M10-LL	1.01	3.71
Promedio				1.03	3.65

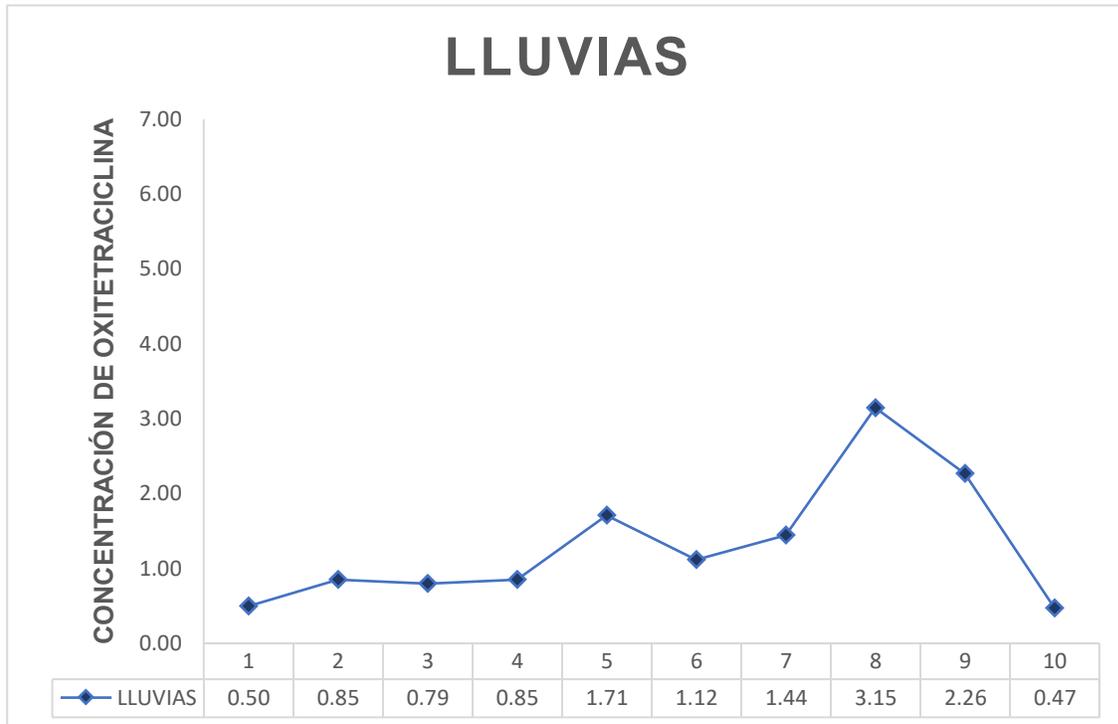


Figura 25. Grafico del comportamiento de la concentración de oxitetraciclina en la temporada de "Lluvias".

El comportamiento de la oxitetraciclina en el agua se ve afectado por el nivel del agua puesto que se trata de una molécula hidrosoluble (Dublely, 2015), en la Figura 26 se presentan el comportamiento de las precipitaciones se puede observar que entre los meses de junio a septiembre la precipitación fue de 270 mm, por lo que el nivel del río Arroyo Moreno se incrementó y la concentración de oxitetraciclina registró su concentración más baja 0.50, mientras que para los meses de enero a mayo las precipitaciones fueron de 13 mm, debido a esto la concentración más alta se registro en el periodo de "Estiaje" siendo de 6.40 ng/l, los meses de noviembre a enero el comportamiento fue similar con una concentración máxima de 5.40 ng/l.

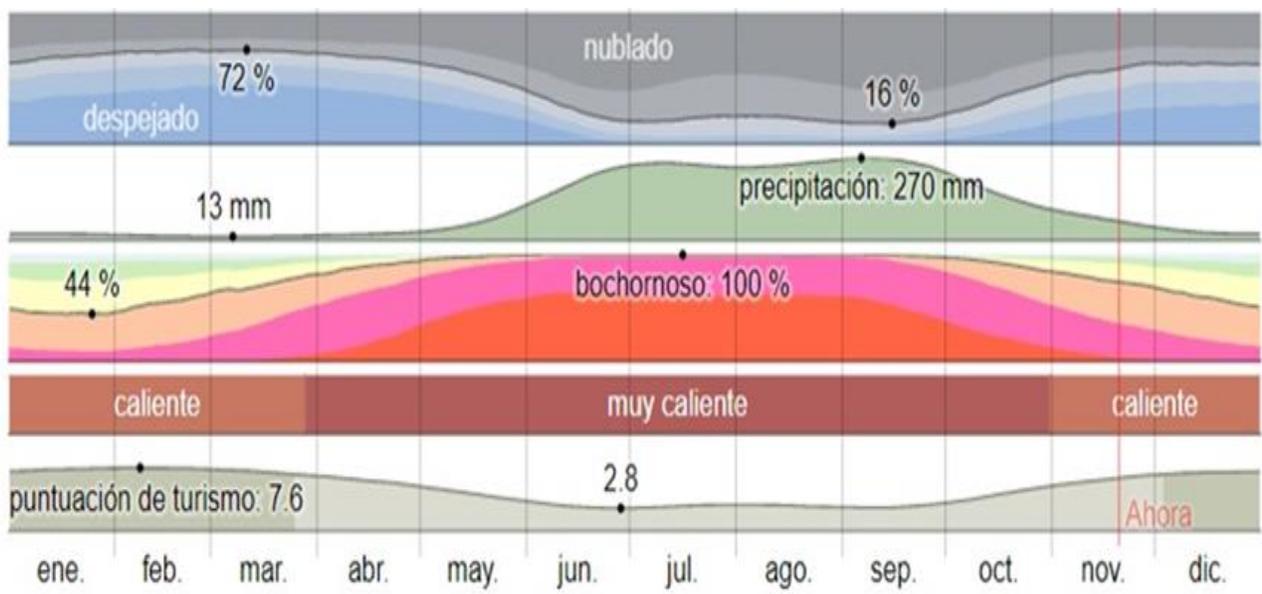


Figura 26. Principales precipitaciones del ciclo anual 2019-2020. Nota: Conagua:2021.

- Relacionar las concentraciones de Oxitetraciclina con las fuentes de contaminación en la zona de estudio durante las temporadas del ciclo anual.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el software Minitab 18, para esto se comprobó la normalidad de los datos obtenidos mediante la prueba de normalidad de Ryan-Joiner. En la Figura 27 se observa que los datos son parámétricos puesto que cumplen los 4 supuestos de la normalidad.

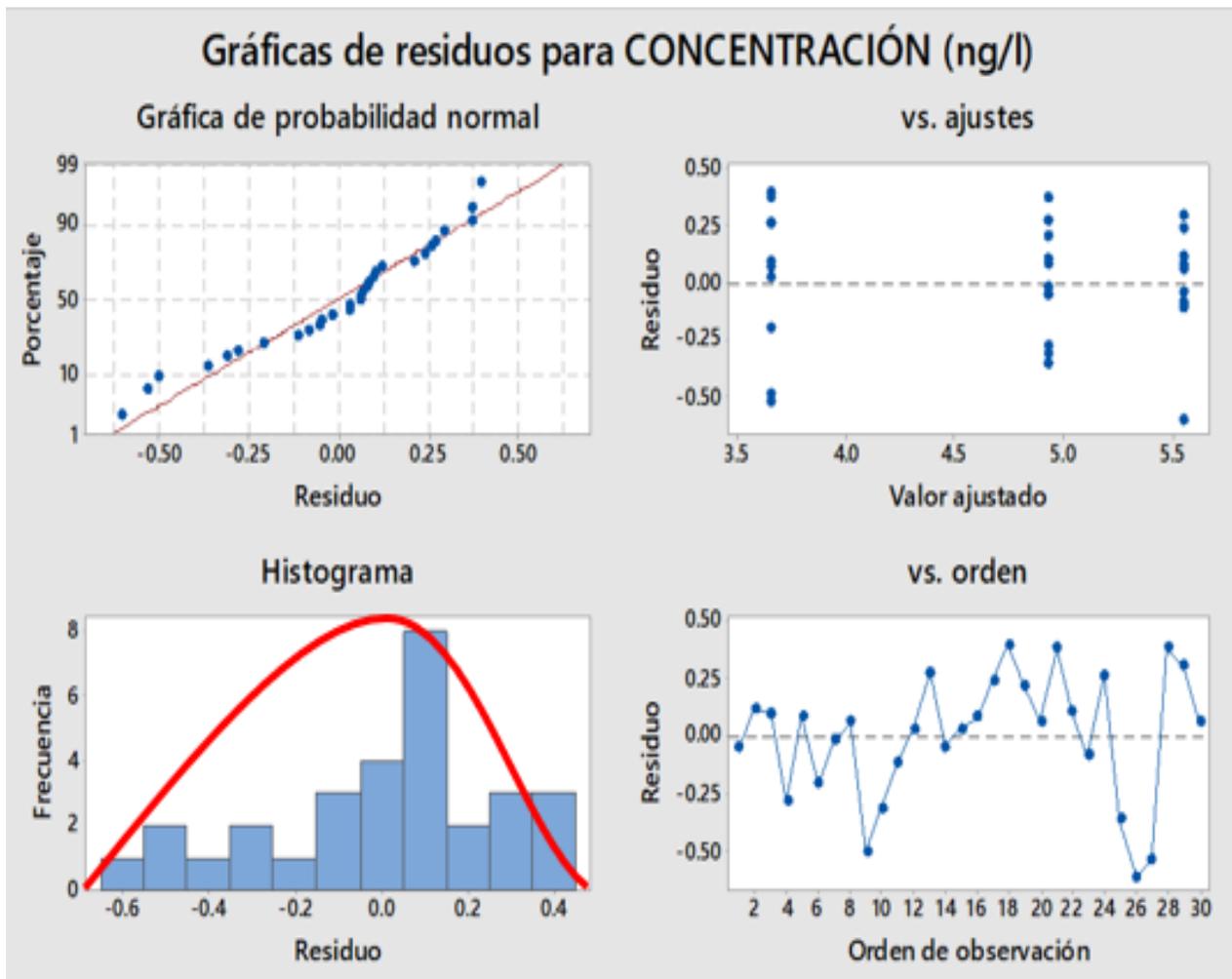


Figura 27. Gráficas de residuos para la Concentración.

Una vez obtenida esta información se procedió a realizar un análisis de la varianza (ANOVA) en específico un modelo lineal general y se obtuvo la siguiente gráfica de caja de las concentraciones obtenidas. En la Figura 28 se observa que las cajas no se empalman entre ellas, lo que significa que si hay diferencias significativas entre los datos de cada temporada climática.

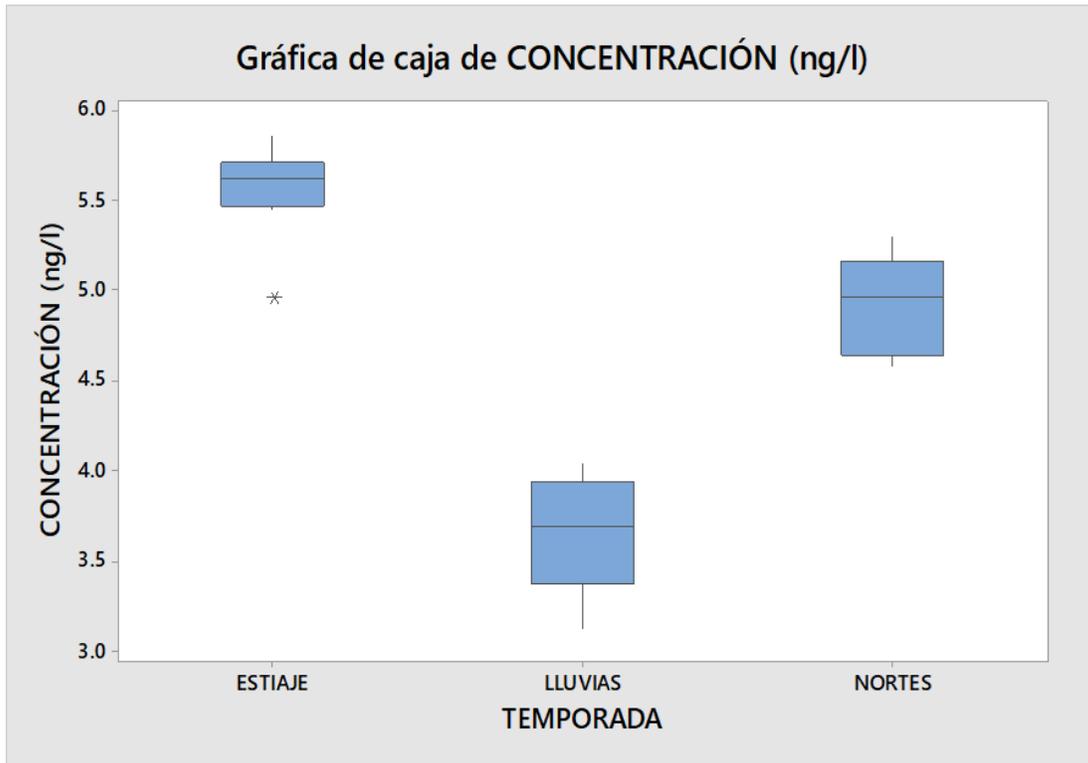


Figura 28. Gráfica de caja de CONCENTRACIÓN (ng/l)

En la Figura 29 se presenta un mapa del comportamiento de las concentraciones de oxitetraciclina por punto de muestreo y temporada climática, se puede observar que las concentraciones más altas se encuentran en la temporada de estiaje, esto se explicó con anterioridad que se debe a la naturaleza química de la molécula, la oxitetraciclina es un antibiotico de primera generación cuya característica es que son hidrosolubles (Torres, 2015), por lo que, entre mayor sea el caudal del río Arroyo Moreno, menor será la concentración y viceversa (Perez-Trallero, 2018).

Los puntos en donde se registró la mayor concentración fueron los puntos 7 y 8, los cuáles corresponden a la principal descarga de aguas residuales que se detecto en la zona del canal de la Zamorana, lo cuál corresponde a que la principal entrada de oxitetraciclina a los ríos es mediante las descarga de aguas residuales (Barceló, 2010), puesto que los sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales no eliminan a este tipo de contaminantes emergentes (Reynoso, 2017).

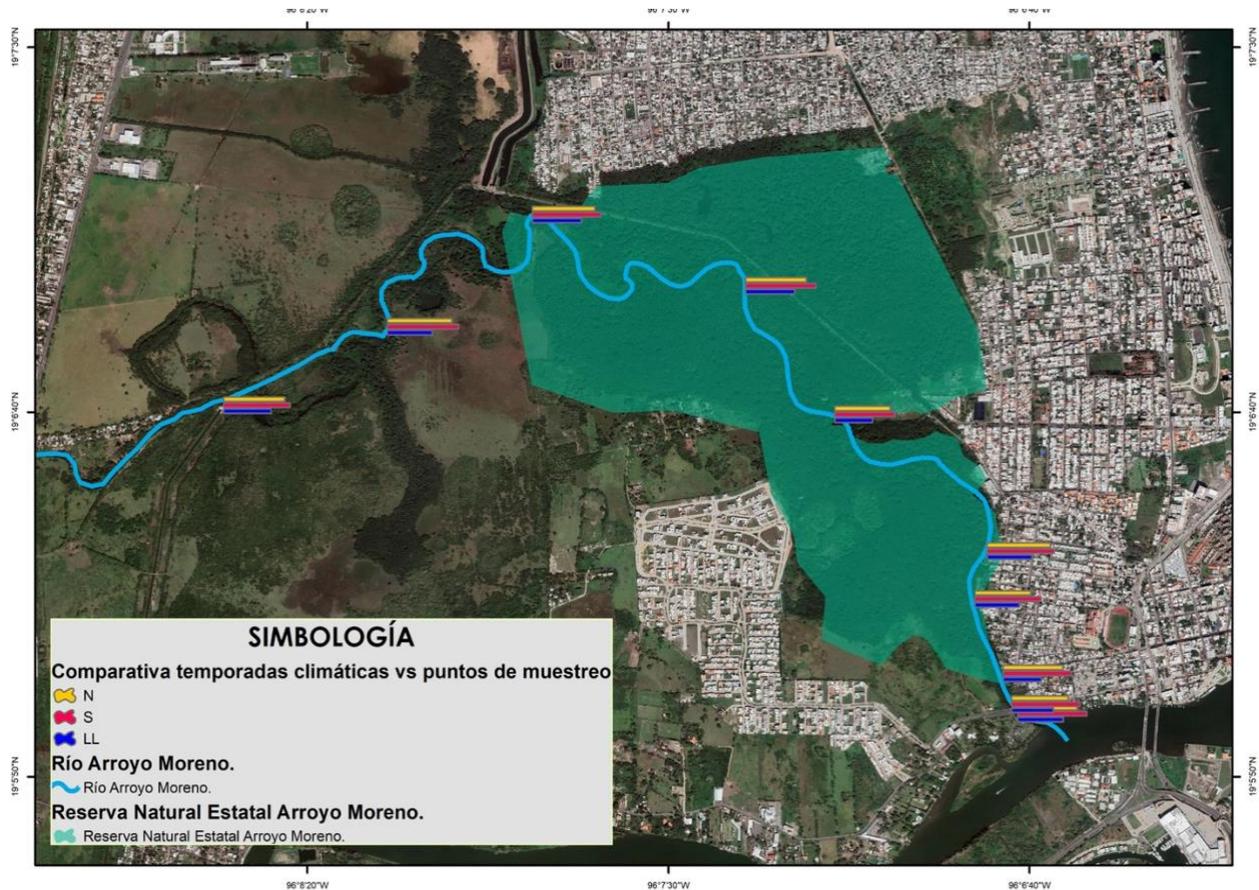


Figura 29. Comportamiento de la concentración de oxitetraciclina por punto de muestreo.

10. CONCLUSIONES

Las principales fuentes de contaminación identificadas fueron fuentes de tipo puntual, en específico descargas de aguas residuales de los principales complejos residenciales aledaños a la zona de estudio, lo que refleja la falta de regularización de dichas descargas por parte de las autoridades correspondientes. Además se confirma que los tratamientos de aguas residuales convencionales son eficientes para la remoción de oxitetraciclina, clasificado como contaminante de tipo “emergente”.

Si bien las concentraciones de oxitetraciclina encontradas en el la Reserva Natural Arroyo Moreno, en comparación con otros trabajos reportados en zonas similares al área de estudio, son bajas, no podemos descartar la posibilidad de que estas concentraciones estén afectando a los organismos acuáticos endémicos de la Reserva Ecológica Arroyo Moreno, debido a que los antibióticos tienen la característica de ser bioacumulables y persistentes en el medioambiente.

Con base a los riesgos ecotoxicológicos que representan este tipo de contaminantes (antibióticos), es indispensable promover una futura regularización de su uso y desecho a través de las Normas Oficiales Mexicanas. A nivel nacional existe un gran vacío del conocimiento respecto a los efectos que tienen los antibióticos sobre los organismos acuáticos, por lo que es importante seguir trabajando sobre esta línea de investigación.

11. LITERATURA CITADA

Aguilar Sierra (coordinadores). 1998. RMP Laguna Verde-Antón Lizardo. En: Arriaga Cabrera, L.; E. Vázquez

Álvarez Calvopiña MD, Molina Maya MJ, Recalde Parra GA. Contaminantes emergentes en aguas y remediación de suelos con nanopartículas. Alianzas y Tendencias BUAP [Internet]. 2021;6(24):50–74. <https://www.aytbuap.mx/aytbuap-624/contaminantes-emergentes-en-aguas-y-remediación-de-suelos-con-nanopartícula>

Arriaga Cabrera, L.; E. Vázquez Domínguez; J. González Cano; R. Jiménez Rosenberg; E. Muñoz López; V.

Barceló, D., & López, M. J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. *Jornadas de presentación de resultados: el estado ecológico de las masas de agua. Panel científico-técnico de seguimiento de la política de aguas, Sevilla*, 1-27.

Calvopiña, M. D. Á. (2021). Contaminantes emergentes en aguas y remediación de suelos con nanopartículas Contaminantes emergentes en aguas y remediación de suelos con nanopartículas.

CONABIO. Sistema Nacional de Información Sobre Biodiversidad (SNIB-CONABIO). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. Consultado en SNIB-CONABIO en marzo de 2008.

Correia, A., & Marcano, L. (2015). Presencia y eliminación de compuestos farmacéuticos en plantas de tratamientos de aguas residuales: Revisión a nivel mundial y perspectiva nacional. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 55(1), 1-18.

Domínguez; J. González Cano; R. Jiménez Rosenberg; E. Muñoz López; V. Aguilar Sierra (coordinadores) 1998. Regiones marinas prioritarias de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México.

- Dresler, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K., & Echániz, G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *salud pública de méxico*, 50, S480-S487.
- Dupuy, A. (2016). Farmacocinética de oxitetraciclina en dosificación oral múltiple en cerdos. Análisis PK-PD. Obtenido de <https://eprints.ucm.es/38802/1/T37643.pdf>
- García-Contreras, G. y F. Rodríguez-Reynaga. 2008. Ficha informativa humedales costeros GM y MC. Proyecto Humedales Costeros del Golfo de México y Mar Caribe. PRONATURA Península de Yucatán.
- García-Villar, A. M., Montoya-Mendoza, J., y Chávez-López, R. APROXIMACIÓN HISTÓRICA DE LA COMPOSICIÓN DE ESPECIES DE PECES EN ARROYO MORENO, VERACRUZ, MÉXICO HISTORICAL APPROACH OF THE FISH SPECIES COMPOSITION IN ARROYO MORENO, VERACRUZ, MEXICO.
- Garibay Pardo, L. (2006). Desarrollo comunitario: base para las propuestas de conservación y manejo del Manglar Arroyo Moreno.
- Gil, Miriam Janet, Soto, Adriana María, Usma, Jorge Iván, y Gutiérrez, Omar Darío. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*, 7(2), 52-73. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552012000200005&lng=en&tlng=es.
- Gobierno de los Estados Unidos Mexicanos, Comisión Intersecretarial para el Desarrollo Rural Sustentable. 2007. Programa Especial concurrente para el Desarrollo Rural Sustentable 2007-2012. Gobierno de los Estados Unidos Mexicanos, Presidencia de la República, México. 125 pp.
- Gobierno estatal de Veracruz de Ignacio de Llave. 1999. Decreto por el que se declara área natural protegida, como zona sujeta a conservación ecológica, el lugar conocido como Arroyo Moreno del Municipio de Boa del Río, Veracruz. Gobierno estatal de Veracruz de Ignacio de Llave, Secretaría de Desarrollo Regional. Gaceta oficial del estado no. 146. 8 pp.

- INECOL A. C. 2006. Áreas de manglar con importancia biológica y de rehabilitación prioritaria (2006). Escala 1:5000.
- Kümmerer K. (2011). Emerging contaminants. *Treatise on Water Science* 3, 69-87. DOI: 10.1016/B978-0-444-53199-5.00052-X
- López-Portillo, J. A., L. R. Gómez-Aguilar y V. Vázquez. Criterios para la selección del sitio de manglar Arroyo Moreno, en Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2009. Sitios de manglar con relevancia biológica y con necesidades de rehabilitación ecológica. CONABIO, México, D.F.
- Lorenzo F. Farmacología: Básica y Clínica. 6ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana. 2008.
- microbiome of water systems—strategies for their mitigation. *npj Clean Water* [Internet]. 2020;3(1).
- MORALES, M. A. G., & PÉREZ, B. K. G. CONTAMINANTES EMERGENTES Y SU RELACIÓN CON EL AMBIENTE. *Publicación digital de la Red del Agua UNAM Número 17, Octubre-Diciembre 2021*, 28.
- Oropesa, AL., & Moreno, JJ., & Gómez, LJ. (2017). Lesiones histopatológicas en peces originadas por la exposición a contaminantes emergentes: recopilando y analizando datos. *Revista de Toxicología*, 34(2),99-108. [fecha de Consulta 2 de noviembre de 2021]. ISSN: 0212-7113.
- Patiño, N. M., & Sepúlveda, A. E. C. (2008). Tetraciclinas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 51(1), 29-32.
- Perdomo Hernández, Alejandro. (2014). "Estudio de uso de antibiótico en medicina interna del Hospital General de Chimalhuacán, Estado de México". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/284157>
- Ramírez-Cando, L. J., Chicaiza Ramírez, S. E., Ramos López, A. D., & Álvarez, C. I. (2019). Detección de antibióticos betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas como contaminantes

emergentes en los ríos San Pedro y Pita del cantón Rumiñahui. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 30(2), 88-102.

Rodriguez, C. y Obrador, G. (2013). *Fichero farmacológico*. McGraw Hill Mexico. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1510§ionid=98007455>

Samboni Ruiz, N, Carvajal Escobar, Y y Escobar, J. (2007.). *Revisión de parámetros fisicoquímicos como indicadores de calidad y contaminación del agua*. Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ingeniería.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2005. Acuerdo por el que se establece las Reglas de Operación para el Programa de Desarrollo Regional Sustentable. Decretado el 1 de junio de 2005.

Seija, V., y Vignoli, R. (2006). *Temas de bacteriología y virología médica*. Sección IV. Principales poblaciones microbianas Principales grupos de antibióticos.(2 ed.): Oficina del Libro FEFMUR.

Urbano G. (2011). *Principios básicos de farmacología: Farmacocinética*. 1ª edición. Editorial Lito-Formas, San Cristóbal, Venezuela.

Verlicchi P. y Zambello E. (2015). Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil — A critical review. *Sci. Total Environ.* 538, 750-767. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.08.10

Verlicchi P., Al Aukidya M. y Zambello E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Sci. Total Environ.* 429, 123-155. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.028

Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 28(2), 122-130.