



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN
Facultad de Ingeniería
Unidad de Posgrado e Investigación

**REMOCIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES
PRESENTES EN AGUAS RESIDUALES
PORCÍCOLAS DEL ESTADO DE YUCATÁN
MEDIANTE HUMEDALES CONSTRUIDOS**

TESIS

PRESENTADA POR:
M.I. KARINA GABRIELA LEÓN AGUIRRE

EN OPCIÓN AL GRADO DE:
DOCTORA EN INGENIERÍA, OPCIÓN AMBIENTAL

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO
2020

“Aunque este trabajo hubiere servido para el Examen de Grado y hubiera sido aprobado por el sínodo, sólo el autor es responsable de las doctrinas emitidas por él”

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado, para llevar a buen término el Doctorado en Ingeniería Opción Ambiental.

A la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Yucatán por la formación profesional; junto con la Facultad de Ingeniería Química, UADY y el CINVESTAV, Unidad Mérida, por la facilidad en la infraestructura para el desarrollo del proyecto.

Los resultados de esta tesis han sido presentados como parte de los siguientes productos académicos:

Karina León-Aguirre, Emanuel Hernández-Núñez, Avel González-Sánchez Roger, Méndez-Novelo, *et al.* (2019). A Rapid and Green Method for the Determination of Veterinary Pharmaceuticals in Swine Wastewater by Fluorescence Spectrophotometry, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 103(4), 610-616.

2018. “Remoción de antibióticos en agua residual porcícola mediante humedales construidos” XVII Congreso Internacional y XXIII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, Zacatecas, Zacatecas.

2017. “Detección de Oxitetraciclina en agua residual porcícola de granjas pequeñas y medianas en Yucatán” 3er Congreso Nacional AMICA en Villahermosa, Tabasco.

2017. “Desarrollo de voltamperometría cíclica con un electrodo de diamante dopado de boro para la detección de penicilina G sódica en aguas residuales porcícolas” 52° Congreso Mexicano de Química en Puerto Vallarta, Jalisco.

2017. “Detección rápida de fármacos en aguas residuales porcícolas por espectrofotometría de fluorescencia” XIV encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia en León, Guanajuato.

RESUMEN

Los fármacos utilizados en la ganadería porcina han llamado la atención en años recientes como contaminantes emergentes, por sus efectos al ambiente y a la salud humana, de este grupo, los antibióticos han sido señalados como responsables de causar el desarrollo de bacterias resistentes en el ambiente. El estado de Yucatán es uno de los seis estados del país, con una alta producción de ganado porcino, actividad que genera grandes cantidades de agua residual conteniendo estos fármacos; debido a la ineficiencia de los sistemas de tratamiento instalados en las granjas porcícolas. En México, estos contaminantes no han sido considerados para los programas de monitoreo ni en la normatividad ambiental, por lo que se debe trabajar a la par en la detección y tratamiento. Los humedales construidos son una opción de tratamiento para estas granjas, dada su facilidad de operación y altas tasas de remoción para los contaminantes que generan las actividades productivas. En este estudio, se probó un sistema experimental de humedales construidos horizontales de flujo subsuperficial para la remoción de una mezcla de 4 antibióticos (oxitetraciclina, enrofloxacina, sulfametoxazol y penicilina G) y un β -agonista (ractopamina), analizando el efecto del soporte (grava, arena y la mezcla de ambas); dos tipos de planta (*Typha latifolia* y *Cyperus papyrus*) y un control sin plantas; y cuatro diferentes tiempos de permanencia en el sistema (de 24 a 96 horas). La eficiencia de este sistema se comprobó mediante métodos de detección también desarrollados y validados como objetivo de esta tesis (espectrofotometría de fluorescencia, cromatografía líquida de alta eficiencia y voltamperometría cíclica), midiendo la diferencia entre la concentración inicial y final de cada fármaco en el efluente de los humedales. Se obtuvieron eficiencias de remoción máximas del 89% para enrofloxacina, 98% para oxitetraciclina, 85% para sulfametoxazol, 96% para ractopamina y 95% para penicilina G, después de 96 horas. Estos porcentajes de remoción se registraron mayormente en las unidades que contaban con plantas, sobre todo *Typha latifolia*, y mezcla o arena como soporte.

Palabras clave

agua residual porcícola, humedales construidos, contaminantes emergentes, fármacos de uso veterinario

ABSTRACT

The veterinary pharmaceuticals used in pig farming have attracted attention in recent years as emerging pollutants due to their effects on the environment and human health. From this group, antibiotics are responsible for causing the development of resistant bacteria in the environment. The state of Yucatan is one of the six states of the country, with a high swine production, an activity that generates large amounts of wastewater; containing these compounds due to the inefficiency of the treatment systems installed in the pig farms. In Mexico, these pollutants have not been considered for monitoring programs or environmental regulations; thus, detection along with treatment must be done. Constructed wetlands are a treatment option for these farms, given their ease of operation and high removal rates for contaminants generated by productive activities. In this study, an experimental system of horizontal subsurface flow constructed wetlands was tested, for the removal of a mixture of 4 antibiotics (oxytetracycline, enrofloxacin, sulfamethoxazole, and penicillin G) and a β -agonist (ractopamine); analysing the effect of the support (gravel, sand and the mixture of both); two types of plant (*Typha latifolia*, *Cyperus papyrus* and a control without plants); and four different retention times in the system (from 24 to 96 hours). The efficiency of this system was proved with the detection methods previously developed as one of the aims in this thesis (fluorescence spectrophotometry, high-performance liquid chromatography, and cyclic voltamperometry); measuring the difference between the initial and final concentration of each pharmaceutical in the effluent of the wetlands. Maximum removal efficiencies of 89% were obtained for enrofloxacin, 98% for oxytetracycline, 85% for sulfamethoxazole, 96% for ractopamine; and 95% for penicillin G, after 96 hours. These removal percentages were registered mostly in the units that had plants, especially *Typha latifolia*, and mixed or sand as support.

Keywords

swine wastewater, constructed wetlands, emerging pollutants, veterinary pharmaceuticals

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	12
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	16
Objetivo específico.....	16
II. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1 La ganadería porcícola en Yucatán.....	17
2.1.1 Ganadería porcícola y su problemática ambiental.....	18
2.2 Contaminantes emergentes.....	19
2.2.1 Ingreso de los fármacos veterinarios al ambiente.....	20
2.2.2 Fármacos de uso veterinario como contaminantes emergentes.....	20
2.3 Detección de contaminantes emergentes.....	24
2.3.1 Detección de contaminantes emergentes por CG-EM.....	25
2.3.2 Detección de emergentes por CLAE.....	26
2.3.3 Detección de emergentes por espectrofotometría de fluorescencia.....	27
2.3.4 Detección de emergentes por voltamperometría cíclica (electroquímica).....	28
2.4 Procesos utilizados en el tratamiento de contaminantes emergentes.....	30
2.4.1 Humedales para el tratamiento de aguas residuales porcícolas.....	30
2.4.2 Humedales para el tratamiento de fármacos en el agua residual porcícola.....	31
III. METODOLOGÍA.....	34
3.1 Información sobre fármacos administrados al ganado porcino en Yucatán.....	34
3.2 Detección de contaminantes emergentes en agua residual porcícola.....	35
3.2.1 Preparación de las muestras.....	36
3.2.2 Análisis por espectrofotometría de fluorescencia.....	37
3.2.3 Análisis por voltamperometría cíclica (electroquímica).....	38
3.2.4 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).....	39
3.2.5 Validación de los métodos.....	41
3.3 Humedales construidos para la remoción de fármacos en agua residual porcícola.....	43
3.3.1 Diseño y operación de los humedales construidos.....	43

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
4.1 Información sobre fármacos administrados al ganado porcino en Yucatán.....	47
4.2 Análisis por espectrofotometría de fluorescencia.....	49
4.3 Análisis por voltamperometría cíclica (electroquímica).....	55
4.4 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia.....	59
4.5 Análisis de la remoción de fármacos mediante humedales construidos.....	65
4.5.1 Análisis estadístico de los humedales construidos.....	73
CONCLUSIONES.....	81
REFERENCIAS.....	82
ANEXOS.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número de granjas porcícolas en Mérida y municipios cercanos.....	18
Tabla 2: Fármacos comúnmente administrados granjas porcícolas.....	23
Tabla 3: Contaminantes emergentes que han sido detectados por CG-EM.....	26
Tabla 4: Contaminantes emergentes que han sido detectados por CLAE.....	27
Tabla 5: Contaminantes emergentes que han sido detectados por fluorescencia.....	28
Tabla 6: Contaminantes emergentes que han sido detectados por voltamperometría.....	29
Tabla 7: Uso de humedales construidos como tratamiento para fármacos.....	32
Tabla 8: Granjas porcícolas seleccionadas para los muestreos.....	34
Tabla 9: Longitudes de onda de excitación y emisión para los fármacos seleccionados.....	38
Tabla 10: Condiciones de análisis de los fármacos en cromatografía líquida.....	40
Tabla 11: Tipos de granjas y vías de administración de los fármacos.....	47
Tabla 12: Fármacos consumidos en las granjas porcícolas.....	48
Tabla 13: Concentraciones de los fármacos en las muestras agua residual en $\mu\text{g/mL}$	50
Tabla 14: Coeficiente de determinación, límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC) para cada fármaco analizado en $\mu\text{g/mL}$	53
Tabla 15: Coeficiente de variación, porcentaje de recuperación y estabilidad de la solución para cada fármaco analizado.....	54
Tabla 16: Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene's para cada uno de los fármacos.....	54
Tabla 17: Concentraciones de penicilina G sódica detectadas en el agua residual.....	57
Tabla 18: Tiempos de retención de las soluciones estándar y las muestras analizadas.....	59
Tabla 19: Concentraciones de los fármacos detectadas mediante CLAE en el agua residual.....	60
Tabla 20: Coeficiente de determinación, límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC) para cada fármaco analizado en $\mu\text{g/mL}$	63
Tabla 21: Coeficiente de variación y porcentaje de recuperación para cada fármaco.....	64
Tabla 22: Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene's para cada uno de los fármacos.....	65
Tabla 23: Caracterización de la roca caliza como material de soporte de los humedales construidos.....	63
Tabla 24: Monitoreo del crecimiento de las plantas de los humedales durante el periodo de adaptación con agua residual porcícola.....	66

Tabla 25: Valores promedio de porcentaje de remoción y desviación estándar, medidos mediante EF, según tiempo de permanencia para cada de las unidades.....	68
Tabla 26: Valores promedio de porcentaje de remoción y desviación estándar, medidos mediante CLAE, según tiempo de permanencia para cada de las unidades.....	68
Tabla 27: Remoción reportada para los fármacos señalados utilizando diversos tipos de plantas y soportes sólidos.....	69
Tabla 28: Análisis de varianza multifactorial para los datos de remoción de cada uno de los fármacos en los humedales construidos.....	74
Tabla 29: Pruebas de rango múltiple por el método LSD de Fisher.....	74
Tabla 30: Resumen análisis discriminante para tipo de planta.....	78
Tabla 31: Resumen análisis discriminante para tipo de soporte.....	71
Tabla 32: Valores de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para cada fármaco.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principales estados productores de carne de cerdo en México, 2014-2016.....	17
Figura 2: Mecanismos generales de remoción de contaminantes en los humedales.....	32
Figura 3: Localización de las granjas seleccionadas para el estudio.....	35
Figura 4: Metodología para extracción en fase sólidas de las muestras.....	37
Figura 5: Equipo Thermo Lumina para espectrofotometría de fluorescencia.....	37
Figura 6: Sistema a) celda y electrodos del sistema: b) electrodo diamante dopado de boro (DDB), c) electrodo de referencia Ag/AgCl y d) electrodo auxiliar de grafito.....	39
Figura 7: Equipo Agilent 1100 para cromatografía líquida de alta eficiencia.....	41
Figura 8: Material de soporte de roca caliza utilizado en los humedales construidos.....	44
Figura 9: Plantas utilizadas en el experimento con humedales construidos.....	44
Figura 10: Sistema de humedales construidos a escala para la remoción de fármacos en agua residual porcícola.....	45
Figura 11: Fármacos administrados en las granjas porcícolas seleccionadas de acuerdo con la encuesta a los porccultores.....	49
Figura 12: Gráfico de voltamperometría cíclica para penicilina G.....	56
Figura 13: Curva de calibración de Penicilina G, según área bajo la curva de $x=0.8$ a 1.1	57
Figura 14: Gráfico de voltamperometría cíclica para penicilina G y una mezcla de penicilina G con amoxicilina y neomicina.....	58
Figura 15: Raíces de <i>Typha latifolia</i> y <i>Cyperus papyrus</i>	66

Figura 16: Porcentaje de remoción para cada fármaco con respecto al tiempo permanencia de acuerdo con el tipo de planta.....	71
Figura 17: Porcentaje de remoción para cada fármaco con respecto al tiempo permanencia de acuerdo con el tipo de soporte.....	72
Figura 18: Gráficas de medias y 95% de Fisher LSD para remoción de cada fármaco de acuerdo con el tipo de planta.....	75
Figura 19: Gráficas de medias y 95% de Fisher LSD para remoción de cada fármaco de acuerdo con el tipo de soporte.....	76
Figura 20: Gráfica de funciones discriminantes canónicas para tipo de planta.....	79
Figura 21: Gráfica de funciones discriminantes canónicas para tipo de soporte.....	79
Figura 22: Gráficos de residuos para remoción de cada fármaco.....	94

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental ha sido una consecuencia inevitable del crecimiento poblacional y del desarrollo de los asentamientos humanos. Desde que el hombre comenzó su vida sedentaria y ante la demanda creciente, se preocupó por satisfacer sus necesidades de vivienda y alimentación. Tal fue el caso de la ganadería que surgió por la necesidad de satisfacer la demanda de alimentos de origen animal, convirtiendo al sector pecuario en uno de los de mayor crecimiento en el mundo y así, el modo tradicional de crianza se convirtió, con el paso del tiempo, en una industria de producción intensiva. Dentro de este sector, la crianza de ganado porcino es la que ocupa el tercer lugar de producción, y es México, a nivel mundial, uno de los mayores productores de carne de cerdo. Sin embargo, esta producción está concentrada en unos pocos estados del país, de tal forma que más del 70% de la producción nacional es generada en Jalisco, Sonora, Guanajuato, Puebla, Michoacán y Yucatán (SAGARPA, 2017); este último, tuvo un rápido desarrollo de la industria porcícola durante las últimas décadas debido al cambio en el esquema de producción del sector y por consecuencia se incrementaron el número de granjas y el volumen de aguas residuales generadas por esta actividad.

La concentración de animales en una misma zona (ganadería intensiva) favorece la acumulación de una gran cantidad de excretas en el agua residual, lo que representa una grave amenaza ambiental por el riesgo de contaminación al acuífero. Debido a que el agua subterránea es la única fuente de agua subterránea en Yucatán, y por la naturaleza cárstica y alta permeabilidad del suelo de la región, los contaminantes producidos podrían migrar de la superficie al acuífero subterráneo y por la dirección de flujo que preferencialmente es hacia el norte, llegar a la costa (Arcega-Cabrera *et al.*, 2014). De esta manera la actividad porcícola figura entre los sectores del estado de Yucatán que más podrían contribuir a la contaminación del agua, debido a la generación de agentes contaminantes contenidos en las excretas animales, como los antibióticos, antiparasitarios y otros fármacos, los productos químicos utilizados como desinfectantes, etc.

Muchas de las prácticas ganaderas en Yucatán se han llevado a cabo sin cumplir con las regulaciones ambientales necesarias para garantizar el mínimo impacto al ambiente y todos los días miles de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la ganadería han sido vertidas al ambiente sin considerar consecuencias (Barceló y López, 2008). Junto con el agua utilizada y las excretas que generan los animales, se desechan compuestos que modifican las propiedades, alteran el ciclo del agua y provocan efectos en las especies que habitan en los ecosistemas acuáticos. Pero no fue hasta décadas recientes que aumentó la preocupación por los efectos adversos de los contaminantes sobre el ambiente y la salud humana, cuando su ingreso en los ecosistemas rebasó la capacidad de éstos para depurar o degradar estos compuestos. Tal es el caso de los fármacos veterinarios, utilizados para el tratamiento y la prevención de enfermedades en animales, los cuales llegan al ambiente no sólo por las excretas, sino también a través de los procesos de tratamiento ineficientes, la eliminación inadecuada de los contenedores, los medicamentos no utilizados, la alimentación del ganado, y los procesos de fabricación (Bártíková *et al.*, 2016), representando una fuente importante de contaminación ambiental.

Algunos de estos contaminantes emergentes han sido regulados para el monitoreo de la calidad del agua, de acuerdo con los estándares de la EPA (Agencia de Protección Ambiental en EUA), las guías de la Organización Mundial de la Salud y las directivas de la Unión Europea. Sin embargo, la mayoría de estos contaminantes no han sido considerados para los programas de monitoreo rutinarios en todo el mundo (Wu *et al.*, 2010). Dependiendo de los resultados de ecotoxicidad los datos de ocurrencia y destino en el ambiente, pueden ser candidatos para estas futuras regulaciones. En el caso de México, no se cuenta con estas regulaciones, por lo que se debe trabajar a la par en la detección y tratamiento. El desarrollo de la tecnología y la necesidad de estudiar la presencia de los fármacos contaminantes en cuerpos de agua, han propiciado el uso de métodos analíticos, siendo actualmente la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM), la técnica dominante para la detección de fármacos polares y no volátiles desde finales de los años 80 (Hao *et al.*, 2007). No obstante, en la mayoría de los laboratorios en México no está disponible este tipo de tecnologías, sumándose a ello, las bajas concentraciones en las que pueden ser

detectados, la complejidad de las matrices ambientales y la falta de métodos estándar para compuestos específicos.

El agua residual porcícola se caracteriza por su alta concentración en materia orgánica, y aunque muchas de las granjas en el estado cuentan con sistemas de tratamientos de tipo biológico, como lagunas de oxidación y biodigestores anaerobios, no se considera la variación de concentración de contaminantes de los efluentes de diferentes procesos productivos de la granja (Garzón-Zúñiga y Buelna, 2013), ni están específicamente diseñados para la eliminación de fármacos, por lo que la descarga de este tipo de sustancias podría volverse un serio problema, sobre todo en Yucatán, por la vulnerabilidad del acuífero. Las opciones de tratamiento típicamente consideradas para la remoción de contaminantes emergentes del agua potable y del agua residual incluyen la adsorción, procesos de oxidación avanzada, nanofiltración y reactores biológicos de membrana. Sin embargo, estas opciones son poco viables para utilizar como tratamiento en las granjas porcícolas de la región, debido al alto costo de operación y mantenimiento. En consecuencia, las aguas residuales porcícolas se descargan con o sin un tratamiento anaeróbico simple, por lo tanto, es de gran necesidad encontrar un método eficiente, pero de bajo costo.

Los humedales construidos (HC) han sido empleados debido al bajo consumo de energía, la fácil operación y el simple mantenimiento que requieren. Como una tecnología de vanguardia que ha experimentado décadas de evolución, los humedales construidos se han utilizado para el tratamiento de aguas residuales de diversos orígenes, incluyendo aguas residuales de actividades ganaderas (Luo *et al.*, 2017), y en combinación con procesos de digestión anaeróbica (Han *et al.*, 2019), pueden ser excelente alternativa de tratamiento. Éstos funcionan utilizando procesos naturales que incluyen vegetación, un soporte sólido y los consorcios de microorganismos asociados, para asistir en el tratamiento de agua residual (Carvalho, 2013). Su potencial para la remoción de fármacos veterinarios ha llamado la atención; por ejemplo, en China se demostró la remoción hasta del 98% de antibióticos usados en la ganadería porcina como la oxitetraciclina y enrofloxacina (Huang *et al.*, 2015), y aunque en general no son usados

como único tratamiento, son la alternativa viable a las necesidades de tratamiento en las granjas porcícolas de Yucatán.

Por las razones expuestas, se plantea en este trabajo de investigación evaluar el potencial de los humedales construidos como opción de tratamiento para los fármacos de uso veterinario detectados en el agua residual proveniente de algunas de las granjas porcícolas pequeñas y medianas que operan con sistema semitecnificado en Yucatán, estableciendo los porcentajes de remoción para cada configuración de humedal e identificando las variables con mayor influencia en la remoción, como el tipo de soporte, tipo de planta y tiempo de retención; no sin antes, establecer los métodos analíticos para la detección de estos fármacos contaminantes en el agua residual. Y de acuerdo con los resultados presentados, concluir si este sistema de tratamiento es adecuado y viable para su instalación y operación en las granjas por parte de los porcicultores de la región.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la remoción de contaminantes emergentes presentes en el agua residual de granjas porcícolas en el Estado de Yucatán, utilizando humedales construidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el tipo de compuestos, la frecuencia y etapas de mayor administración de fármacos a los cerdos en las granjas, a través de la información obtenida a través de encuestas.
- Establecer los métodos analíticos para la detección de los contaminantes emergentes de mayor prioridad o consumo en el agua residual porcícola de las granjas seleccionadas para el estudio.
- Desarrollar y validar los métodos analíticos para la detección de los contaminantes emergentes en las muestras de agua residual porcícola.
- Evaluar el efecto en los humedales construidos, de cada una de las variables y de la relación entre variables, según tipo de planta, soporte y tiempo de permanencia, en la remoción de los contaminantes emergentes en el agua residual porcícola.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 La ganadería porcícola en Yucatán

En los años setenta, el gobierno del Estado de Yucatán, a raíz de la crisis henequenera, buscó apoyar a los campesinos a través de la diversificación de actividades productivas, por lo que crianza de cerdos se inició como negocio familiar, seguido de un esquema de producción de ejidatarios. A principios de la década de los noventa el esquema de producción cambió notablemente, volviéndose un gran sistema de granjas más grandes con mayor población de animales, convirtiendo a la porcicultura en una de las actividades más importantes para la economía regional (Méndez *et al.*, 2009), teniendo como compradores más importantes: la industria procesadora de embutidos, los supermercados y las carnicerías y mercados regionales (Díaz y Rodríguez, 2010), lo cual ha convertido al estado en uno de los principales productores de carne de cerdo (Figura 1) (FIRA, 2017; SAGARPA, 2015), con una producción en 2017 de 138,917 toneladas, exportando a países como Japón, Corea del Sur, Estados Unidos y Canadá. De acuerdo con la Encuesta Nacional Agropecuaria 2017, hay más de un millón de cerdos, de los cuales más de la mitad eran de engorda, con un peso promedio de 95.48 kg (INEGI, 2017).

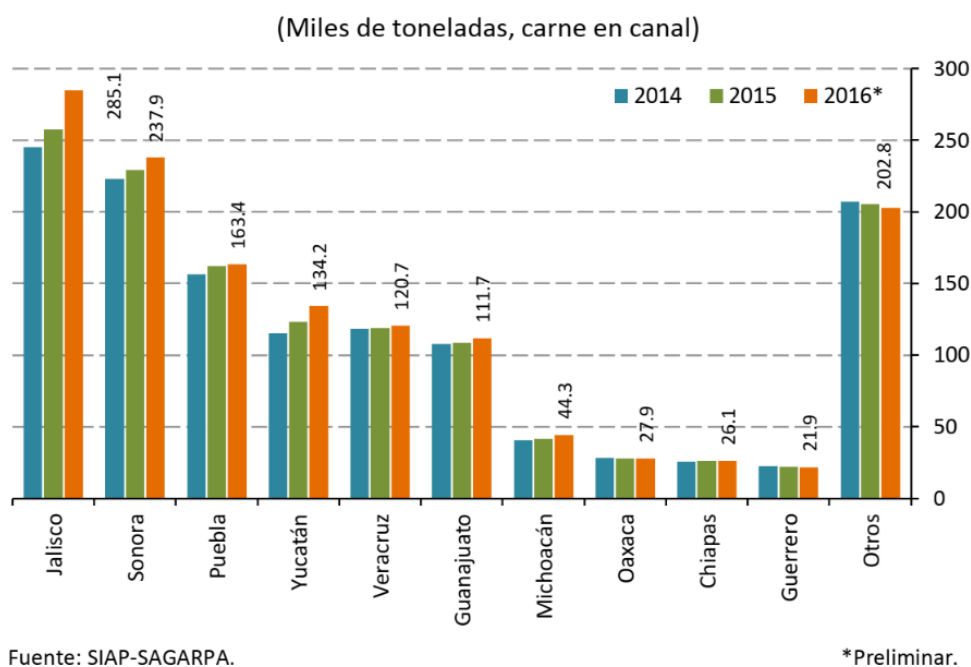


Figura 1: Principales estados productores de carne de cerdo en México, 2014-2016

La producción porcina en el estado se realiza en granjas de diversos tamaños clasificadas como pequeñas, medianas, grandes y mega, las cuales operan de acuerdo con las tecnologías que manejan y se catalogan como sistema tecnificado, semitecnificado privado, semitecnificado ejidal y de producción familiar (Méndez *et al.*, 2009). Se tienen registradas alrededor de 470 granjas en todo el estado de Yucatán (SEDUMA, 2015) y tan solo en el municipio de Mérida existen 26 granjas porcícolas y en conjunto con las de los municipios cercanos, suman más de 100, de acuerdo con la Tabla 1, siendo éste el último registro que se tiene reportado.

Tabla 1: Número de granjas porcícolas en Mérida y municipios cercanos

Municipio	Total	Con ≥ 1000 animales
Mérida	26	-
Progreso	5	3
Ucú	2	-
Kanasín	6	4
Conkal	36	7
Tixpéhual	5	1
Umán	15	-

Fuente: SEDUMA (Ahora SDS)

En cuanto a la operación de las granjas porcícolas, es sabido que es de las actividades pecuarias que más preocupación genera en materia ambiental, sobre todo la generación de aguas residuales, en donde se conjuntan el agua para el lavado de los cerdos, el agua para la limpieza de las excretas y el agua para beber desperdiciada, junto con sobras de alimento; lo que provoca que sea un agua residual con una alta carga de materia orgánica con presencia de sólidos suspendidos, coliformes fecales, nitrógeno y fósforo. Tan solo Estado de Yucatán se producían aproximadamente 16,700 m³ (Drucker *et al.*, 2003) diarios de aguas residuales de granjas porcícolas.

2.1.1 Ganadería porcícola y su problemática ambiental

Pese a la importancia de la ganadería porcícola los residuos que genera representan un serio problema de contaminación. El agua residual de las granjas porcícolas no recibe el tratamiento adecuado debido a la diversidad de condiciones presentes en cada granja, como el tamaño, población de animales en cada una de las etapas, lo que genera una variación en la concentración de los contaminantes (Garzón y Buelna, 2014), por lo que

la mayoría de los sistemas de tratamiento de efluentes, presentan bajas eficiencias de remoción en cuanto a materia orgánica, nitrógeno, fósforo; la generación de gases como amoníaco y metano; y la presencia de metales pesados, plaguicidas (Méndez *et al.*, 2009) y se presume también la presencia de contaminantes emergentes. El inadecuado tratamiento o disposición final de estos efluentes puede llegar a ocasionar la contaminación de aguas subterráneas, donde el problema de disposición de aguas residuales porcícolas y su tratamiento abarca muchas posibles soluciones dependiendo de las circunstancias: como el tamaño de la granja, su ubicación, la disposición de terreno, las costumbres de trabajo, el tipo de granja (Magaña y Drucker, 2001).

2.2 Contaminantes emergentes

Los trabajos en ciencia y tecnología ambiental se habían centrado en la investigación y desarrollo para la detección y tratamiento de los contaminantes que se encuentran regulados en las legislaciones de los países, pero desde décadas recientes se ha empezado a prestar atención a contaminantes, que han sido encontrados aun en concentraciones muy pequeñas y que representan un alto potencial de impacto ambiental y daño a las especies, y aunque su presencia no es reciente, sí lo es la preocupación por sus efectos, lo que llevó a nombrarlos como “contaminantes emergentes” (Barceló y López, 2008). El sentido de emergentes se le puede atribuir a Rachel Carson, quien en su libro “Primavera Silenciosa” de 1962, mostró evidencia convincente de que el amplio uso de DDT para eliminar mosquitos y otras plagas caseras había ocasionado la muerte y decadencia en la población de pájaros y aunque fue criticada por dar tal advertencia, después el mismo DDT, también usado como plaguicida fue prohibido y hoy sus efectos tóxicos son conocidos (Sauvé y Desrosiers, 2014). Con este término se denominan a todos aquellos compuestos de distinto origen y naturaleza química (Gil *et al.*, 2012) que permanecen sin regulación ambiental o están en proceso de tenerla y no se tienen la información suficiente para concluir sus efectos en los seres vivos y en el ambiente ni sus límites máximos permisibles. La EPA los define como nuevos compuestos químicos sin estatus de regulación y cuyo impacto en el ambiente y la salud humana es escasamente entendido (Deblonde *et al.*, 2011).

Dentro de los contaminantes emergentes se encuentran los fármacos de uso veterinario, que son utilizados en la ganadería en grandes cantidades para la prevención y tratamiento de enfermedades y como promotores de crecimiento (Sim *et al.*, 2011). Los fármacos son excretados en su forma original o como metabolitos (Sándor *et al.*, 2012), pero solo una pequeña parte de estos compuestos han sido estudiados desde el punto de vista ambiental (Cunningham, 2008). Se ha reportado la toxicidad de varios fármacos, que incluyen casos de mortalidad en algas, invertebrados y peces (Escher *et al.*, 2011). Asimismo, antibióticos y mezclas de estos han sido encontrados en microorganismos acuáticos como cianobacterias y algas verdes (González *et al.*, 2013), convirtiéndolos en la principal causa para la propagación de cepas resistentes a los antibióticos en las poblaciones bacterianas (OMS, 2015; Sándor *et al.*, 2012). También se pueden mencionar los efectos negativos en la reproducción de los peces ocasionada por los compuestos estrogénicos y la inhibición de la fotosíntesis en algas causada por β -bloqueadores (Escher *et al.*, 2011).

2.2.1 Ingreso de los fármacos veterinarios al ambiente

Entre los mecanismos de incorporación de los fármacos a los cuerpos de agua están los procesos de excreción de animales y humanos, los vertidos de la industria farmacéutica, los residuos hospitalarios, la disposición inadecuada de recipientes vacíos, fármacos vencidos o no utilizados, y los vertidos de instituciones de investigación y desarrollo de fármacos, entre otros (Jiménez, 2011). Debido a la constante recarga y a su naturaleza química, no pueden ser tratados efectivamente como otros contaminantes (Eibes *et al.*, 2011). Antibióticos usados por animales, llegan al suelo a causa de los animales de pastoreo o el estiércol utilizado como fertilizante, pudiendo llegar a los cuerpos de agua mediante el agua de lluvia, Se ha reportado su presencia en aguas subterráneas o agua para beber (Ahmad *et al.*, 2012).

2.2.2 Fármacos de uso veterinario como contaminantes emergentes

El principal objetivo de la producción porcina es obtener la mayor ganancia en peso de los animales, con el menor consumo de alimento y tiempo de engorda posible. Sin embargo, la producción porcina se ve afectada por diversos tipos de enfermedades,

siendo las más comunes las enfermedades parasitarias, las infecciones respiratorias y gastrointestinales (Ballina, 2010). Es entonces que se recurre a la administración de fármacos, sobre todo antibióticos, utilizados para el control y la prevención de enfermedades y como promotores de crecimiento (Tasho *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2011), por su efecto en el crecimiento de microorganismos sintetizadores de nutrientes en el tracto intestinal de los cerdos (Dibner y Richards, 2005); siendo el alimento o el agua las vías de administración más usadas para suministrarlos (Cancho *et al.*, 2000).

Esta práctica podría convertir a los cuerpos de agua en un reservorio de microorganismos resistentes a múltiples fármacos, esto sucede debido a que los antibióticos, que se liberan principalmente en el medio ambiente a baja concentración, ejercen una alta presión selectiva sobre las comunidades bacterianas y, en consecuencia, aceleran el desarrollo de bacterias resistentes (Dires *et al.*, 2018). Lo cual representa una grave amenaza para el ambiente que comprende, impactos a la salud humana a través de la ingesta de productos alimenticios de origen animal o vegetal y el agua potable con residuos de antibióticos, efectos tóxicos en animales no objetivo e impactos ecológicos en los ecosistemas (Bártíková *et al.*, 2016).

Otro grupo de sustancias que se administran a los cerdos con fines de incrementar la productividad, son los β -agonistas adrenérgicos, son sustancias análogas a la adrenalina y noradrenalina que favorecen el anabolismo de las proteínas y la disminución de las grasas (Ku, 2011), incrementando el peso de los animales y la calidad de la carne magra. Dentro de este grupo destacan el clenbuterol y la ractopamina, de los cuales el primero ha sido prohibido por su daño a la salud humana, mientras que la ractopamina se metaboliza rápidamente en los animales (Sumano *et al.*, 2002). Se ha estudiado que la exposición a la ractopamina en concentraciones detectadas en aguas residuales liberadas de granjas y en cuerpos de agua, puede inducir alteraciones del comportamiento y desequilibrio del estado oxidativo en adultos de pez cebra (Sachett *et al.*, 2018).

Una medida que se debe seguir para eliminar los riesgos a la salud humana con el consumo de carne de cerdo es la implementación de programas de control de parásitos internos. Los fármacos antihelmínticos se utilizan ampliamente para el tratamiento de

parásitos gastrointestinales, más de diez diferentes antihelmínticos están disponibles comercialmente (Sim *et al.*, 2013), siendo la ivermectina uno de los antihelmínticos más utilizados. En el aspecto ambiental, se ha prestado atención a los antihelmínticos debido a su resistencia a la biodegradación y riesgos potenciales en organismos no objetivo, ya que pueden causar efectos subletales críticos en organismos como lombrices de tierra y facilitar la formación de cepas de parásitos resistentes (Horvat *et al.*, 2012). Algunos ejemplos de fármacos que se administran a los cerdos en las granjas porcícolas (Tasho *et al.*, 2016; Bártíková *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2010) y sus efectos en el ambiente o en seres vivos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Fármacos comúnmente administrados granjas porcícolas

Fármacos	Clase de fármaco	Propiedades fisicoquímicas (Kim <i>et al.</i> , 2019)	Efectos ambientales y/o toxicidad
Sulfametoxazol	Sulfonamida	PM: 253.28 g/mol Sol. H ₂ O: 610 mg/L (37 °C) log K _{octanol/agua} : 0.89	Resistencia bacteriana (Patrolecco <i>et al.</i> , 2018) DL ₅₀ alga: 0.81 mg/L, DL ₅₀ cianobacteria: 0.027 mg/L (van der Aa <i>et al.</i> , 2011)
Oxitetraciclina	Tetraciclina	PM: 460.43 g/mol Sol. H ₂ O: 313 mg/L (25 °C) log K _{octanol/agua} : -0.9	Inhibición de crecimiento microbiano en lodos activados, resistencia bacteriana DL ₅₀ <i>Litopenaeus vannamei</i> : >160 mg/L (Schmidt <i>et al.</i> , 2007)
Ivermectina	Lactona macrocíclica	PM: 875.101 g/mol Sol. H ₂ O: 4 mg/L (25 °C) log K _{octanol/agua} : 3.2	Altamente persistente en sedimentos DL ₅₀ <i>Daphnia magna</i> : 25 ng/L (Sanderson <i>et al.</i> , 2007)
Enrofloxacin	Fluoroquinolona	PM: 359.39 g/mol Sol. H ₂ O: 146 mg/L (25 °C) log K _{octanol/agua} : 4.45	Resistencia bacteriana, afecta fertilidad de suelos (Trouchon y Lefebvre, 2016) CE ₅₀ alga: 49 µg/L CE ₅₀ cianobacteria: 7400 µg/L (Robinson <i>et al.</i> , 2009)
Tilosina	Macrólido	PM: 916.11 g/mol Sol. H ₂ O: 5 mg/mL (25 °C) log K _{octanol/agua} : 1.63	Resistencia bacteriana, altamente persistente en sedimentos DL ₅₀ <i>C. closterium</i> : 0.27 mg/L (Hagenbuch <i>et al.</i> , 2012)
Penicilina G	β-lactámico	PM: 334.39 g/mol Sol. H ₂ O: 210 mg/L (25 °C) log K _{octanol/agua} : 1.83	Resistencia bacteriana CE ₅₀ <i>Daphnia magna</i> : 1496.9 mg/L (Havelkova <i>et al.</i> , 2016)
Ractopamina	β-agonista	PM: 301.39 g/mol Sol. H ₂ O: 4100 mg/L (25 °C) log K _{octanol/agua} : 2.4	Alteraciones endocrinas en peces a concentraciones de 5 a 625 µg/L (Sun <i>et al.</i> , 2015)
Estreptomycin	Aminoglucósidos	PM: 581.58 g/mol Sol. H ₂ O: 12.8 g/L (25 °C) log K _{octanol/agua} : -7.53	Retardo en el crecimiento de algas a concentraciones de 0.09 a 0.86 mg/L 11 (Harrass <i>et al.</i> , 1985)
Gentamicina	Aminoglucósido	PM: 477.60 g/mol Sol. H ₂ O: 100 mg/mL (25 °C) log K _{octanol/agua} : -1.88	Resistencia bacteriana (Kümmerer, 2009)
Neomicina	Aminoglucósido	PM: 614.65 g/mol Sol. H ₂ O: 250 mg/mL (25 °C) log K _{octanol/agua} : -3.70	Resistencia bacteriana, alteraciones de poblaciones microbianas y su funcionamiento ecológico (Grenni <i>et al.</i> , 2018)

PM: peso molecular, Sol. H₂O: solubilidad en agua, log K: coeficiente de reparto, DL₅₀: dosis letal media, CE₅₀: concentración efectiva media máxima

Los compuestos mencionados anteriormente son solo algunos ejemplos de fármacos utilizados en las granjas de cerdos en Yucatán para optimizar su crianza y mejorar la producción, también pueden utilizarse germicidas y antiparasitarios externos, vacunas y aditivos no nutritivos, como por ejemplo enzimas y prebióticos. La frecuencia, dosis y medio de administración de los fármacos puede variar de acuerdo con el tipo y tamaño de la granja porcícola. La mayoría de los fármacos veterinarios no son metabolizados completamente por humanos y animales, por lo que del 25 al 75% del compuesto pasa

al ambiente a través de las excretas, por lo que pueden ser más probablemente encontrados en los efluentes de las granjas (Zheng *et al.*, 2017). Con esta metabolización incompleta, se consideran también los productos de biotransformación, que se generan dentro de los organismos de los animales, por la acción de enzimas y bacterias en el tracto digestivo y las bacterias y hongos presentes en el ambiente y los productos de transformación que ocurren en el ambiente, por reacciones fisicoquímicas como fotólisis, hidrólisis, etc. Cabe destacar que dado la complejidad de las moléculas de estos compuestos y su persistencia una transformación completa y mineralización no llega a ocurrir (Kümmerer, 2009).

2.3 Detección de contaminantes emergentes

Para abordar la presencia y distribución de los fármacos en el ambiente, se necesitan métodos analíticos eficientes y confiables, pero surgen dificultades debido a la complejidad de las matrices, el gran número de compuestos presentes y las bajas concentraciones en las que éstos se encuentran en las muestras (Agüera *et al.*, 2013). La preparación de la muestra seguida por la separación, y el análisis cualitativo y cuantitativo con varios detectores se ha convertido en el enfoque estándar (Hao *et al.*, 2007). En la actualidad, las técnicas de cromatografía de gases y líquidos (CG y CL) en combinación con métodos modernos de extracción, derivatización y limpieza brindan la oportunidad de cuantificar muchos compuestos farmacéuticos hasta niveles de ng/L (Kostopoulou *et al.*, 2008). Se han estado desarrollando diferentes métodos, basados principalmente en CLAE-EM y CG-EM, en combinación la extracción en fase sólida (EFS) basada en C18, para el análisis de compuestos farmacéuticos. Sin embargo, los efectos de la matriz son un problema importante en la extracción de analitos; pero la preparación de la muestra es necesaria para eliminar las posibles interferencias, aumentar la concentración de un analito o para convertir un analito en una forma más adecuada; y, para proporcionar un método robusto y reproducible que sea independiente de las variaciones en la matriz. La EFS ha reemplazado gradualmente la extracción clásica de líquido-líquido (ELL) y se ha convertido en la técnica de preparación de muestras más común en áreas ambientales. En general, los límites de detección (LDD) alcanzados con los métodos de CLAE-EM son más altos que los obtenidos con los métodos de CG-EM;

sin embargo, la cromatografía líquida tiene ventajas en términos de versatilidad y preparación de la muestra, ya que no es necesaria la derivatización (Pavlović *et al.*, 2007).

2.3.1 Detección de contaminantes emergentes por CG-EM

La cromatografía de gases conlleva la vaporización de una muestra líquida, seguida de la separación de los diferentes compuestos gaseosos formados, así pueden ser medidos e identificados individualmente (Sawyer *et al.*, 2003). El uso de la cromatografía de gases en conjunto con la espectrometría de masas proporciona información de la estructura molecular del compuesto, comparando el espectro de masas con bases de datos. En el caso de los fármacos, se han desarrollado varias metodologías analíticas con CG-EM para determinar antiinflamatorios no esteroideos en diferentes muestras ambientales, sin embargo, algunos otros fármacos como las sulfonamidas, no es factible debido a la baja volatilidad de estos compuestos. La derivatización podría superar este problema, pero la principal desventaja de este proceso es el largo tiempo de preparación de la muestra, especialmente cuando se tiene un gran número de éstas (Shaaban *et al.*, 2011). En la Tabla 3 se muestran algunos estudios para la determinación de contaminantes emergentes en diferentes muestras de aguas residuales, orina de ganado y otras matrices acuosas, mediante CG-EM.

Tabla 3: Contaminantes emergentes que han sido detectados por CG-EM

Compuesto	Método/condiciones de detección	Concentraciones encontradas	Referencia
Ibuprofeno en agua residual de la Ciudad de México	MEFS ^a con NaCl a pH 3 y derivatización, columna capilar ZB-5 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm y T _{inicial} = 70 °C T _{final} = 300 °C	48.0-1488 pg/mL	Peña-Álvarez y Castillo-Alanís, 2015
Cafeína en agua residual de Izúcar de Matamoros, Puebla	EFS ^b con acetato de etilo, metanol y agua, columna capilar AB-5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm y T _{inicial} = 80 °C T _{final} = 290 °C.	70-200 µg/mL	Navarro <i>et al.</i> , 2014
Dexametasona en orina de ganado	EFS con NaOH, metanol y agua. Columna SPB-5 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm y T _{inicial} = 100°C T _{final} = 300 °C.	Detección hasta 0.2 ng/mL	Huetos <i>et al.</i> , 2002
17β-Estradiol en agua residual de Polonia	EFS con metanol y agua y derivatización. Columna RTX-5 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm y T _{inicial} = 100 °C T _{final} = 300 °C	0.08-3.91 ng/L	Migowska <i>et al.</i> , 2012

^aMEFS: Micro Extracción en Fase Sólida, ^bEFS: Extracción en fase sólida

2.3.2 Detección de emergentes por CLAE

La cromatografía líquida de alta eficiencia ha sido utilizada desde la década de los sesentas, en la cual una fase móvil es inyectado y bombeado mecánicamente a través de una columna que está empacada con la fase estacionaria, es utilizada para el análisis de compuestos no volátiles, de los iones más pequeños hasta grandes moléculas biológicas (Wu *et al.*, 2010). Es uno de los métodos más populares y sensibles que puede separar una amplia variedad de fármacos, algunos de los cuales no son susceptibles de detectarse por cromatografía de gases (Babić *et al.*, 2006). Ha sido utilizada para el análisis de residuos de antibióticos empleando detector UV de longitud de onda fija, de longitud de onda variable, de fluorescencia, de arreglo de diodos y acoplado con espectrometría de masas, el más sensible pero costoso (Srinivasan *et al.*, 2012). Varias metodologías para CLAE para la detección de contaminantes emergentes en aguas residuales de diversos orígenes que se encuentran en la literatura se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Contaminantes emergentes que han sido detectados por CLAE

Compuesto	Método/condiciones de detección	Concentraciones encontradas	Referencia
Enrofloxacin en agua residual farmacéutica, Croacia	EFS, columna 100CN 125 mm x 4.0 mm x 5 µm, DAD, fase móvil: ácido oxálico-acetonitrilo, 280 nm	23.7 µg/L	Babić <i>et al</i> , 2006
Enrofloxacin en agua residual industrial, Croacia	EFS, columna C18 150 mm x 4.6 mm x 4 µm, DAD-DFL, fase móvil: ácido acético 0.1%-acetonitrilo, 280 nm	6.7 µg/L	Ašperger <i>et al</i> , 2014
Carbamazepina en agua residual urbana, España	EFS, columna RP18 125 mm x 4.0 mm x 5 µm, DAD-DFL, fase móvil: metanol-acetonitrilo-KH ₂ PO ₄ , 285 nm	0.55-2.1 µg/L	Santos <i>et al</i> , 2005
Diclofenaco en agua residual urbana, Italia	EFS columna C18 250 mm x 4.6 mm x 5 µm, DAD-DFL, fase móvil: acetonitrilo-agua-ácido acético glacial, 230 nm	1020 µg/L	Patrolecco <i>et al.</i> , 2013
Sulfametoxazol en lodo de PTAR, Irán	EFS columna RP18 70 mm x 4.6 mm x 5 µm, DAD, fase móvil: metanol-solución amortiguadora de fosfatos, 270 nm	7.3-40.8 µg/L	Vosough <i>et al.</i> , 2015

^aEFS: Extracción en fase sólida, ^bDAD: Detector de arreglo de diodos, ^cDFL: Detector de fluorescencia

2.3.3 Detección de emergentes por espectrofotometría de fluorescencia

Aunque la cromatografía líquida es uno de los métodos más comúnmente aplicados para la determinación de compuestos farmacéuticos y sus productos de degradación en las muestras acuosas, las técnicas que requieran menos separaciones y pasos de limpieza previos de la muestra, minimizando el uso de solventes orgánicos son de gran interés, tal es el caso de la espectrofotometría de fluorescencia. El uso de técnicas ópticas para la detección de la calidad del agua ha atraído mucho interés, ya que ofrecen muchas ventajas sobre las técnicas de detección tradicionales, como los tiempos de respuesta más rápidos, la adquisición de datos dinámicos y, en algunos casos, el monitoreo no invasivo (Reynolds, 2002). Entre las técnicas ópticas se encuentra la espectrofotometría de fluorescencia, que ha demostrado ser una valiosa técnica para caracterizar y monitorear aguas residuales rastreando fuentes de contaminación (Carstea *et al.*, 2016), en la región UV-Visible. Puede usarse para realizar las mediciones directamente en una matriz, con características favorables de simplicidad, sensibilidad, robustez, selectividad, rapidez, etc. (Moreira *et al.*, 2005) Esta técnica se utiliza para detectar la presencia de una sustancia o una clase de sustancias de interés con gran

especificidad. En la Tabla 5 se muestran ejemplos de estudios realizados para la determinación de contaminantes emergentes en diferentes matrices, utilizando esta técnica.

Tabla 5: Contaminantes emergentes que han sido detectados por fluorescencia

Compuesto	Método/condiciones de detección	Concentraciones encontradas	R Referencia
Triclosán en agua residual urbana, Italia	$\lambda_{ex}=245$ nm $\lambda_{em}=440$ nm	Se midió remoción >70%	Sgroi <i>et al.</i> , 2017
Sulfonamidas en leche, España	$\lambda_{ex}=390$ nm $\lambda_{em}=480$ nm	30-210 $\mu\text{g/L}$	Rodríguez <i>et al.</i> , 2010
Carbamazepina en agua subterránea, España	$\lambda_{ex}=246-333$ nm $\lambda_{em}=380-480$ nm	>0.13 ng/mL	Hurtado-Sánchez <i>et al.</i> , 2015
Sulfonamidas en leche, España	$\lambda_{ex}=350-450$ nm $\lambda_{em}=420-550$ nm	115 $\mu\text{g/kg}$	Díez <i>et al.</i> , 2007

2.3.4 Detección de emergentes por voltamperometría cíclica (electroquímica)

Los métodos electroquímicos han cobrado un gran interés debido a las ventajas de ser más simples y sensibles, ofrecen una excelente estabilidad y repetibilidad; y tiempos cortos de análisis en comparación con los métodos tradicionales. La simplicidad de manejo, el bajo costo y su potencial adecuado para la automatización constituyen un amplio campo de investigación que se está expandiendo constantemente en el área de la química analítica (Wong *et al.*, 2018). Dentro de las técnicas analíticas que se han reportado para la detección de fármacos, se encuentra la voltamperometría, esta técnica resulta de gran importancia en el campo de la electroquímica, especialmente para estudios de procesos redox, mecanismos de reacción, propiedades electrocatalíticas, etc. No tiene igual relevancia para determinaciones cuantitativas, sin embargo, mediante ensayos relativamente sencillos y rápidos es posible obtener un importante conjunto de informaciones. Esta técnica se basa en aplicar un barrido de potencial al electrodo de trabajo tanto en el sentido directo como en el inverso, es decir realizando lo que se denomina barrido triangular de potencial, iniciando en un valor inicial E_i hasta un valor de corte denominado E_f (Vázquez, 2007), midiendo la intensidad de corriente que circula por el electrodo de trabajo. La voltamperometría cíclica ha sido utilizada en la detección de compuestos farmacéuticos presentes en muestras acuosas como orina. Su ventaja

frente a la cromatografía radica en el menor tiempo de preparación de la muestra y de análisis, además de que se utilizan equipos de menor costo y tamaño (Švorc *et al.*, 2012). Entre todos los tipos de electrodos que se utilizan en esta técnica, los de diamante dopado con boro (DDB) se han convertido en un material prometedor para su uso en el análisis voltamétrico, debido a sus características, que incluyen grandes rangos de potencial anódico y catódico (> 2 V), corrientes de fondo bajas y adsorción mínima. Las características electroquímicas de los electrodos DDB están directamente vinculadas al nivel de dopaje de boro necesario para convertirse en el material conductor, pero en niveles más altos de dopaje, el electrodo DDB exhibe una gran cantidad de sitios sp^2 que mejoran la adsorción de materiales orgánicos y la corriente de fondo. Además, los electrodos DDB pueden considerarse ecológicos, ya que pueden usarse para reemplazar el mercurio como electrodo de trabajo en numerosos análisis (Selva *et al.*, 2017). En la Tabla 6 se muestran algunos ejemplos de cómo se ha utilizado la voltamperometría para la detección de fármacos.

Tabla 6: Contaminantes emergentes que han sido detectados por voltamperometría

Compuesto	Método/condiciones de detección	Concentraciones encontradas	Referencia
Paracetamol en orina humana, Polonia	Voltamperometría cíclica Electrodo de trabajo: DDB Electrodo auxiliar: Pt Electrodo de referencia: Ag/AgCl Electrolito: solución amortiguadora de fosfatos pH 7, 0.01 M Velocidad de escaneo: 100 mV/s	LDD ^a = 0.430 μ M	Niedziałkowski <i>et al.</i> , 2019
Enrofloxacin en orina humana, Turquía	Voltamperometría cíclica Electrodo de trabajo: DDB Electrodo auxiliar: Pt Electrodo de referencia: Ag/AgCl Electrolito: solución amortiguadora de fosfatos pH 2.5, 0.1 M Velocidad de escaneo: 100 mV/s	0.006 μ g/mL	Dönmez <i>et al.</i> , 2018
Benzocaína en orina humana, Ucrania	Voltamperometría diferencial de pulso Electrodo de trabajo: DDB Electrodo auxiliar: carbón serigrafiado Electrodo de referencia: Ag Electrolito: solución amortiguadora Britton-Robinson pH 4, 0.5 mM Velocidad de escaneo: 100 mV/s	2.1-3.8 μ M	Pysarevska <i>et al.</i> , 2018

^aLDD: Límite de detección

2.4 Procesos utilizados en el tratamiento de contaminantes emergentes

Las propiedades fisicoquímicas de muchos contaminantes emergentes hacen difícil su eliminación mediante los procesos convencionales de tratamiento de agua. Uno de los principales problemas de este tipo de contaminantes radica en que las actuales plantas de tratamiento de aguas residuales no consiguen eliminarlos, éstas se encuentran diseñadas para eliminar materia orgánica y nutrientes en mayores concentraciones. Por ello, los contaminantes emergentes se encuentran presentes en aguas superficiales, aguas subterráneas y de consumo humano (Patiño *et al.*, 2014). Las opciones de tratamiento típicamente consideradas para la remoción de contaminantes emergentes del agua potable y del agua residual incluyen la adsorción, los procesos de oxidación avanzada, nanofiltración y membranas de osmosis inversa. Sin embargo, las desventajas de la mayoría de estos métodos son el alto costo y operación complicada (Grassi *et al.*, 2012). En el caso de los fármacos, debido a su uso continuo, la acción inhibitoria en los procesos biológicos y sus propiedades fisicoquímicas permiten su penetración a través de todos los filtros naturales e instalaciones de tratamiento instaladas (Babić *et al.*, 2012; Hey, 2013). Por esta razón, cuando no se puede instalar algún sistema de tratamiento específico para remover contaminantes como los fármacos, se deben implementar sistemas de tratamiento alternativos o adicionales para reducir los problemas y efectos que pudieran ocasionar al ambiente y a la salud.

2.4.1 Humedales para el tratamiento de aguas residuales porcícolas

Los primeros experimentos usando humedales construidos (HC) para el tratamiento de aguas residuales fueron realizados en Alemania a principio de los cincuenta (Töre *et al.*, 2012). En la etapa inicial de su desarrollo se utilizaron principalmente para el tratamiento de aguas residuales domésticas y urbanas y más recientemente se ha aplicado para tratar los efluentes agrícolas, ganaderos, mineros, industriales, aguas de drenaje, lixiviados, aguas de acuicultura y escorrentía urbana y de carreteras. La eliminación de contaminantes en los humedales construidos es compleja y depende de una variedad de mecanismos, que incluyen sedimentación, filtración, precipitación, volatilización, adsorción, absorción por la planta y diversos procesos microbianos (Wu *et al.*, 2014). Su

potencial para la remoción de contaminantes provenientes de las actividades humanas ha llamado la atención, y aunque en general no son usados como tratamiento único de aguas residuales, su bajo costo y facilidad de operación los han convertido en una alternativa viables para el tratamiento de aguas residuales provenientes de granjas porcícolas. Estas características los han llevado a ser utilizados en países en desarrollo, donde han sido utilizados para la remoción de DQO, DBO, sólidos totales, sólidos suspendidos totales, nitrógeno total, nitrógeno amoniacal y fósforo total (Chen *et al.*, 2016); parámetros que se suelen medir para conocer el grado de contaminación de este tipo de aguas residuales. Hasta hace poco los humedales habían sido utilizados en el sector ganadero para la remoción principalmente de nitrógeno, fósforo y materia orgánica pero ya en años recientes se ha estudiado que pueden ser utilizados para la remoción de micro contaminantes orgánicos, como son los fármacos (Li *et al.*, 2014).

2.4.2 Humedales para el tratamiento de fármacos en el agua residual porcícola

Recientemente se ha estudiado el potencial de los humedales construidos para la remoción de fármacos presentes en el agua residual de las actividades pecuarias. Los humedales construidos eliminan trazas de estos contaminantes orgánicos a través de procesos sinérgicos que involucran la biomasa de las plantas, hidrólisis, volatilización, sorción, biodegradación y fotólisis (Sharif *et al.*, 2014) (Figura 2). Donde los parámetros de diseño de los humedales influyen en estos procesos, entre los parámetros de diseño destacan: *el soporte sólido*, el cual desempeña una doble función: proporcionar un entorno básico para el crecimiento de plantas y microbios, y eliminar fármacos mediante el efecto acoplado de la adsorción, degradación y absorción biológica; *las plantas y microorganismos*, proporcionan un área de superficie en la que se puede producir la absorción de contaminantes, las bacterias pueden adherirse y crecer en las superficies de las plantas (Guan *et al.*, 2017); aunque algunos investigadores señalan que la importancia de las plantas de los humedales es insignificante cuando se tratan antibióticos (Xiaoyan *et al.*, 2015). La elección de las plantas es un tema importante en los HC, ya que tienen que ser especies capaces de sobrevivir a los efectos tóxicos potenciales de las aguas residuales y también a su variabilidad (Carvalho *et al.*, 2012). Existe un consenso general entre muchos investigadores de que los humedales

construidos tienen un gran potencial de ser utilizados como un sistema de tratamiento de aguas residuales secundario alternativo o como un sistema de tratamiento de pulido de aguas residuales para la eliminación de fármacos, pero los estudios relevantes informados son escasos y no son concluyentes en sus hallazgos (Li *et al.*, 2014). Algunos de estos estudios de sistemas de HC utilizados para la remoción de antibióticos y otros fármacos se muestran en la Tabla 7.

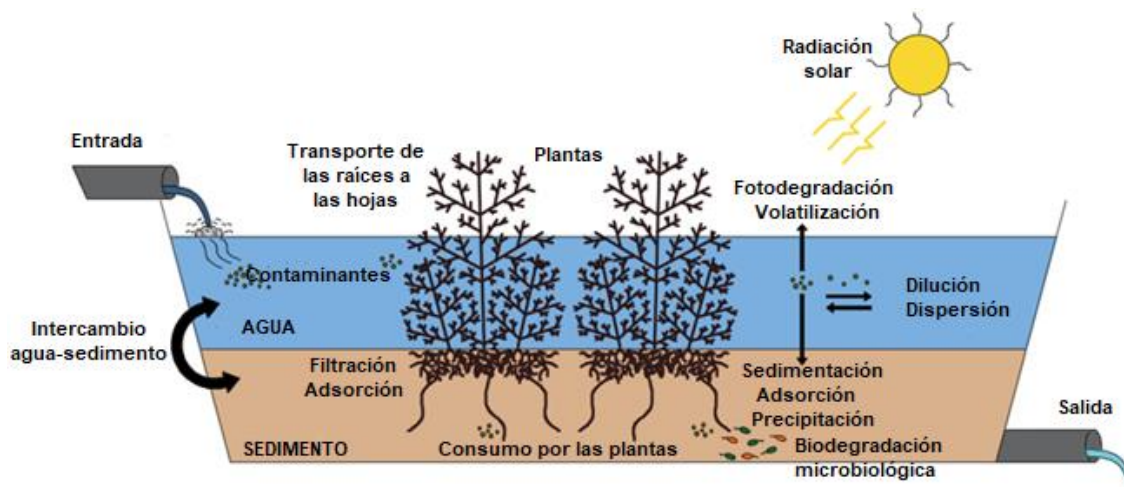


Figura 2: Mecanismos generales de remoción de contaminantes en los humedales, adaptado de Zhang *et al.*, 2014

Tabla 7: Uso de humedales construidos como tratamiento para fármacos

Compuesto(s)	Lugar y tipo de humedal	Remoción	Planta y/o soporte usado	Referencia
Sulfametoxazol y diclofenaco en agua residual sintética	República Checa Humedal horizontal, flujo subsuperficial	95.8% 77.6%	<i>Miscanthus giganteus</i> , <i>Iris pseudacorus</i> , grava de ceramita y arena de cuarzo	Sochacki <i>et al.</i> , 2018
Naproxeno e ibuprofeno en agua residual sintética	China Humedal horizontal, flujo subsuperficial	82.3% 79%	<i>Canna indica</i> , grava y zeolita	Zhang <i>et al.</i> , 2018
Oxitetraciclina y diclofenaco en agua residual porcícola	China Humedal vertical, flujo vertical	>84%	<i>Phragmites australis</i> , ladrillo y concha de ostra	Huang <i>et al.</i> , 2017
Sulfametoxazol en agua residual porcícola	Corea Humedal horizontal	49.43%	<i>Phragmites australis</i> y <i>Miscanthus saccharifloru</i> , sedimento de río	Choi <i>et al.</i> , 2016
Enrofloxacina y tetraciclina en agua residual porcícola	Portugal Humedal vertical flujo subsuperficial	94-98%	<i>Phragmites australis</i> , arena con raíces de plantas	Carvalho <i>et al.</i> , 2013

HIPÓTESIS

- Es posible desarrollar y validar un método de detección en agua residual porcícola de fármacos de uso veterinario, que representan un efecto negativo para el ambiente, debido a su administración no controlada en granjas de ganado porcino.
- Un método analítico validado permitirá cuantificar fármacos provenientes de aguas residuales porcícolas.
- Es posible remover fármacos del agua residual porcícola mediante humedales construidos.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- Como los humedales construidos han sido empleados para el tratamiento de micro contaminantes en el agua residual municipal y porcícola, ¿Serán una alternativa eficiente para la remoción de contaminantes emergentes como los fármacos?
- ¿Los sistemas de tratamiento instalados en las granjas porcícolas son eficientes para la remoción de contaminantes emergentes?
- ¿Podrían los humedales construidos instalados como sistema adicional, ser una mejor alternativa en el tratamiento y remoción de contaminantes emergentes?

III METODOLOGÍA

Con base en los objetivos planteados para el proyecto se describen las actividades que se realizaron durante el programa de doctorado.

3.1 Información sobre fármacos administrados al ganado porcino en Yucatán

En la primera parte del proyecto se buscó recabar la mayor información posible sobre la administración de fármacos al ganado en las granjas porcícolas del estado de Yucatán, a través de una encuesta (Anexo 1), la cual permitió conocer cuáles son los compuestos que consumen los cerdos, la vía de administración (con el alimento, en el agua o aplicación directa al animal), la frecuencia con la que el fármaco es administrado (si su consumo es programado, las temporadas de mayor consumo, si se trata de profilaxis o es un tratamiento específico). Esta información permitió conocer que sustancias son más probables de encontrarse en las excretas de los cerdos y proponer la metodología más adecuada para el tipo de compuestos que fueron analizados.

Las granjas que fueron seleccionadas para el estudio se encuentran en la periferia de la ciudad de Mérida y en las comisarías cercanas, de acuerdo con la Tabla 8 y la Figura 3.

Tabla 8: Granjas porcícolas seleccionadas para los muestreos

Granja	Ubicación
A	Kanasín
B	Sierra Papacal
C	Sierra Papacal
D	Paraíso, carr. Mérida-Progreso
E	Xcanatun
F	Chixulub pueblo
G	Chixulub pueblo
H	Conkal
I	San José Tzal
J	Cholul

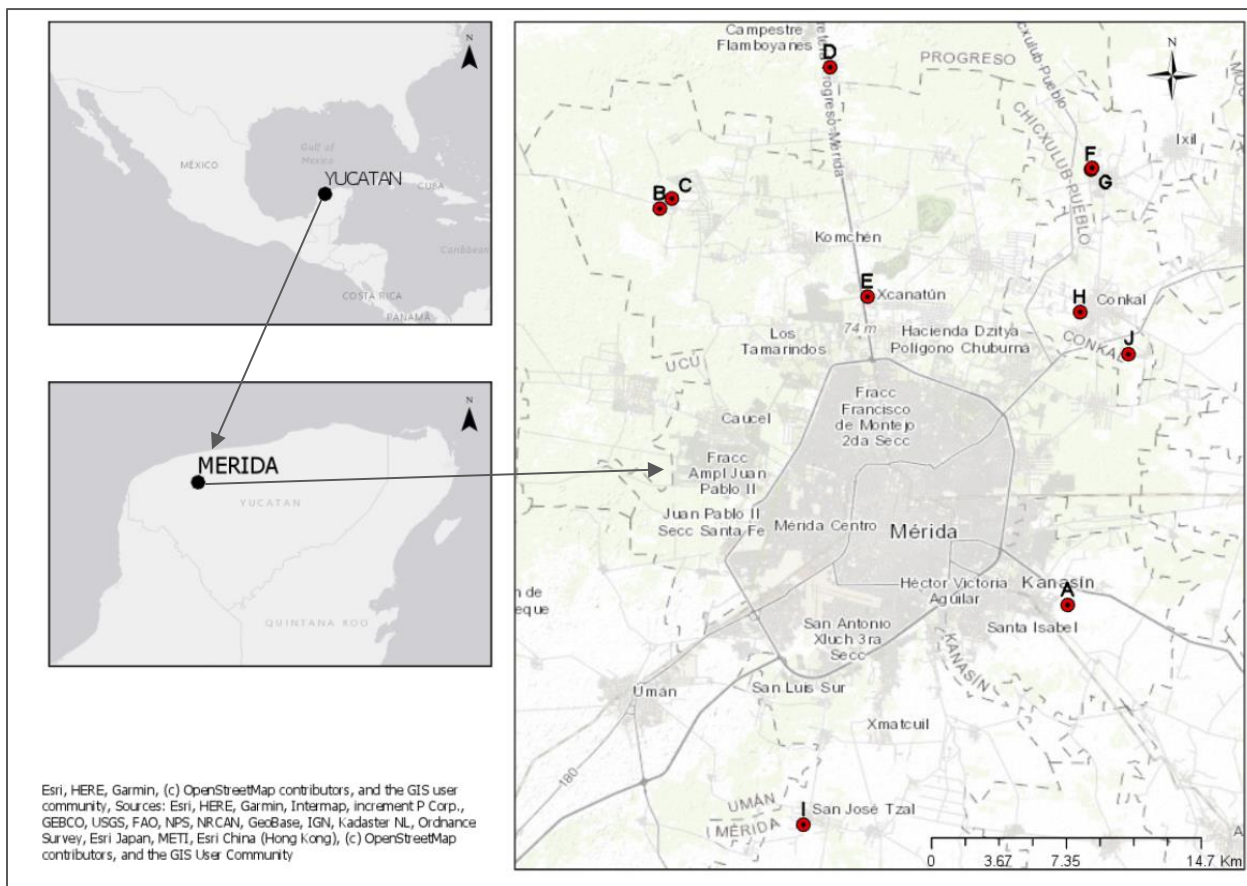


Figura 3: Localización de las granjas seleccionadas para el estudio

3.2 Detección de contaminantes emergentes en agua residual porcícola

Con la información recabada en las actividades anteriores, se logró conocer cuáles son los compuestos que mayormente se administran a los cerdos en la granja, lo que corresponde en su mayoría a antibióticos y β -agonistas. Por lo anterior se consideró que la cromatografía líquida de alta eficiencia es la técnica más adecuada, debido al peso molecular, propiedades químicas (polaridad) y tamaño de las moléculas que se desean detectar en las muestras de agua residual, adicionalmente una determinación inicial utilizando espectrofotometría de fluorescencia y voltamperometría cíclica, que sirvió como un escaneo general para dichas granjas.

3.2.1 Preparación de las muestras

Se recolectó 1 L de muestra de agua residual, proveniente de la entrada (cárcamo de recepción, donde se colecta el agua de lavado de los corrales y de los cerdos) y de la salida del biodigestor, en cada una de las 10 granjas porcícolas descritas en la sección 3.1. Las muestras se transportaron al laboratorio en botellas de vidrio ámbar y fueron refrigeradas a aproximadamente 4 °C. Se realizaron muestreos simples en cada una de las granjas seleccionadas.

Para todos los análisis, las muestras fueron filtradas en varias etapas que incluían: una malla de algodón estéril de 1 mm, filtro comercial para cafeteras de 85 μm , papel filtro cualitativo comercial de 25 μm y papel filtro Whatman No.2 de 8 μm . Para el caso exclusivo de la cromatografía líquida de alta eficiencia, se recuperaron 250 mL de la muestra filtrada y adicionalmente se realizó la extracción en fase sólida (EFS) (Figura 4), utilizando cartuchos Octadecyl C18 de 6 mL (J.T. Baker). Siguiendo el siguiente procedimiento: 1) se acondicionaron las columnas con 30 mL de acetonitrilo (grado HPLC $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich), 30 mL de metanol (grado HPLC $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich) y 30 de agua tridestilada Millipore. Los cartuchos se mantuvieron húmedos antes de introducir las muestras; 2) se hicieron pasar 250 mL del agua residual previamente filtrada, utilizando vacío a razón de 1.3-2 mL/min y la presión estuvo por debajo de 20 mmHg; 3) se realizó el lavado de las columnas con 25 mL de agua tridestilada Millipore. 4) finalmente, la elución se realizó con 6 mL de metanol (grado HPLC $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich) y 6 mL de acetonitrilo (grado HPLC $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich), de los cuales fueron recuperados por separado, 1 mL de cada uno en viales de cromatografía. Por tanto, los resultados de las concentraciones están referidos a ambas fracciones.

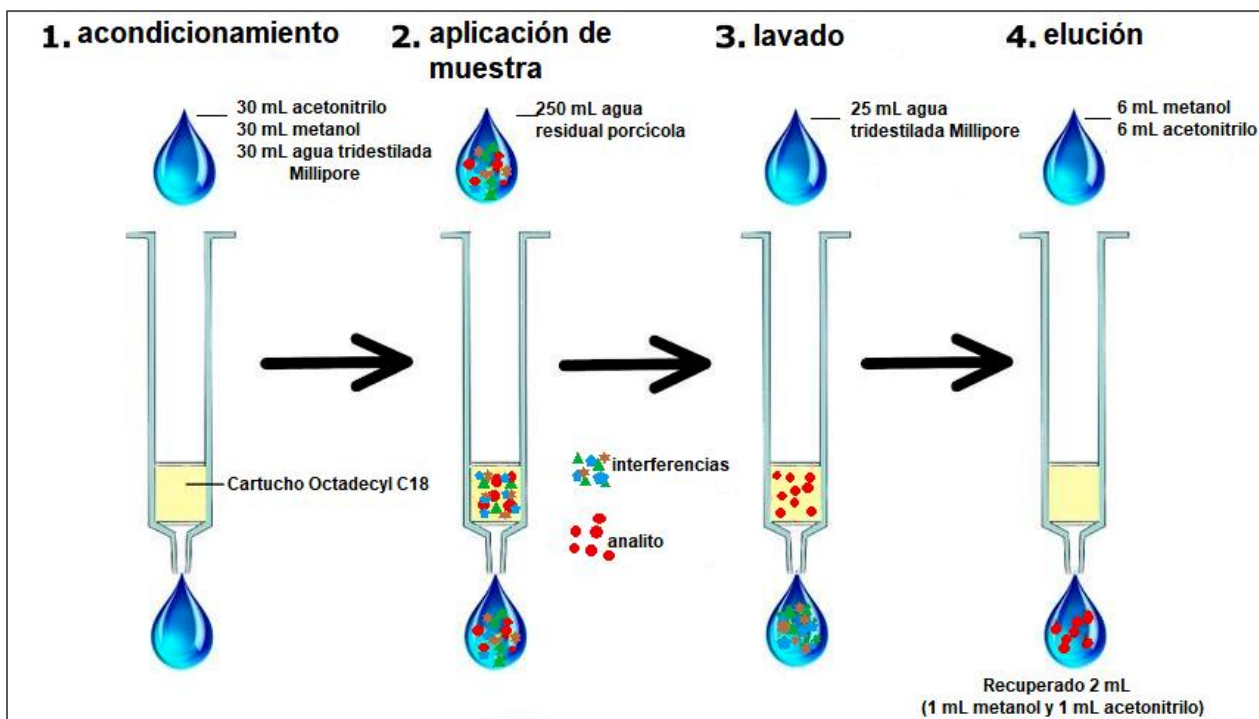


Figura 4: Metodología para extracción en fase sólidas de las muestras (adaptado de Sandoval-Riofrio, 2016)

3.2.2 Análisis por espectrofotometría de fluorescencia

Las pruebas por esta técnica fueron realizadas en un equipo Lumina Fluorescence Spectrometer (Thermo Scientific) con una lámpara de xenón libre de ozono de 150 W (Figura 5), que se encuentra en el Laboratorio de nano y biomateriales del CINVESTAV, Unidad Mérida. Las lecturas se realizaron en celdas de poliestireno de 10x10x45 mm (SARSTEDT, Alemania).

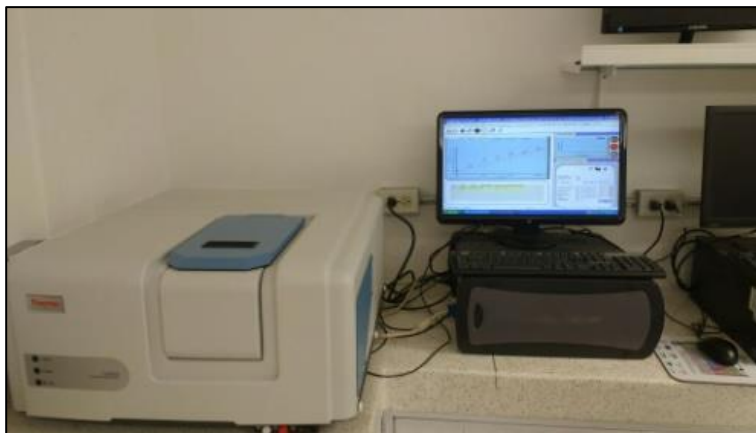


Figura 5: Equipo Thermo Lumina para espectrofotometría de fluorescencia

Con esta técnica se analizaron 4 fármacos: enrofloxacina (99.8%, estándar analítico, Vetranal™, Alemania), oxitetraciclina ($\geq 95\%$, HPLC, Sigma-Aldrich, Israel), ractopamina (95.5%, estándar analítico, Vetranal™, Alemania) y sulfametoxazol ($\geq 95\%$, estándar analítico, Sigma-Aldrich, Italia). Se prepararon soluciones madre de dichos compuestos con una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ disueltos en etanol grado espectrofotometría UV (UvasolR Merck, Alemania). Las curvas de calibración se construyeron con siete puntos en un intervalo de 0 a 1.47 $\mu\text{g/mL}$ para oxitetraciclina y enrofloxacina, y de 0 a 14.77 $\mu\text{g/mL}$ para sulfametoxazol y ractopamina en una solución 1:1 etanol/agua residual utilizada como blanco; con las condiciones mostradas en la Tabla 9.

Tabla 9: Longitudes de onda de excitación y emisión para los fármacos seleccionados

Fármaco	λ excitación (nm)	λ emisión (nm)
Oxitetraciclina	390	512
Sulfametoxazol	300	381
Enrofloxacina	320	448
Ractopamina	286	305

Finalmente se analizaron las muestras de agua residual de cada una de las granjas, añadiendo 25 μL de cada muestra a 2 mL de solución blanco contenidos en la celda y se realizaron las lecturas correspondientes para cada fármaco (Tabla 9). Los muestreos de agua residual para el análisis con esta técnica fueron realizados de junio a septiembre de 2016.

3.2.3 Análisis por voltamperometría cíclica (electroquímica)

Para el caso exclusivo de la penicilina G sódica ($\geq 98\%$ (N), Sigma-Aldrich, Israel), se analizó mediante voltamperometría cíclica, la penicilina G sódica ($\geq 98\%$ (N), Sigma-Aldrich, Israel), de la cual se preparó una solución madre 5 mM en una solución amortiguadora de acetato pH 3. Se construyó una curva de calibración para la penicilina G con siete puntos en un intervalo de 0 a 1.72 mM, utilizando la solución de acetato pH 3 como blanco. Las pruebas se realizaron en una celda de PVC con 1 cm de diámetro (a). El sistema estaba conformado por un electrodo de trabajo de diamante dopado de boro de 5 x 2.5 cm (b); un electrodo auxiliar de grafito de 12 cm de largo y diámetro de 0.8 cm (c) y un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (d) (Figura 6). Las mediciones fueron realizadas a una velocidad de escaneo de 0.05 V/s. El software

utilizado fue Gamry Framework-Echem Analyst Versión 4.2. Los muestreos de agua residual para el análisis con voltamperometría cíclica fueron realizados de junio a agosto de 2016. Los análisis fueron realizados en laboratorio de electroquímica del CINVESTAV, Unidad Mérida.

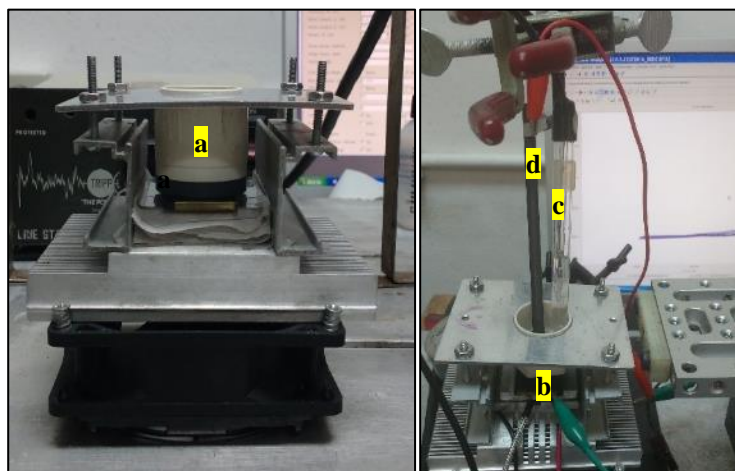


Figura 6: Sistema a) celda y electrodos del sistema: b) electrodo diamante dopado de boro (DDB), c) electrodo de referencia Ag/AgCl y d) electrodo auxiliar de grafito

3.2.4 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

Para el análisis por CLAE se utilizó un equipo Agilent 1100 con detector de longitud de onda variable UV y bomba binaria. El registro de datos fue realizado con el software OPENLAB-CDS, Chemstation 2011 (Figura 7). Se empleó una columna HYPERSIL GOLD (Thermo Scientific) de 250 mm, 4.6 de diámetro mm y 5 μm de poro, operando a 25 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura. Con esta técnica se analizaron 6 fármacos: enrofloxacin (99.8%, estándar analítico, VetranalTM, Alemania), neomicina (estándar farmacéutico secundario, EUA) oxitetraciclina ($\geq 95\%$, HPLC, Sigma-Aldrich, Israel), penicilina G sódica ($\geq 98\%$ (N), Sigma-Aldrich, Israel), ractopamina (95.5%, estándar analítico, VetranalTM, Alemania) y sulfametoxazol ($\geq 95\%$, estándar analítico, Sigma-Aldrich, Italia). Se prepararon soluciones madre (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de neomicina, oxitetraciclina, penicilina G, ractopamina y sulfametoxazol en metanol (grado HPLC $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich); y enrofloxacin en solución 1:1 metanol (grado HPLC $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich) / acetonitrilo (grado HPLC $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich). Las curvas de calibración se construyeron con siete puntos en un intervalo de concentración de 1 a 13.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para enrofloxacin,

penicilina G y ractopamina; de 2.5 a 15 $\mu\text{g/mL}$ para neomicina y oxitetraciclina; y de 0.5 a 12.5 $\mu\text{g/mL}$ para sulfametoxazol. La fase móvil consistió en una mezcla: 50% agua tridestilada Millipore pH 4 (componente A) y 50% acetonitrilo (componente B), se utilizó ácido acético glacial para ajustar el pH. Se inyectaron 5 μL de cada solución utilizando el auto-muestreador del equipo. Inicialmente, se analizaron los 6 fármacos de manera individual para obtener las condiciones de detección: proporciones de las fases, longitudes de onda, tiempo de corrida y velocidad de flujo, para después agrupándolos de acuerdo con sus mejores características cronográficas (resolución del pico, sensibilidad e intensidad) los compuestos en mezclas (Tabla 10). Posteriormente se realizó el análisis de las muestras ya preparadas por extracción en fase sólida, descrita en la sección 3.2.1. Los muestreos de agua residual para el análisis con esta técnica fueron realizados de noviembre de 2016 a febrero de 2017. El análisis se realizó por método isocrático. Los análisis fueron realizados en laboratorio de análisis instrumental de la Facultad de Ingeniería Química, UADY.

Tabla 10: Condiciones de análisis de los fármacos en cromatografía líquida

Fármacos	λ (nm)	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Temperatura de la columna	Tiempo de corrida
Mezcla 1 Sulfametoxazol Oxitetraciclina	255	1:1 acetonitrilo / agua	0.4	25°C	20 min
Mezcla 2 Enrofloxacin Neomicina	280	1:1 acetonitrilo / agua	0.4	25°C	20 min
Mezcla 3 Penicilina Ractopamina	230	1:1 acetonitrilo / agua	0.4	25°C	15 min



Figura 7: Equipo Agilent 1100 para cromatografía líquida de alta eficiencia

3.2.5 Validación de los métodos

Fue necesario comprobar que los métodos analíticos utilizados demuestren resultados confiables, dentro de intervalos definidos, por lo tanto, se realizaron las pruebas de validación, para determinar la linealidad, rango lineal, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud y estabilidad de las soluciones. Lo anterior, basándose en los protocolos de la Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados (EURACHEM, 2014) y la Guía de Validación de Procedimientos Analíticos: Texto y Metodología (ICH, 2005).

Se comprobó la linealidad de cada método, construyendo 3 curvas de calibración por triplicado para cada uno de los fármacos con seis puntos, a diferentes intervalos de concentraciones, de acuerdo con el compuesto, utilizando las condiciones para cada método descritas en las secciones anteriores. Con las curvas obtenidas se realizó el ajuste por regresión lineal con mínimos cuadrados, excepto para voltamperometría cíclica, donde el ajuste se realizó mediante una ecuación de segundo grado, utilizando las áreas bajo la curva. Para todos los casos se calculó el coeficiente de correlación (R) y el de determinación (R^2).

Para las pruebas de precisión y exactitud se realizaron 6 lecturas de la intensidad de tres niveles de concentraciones por el método de añadido-recuperado, utilizando como blancos acetonitrilo, solución 1:1 etanol/agua y solución de acetatos pH 3; para cromatografía líquida de alta eficiencia, espectrofotometría de fluorescencia, y voltamperometría cíclica, respectivamente. Se estableció como criterio el porcentaje de recobro ($100 \pm 25\%$, coeficiente de variación o desviación estándar relativa de $\leq 2\%$, para métodos cromatográficos y de $\leq 3\%$, para métodos espectrofotométricos (Vega, 2011).

Para el cálculo de los límites de detección y cuantificación se utilizó el método recomendado por la guía de EURACHEM (2014) para validación de métodos, empleando las relaciones mostradas en la Ecuación 1. Para el caso de espectrofotometría de fluorescencia se calcularon a partir de la curva de calibración, para cromatografía líquida de acuerdo con los interceptos de la curva (Magnusson and Örnemark, 2014; ICH, 2005) y para voltamperometría cíclica de acuerdo con la relación señal/ruido (Shrivastava y Gupta, 2011, Stankovic y Kalcher, 2016; Bandzuchová *et al.*, 2013).

$$LDD= 3.3S_0$$

$$LDC= 10S_0$$

Ecuación 1: Expresiones para el cálculo para el límite de detección y cuantificación, donde LDD corresponde al límite de detección, LDC al límite de cuantificación y S_0 a la desviación estándar del blanco

Finalmente, para comprobar la estabilidad de los métodos se midieron las concentraciones de las soluciones estándar cada 24 horas hasta obtener lecturas que demostraran la disminución de la concentración inicial en un 15%.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el análisis de varianza de los datos, utilizando la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene's en el software Origin versión 2018, corroborando que no hubiera diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las varianzas de cada nivel de datos de las curvas al 95% de confianza.

3.3 Humedales construidos para la remoción de fármacos en agua residual porcícola

La tercera etapa del proyecto de investigación consistió en la implementación de un sistema de tratamiento que se pueda acoplar como complemento a los biodigestores ya instalados en las granjas porcícolas de Yucatán, para la remoción de fisicoquímicos y fármacos presentes en el agua residual del efluente directo de la granja o en el efluente luego de su paso por el biodigestor u cualquier otro sistema operado en la granja.

3.3.1 Diseño y operación de los humedales construidos

Se diseñó un sistema a pequeña escala que consiste en 9 unidades de polipropileno de alta densidad con dimensiones de 37x27x20 cm, en la cual se realizaron 72 experimentos incluyendo sus réplicas. En los humedales se utilizó como soporte sólido roca caliza sedimentaria, compuesta mayoritariamente por carbonato de calcio (CaCO_3), con trazas de carbonato de magnesio (MgCO_3) y otros carbonatos, conteniendo además pequeñas cantidades de minerales como arcilla, hematita, siderita, cuarzo, etc. Este material fue donado por el laboratorio de materiales de la Facultad de Ingeniería de UADY, de este material se escogieron tres tamaños para en los humedales: arenas 0.88-2.1 mm, gravas de 2.2-6 mm y la mezcla de ambas al 50% (Figura 8). Previamente se realizaron pruebas (según los métodos indicados) de granulometría (ASTM D 422-63), peso volumétrico seco (ASTM C97-83), permeabilidad (ASTM D 2434-68); y gravedad específica, peso específico y porosidad (ASTM D 854-83), para determinar si cumplía con las características para funcionar adecuadamente como soporte sólido de los humedales construidos. Los ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Geotecnia de la Facultad de Ingeniería UADY.



Figura 8: Material de soporte de roca caliza utilizado en los humedales construidos

En el sistema de humedales se utilizaron dos tipos de plantas: Typha (*Typha latifolia*), recolectada en el Acuaparque al oriente de Mérida y papiro (*Cyperus papyrus*), adquirida en un vivero de la zona norte de la ciudad (Figura 9). Las plantas pasaron por un proceso de preparación que consistió en un lavado con agua corriente y una desinfección de las raíces en una solución de agua destilada con plata coloidal por 15 min, posteriormente fueron trasplantadas a las unidades de los humedales con el soporte sólido con 250 g de humus de lombriz, las plantas fueron regadas con agua corriente para después pasar por un proceso gradual de adaptación con agua residual porcícola del 10 al 60%, durante tres meses (agosto a octubre de 2017), monitoreando el crecimiento de las plantas.



Figura 9: Plantas utilizadas en el experimento con humedales construidos

Además, se utilizaron tres unidades sin plantas como controles, cada una con su respectivo soporte sólido. Se manejaron cuatro tiempos de permanencia en el humedal de 24, 48, 72 y 96 h, en el cual se evaluaron las concentraciones iniciales y finales de una mezcla de fármacos (oxitetraciclina 2 $\mu\text{g/mL}$, sulfametoxazol 2 $\mu\text{g/mL}$, enrofloxacina

0.2 µg/mL, ractopamina 2 µg/mL, penicilina G 2 µg/mL) utilizando espectrofotometría de fluorescencia y cromatografía líquida para el análisis de las muestras. En la Figura 10 se muestra el sistema de humedales construidos, donde el soporte A corresponde a la arena, el B a las gravas y el C a la mezcla de ambas, la planta 1 corresponde a *Typha latifolia*, la planta 2 a *Cyperus papyrus* y el 3 a los controles sin plantas.

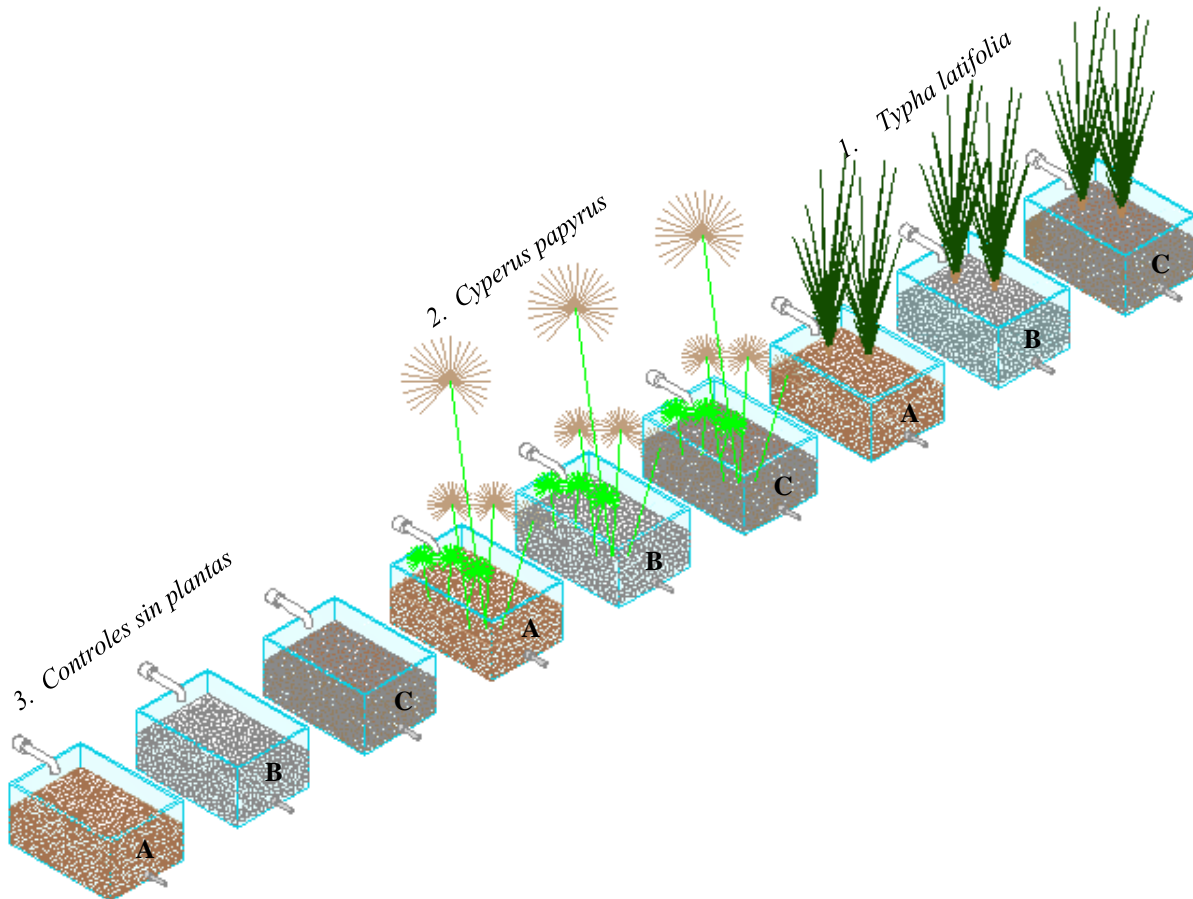


Figura 10: Sistema de humedales construidos a escala para la remoción de fármacos en agua residual porcícola

Para el análisis estadístico de los experimentos con humedales se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial utilizando el software Statgraphics Centurion 16.1.03, para determinar qué factores (planta, soporte, tiempo) tuvieron un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) sobre la remoción de los fármacos en los humedales, también se evaluó la significancia de las interacciones entre los factores con un 95% de nivel de confianza, basándose en el modelo estadístico: $y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + \tau\beta_{ij} + \tau\gamma_{ik} + \beta\gamma_{jk} + \varepsilon_{ijkl}$. Previamente se realizó la prueba de Prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad de los datos. Para discriminar entre las

medias se utilizó el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Finalmente, se realizó un análisis discriminante para ayudar a predecir cuál combinación de soporte y planta (variables categóricas) podría funcionar mejor para configurar un humedal capaz de remover todos los fármacos con base en los valores de las variables cuantitativas utilizando el software IBM SPSS Statistics versión 25.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Información sobre fármacos administrados al ganado porcino en Yucatán

Con las respuestas obtenidas mediante la encuesta (Anexo 1), se logró obtener información sobre los fármacos de mayor consumo en las granjas seleccionadas para este estudio. La frecuencia de consumo varía según la población y tamaño de producción de la granja (Tabla 11), cabe destacar que la gran mayoría de estos compuestos corresponden al grupo de los antibióticos (Tabla 12) y son administrados a los cerdos durante los primeros días de nacidos para la prevención de enfermedades y como tratamiento en cualquier etapa de la vida de los cerdos

Tabla 11: Tipos de granjas y vías de administración de los fármacos

Granja	Tipo de granja	Población	Tipo de alimento	Vía de administración de los fármacos
A	Ciclo completo	186	Granos: sorgo, maíz, soya	Oral e inyección
B	Engorda	600	Mezcla comercial	Alimento
C	Pie de cría	651	Mezcla comercial	Inyección
D	Pie de cría	550	Premezcla	Oral
E	Ciclo completo	751	Mezcla comercial	Inyección
F	Engorda	651	Mezcla comercial	Alimento
G	Pie de cría	420	Mezcla comercial	Alimento
H	Ciclo completo	173	Mezcla comercial	Oral
I	Ciclo completo	457	Mezcla comercial	Oral e inyección
J	Ciclo completo	120	Granos	Inyección

México no genera los productos que demanda la porcicultura, de ahí que se tenga que importar el 41.5% de los cereales y el 98% de la soya que se consume en México. En Estados Unidos, Canadá e Inglaterra, los cerdos siguen una alimentación, que incluye: cebada, avena, arroz, trigo, residuos de panadería, residuos de cervecería, granos secos de destilería, betabel, linaza, frituras, subproductos del trigo y del maíz, frijoles, canola,

habas, chicharos, harinas de carne, subproductos lácteos, entre otros; mientras que en América Latina, Asia y Oceanía, se han manejado: plátano, yuca, camote, papa y moringa (Montero *et al.*, 2015). Las fuentes más utilizadas para la alimentación porcina en Yucatán son el maíz y el sorgo, y de proteína la harina de soya y las mezclas comerciales conteniendo ingredientes antes mencionados.

Tabla 12: Fármacos consumidos en las granjas porcícolas

Tipo de fármaco	Uso o efecto	Frecuencia de administración
Sulfametoxazol	Tratamiento y prevención de enfermedades	Recién nacidos durante 3-5 días
Oxitetraciclina	Promotor de crecimiento	Diario, con el alimento
Ivermectina	Ectoparasitocida y endoparasitocida	Cada 15-42 días
Amoxicilina	Tratamiento y prevención de enfermedades	Cuando hay animales enfermos, durante 2-3 días
Enrofloxacin	Tratamiento de enfermedades	Cuando hay animales enfermos, durante 2-3 días
Tilosina	Tratamiento de enfermedades	Cuando hay animales enfermos, durante 2-3 días
Penicilina G	Tratamiento y prevención de enfermedades	Recién nacidos durante 3-5 días
Ractopamina	Promotor de crecimiento	Diario, con el alimento
Estreptomicina	Tratamiento de enfermedades	Recién nacidos durante 3-5 días
Gentamicina	Tratamiento de enfermedades	Cuando hay animales enfermos, durante 2-3 días
Neomicina	Tratamiento y control de diarreas	Recién nacidos durante 3-5 días

En específico para estas 10 granjas, nombradas de la A hasta J, fueron reportados por los porcicultores y dueños de las granjas que se administran a los cerdos los fármacos presentados en la Figura 11. En este tipo de granjas en México, no se lleva un control del consumo de fármacos por los cerdos, cada granja lleva su propio registro, por lo que no se cuenta con datos globales de consumo a nivel nacional. Por ejemplo, en España se emplean 402 mg de antibióticos por cada kg de carne producido, cuatro veces más que Alemania y casi seis veces más que Francia (González-Zorn y Moyano, 2017).

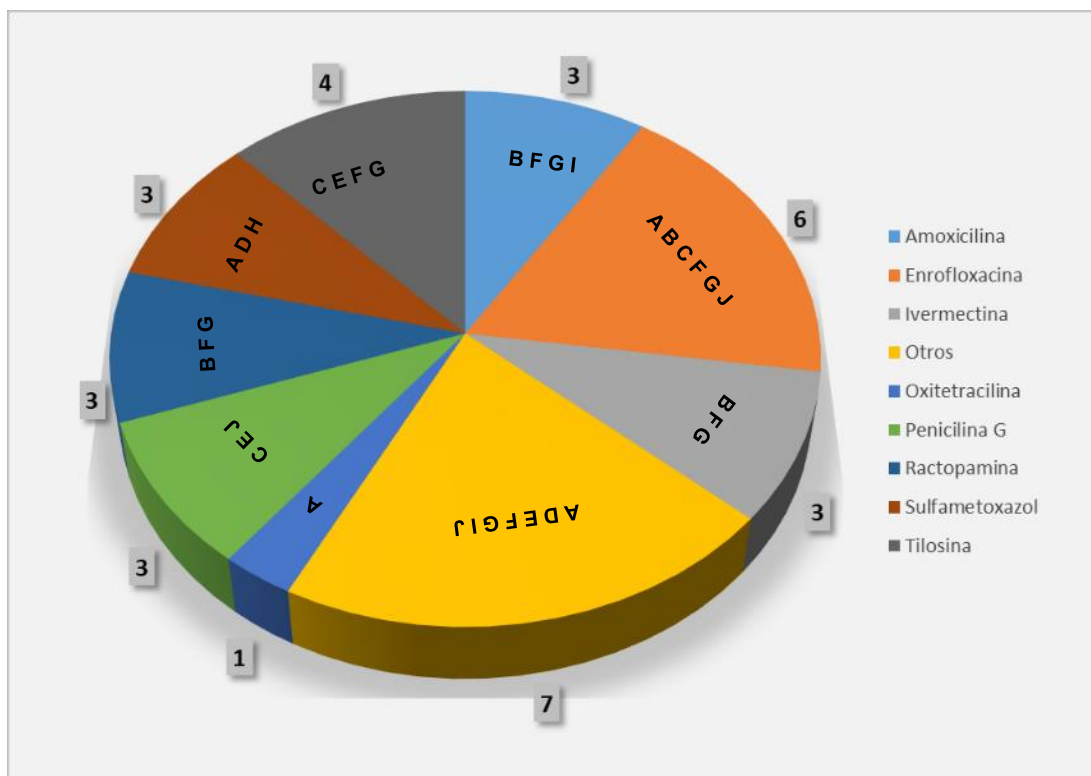


Figura 11: Fármacos administrados en las granjas porcinas seleccionadas de acuerdo con la encuesta a los poricultores

Los antibióticos presentados en la gráfica son los de uso frecuente en la porcicultura en México, de los cuales se tiene reportado un consumo de 10-30 mg/kg para oxitetraciclina, 2.5-5 mg/kg para enrofloxacina y 12.5-15 mg/kg para sulfametoxazol (Montero *et al.*, 2015). En las granjas donde se realizó la encuesta no se tiene registro de las dosis que son administradas. No obstante, la información anterior permitió decidir cuáles de estos fármacos se utilizarían como estándares para el desarrollo de los métodos analíticos de detección, con base en su importancia y uso en la ganadería porcícola y la disponibilidad y costos del reactivo. Los fármacos ya fueron descritos anteriormente en la sección 3.

4.2 Análisis por espectrofotometría de fluorescencia

En la Tabla 13 se presentan los resultados de los análisis realizados por espectrofotometría de fluorescencia para las muestras de agua residual provenientes del cárcamo de recepción y del efluente del biodigestor, correspondientes a la entrada y salida del sistema de tratamiento instalado en las granjas. Se muestran las

concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ correspondientes a tres antibióticos (enrofloxacina, sulfametoxazol y oxitetraciclina) y un bloqueador- β (ractopamina) presentes en las muestras de agua residual. Como se explica en la sección 3, tanto las curvas de calibración como las lecturas de las muestras fueron realizadas en la misma dilución, por lo que los valores de las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ deben considerarse como aparecen.

Tabla 13: Concentraciones de los fármacos detectados en las muestras agua residual en $\mu\text{g/mL}$

Fármaco	Granja	Influyente ($\mu\text{g/mL}$)	DE	Efluente ($\mu\text{g/mL}$)	DE
Enrofloxacina	A	0.186	0.002	ND	-
	B	0.170	0.001	ND	-
	C	0.043	0.006	ND	-
	D	0.033	0.001	0.017	0.001
	E	0.389	0.002	0.043	0.001
	F	ND	-	ND	-
	G	ND	-	ND	-
	H	ND	-	ND	-
	I	ND	-	ND	-
	J	0.033	0.005	0.038	0.001
Sulfametoxazol	A	3.966	0.279	ND	-
	B	8.101	0.243	0.196	0.028
	C	12.778	0.239	0.090	0.055
	D	14.147	0.137	2.324	0.223
	E	0.265	0.224	6.762	0.737
	F	11.637	0.161	4.051	0.295
	G	2.368	0.083	2.224	0.018
	H	2.516	0.083	3.864	0.088
	I	4.607	0.082	1.952	0.199
	J	5.972	0.393	9.748	0.021

DE: Desviación estándar, ND: No detectado

Tabla 13 (Continuación): Concentraciones de los fármacos detectados en las muestras agua residual en µg/mL

Fármaco	Granja	Influyente (µg/mL)	DE	Efluente (µg/mL)	DE
Oxitetraciclina	A	1.337	0.105	0.140	0.030
	B	ND	-	ND	-
	C	0.532	0.033	ND	-
	D	0.725	0.017	0.255	0.009
	E	0.799	0.016	1.167	0.029
	F	1.039	0.002	1.158	0.023
	G	0.021	0.020	1.072	0.030
	H	0.445	0.031	1.318	0.003
	I	0.782	0.041	1.427	0.038
	J	0.561	0.003	0.163	0.027
Ractopamina	A	4.108	0.033	ND	-
	B	0.109	0.048	ND	-
	C	3.574	0.123	ND	-
	D	2.969	0.042	ND	-
	E	4.258	0.067	ND	-
	F	ND	ND	ND	-
	G	1.944	0.039	ND	-
	H	ND	ND	ND	-
	I	1.044	0.016	ND	-
	J	0.420	0.009	ND	-

DE: Desviación estándar, ND: No detectado

Para 6 de las 10 granjas (Granja A, E, F, G, H e I) se detectó un incremento en la concentración del antibiótico oxitetraciclina en el efluente del biodigestor, esta persistencia puede atribuirse a que es utilizado como promotor de crecimiento, administrado en premezclas junto con el alimento de los cerdos (Gutiérrez *et al.*, 2010), este consumo diario representa una recarga constante que sobrepasa la capacidad del sistema de tratamiento para degradar los compuestos. Para el caso del sulfametoxazol también se detectó mayor concentración en el efluente; este hecho coincide con que las granjas E, H y J, son granjas de ciclo completo, donde el sulfametoxazol es administrado a los cerdos recién nacidos durante los primeros 5-7 días para la prevención de diarreas (Ballina *et al.*, 2010), y en las granjas de este tipo, los ciclos de reproducción son frecuentes, por lo que las altas dosis de sulfametoxazol son necesarias, produciendo otra

constante recarga. Por otro lado, el incremento en la concentración de enrofloxacin sólo se presenta en el efluente del biodigestor de la granja J. En el caso del único β -agonista, ractopamina, no se detectó en el efluente y podría haberse eliminado a un nivel por debajo del límite de detección, pero la posible interferencia de la ractopamina en el proceso de digestión anaeróbica aún se investiga (Santos *et al.*, 2016). Para los valores por debajo del límite de cuantificación, este método tiene certeza para la región donde se logró la calibración, y fue posible detectar a nivel semicuantitativo las concentraciones de fármacos entre el límite de detección y el límite de cuantificación (Tabla 14). Los valores por debajo del límite de detección pueden considerarse como no detectados y para dichas muestras se recomienda utilizar métodos como la cromatografía líquida. Podría considerarse que el valor de las concentraciones de estos fármacos detectados en el agua residual de las granjas es alto si se comparan con las concentraciones de fármacos comúnmente encontradas en ambientes acuáticos, que están en el intervalo de $\mu\text{g/L}$ o ng/L , pero debe tomarse en cuenta el suministro diario de antibióticos en las dietas de los cerdos (determinado por la población y el peso), la recarga continua de las aguas residuales causada por la excreción de los cerdos y la menor tasa de dilución de las aguas residuales en estas granjas, como consecuencia del menor volumen generado, en comparación con el de las aguas residuales urbanas, que tiene varias fuentes para la generación de aguas residuales.

En la Tabla 14 se muestran los coeficientes de correlación R y determinación R^2 , confirmando la linealidad del método con valores de $R > 0.99$ para todos los fármacos que fueron analizados y se determina la región de la curva donde existe una relación directa entre la señal instrumental y la concentración del analito. Adicionalmente, se muestran los límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC), los cuales corresponden a las concentraciones mínimas que el método puede detectar y cuantificar con exactitud y precisión.

Tabla 14: Coeficiente de determinación, límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC) para cada fármaco analizado en $\mu\text{g/mL}$

Fármaco	Coeficiente de correlación R	Coeficiente de determinación R^2	LDD ($\mu\text{g/mL}$)	LDC ($\mu\text{g/mL}$)
Enrofloxacin	0.999	0.999	0.133	0.403
Sulfametoxazol	0.997	0.994	2.532	7.673
Oxitetraciclina	0.999	0.998	0.149	0.450
Ractopamina	0.996	0.991	1.890	5.726

Mientras que en la Tabla 15 se muestran los porcentajes de recuperación, cuyos valores cumplen con el criterio de aceptación de $100 \pm 25\%$ y los coeficientes de variación, que cumplen con el criterio de aceptación de $\leq 3\%$ para métodos espectrofotométricos (EURACHEM, 2003; Vega, 2011), además se muestra la estabilidad de la solución según el tiempo en horas, en la cual se detecta hasta el 85% de la concentración inicial de la solución; las soluciones de sulfametoxazol, oxitetraciclina y ractopamina fueron estables durante 96 horas y la de enrofloxacin durante 120 horas, debido a estos resultados obtenidos. No se recomienda mantener las muestras almacenadas bajo ciclos de congelación y descongelación por más tiempo del indicado.

Tabla 15: Coeficiente de variación, porcentaje de recuperación y estabilidad de la solución para cada fármaco analizado

Fármaco	Concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Coeficiente de variación	Porcentaje de recuperación	Estabilidad
Enrofloxacina	0.249	1.10%	102.99%	120 h
	0.744	0.44%	116.75%	
	1.478	1.17%	102.99%	
	2.49	2.38%	106.69%	
Sulfametoxazol	7.44	1.64%	123.53%	96 h
	14.78	1.56%	123.83%	
	0.249	1.93%	120.92%	
Oxitetraciclina	0.744	2.95%	106.43%	96 h
	1.478	1.18%	102.32%	
	2.49	1.95%	104.31%	
Ractopamina	7.44	2.76%	96.89%	96 h
	14.78	2.43%	96.12%	

Debido a que el análisis de varianza es robusto para refutar la hipótesis nula de que las varianzas son iguales, la homogeneidad de las varianzas se evaluó con la prueba de Levene (Tabla 16), ya que no es sensible a la violación del supuesto de normalidad. Al nivel de significancia de 0.05, para sulfametoxazol y ractopamina, no hay diferencia estadística significativa. Para enrofloxacina y oxitetraciclina, existe una diferencia significativa, sin embargo, la información proporcionada no debe ser rechazada, y se necesitan más estudios o grupos para verificarla.

Tabla 16: Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene's para cada uno de los fármacos

Fármaco	Valor de F	Probabilidad
Enrofloxacina	2.4903	0.0749
Sulfametoxazol	1.3300	0.3076
Oxitetraciclina	4.3292	0.0112
Ractopamina	1.4774	0.2556

4.3 Análisis por voltamperometría cíclica (electroquímica)

En la Figura 12 se muestra el gráfico generado del análisis de voltamperometría cíclica para la penicilina G, se observa que, al aumentar la concentración también se incrementa la intensidad de corriente, se presenta un pico máximo de intensidad cuando alcanza 0.9 V y una curva característica en la región de 0.8 a 1.1 V, cuya forma es característica de la familia de las penicilinas (Švorc *et al.*, 2012; Dzul *et al.*, 2013), conservando el mismo comportamiento creciente en intensidad al aumentar la concentración.

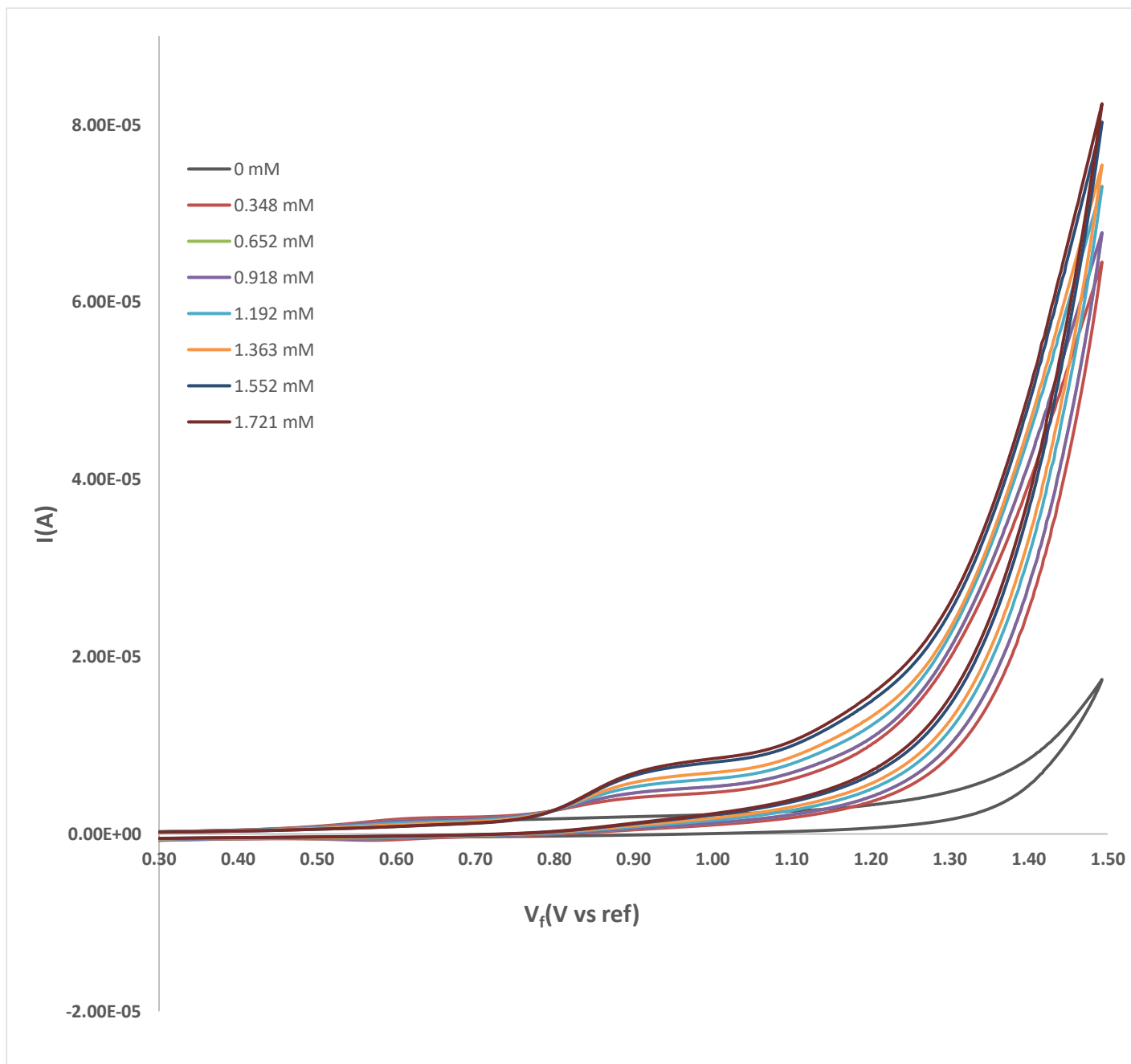


Figura 12: Gráfico de voltamperometría cíclica para penicilina G

Se utilizaron los valores del área bajo la curva en la región de 0.8 a 1.1 V para construir una curva de calibración (Figura 13) con ajuste mediante una ecuación de segundo grado ($\text{Área} = -3 \times 10^{-8}[\text{PEN}]^2 + 9 \times 10^{-7}[\text{PEN}] + 2 \times 10^{-6}$), donde se obtuvo el coeficiente de determinación $R^2 = 0.9802$ y coeficiente de correlación $R = 0.9901$.

En la lectura de las muestras de agua residual, se observó el comportamiento de la curva en el voltamograma dentro de la misma región del eje de las abscisas de 0.8 a 1.1 V, suponiendo que los cambios de intensidad de corriente se deban a la presencia de penicilina G sódica, en la muestra se calculó el área bajo la curva para determinar la concentración, como se muestra en la Tabla 17.

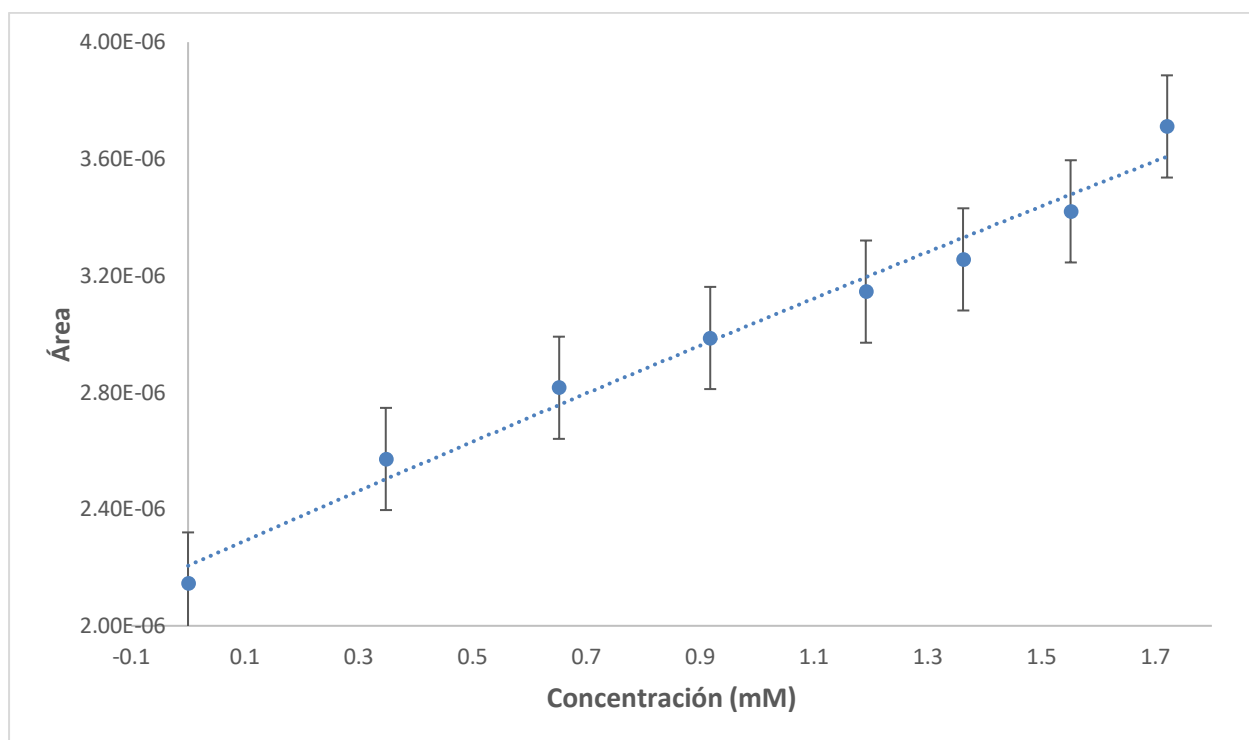


Figura 13: Curva de calibración de Penicilina G, según área bajo la curva de x=0.8 a 1.1

Tabla 17: Concentraciones de penicilina G sódica detectadas en el agua residual

Granja	Área promedio	Concentración (mM)	DE
A	2.63e-06	0.496	0.017
C	4.40e-06	2.791	0.007
E	2.34e-06	0.151	0.027
I	3.52e-06	1.609	0.021
J	3.17e-06	1.162	0.003

DE: Desviación estándar

Dado que se trató de un ajuste con una ecuación de segundo grado la cual genera dos valores de concentración, tomando como criterio de discriminación aquellos valores negativos o con valores exorbitantes.

Con esta técnica, el límite de detección resultó de 0.735 mM y el límite de cuantificación 2.450 mM, de acuerdo con la relación señal/ruido (Shrivastava y Gupta, 2011) y la estabilidad de la solución de penicilina G sódica fue de 96 horas. Se corroboró la selectividad y especificidad del método realizando mediciones con las mismas condiciones agregando soluciones de amoxicilina y neomicina como interferencias, como se observa en la Figura 14, los cambios en la curva en la región que abarca el intervalo de 0.8 a 1.1 son mínimos comparados con la curva de la solución de sólo penicilina G, lo que nos indica que fármacos de la familia de las aminopenicilinas o aminoglucósidos no tienen efecto en la señal de respuesta.

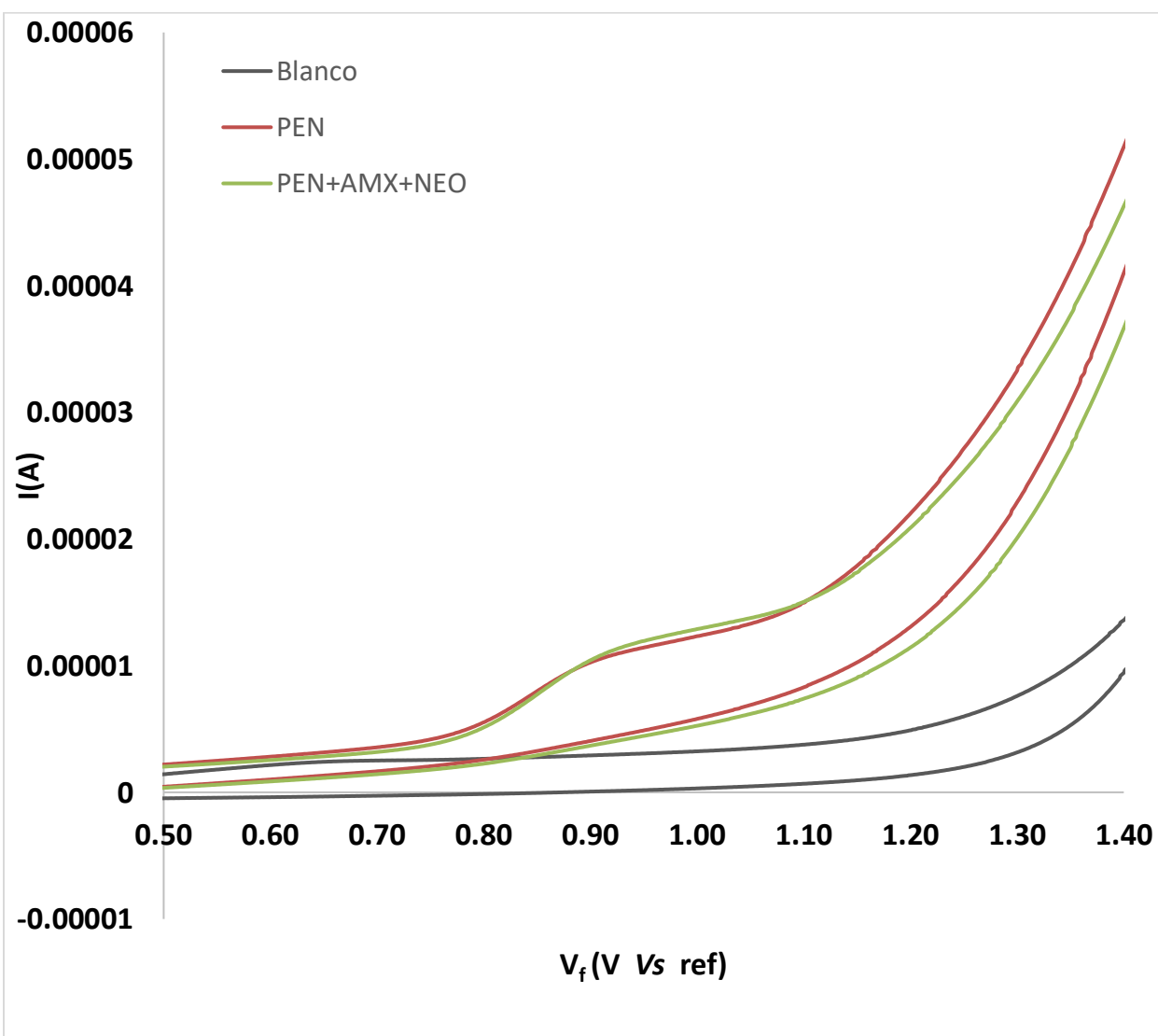


Figura 14: Gráfico de voltamperometría cíclica para penicilina G y una mezcla de penicilina G con amoxicilina y neomicina

4.4 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia

En la Tabla 18 se muestran los tiempos de retención (t_R) para cada uno de los fármacos analizados, comparando los tiempos correspondientes en los que aparecen los picos de las soluciones estándar para las curvas de calibración con los tiempos de retención promedio para la detección de los fármacos en las muestras de agua residual.

Tabla 18: Tiempos de retención de las soluciones estándar y las muestras analizadas

Fármaco	t_R curva de calibración (min)	t_R muestras (min)
Enrofloxacina	8.936	8.802
Sulfametoxazol	10.412	10.342
Oxitetraciclina	7.265	7.212
Penicilina G	7.238	7.195
Ractopamina	13.966	12.616
Neomicina	7.263	7.216

En la Tabla 19 se muestran los valores de las concentraciones detectadas en cada una de las granjas.

Tabla 19: Concentraciones de los fármacos detectadas mediante CLAE en el agua residual

Fármaco	Granja	Entrada (µg/mL)	DE	Salida (µg/mL)	DE
Enrofloxacina	A	0.016	0.022	ND	--
	B	0.016	0.031	ND	--
	C	0.014	0.032	ND	--
	D	0.020	0.032	0.016	0.060
	E	0.020	0.047	0.020	0.071
	F	ND	--	ND	--
	G	ND	--	ND	--
	H	ND	--	ND	--
	I	ND	--	ND	--
	J	0.022	0.058	0.022	0.070
Oxitetraciclina	A	0.036	0.068	0.050	0.056
	B	ND	--	ND	--
	C	0.010	0.059	ND	--
	D	0.029	0.0867	0.021	0.075
	E	0.023	0.046	0.060	0.045
	F	0.028	0.029	0.024	0.082
	G	ND	--	ND	--
	H	ND	--	ND	--
	I	0.016	0.066	0.076	0.051
	J	0.077	0.052	0.028	0.073

DE: Desviación estándar, ND: No detectado, MeCN: Acetonitrilo, MeOH: Metanol

Tabla 19 (Continuación): Concentraciones de los fármacos detectadas mediante CLAE en el agua residual

Fármaco	Granja	Entrada (µg/mL)	DE	Salida (µg/mL)	DE
Sulfametoxazol	A	0.055	0.024	0.010	0.036
	B	0.128	0.006	0.016	0.041
	C	0.036	0.022	0.019	0.028
	D	0.093	0.010	0.035	0.028
	E	0.012	0.039	0.014	0.038
	F	0.176	0.005	0.089	0.006
	G	0.019	0.035	0.020	0.026
	H	0.041	0.030	0.051	0.024
	I	0.047	0.021	0.040	0.032
	J	ND	--	ND	--
Ractopamina	A	0.045	0.046	0.006	0.177
	B	0.007	0.224	ND	--
	C	0.061	0.029	0.003	0.073
	D	ND	--	ND	--
	E	0.074	0.023	0.008	0.065
	F	0.030	0.037	0.002	0.122
	G	ND	--	ND	--
	H	ND	--	ND	--
	I	0.043	0.026	ND	--
	J	0.011	0.138	ND	--

DE: Desviación estándar, ND: No detectado, MeCN: Acetonitrilo, MeOH: Metanol

Tabla 19 (Continuación): Concentraciones de los fármacos detectadas mediante CLAE en el agua residual

Fármaco	Granja	Entrada (µg/mL)	DE	Salida (µg/mL)	DE
Penicilina G	A	0.062	0.026	0.044	0.045
	B	ND	--	ND	--
	C	0.018	0.054	0.015	0.035
	D	ND	--	ND	--
	E	0.043	0.077	0.023	0.040
	F	ND	--	ND	--
	G	ND	--	ND	--
	H	ND	--	ND	--
	I	0.008	0.051	0.018	0.051
	J	0.020	0.031	0.019	0.026
Neomicina	A	0.079	0.150	0.056	0.097
	B	ND	--	ND	--
	C	0.109	0.073	0.056	0.079
	D	0.133	0.086	0.131	0.098
	E	ND	--	ND	--
	F	0.063	0.162	0.111	0.049
	G	0.072	0.053	0.110	0.212
	H	ND	--	ND	--
	I	0.106	0.137	0.089	0.084
	J	ND	--	ND	--

DE: Desviación estándar, ND: No detectado, MeCN: Acetonitrilo, MeOH: Metanol

Con esta técnica cromatográfica se detectó concentración residual de enrofloxacin en el efluente de 30% de las granjas. Para el caso de oxitetraciclina (granjas A, E, I) y sulfametoxazol (granjas E, G, H) la concentración detectada a la salida del biodigestor fue mayor que la detectada en el cárcamo de recolección. Aunque se trata de muestras diferentes de las mismas granjas, en diferentes épocas, en este caso se detectó concentración residual de ractopamina en el efluente de 4 granjas (A, C, E, F), porque no se detectó en fluorescencia. Para los antibióticos que no habían sido analizados con espectrofotometría de fluorescencia, debido a su baja respuesta (intensidad de emisión) como penicilina G y neomicina, éstos fueron detectados en el agua residual de la salida del biodigestor, la penicilina G en el 50% de las granjas y la neomicina en 60% de éstas (con concentración mayor en efluente de F, G, I). La recarga constante junto con la mala operación del sistema de tratamiento y el efecto inhibitorio de los antibióticos en la

actividad microbiana del proceso anaerobio pueden ser los responsables de la presencia de antibióticos en los efluentes.

En la Tabla 20, se muestran los coeficientes de correlación R y determinación R², confirmando la linealidad del método y se determina la región de la curva en que hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del analito para aquellos fármacos cuyo valor $R \geq 0.99$, también se muestran los límites de detección y cuantificación del método. los cuales corresponden a las concentraciones mínimas que el método puede detectar y cuantificar con exactitud y precisión. Mientras que en la Tabla 21 se muestran los porcentajes de recuperación, donde se observa que todos los fármacos cumplen con el criterio de aceptación de $100 \pm 25\%$ y sólo los coeficientes de variación de sulfametoxazol y enrofloxacin cumplen con el criterio de aceptación de $\leq 2-3\%$ para métodos cromatográficos, para los fármacos que no cumplen con este criterio de aceptación, su respuesta mejora con concentraciones mayores.

Tabla 20: Coeficiente de determinación, límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC) para cada fármaco analizado en $\mu\text{g/mL}$

Fármaco	Coeficiente de correlación R	Coeficiente de determinación R ²	LDD ($\mu\text{g/mL}$)	LDC ($\mu\text{g/mL}$)
Enrofloxacin	0.9981	0.9964	0.2394	0.7254
Oxitetraciclina	0.9939	0.9878	1.0974	3.3254
Sulfametoxazol	0.9999	0.9999	0.0114	0.0346
Ractopamina	0.9826	0.9913	2.1616	6.5503
Penicilina G	0.9842	0.9921	1.0506	3.1836
Neomicina	0.9854	0.9926	0.9369	2.8391

LDD: Límite de detección, LDC: Límite de cuantificación

Tabla 21: Coeficiente de variación y porcentaje de recuperación para cada fármaco

Fármaco	Concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Coeficiente de variación	Porcentaje de recuperación
	3.5	1.73%	102.13%
Enrofloxacina	8.5	1.19%	95.91%
	13.5	4.99%	103.23%
	5	6.81%	91.42%
Oxitetraciclina	10	2.98%	86.99%
	15	5.29%	101.43%
	2.5	1.090%	95.93%
Sulfametoxazol	7.5	0.506%	99.44%
	12.5	0.265%	99.36%
	3.5	19.049%	106.17%
Ractopamina	8.5	21.897%	90.14%
	13.5	2.274%	104.94%
	3.5	23.212%	89.52%
Penicilina G	8.5	8.197%	106.05%
	13.5	4.523%	94.82%
	5	22.430%	57.95%
Neomicina	10	6.514%	70.90%
	15	5.135%	86.32%

Por falta de disponibilidad del equipo para esta técnica, no se pudieron realizar las pruebas para estabilidad de las soluciones e interferencias de la matriz.

Debido a que el análisis de varianza es robusto para refutar la hipótesis nula de que las varianzas son iguales, la homogeneidad de las varianzas se evaluó con la prueba de Levene (Tabla 22), ya que no es sensible a la violación del supuesto de normalidad. Al nivel de significancia de 0.05, para sulfametoxazol, oxitetraciclina, ractopamina, penicilina G y neomicina no hay diferencia estadística significativa. Para enrofloxacina,

existe una diferencia significativa, sin embargo, la información proporcionada no debe ser rechazada, y se necesitan más estudios o grupos para verificarla. No hay relación entre codependencia entre los errores y las concentraciones.

Tabla 22: Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene's para cada uno de los fármacos

Fármaco	Valor de F	Probabilidad
Enrofloxacina	3.2398	0.0442
Sulfametoxazol	1.6558	0.2195
Oxitetraciclina	1.9842	0.1535
Ractopamina	2.8757	0.0621
Penicilina G	1.1808	0.3741
Neomicina	1.6615	0.2182

4.5 Análisis de la remoción de fármacos mediante humedales construidos

En la Tabla 23 se muestran los resultados de las pruebas de la caracterización del material de soporte, las propiedades físicas del suelo obtenidas en las pruebas indican que esta roca caliza no tiene un comportamiento favorable en cuestiones de construcción, debido a su falta de resistencia. Cabe recalcar que no existen características estándar que deba tener un material para actuar como soporte sólido en un humedal, los valores dependen del diseño del humedal, también hay que considerar que éstos son humedales a pequeña escala y pueden utilizar soportes de menor tamaño a los comúnmente usados. Este tamaño de partícula, junto con su permeabilidad y porosidad son ideales para proporcionar mayor área superficial para la actividad microbiana y la adsorción (Delgadillo *et al.*, 2010). Hay que hacer hincapié que la roca caliza es un material abundante en Yucatán, que es más poroso y permeable que las rocas en otros lugares, es más viable económicamente para fines de instalación de humedales en las granjas, que traer materiales de otras regiones.

Tabla 23: Caracterización de la roca caliza como material de soporte de los humedales construidos

Parámetros	Arena	Grava
Tamaño de partícula (mm)	0.88 – 2.1	2.2-6
Peso específico (g/cm ³)	1.210	1.183
Gravedad específica de sólidos Ss	2.62	2.17
Porosidad efectiva	16% media	16% media
Coefficiente de permeabilidad (cm/s)	1.0x10 ⁻²	1.88x10 ⁻²

Durante el periodo de adaptación de las plantas con agua residual porcícola, para el caso de las typhas se observó un mayor crecimiento en las unidades con grava y para los papiros en las unidades con arena. Este crecimiento mayor de las typhas en las gravas se debe a que su raíz, de tipo tuberosa (Figura 15a), es más grande y es más fácil que crezca entre los espacios de las gravas, en comparación con la raíz del papiro, de tipo fasciculada (Figura 15b), que es pequeña, se enreda y puede crecer mejor en las arenas. Las mediciones de este crecimiento se muestran en la Tabla 24. El crecimiento se midió durante los tres meses de adaptación, después de un mes de experimentos, los papiros se mantuvieron casi del mismo tamaño los meses siguientes.

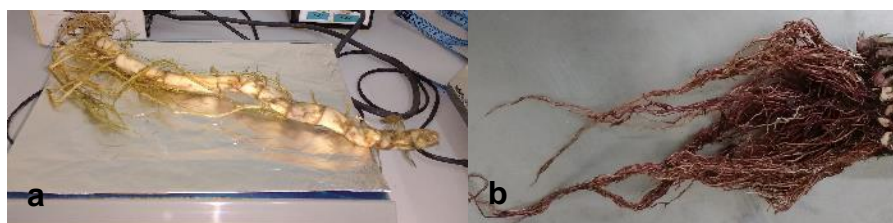


Figura 15: Raíces de *Typha latifolia* y *Cyperus papyrus*

Tabla 24: Monitoreo del crecimiento de las plantas de los humedales durante el periodo de adaptación con agua residual porcícola

Planta/Soporte	Crecimiento (cm)	Porcentaje de crecimiento
Typha/mezcla	69	39.80%
Typha/grava	106.5	50.95%
Typha/arena	84	40.57%
Papiro/mezcla	73.5	48.51%
Papiro/grava	51	44.73%
Papiro/arena	75	57.69%

A continuación, se muestran los resultados de la remoción de cada uno de los fármacos, expresados como porcentaje, en cada una de las unidades del sistema de humedales construidos. En la Tabla 25 se muestran los valores obtenidos mediante espectrofotometría de fluorescencia (EF), mientras que en la Tabla 26, los resultados por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Se señala con negritas el mayor porcentaje de remoción para cada uno de los fármacos. En el caso de enrofloxacin, la mayor remoción se obtuvo en las unidades con *Typha latifolia* y arena como soporte, con valores de 89.89% y 89.01% medidos por EF y CLAE, respectivamente; para oxitetraciclina, ocurrió en las unidades con arena y *Cyperus papyrus*, alcanzado hasta 97.28% y 97.65% de remoción; para sulfametoxazol se obtuvo 75.07% de remoción, medido por EF y 85.39% por CLAE en las unidades con *Typha latifolia* y mezcla o arena; con la ractopamina, 97.81% y 95.92%, respectivamente, utilizando *Typha latifolia* y arena y finalmente, para la penicilina G, que sólo fue posible medir la remoción mediante CLAE, se obtuvo hasta 95% con *Typha latifolia* y arena. En general, se observó una mayor remoción de todos los fármacos, en las unidades que contienen arena o mezcla como soporte sólido, la cual se incrementó con el tiempo de permanencia, esto es debido a que este tipo de soporte proporciona una mayor área superficial para los procesos de adsorción y la degradación microbiana (García Ocaña *et al.*, 2007; Delgadillo *et al.*, 2010); aunque la diversidad y los mecanismos de degradación microbiana no fueron estudiados, también se descartaron otras variables como la evaporación y la evapotranspiración, pH y temperatura. Aunque es poca la diferencia, en las unidades con plantas se registró una remoción promedio mayor que en los controles del 6.4 % medido por EF y del 9.5% por CLAE, por lo que, no se puede descartar el efecto de la planta, pero puede considerarse que este efecto ocurre gracias al incremento en el área superficial debido a sus raíces (Cervantes *et al.*, 2017; Morales *et al.*, 2013). De esta manera, este estudio demuestra que los humedales construidos representan una buena alternativa para la remoción de fármacos de las aguas residuales porcícolas, pero debido a que fueron pocos los parámetros de diseño y variables considerados para este trabajo, se recomienda conocer con mayor precisión los procesos que ocurren en el sistema, para lo cual se requiere evaluar a detalle otros procesos, como los mecanismos de sorción en el soporte y rizosferas, la distribución hidráulica en el sistema, las

comunidades de microorganismos con las dos especies de plantas y el control, entre otros procesos que en conjunto, contribuyen a que se logre una mayor eficiencia de remoción.

Tabla 25: Valores promedio de porcentaje de remoción y desviación estándar, medidos mediante EF, según tiempo de permanencia para cada de las unidades

Fármaco/Tiempo	TG	TM	TA	PG	PM	PA	CG	CM	CA
ENR									
24 h	85.13%	85.23%	85.34%	82.93%	84.00%	84.89%	83.14%	83.85%	84.11%
	±0.0005	±0.0012	±0.0006	±0.0003	±0.0009	±0.0005	±0.0006	±0.0013	±0.0006
48 h	85.84%	86.23%	86.70%	84.09%	84.44%	85.79%	84.04%	85.01%	85.91%
	±0.0004	±0.0009	±0.0003	±0.0006	±0.0004	±0.0007	±0.0004	±0.0004	±0.0005
72 h	86.96%	87.09%	87.66%	85.79%	86.94%	86.59%	84.15%	85.50%	85.87%
	±0.0007	±0.0008	±0.0007	±0.0011	±0.0004	±0.0002	±0.0005	±0.0005	±0.0006
96 h	89.09%	89.11%	89.89%	86.87%	87.34%	87.70%	85.68%	86.99%	86.68%
	±0.0006	±0.0009	±0.0008	±0.0005	±0.0005	±0.0004	±0.0011	±0.0011	±0.0005
OXT									
24 h	80.50%	80.95%	82.45%	82.01%	85.64%	82.35%	76.11%	78.89%	81.33%
	±0.0434	±0.0252	±0.0250	±0.0103	±0.00792	±0.0083	±0.0269	±0.0328	±0.0318
48 h	84.93%	86.83%	86.67%	85.60%	89.63%	87.06%	84.86%	85.08%	85.96%
	±0.0233	±0.0277	±0.0507	±0.0275	±0.0191	±0.0289	±0.0385	±0.0272	±0.0276
72 h	85.17%	86.68%	86.60%	85.70%	87.63%	87.84%	85.42%	86.27%	87.35%
	±0.0331	±0.0119	±0.0105	±0.0173	±0.0304	±0.0259	±0.0209	±0.0296	±0.0512
96 h	95.59%	96.91%	97.14%	95.54%	97.06%	97.28%	94.20%	95.34%	94.91%
	±0.0431	±0.0221	±0.0247	±0.0414	±0.0509	±0.0080	±0.0317	±0.0144	±0.0405
SMX									
24 h	42.80%	46.43%	47.38%	40.60%	43.55%	45.48%	36.89%	38.41%	40.50%
	±0.1051	±0.2061	±0.0291	±0.2930	±0.2947	±0.3125	±0.3484	±0.1662	±0.2863
48 h	52.55%	51.94%	58.21%	52.42%	54.53%	55.20%	52.62%	54.16%	52.99%
	±0.1542	±0.1147	±0.0442	±0.1207	±0.1069	±0.0571	±0.0808	±0.0907	±0.0272
72 h	61.44%	64.92%	62.34%	60.87%	61.71%	63.92%	53.96%	58.95%	60.48%
	±0.0671	±0.1169	±0.0879	±0.0857	±0.2403	±0.1329	±0.2204	±0.2033	±0.1672
96 h	71.33%	75.07%	75.00%	70.29%	72.94%	74.19%	64.99%	72.57%	69.82%
	±0.1851	±0.1964	±0.1365	±0.2113	±0.0772	±0.0964	±0.1645	±0.4023	±0.1475
RAC									
24 h	75.80%	78.21%	80.48%	72.40%	75.61%	77.07%	70.62%	71.97%	71.91%
	±0.0484	±0.0622	±0.0637	±0.0531	±0.0511	±0.0350	±0.0180	±0.0340	±0.0376
48 h	84.49%	84.68%	84.55%	82.67%	84.72%	86.34%	79.63%	82.73%	83.12%
	±0.0454	±0.0355	±0.0142	± 0.0618	±0.0383	±0.0766	±0.0481	±0.0561	±0.0619
72 h	90.76%	93.64%	93.32%	88.13%	91.28%	91.94%	86.12%	87.39%	88.69%
	±0.0271	±0.0316	±0.0651	±0.0289	±0.0531	±0.0424	±0.0444	±0.0210	±0.0416
96 h	95.46%	97.56%	97.81%	91.78%	96.54%	94.87%	89.47%	93.39%	93.95%
	±0.0597	±0.0487	±0.0388	±0.0388	±0.0642	±0.0404	±0.0465	±0.0704	±0.0454

ENR: enrofloxacin, OXT: oxitetraciclina, RAC: ractopamina, SMX: sulfametoxazol, T: typha, O: papiro, C: control, G: grava, M: mezcla, A: arena, EF: espectrofotometría de fluorescencia

Tabla 26: Valores promedio de porcentaje de remoción y desviación estándar, medidos mediante CLAE, según tiempo de permanencia para cada de las unidades

Fármaco/Tiempo	TG	TM	TA	PG	PM	PA	CG	CM	CA
ENR									
24 h	66.24%	69.87%	71.85%	63.74%	68.11%	70.71%	62.17%	67.35%	71.55%
	±0.0114	±0.0122	±0.0570	±0.0803	±0.0101	±0.0924	±0.0633	±0.0757	±0.0863
48 h	73.02%	75.93%	76.72%	71.41%	74.86%	75.47%	68.91%	71.83%	73.36%
	±0.0649	±0.0808	±0.0396	±0.0584	±0.0774	±0.0141	±0.0120	±0.0149	±0.0778
72 h	83.57%	83.73%	84.49%	83.34%	83.31%	83.87%	78.63%	80.87%	81.13%
	±0.0107	±0.0252	±0.0802	±0.0586	±0.0118	±0.0216	±0.0415	±0.0101	±0.0749
96 h	87.03%	87.28%	89.01%	84.44%	85.38%	86.76%	81.97%	84.23%	85.70%
	±0.0603	±0.0998	±0.0946	±0.0166	±0.0139	±0.0925	±0.0727	±0.0989	±0.0158
OXT									
24 h	74.03%	81.20%	81.94%	79.81%	82.31%	82.60%	75.44%	78.66%	78.26%
	±0.0112	±0.0780	±0.0112	±0.0474	±0.0779	±0.0142	±0.0583	±0.0950	±0.1334
48 h	78.78%	82.54%	82.38%	82.49%	89.33%	87.32%	79.30%	81.47%	84.13%
	±0.0960	±0.0112	±0.0579	±0.0721	±0.0114	±0.0822	±0.0124	±0.0908	±0.0588
72 h	85.59%	87.38%	85.12%	86.19%	93.98%	89.46%	85.07%	91.43%	87.53%
	±0.0926	±0.0985	±0.0873	±0.0979	±0.0969	±0.0698	±0.0117	±0.0761	±0.0298
96 h	91.57%	93.47%	95.54%	94.27%	96.04%	97.65%	87.71%	91.51%	91.02%
	±0.0114	±0.0448	±0.0932	±0.0532	±0.0964	±0.0145	±0.0116	±0.0420	±0.0981
SMX									
24 h	55.38%	60.26%	57.92%	60.04%	60.48%	60.18%	50.99%	50.76%	52.41%
	±0.0193	±0.0322	±0.0677	±0.0173	±0.0568	±0.0427	±0.1407	±0.1272	±0.0683
48 h	65.74%	68.00%	68.15%	66.57%	65.97%	66.76%	65.87%	65.54%	66.53%
	±0.1060	±0.1578	±0.0973	±0.1478	±0.1132	±0.0777	±0.0713	±0.1377	±0.0589
72 h	79.87%	79.58%	76.97%	73.46%	79.88%	71.85%	74.61%	70.75%	75.19%
	±0.1096	±0.0643	±0.1318	±0.0958	±0.0166	±0.0984	±0.0077	±0.1075	±0.1467
96 h	78.98%	83.05%	85.39%	73.91%	76.84%	74.57%	78.03%	75.80%	73.54%
	±0.0626	±0.0369	±0.0423	±0.0345	±0.0523	±0.0870	±0.0432	±0.0746	±0.0174
RAC									
24 h	64.53%	66.40%	69.94%	63.76%	67.18%	69.62%	66.11%	64.84%	66.11%
	±0.0319	±0.0416	±0.0319	±0.0470	±0.0411	±0.0294	±0.0259	±0.0276	±0.0508
48 h	73.92%	75.21%	77.67%	72.54%	73.28%	74.14%	81.47%	72.05%	81.47%
	±0.0160	±0.0055	±0.0065	±0.0184	±0.0105	±0.0140	±0.0173	±0.0159	±0.0097
72 h	83.22%	83.14%	87.14%	80.16%	79.68%	82.76%	78.69%	81.39%	78.69%
	±0.0321	±0.0181	±0.0254	±0.0117	±0.0083	±0.0170	±0.0009	±0.0092	±0.0052
96 h	90.65%	93.24%	95.92%	90.07%	90.28%	92.38%	89.46%	87.17%	89.46%
	±0.0495	±0.1030	±0.0924	±0.0457	±0.0554	±0.0394	±0.0198	±0.0418	±0.1244
PEN									
24 h	72.18%	73.91%	79.47%	65.69%	67.19%	71.40%	62.05%	62.12%	62.05%
	±0.0182	±0.0145	±0.0139	±0.1584	±0.1396	±0.1086	±0.1680	±0.0178	±0.0160
48 h	76.61%	78.51%	78.67%	78.05%	77.02%	80.02%	77.78%	76.24%	77.78%
	±0.0139	±0.0918	±0.0134	±0.0152	±0.0152	±0.0117	±0.0156	±0.0130	±0.0179
72 h	84.40%	87.07%	91.76%	83.10%	83.34%	83.85%	78.69%	79.25%	78.69%
	±0.0292	±0.0115	±0.0120	±0.0113	±0.0123	±0.0810	±0.0146	±0.0195	±0.0148
96 h	90.22%	90.43%	95.00%	89.43%	89.39%	94.11%	85.31%	89.49%	87.31%
	±0.0627	±0.0140	±0.0953	±0.0515	±0.0155	±0.0229	±0.0211	±0.0132	±0.0798

ENR: enrofloxacin, OXT: oxitetraciclina, RAC: ractopamina, SMX: sulfametoxazol, PEN: Penicilina, T: typha, P: papiro, C: control, G: grava, M: mezcla, A: arena, CLAE: cromatografía líquida de alta eficiencia

En las Figura 16 se muestran las gráficas más representativas comparando el porcentaje de remoción, y por consiguiente la disminución de la concentración inicial, de cada uno de los fármacos conforme transcurre el tiempo de permanencia en el humedal de acuerdo con el tipo de planta, y en la Figura 17, de acuerdo con el tipo de soporte. Como se mencionó anteriormente, ocurrió una mayor remoción en las unidades con plantas sobre los controles sin plantas, esto ya ha sido demostrado en estudios anteriores con humedales construidos a escala utilizados para el tratamiento de aguas residuales que contienen contaminantes emergentes, como fármacos de uso humano y veterinario (Cervantes *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2014; Navarro *et al.*, 2014). Las plantas en los humedales construidos juegan un papel importante en la absorción directa de muchos contaminantes orgánicos en aguas residuales, aunque no se conoce el mecanismo de fitodegradación específico para los fármacos, ya que depende de las características fisicoquímicas de los compuestos, incluidos: coeficiente de reparto, la hidrofobicidad, y concentración (Carvalho, 2013). El soporte sólido es importante para el crecimiento de las plantas y los microorganismos, pero también interactúa directamente con los contaminantes a través de los procesos de sorción, que puede ocurrir a través de diferentes mecanismos, aún existe muy poca información disponible sobre la comprensión integral del rendimiento de sorción y los mecanismos asociados para la eliminación de fármacos de las aguas residuales utilizando humedales (Li *et al.*, 2014). Lo que sí existe, es un consenso general entre investigadores de que los humedales construidos tienen un gran potencial de ser utilizados como un sistema de tratamiento de aguas residuales complementario para la eliminación de fármacos y para el caso de las comunidades pequeñas o rurales, resulta ventajoso la utilización de materiales de soporte y plantas que se encuentren disponibles en la región, disminuyendo los costos del transporte, construcción, operación y mantenimiento, favoreciendo la sustentabilidad de los humedales construidos como sistema de tratamiento en comparación con otras alternativas (Herrera-Cárdenas *et al.*, 2015; García-Ocaña *et al.*, 2019).

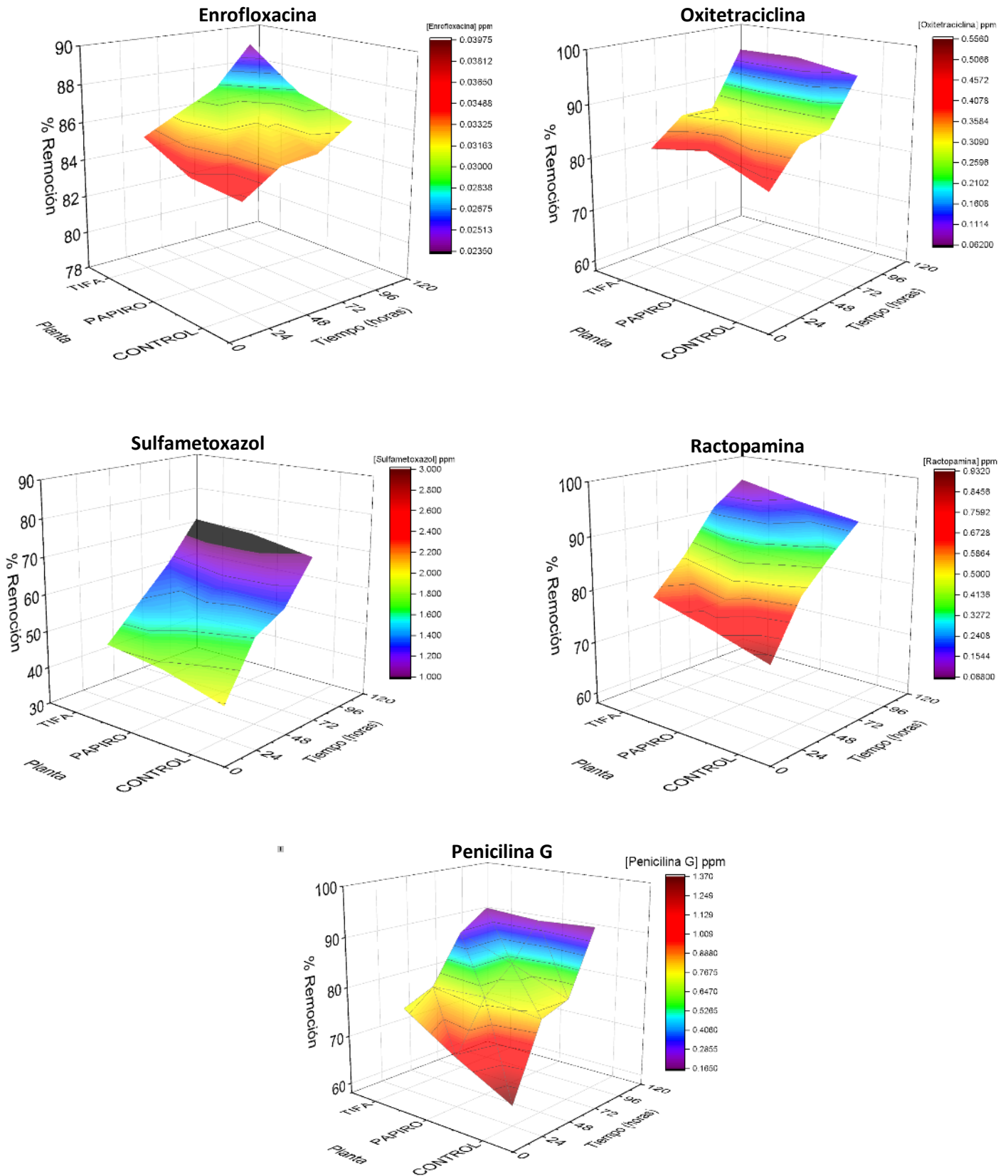


Figura 16: Porcentaje de remoción para cada fármaco con respecto al tiempo permanencia de acuerdo con el tipo de planta

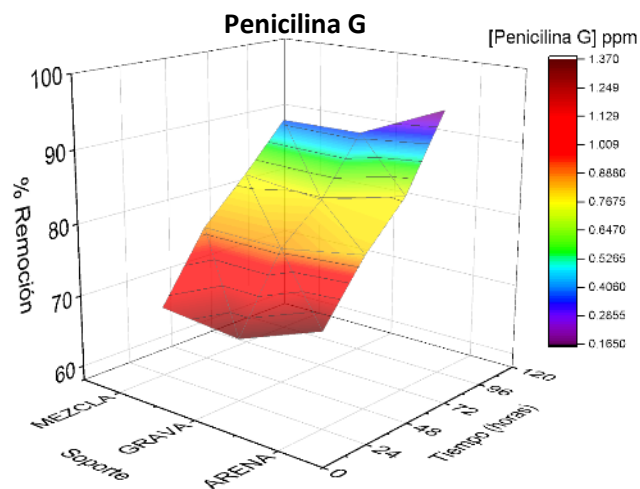
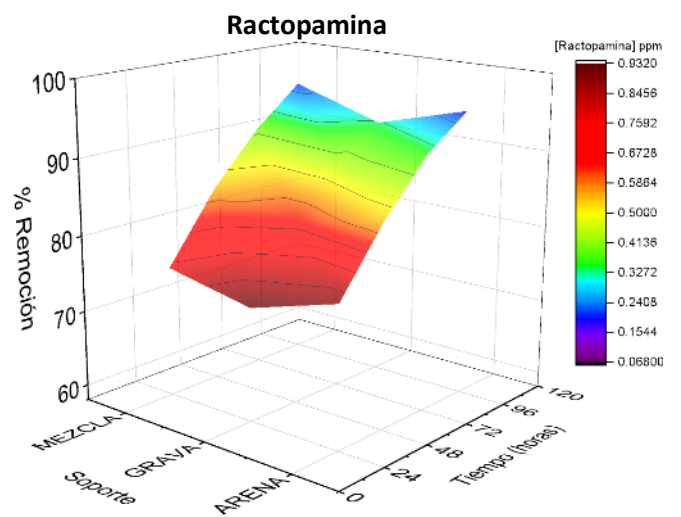
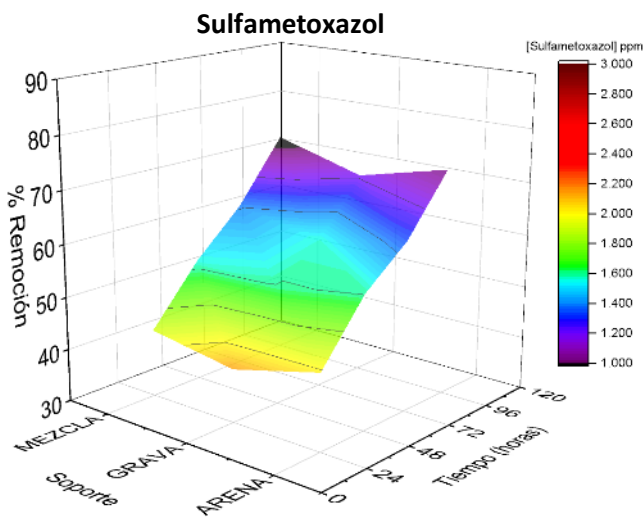
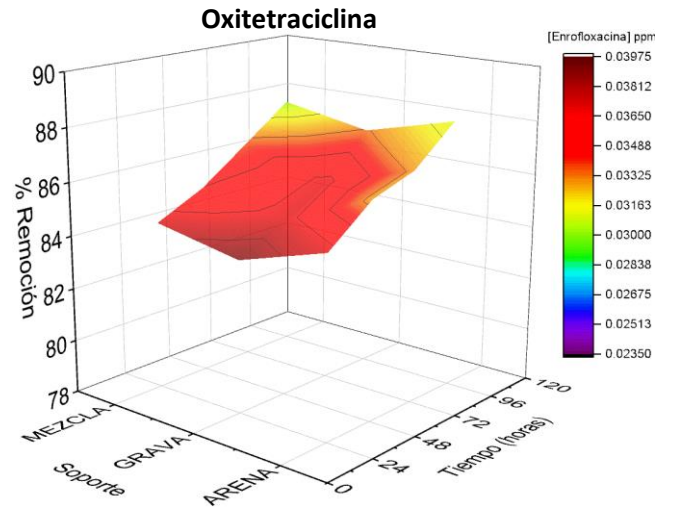
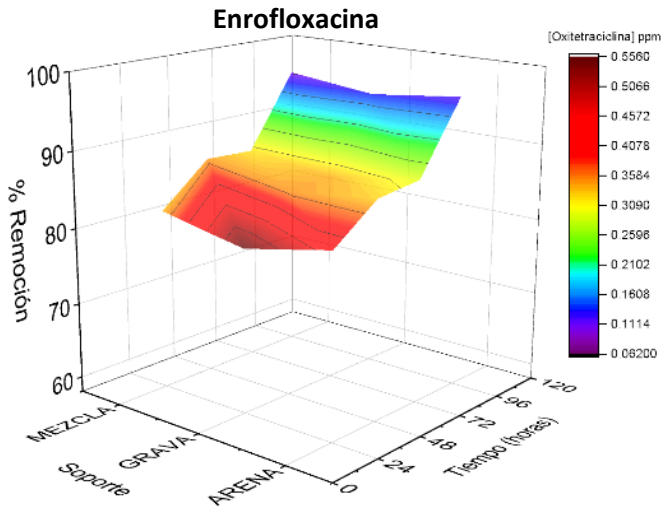


Figura 17: Porcentaje de remoción para cada fármaco con respecto al tiempo permanencia de acuerdo con el tipo de soporte

A manera de comparación, en la Tabla 27 se muestran los porcentajes de remoción de los mismos fármacos veterinarios seleccionados para este estudio, que han sido reportados por otros autores, utilizando diferentes sistemas de humedales construidos. Claramente se observa que los porcentajes de remoción reportados en trabajos previos son muy próximos a los calculados en este estudio, independientemente de los tipos de plantas y de soportes utilizados. Aunque son pocos los trabajos sobre el uso de humedales construidos para la remoción de fármacos de uso veterinario, se confirma una vez más, su eficiencia como sistema de tratamiento, donde la información todavía es muy limitada como para poder determinar cuál sistema es mejor, debido a que hay una variación extensa en la selección de parámetros de diseño y estos dependen en gran medida del tipo de compuestos y agua residual a tratar.

Tabla 27: Remoción reportada para los fármacos señalados utilizando diversos tipos de plantas y soportes sólidos

Compuesto	Remoción máxima (este estudio)	Remoción máxima reportada	Dimensión del humedal, tipos de plantas y soportes	Referencia
Enrofloxacina	89.89%	94%	0.4 x 0.3 x 0.3 m, <i>Phragmites australis</i> , grava de roca volcánica	Carvalho <i>et al.</i> , 2013
Sulfametoxazol	85.39%	95.8%	1.5 x 1.0 x 1.0 m, <i>Miscanthus giganteus</i> , <i>Iris pseudacorus</i> , grava de ceramita y arena de cuarzo	Sochacki <i>et al.</i> , 2018
Oxitetraciclina	97.65%	92.7%-99.9%	0.4 m de diámetro x 0.8 m de altura, <i>Phragmites australis</i> , ladrillo y concha de ostra	Huang <i>et al.</i> , 2017
Ractopamina		No se ha reportado su remoción mediante humedales construidos		
Penicilina G		No se ha reportado su remoción mediante humedales construidos		

4.5.1 Análisis estadístico de los humedales construidos

Con la prueba de Kolmogorov-Smirnov se verificó que los resultados provienen de una distribución normal (Anexo 2), así que se procedió con el análisis de varianza. De acuerdo con la Tabla 28, se determinó que cada uno de los factores (planta, soporte y tiempo de permanencia) tiene un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) sobre la remoción para todos los fármacos, sin embargo, no ocurre lo mismo para las

interacciones, donde sólo la interacción entre planta y tiempo de permanencia tiene un efecto estadísticamente significativo en la remoción enrofloxacina y penicilina G.

Tabla 28: Análisis de varianza multifactorial para los datos de remoción de cada uno de los fármacos en los humedales construidos

Variable de respuesta:	ENR		OXT		SMX		RAC		PEN	
% de remoción	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Efectos principales										
Planta	121.14	0.0000	21.25	0.0002	22.65	0.0001	44.93	0.0013	56.08	0.0000
Soporte	114.91	0.0000	19.35	0.0005	16.39	0.0004	25.32	0.0004	22.30	0.0001
Tiempo	1381.03	0.0000	253.75	0.0000	490.03	0.0000	518.45	0.0000	448.51	0.0000
Interacciones										
Planta-Soporte	3.63	0.0527	0.965	0.5679	0.37	0.8247	0.47	0.7592	1.70	0.2136
Planta-Tiempo	10.03	0.0024	2.32	0.1034	1.81	0.1789	2.87	0.0576	15.62	0.0000
Soporte-Tiempo	11.78	0.2654	0.96	0.5642	0.71	0.6495	0.63	0.7023	1.37	0.3029

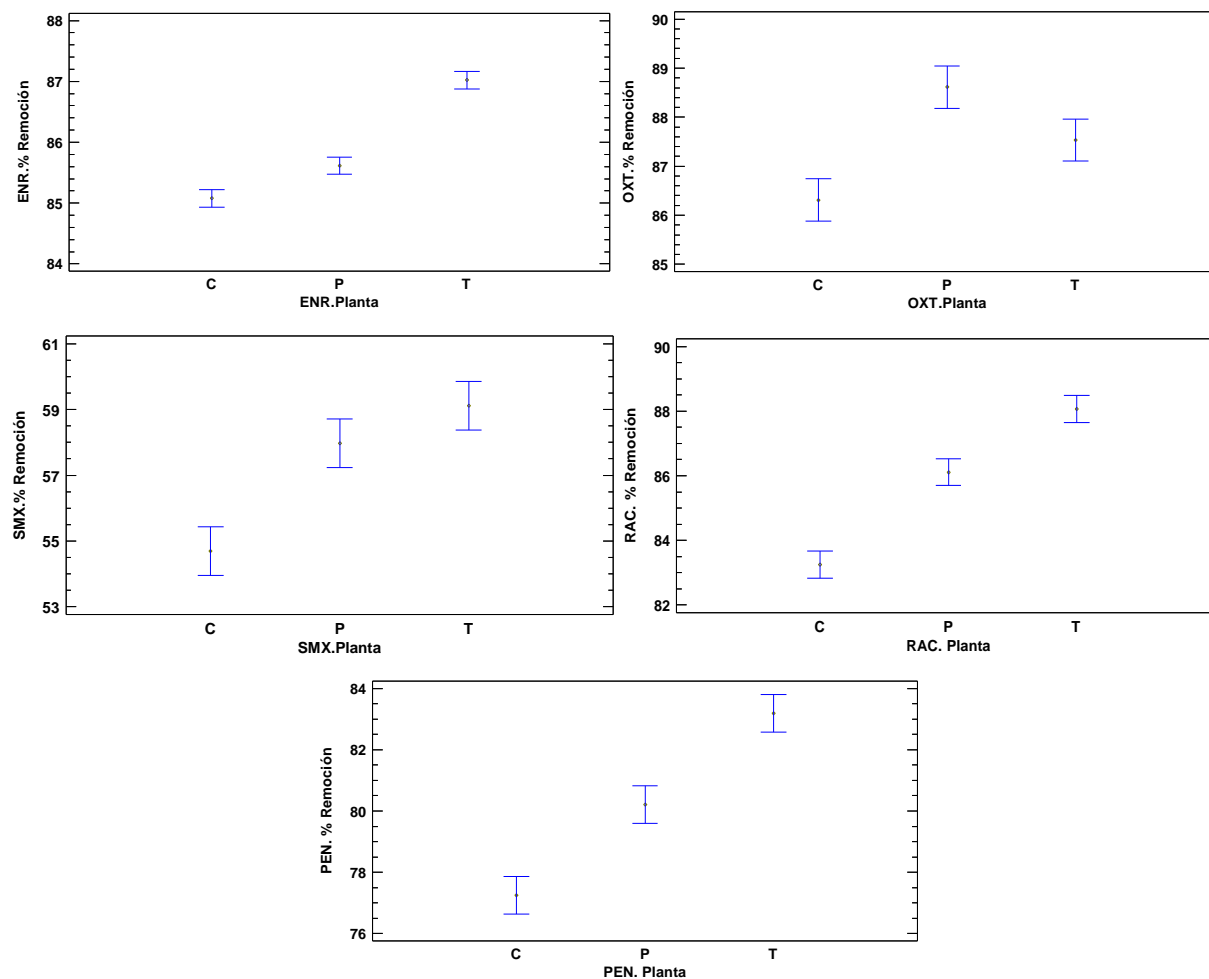
ENR: enrofloxacina, OXT: oxitetraciclina, RAC: ractopamina, SMX: sulfametoxazol, PEN: penicilina

En la Tabla 29 se muestran los resultados de la prueba de rangos múltiples empleando el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con el que se determinó cuáles medias son significativamente diferentes de otras. En la Figuras 18 y 19 se incluyen las gráficas de medias y de interacciones para la interpretación de los efectos significativos de acuerdo con tipo de planta y soporte, respectivamente. En el Anexo 3, se encuentran las gráficas de residuos para comprobar si los datos han violado los supuestos subyacentes al análisis de varianza.

Tabla 29: Pruebas de rango múltiple por el método LSD de Fisher

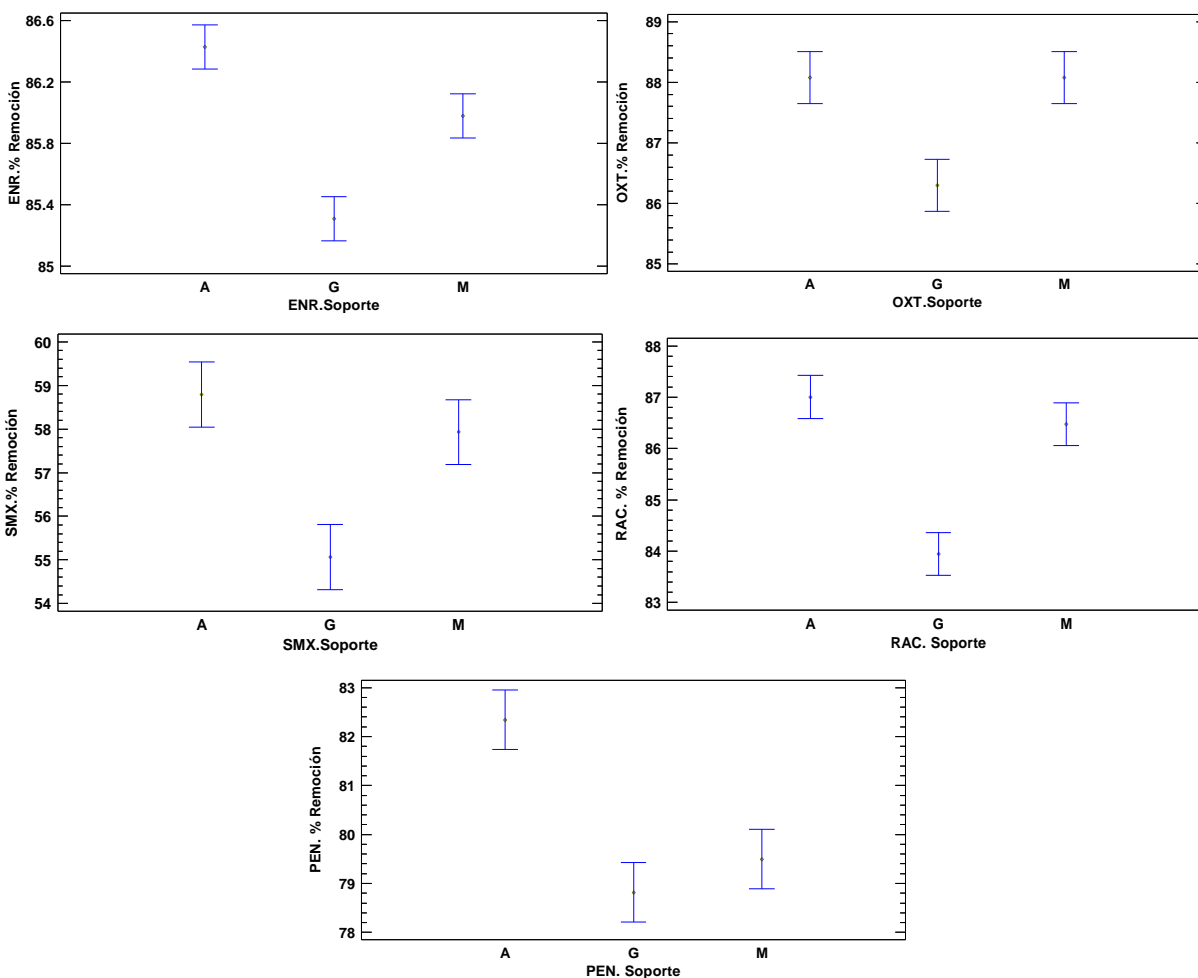
Grupos homogéneos	ENR	OXT	SMX	RAC	PEN
Por planta					
Control	x	x	x	x	x
Papiro	x	x	x	x	x
Typha	x	x	x	x	x
Contrastes					
Control-Papiro	*	*	*	*	*
Control-Typha	*	*	*	*	*
Papiro-Typha	*	*	*	*	*
Por soporte					
Grava	x	x	x	x	x
Mezcla	x	x	x	x	x
Arena	x	x	x	x	x
Contraste					
Grava-Mezcla	*	*	*	*	*
Grava-Arena	*	*	*	*	*
Mezcla-Arena	*	*	*	*	*

El asterisco (*) que se encuentra al lado de los pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.



ENR: enrofloxacin, OXT: oxitetraciclina, RAC: ractopamina, SMX: sulfametoxazol, PEN: Penicilina, T: typha, P: papiro, C: control

Figura 18: Gráficas de medias y 95% de Fisher LSD para remoción de cada fármaco de acuerdo con el tipo de planta



ENR: enrofloxacin, OXT: oxitetraciclina, RAC: ractopamina, SMX: sulfametoxazol, PEN: Penicilina, G: grava, M: mezcla, A: arena

Figura 19: Gráficas de medias y 95% de Fisher LSD para remoción de cada fármaco de acuerdo con el tipo de soporte

Finalmente, dado que las variables planta y soporte son categóricas, se escogió el análisis discriminante para este estudio, el cual permitió desarrollar un conjunto de funciones discriminantes, para ayudar a predecir cuál tipo de planta y tipo de soporte son los ideales para construir un sistema de humedales capaz de tener una mayor remoción de todos los fármacos. Se utilizaron 36 casos para desarrollar un modelo que discrimine entre los 3 niveles de planta y los 3 niveles de soporte, donde 5 variables predictoras fueron introducidas. En la Tabla 30 y la Tabla 31 se muestra el resumen del análisis discriminante para la variable planta y soporte, respectivamente. Entre los coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas para cada caso, la variable con el coeficiente mayor es la que tiene más importancia al momento de tomar una decisión de a cuál grupo elegir; por lo que para el caso de planta queda explicado

mediante el coeficiente de enrofloxacin en la funci3n 1 y el coeficiente de ractopamina en la funci3n 2, f3rmacos cuya remoci3n mayor se obtuvo utilizando *Typha latifolia*. Para las funciones que corresponden a soporte, los coeficientes mayores corresponden a ractopamina en la funci3n 1 y enrofloxacin en la funci3n 2, donde en los humedales, estos f3rmacos presentaron la mayor remoci3n, utilizando arena.

Se observa un porcentaje de varianza de 95.4% en la primera funci3n discriminante para planta, lo que explica casi toda la variabilidad del modelo, donde el valor de P de las funciones derivadas es menor que 0.05, siendo esta funci3n estadisticamente significativa con un nivel de confianza del 95.0%, esto no ocurre con los valores de P para soporte, donde en ninguna de las funciones derivadas es menor que 0.05, de modo que ninguna es estadisticamente significativa con un nivel de confianza del 95.0%. Tambi3n se puede interpretar la diferencia entre los valores de la correlaci3n can3nica ($0.817 > 0.296$) para planta, la cual es mayor que la diferencia entre los valores para soporte ($0.373 \approx 0.377$). Se mide una correlaci3n entre una variable y la otra, mientras mayor sea la diferencia y m3s alto sea el valor, mejor; si los valores de correlaci3n can3nica decrecen la primera funci3n discrimina m3s que la segunda. Esto, adem3s, queda demostrado con el valor menor de Lambda de Wilks, con el que podemos comprobar que la primera funci3n discriminante para planta (0.303) separa significativamente grupos, es decir, discrimina m3s que la segunda funci3n discriminante de planta y las dos funciones discriminantes para soporte, que no consigue una separaci3n igualmente significativa. Con esta informaci3n y las gr3ficas presentadas en las Figuras 20 y 21, se concluye que una mayor remoci3n se obtiene seleccionando preferentemente *Typha latifolia*, sobre el control sin plantas y *Cyperus papyrus* (Figura 20) y que no habr3a tanta diferencia estadisticamente significativa en cuanto al soporte utilizado, aunque arena y mezcla se agrupan de manera similar para favorecer la remoci3n (Figura 21). Lo anterior debe interpretarse como un ayuda para decidir cu3l es la configuraci3n de humedal que mejoraría la remoci3n de todos los f3rmacos presentados en este estudio, sin embargo, se requieren m3s par3metros de dise1o y variables a considerar en la construcci3n y operaci3n del humedal para poder predecir cu3l es el mejor sistema para este prop3sito.

Tabla 30: Resumen análisis discriminante para tipo de planta

Coefficientes de las funciones discriminantes canónicas				
Función 1: 2.544*ENR -0.499*OXT-3.45*SMX + 0.255*RAC + 1.462*PEN				
Función 2: -0.233*ENR +2.588*OXT-5.255*SMX + 4.091*RAC-0.601*PEN				
Resumen de funciones discriminantes canónicas				
Función discriminante	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	2.011	95.4	95.4	0.817
2	0.096	4.6	100.0	0.296
Funciones derivadas	Lambda de Wilks	Chi-cuadrado	GL	Valor-P
1 a 2	0.303	37.016	10	0.000
2	0.912	2.845	4	0.584

Tabla 31: Resumen análisis discriminante para tipo de soporte

Coefficientes de las funciones discriminantes canónicas				
Función 1: 0.093*ENR+1.399*OXT-1.932*SMX+4.200*RAC-3.571*PEN				
Función 2: 1.836*ENR+0.452*OXT-2.188*SMX-0.116*RAC+0.667*PEN				
Resumen de funciones discriminantes canónicas				
Función discriminante	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	0.237	61.9	61.9	0.438
2	0.146	38.1	100.0	0.357
Funciones derivadas	Lambda de Wilks	Chi-cuadrado	GL	Valor-P
1 a 2	0.706	10.808	10	0.373
2	0.873	4.221	4	0.377

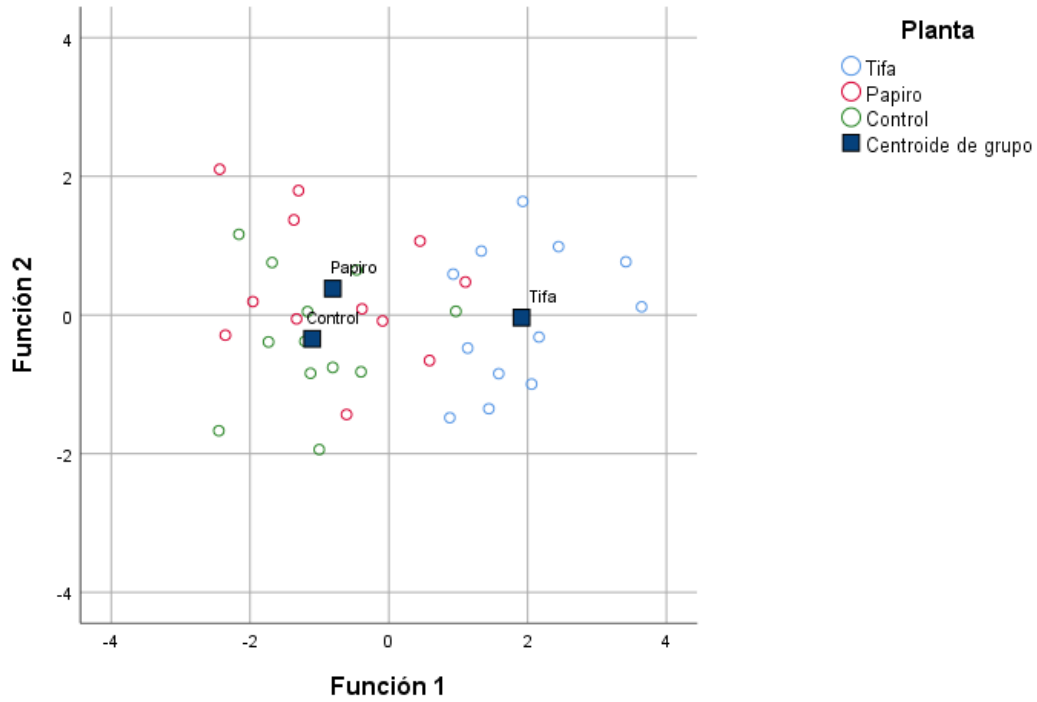


Figura 20: Gráfica de funciones discriminantes canónicas para tipo de planta

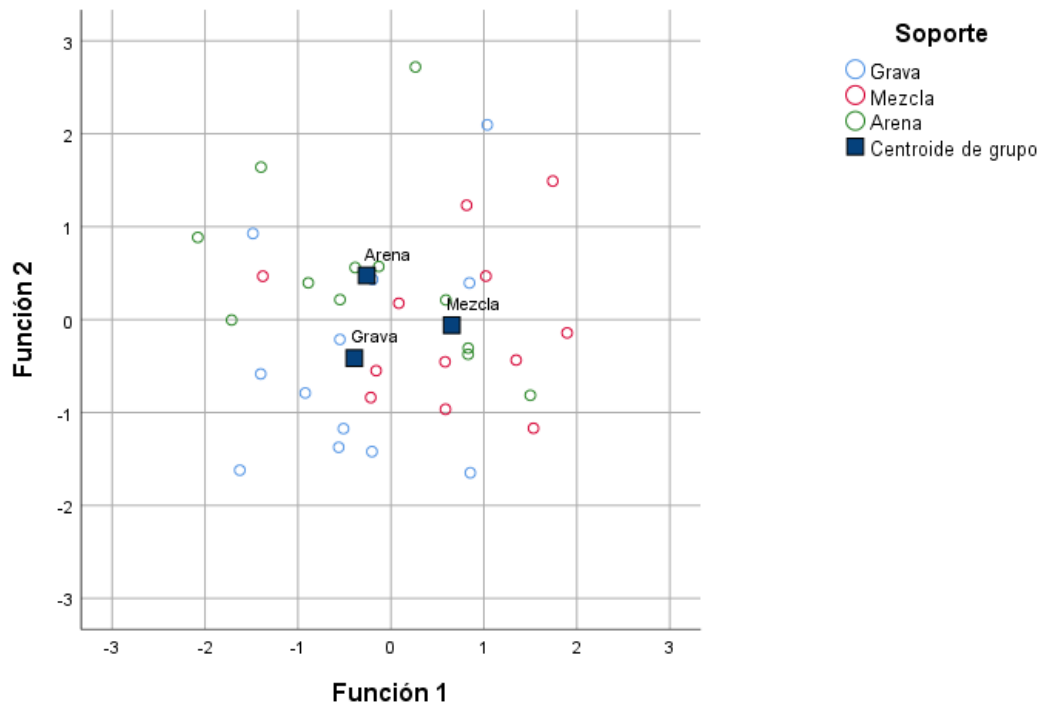


Figura 21: Gráfica de funciones discriminantes canónicas para tipo de soporte

CONCLUSIONES

Para poder evaluar las eficiencias de remoción en los humedales se requirió el desarrollo de métodos de detección, que sirvieron además para detectar concentraciones de los fármacos veterinarios en el agua residual de las granjas, se utilizó la espectrofotometría de fluorescencia y la voltamperometría cíclica como técnicas de detección rápidas, que generan menos residuos y posteriormente se utilizó la cromatografía líquida de alta eficiencia que ofrece una mayor selectividad, se sugiere la realización de pruebas adicionales para optimizar y validar los métodos ya implementados.

Se comprobó que el material seleccionado como soporte sólido es uniforme y apto para usarse como medio granular de los humedales construidos, ya que, los valores de permeabilidad, porosidad, porcentaje de absorción, y peso volumétrico se encuentran dentro del rango de aceptación. Tiene la ventaja de proporcionar una mayor área superficial para la actividad microbiana y los fenómenos de adsorción. En la remoción de fármacos con los humedales construidos se observa que ocurre una mayor remoción en las unidades que contienen arena o mezcla. También se observaron remociones mayores en las unidades que contenían plantas, para el caso de enrofloxacin, sulfametoxazol, ractopamina y penicilina G ocurre con la typha, mientras que para la oxitetraciclina resultó mejor el papiro, se sugiere realizar pruebas utilizando ambas plantas en el mismo humedal. Lo anterior quedó demostrado en el análisis estadístico de las pruebas con humedales construidos.

Se desconoce cuál fue el mecanismo de mayor influencia en la remoción de los fármacos en el sistema de humedales, aunque se ha reportado a los procesos de sorción como la principal vía de eliminación de antibióticos, sin embargo, para conocer el mecanismo exacto de remoción para estos compuestos se requiere más investigación utilizando experimentos más controlados incluyendo más parámetros.

REFERENCIAS

Ahmad, M., Khan, A., Wahid, A., Butt, Z., Farhan, M., & Ahmad, F. (2012). Role of hospital effluents in the contribution of antibiotics and antibiotics resistant bacteria to the aquatic environment. Pakistan Journal of Nutrition, 11(12), 1122-1182.

Arcega-Cabrera, F., Velázquez-Tavera, N., Fargher, L., Derrien, M., & Noreña-Barroso, E. (2014). Fecal sterols, seasonal variability, and probable sources along the ring of cenotes, Yucatan, Mexico. Journal of Contaminant Hydrology, 168, 41-49.

Ašperger, D., Tišler, V., & Zrnc, M. (2014). HPLC-DAD-FLD Determination of veterinary pharmaceuticals in pharmaceutical industry wastewater with precolumn derivatization using fluorecamine. Chromatographia 77,1059-1066.

B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) (2014). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed.). Disponible en www.eurachem.org.

Babić, S., Ašperger, D., Mutavdžić, D., Horvat, A. J. M., & Kaštelan-Macan, M. (2006). Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. Talanta, 70(4), 732-738.

Babić, S., Ašperger, D., Mutavdžić, D., Horvat, A. J. M., & Kaštelan-Macan, M. (2006). Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. Talanta, 70(4), 732-738.

Ballina, A. (2010). Principales enfermedades de los cerdos. Serie asistencia técnica. Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. Programa Especial para la Seguridad Alimentaria (PESA-FAO), 3,51. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-as540s.pdf>

Barceló, D. & López, M. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Panel Científico-Técnico de Seguimiento de la política de agua, Fundación Nueva Cultura del Agua.

Bártíková, H., Podlipná, R., & Skálová, L. (2016). Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. Chemosphere, 144, 2290-2301.

Ben, W., Qiang, Z., Adams, C., Zhang, H., & Chen, L. (2008). Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1202(2), 173-180.

Cancho Grande, B., García Falcón, M. S., & Simal Gándara, J. (2000). El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 3(1), 39-47

Carvalho, P. N. (2013). Implementation of methodologies for removal of veterinary pharmaceuticals residues from WWTPS effluents of the livestock industry. Tesis de doctorado, Universidad de Porto, Portugal.

Carvalho, P. N., Araújo, J. L., Mucha, A. P., Basto, M. C. P., & Almeida, C. M. R. (2013). Potential of constructed wetlands microcosms for the removal of veterinary pharmaceuticals from livestock wastewater. Bioresource Technology, 134, 412-416.

Carvalho, P. N., Basto, M. C. P., & Almeida, C. M. R. (2012). Potential of *Phragmites australis* for the removal of veterinary pharmaceuticals from aquatic media. *Bioresource Technology*, 116, 497-501.

Cervantes, S. P., Londoño, Y. A., Gutiérrez, F. R., & Peñuela, G. A. (2017). Evaluación de humedales artificiales de flujo subsuperficial en la remoción de diferentes concentraciones de ibuprofeno empleando *Cyperus papyrus*. *Tecnología y Ciencias Del Agua*, 8(5), 105-116.

Chen, Y., Vymazal, J., Březinová, T., Koželuh, M., Kule, L., Huang, J., & Chen, Z. (2016). Occurrence, removal and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in rural wastewater treatment wetlands. *Science of the Total Environment*, 566–567, 1660-1669.

Choi, Y. J., Kim, L. H., & Zoh, K. D. (2016). Removal characteristics and mechanism of antibiotics using constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 91, 85-92.

Shrivastava, A., Gupta, V.B. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21–25.

Cunningham, V., 2008. Special characteristics of pharmaceuticals related to environmental fate. *Pharmaceuticals in the Environment*. (1a ed., pp. 23-34). Berlin: Springer.

Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., & Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 442-448.

Delgadillo, O., Camacho, A., Pérez, L.F. & Andrade, M. (2010). Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales. Serie técnica, Centro Andino para la Gestión y Uso del Agua (Centro AGUA), Cochabamba, Bolivia.

Díaz, M., & Rodríguez, G. (2010). Análisis de la oferta y demanda de la carne de cerdo en canal en México 1980-2009. *Paradigma Económico*, 2(2), 41-57.

Dibner, J., & Richards, J. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. Presentado en el Simposio: Antibiotics in animal feeds: are there viable alternatives? Poultry Science Association.

Díez, R., Sarabia, L., & Ortiz, M. C. (2007). Rapid determination of sulfonamides in milk samples using fluorescence spectroscopy and class modeling with n-way partial least squares. *Analytica Chimica Acta*, 585(2), 350-360.

Dires, S., Birhanu, T., Ambelu, A., & Sahilu, G. (2018). Antibiotic resistant bacteria removal of subsurface flow constructed wetlands from hospital wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 4265-4272.

Dönmez, F., Yardım, Y., & Şentürk, Z. (2018). Electroanalytical determination of enrofloxacin based on the enhancement effect of the anionic surfactant at anodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials*, 84, 95-102.

Drucker, A., Escalante, R., Gómez, V., & Magaña, S. (2003). La industria porcina en Yucatán: Un análisis de la generación de aguas residuales. Problemas del Desarrollo: Revista Latinoamericana de Economía, 34(135). 10-12.

Dzul, M., Wirzal, H., Rahim, A., Yusoff, M., Zima, J., & Berek, J. (2013). Degradation of ampicillin and penicillin g using anodic oxidation. International Journal of Electrochemical Science, 8, 8978-8988.

Eibes, G., Debernardi, G., Feijoo, G., Moreira, M., & Lema, J. (2011). Oxidation of pharmaceutically active compounds by a ligninolytic fungal peroxidase. Biodegradation, 22, 539-550.

Escher, B., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., & McArdell, C. (2011). Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospitals wastewater. Water Research, 45, 75-92.

EURACHEM/CITAC. (2003). Guide Traceability in Chemical Measurement. A guide to achieving comparable results in chemical measurement. London: UK Department of Trade and Industry and National Measurement System Valid Analytical Measurement (VAM) Program.

FIRA (Fideicomisos Instituidos en relación con la Agricultura) (2017) Panorama Agroalimentario: Carne de cerdo, México.

García Ocaña, J. A., López Ocaña, G., & Torres Balcázar, C. A. (2019). Evaluación de medios de soporte en humedales artificiales con vegetación Sagittaria latifolia en la remoción de contaminantes básicos. CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias, 8(15).

Garzón-Zúñiga, M., & Buelna, G. (2014). Caracterización de aguas residuales porcinas y su tratamiento por diferentes procesos en México. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 30(1), 65-79.

Gil, M., Soto, A., Usmo, J., & Gutiérrez, O. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. Producción+Limpia, 7(2), 52-57.

González, M., Gonzalo, S., Rodea, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., et al. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. Water Research, 47, 2050-2064.

Gorito, A. M., Ribeiro, A. R., Almeida, C. M. R., & Silva, A. M. T. (2017). A review on the application of constructed wetlands for the removal of priority substances and contaminants of emerging concern listed in recently launched EU legislation. Environmental Pollution, 227, 428-443.

Grassi, M., Kaykioglu, G., Belgiorno, V., & Lofrano, G. (2012). Removal of Trace Pollutants from Wastewater in Constructed Wetlands. En Removal of Emerging Contaminants from Water and Wastewater by Adsorption Process (1a ed., pp. 15-16). Salerno: Springer.

Guan, Y., Wang, B., Gao, Y., Liu, W., Zhao, X., Huang, X., & Yu, J. (2017). Occurrence and fate of antibiotics in the aqueous environment and their removal by constructed wetlands in china: A review. Pedosphere, 27(1), 42-51.

Gutiérrez, K., Alfaro, M., Granados, F., Sánchez, J., García, F., Rodríguez, C. (2010). Detección de tetraciclinas en nueve lotes de alimentos para cerdos, tilapias y pollos producidos en Costa Rica: Incumplimiento de normativas y disconformidades con el etiquetado oficial de garantía. *Agronomía Costarricense*, 34, 145.

Hagenbuch, I. M., & Pinckney, J. L. (2012). Toxic effect of the combined antibiotics ciprofloxacin, lincomycin, and tylosin on two species of marine diatoms. *Water Research*, 46(16), 5028-5036.

Han, Z., Dong, J., Shen, Z., Mou, R., Zhou, Y., Chen, X., Yang, C., *et al.* (2019). Nitrogen removal of anaerobically digested swine wastewater by pilot-scale tidal flow constructed wetland based on in-situ biological regeneration of zeolite. *Chemosphere*, 217(2019), 364–373.

Hao, C., Zhao, X., & Yang, P. (2007). GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(6), 569-580.

Harrass, M. C., Kindig, A. C., Taub, F. B. (1985). Responses of blue-green and green algae to streptomycin in unialgal and paired culture. *Aquatic Toxicology*, 6(665), 1-11.

Havelkova, B., Brno, P. S., Beklova, M., Brno, P. S., Kovacova, V., Brno, P. S., & Brno, P. S. (2016). Ecotoxicity of selected antibiotics for organisms of aquatic and terrestrial ecosystems. *Neuroendocrinology Letters*, 37(1), 38-44.

Havelkova, B., Brno, P. S., Beklova, M., Brno, P. S., Kovacova, V., Brno, P. S., & Brno, P. S. (2016). Ecotoxicity of selected antibiotics for organisms of aquatic and terrestrial ecosystems, 37(1),38-44.

Herrera-Cárdenas, J., Navarro, A. E., & Torres, E. (2016). Effects of porous media, macrophyte type and hydraulic retention time on the removal of organic load and micropollutants in constructed wetlands. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 51(5), 380-388.

Hey, G. (2013). Application of chemical oxidation processes for the removal of pharmaceuticals in biologically treated water. Tesis de doctorado. *Water and Environmental Engineering, Department of Chemical Engineering.* Lund University, Sweden.

Horvat, A.J.M., Petrovic, M., Babic, S., Pavlovic, D.M., Asperger, D., Pelko, S., Mance, A.D., Kastelan-Macan, M. (2012). Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 31, 61-84.

Huang, X., Liu, C., Li, K., Su, J., Zhu, G., & Liu, L. (2015). Performance of vertical up-flow constructed wetlands on swine wastewater containing tetracyclines and tet genes. *Water Research*, 70, 109-117.

Huang, X., Zheng, J., Liu, C., Liu, L., Liu, Y., & Fan, H. (2017). Removal of antibiotics and resistance genes from swine wastewater using vertical flow constructed wetlands: Effect of hydraulic flow direction and substrate type. *Chemical Engineering Journal*, 308, 692-699.

Huetos Hidalgo, O. (2004). Estudio comparativo y evaluación de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de residuos de corticosteroides en muestras biológicas. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid.

Hurtado-Sánchez, M. D. C., Lozano, V. A., Rodríguez-Cáceres, M. I., Durán-Merás, I., & Escandar, G. M. (2015). Green analytical determination of emerging pollutants in environmental waters using excitation-emission photoinduced fluorescence data and multivariate calibration. *Talanta*, 134, 215-223.

ICH (International Conference on Harmonisation) (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Switzerland.

INEGI (2017). Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA). Conociendo al campo de México. Resultados. Levantamiento: octubre y noviembre de 2017.

Jiménez, C. (2011). Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: Productos farmacéuticos. *Revista Lasallista de Investigación*, 8(2), 143-153.

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B.A., Thiessen, P.A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., Bolton, E.E. (2019). PubChem 2019 update: improved access to chemical data.47(D1): D1102-1109. [PubMed PMID: 30371825]

Kostopoulou, M., & Nikolaou, A. (2008). Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 1023-1035.

Ku Vera, J. (2011). Clembuterol: su uso en medicina veterinaria y producción animal. *Bioagrociencias*, 4(1), 49-52.

Kümmerer, K. (2009). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 90(8), 2354-2366.

Li, Y., Zhu, G., Ng, W. J., & Tan, S. K. (2014). A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Science of the Total Environment*, 468-469, 908-932.

Luo, P., Liu, F., Liu, X., Wu, X., Yao, R., Chen, L., Li, X., Xiao, R., Wu, J. (2017). Phosphorus removal from lagoon-pretreated swine wastewater by pilot-scale surface flow constructed wetlands planted with *Myriophyllum aquaticum*. *Science of Total Environment*. 576, 490-497.

Magaña, A., & Drucker, A. (2001). Sistema de depuración de aguas residuales porcícolas para granjas de 20-80 vientres. Biblioteca Virtual De Desarrollo Sostenible Y Salud Ambiental. Consultado octubre de 2015, disponible en:
<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/aresidua/mexicon/R-0036.pdf>

Méndez, R., Castillo, E., Vázquez, E., Briceño, O., Coronado, V., Pat, R., & Garrido, P. (2009). Estimación del potencial contaminante de las granjas porcinas y avícolas del estado de Yucatán. *Ingeniería*, 13(2), 13-21.

Migowska, N., Caban, M., Stepnowski, P., & Kumirska, J. (2012). Simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection. *Science of The Total Environment*, 441, 77-88.

Navarro A., Morales L., Sánchez J., Montoya J., Herrera J., (2014). Depuración terciaria de aguas residuales municipales con humedales híbridos: una experiencia piloto. Memorias del VII Seminario Internacional de Gestión Ambiental y II Seminario de Ciencias Ambientales SUE Caribe, (pp. 72-78). Santa Marta, Colombia.

Navarro, A. E., Hernández, M. E., Bayona, J. M., Morales, L., Ruiz, P. (2011). Removal of selected organic pollutants and coliforms in pilot constructed wetlands in southeastern Mexico. International Journal of Environmental and Analytical Chemistry, 91:7-8, 680-692.

Niedziałkowski, P., Cebula, Z., Malinowska, N., Białobrzaska, W., Sobaszek, M., Ficek, M., *et al.*, (2019). Comparison of the paracetamol electrochemical determination using boron-doped diamond electrode and boron-doped carbon nanowalls. Biosensors and Bioelectronics, 126, 308-314.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2015). Antibiotic Resistance: Multi-Country Public Awareness Survey. WHO Press, Ginebra.

Pan, X., Qiang, Z., Ben, W., & Chen, M. (2011). Simultaneous determination of three classes of antibiotics in the suspended solids of swine wastewater by ultrasonic extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Environmental Sciences, 23(10), 1729-1737.

Patiño, Y., Díaz, E., Ordóñez, S. (2014). Microcontaminantes emergentes en aguas: tipos y sistemas de tratamiento. Avances en Ciencias e Ingeniería, 5(2), 1-20.

Patrolecco, L., Ademollo, N., Grenni, P., Tolomei, A., Barra, A., & Capri, S. (2013). Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection. Microchemical Journal, 107, 165-171.

Patrolecco, L., Rauseo, J., Ademollo, N., Grenni, P., Cardonia, M., Levantesi, C., Luprano, M.L., Caracciolo, A.B. (2018). Persistence of the antibiotic sulfamethoxazole in river water alone or in the co-presence of ciprofloxacin. Science of The Total Environment, 640–641, 1438-1446.

Pavlović, D. M., Babić, S., Horvat, A. J. M., & Kaštelan-Macan, M. (2007). Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 26(11), 1062-1075.

Peña-Álvarez, A., & Castillo-Alanía, A. (2015). Identificación y Cuantificación de Contaminantes Emergentes en Aguas Residuales por Microextracción en Fase Sólida-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (MEFS-GC-MS). Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 18(1), 29-42.

Pinelli, A., Acedo, E., Hernández, J., & Belmar, R. (2005). Manual de Buenas Prácticas de Producción en Granjas Porcícolas. SENASICA y Centro de Investigación en Alimentación Y Desarrollo, A.C.

Pysarevska, S., Dubenska, L., Plotycya, S., & Švorc, L'. (2018). A state-of-the-art approach for facile and reliable determination of benzocaine in pharmaceuticals and biological samples based on the use of miniaturized boron-doped diamond electrochemical sensor. Sensors and Actuators, B: Chemical, 270, 9-17.

- Reynolds, D. M. (2002). The differentiation of biodegradable and non-biodegradable dissolved organic matter in wastewaters using fluorescence spectroscopy. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77(8), 965-972.
- Robinson, A. P. A. R., Elden, J. A. B. B., & Ydy, M. I. J. L. (2005). Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(2), 423-430.
- Rodríguez, N., Ortiz, M. C., Sarabia, L. A., & Herrero, A. (2010). A multivariate multianalyte screening method for sulfonamides in milk based on front-face fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 657(2), 136-146.
- Sachett, A., Bevilaqua, F., Chitolina, R., Garbinato, C., Gasparetto, H., Magro, J. D., *et al.* (2018). Ractopamine hydrochloride induces behavioral alterations and oxidative status imbalance in zebrafish. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 1-8.
- SAGARPA (2015). Yucatán espacio propicio para la industria porcícola. *Boletín SAGARPA Delegación Yucatán*. Consultado octubre de 2015, disponible en: <http://sagarpa.gob.mx/Delegaciones/yucatan/Boletines/Paginas/201504B090.aspx>
- SAGARPA (2017). Anuario Estadístico de la Producción Ganadera. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Consultado octubre de 2018, disponible en: https://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/
- Sanderson, H., Laird, B., Pope, L., Brain, R., Wilson, C., Johnson, D., Solomon, K., *et al.* (2007). Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosms, 85, 229–240.
- Sándor, Z., Papp, Z., Kosáros, T., Hegedüs, R., & Csengeri, I. (2012). Potencial Effects of pharmaceuticals and their residues in aquatic environment. *Studia Universitatis*, 22(2), 247-253.
- Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E., & Callej, M. (2005). Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors, 550, 116-122.
- Santos, T.M.B., Trevizan, P.S.F., Xavier, C.A.N., Kiefer, C., Ferraz, A.L.J. (2016) Anaerobic biodegradation of manure from finishing pig supplemented with ractopamine over different periods. *Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering*, 36(3):399-407.
- Sauvé, S., & Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, 8, 1-7.
- Sawyer, C., & McCarty, P. (2003). Chromatographic methods of analysis. *Chemistry for environmental engineering and science* (5a ed. pp. 504). Boston: McGraw-Hill.
- Schmidt, L. J., Gaikowski, M. P., Gingerich, W. H., Dawson, V. K., & Schreier, T. M. (2007). An Environmental Assessment of the Proposed Use of Oxytetracycline-Medicated Feed in Freshwater Aquaculture, 54603(608).
- SEDUMA (2015). Industrias y Agroindustrias. Desarrollo Urbano. Consultado el 30 de septiembre de 2015, disponible en: http://www.seduma.yucatan.gob.mx/desarrollo-urbano/documentos/ZonaMetropolitana/2_8_Industria_Agroindustrias.pdf

Selva, T. M. G., de Araujo, W. R., Bacil, R. P., & Paixão, T. R. L. C. (2017). Study of Electrochemical Oxidation and Quantification of the Pesticide Pirimicarb Using a Boron-Doped Diamond Electrode. *Electrochimica Acta*, 246, 588–596.

SgROI, M., Roccaro, P., Korshin, G. V., Greco, V., Sciuto, S., Anumol, T., Vagliasindi, F. G. A. *et al.* (2017). Use of fluorescence EEM to monitor the removal of emerging contaminants in full scale wastewater treatment plants. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 367-376.

Shaaban, H., & Górecki, T. (2011). High temperature-high efficiency liquid chromatography using sub-2 μ m coupled columns for the analysis of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and veterinary antibiotics in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, 702(1), 136-143.

Sharif, F., Westerhoff, P., & Herckes, P. (2014). Impact of hydraulic and carbon loading rates of constructed wetlands on contaminants of emerging concern (CECs) removal. *Environmental Pollution*, 185, 107-115.

Sim, W. J., Kim, H. Y., Choi, S. D., Kwon, J. H., & Oh, J. E. (2013). Evaluation of pharmaceuticals and personal care products with emphasis on anthelmintics in human sanitary waste, sewage, hospital wastewater, livestock wastewater and receiving water. *Journal of Hazardous Materials*, 248–249(1), 219-227.

Sim, W. J., Lee, J. W., Lee, E. S., Shin, S. K., Hwang, S. R., & Oh, J. E. (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere*, 82(2), 179-186.

Sochacki, A., Felis, E., Bajkacz, S., Nowrotek, M., & Miksch, K. (2018). Removal and transformations of diclofenac and sulfamethoxazole in a two-stage constructed wetland system. *Ecological Engineering*, 122(6), 159-168.

Srinivasan, P., Sarmah, A. K., Manley-Harris, M., & Wilkins, A. L. (2012). Development of an HPLC method to analyze four veterinary antibiotics in soils and aqueous media and validation through fate studies. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 47(13), 2120-2132.

Sumano, H., Ocampo, L., Gutiérrez, L. (2002). Clembuterol y otros β -agonistas, ¿Una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública? *Veterinaria México*, 33(2), 137-159.

Sun, L., Wang, S., Lin, X., Tan, H., & Fu, Z. (2016). Early Life Exposure to Ractopamine Causes Endocrine- Disrupting Effects in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(2), 150-155.

Švorc, L., Sochr, J., Rievaj, M., Tomčík, P., & Bustin, D. (2012). Voltammetric determination of penicillin V in pharmaceutical formulations and human urine using a boron-doped diamond electrode. *Bioelectrochemistry*, 88, 36-41.

Tasho, R. P., & Cho, J. Y. (2016). Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. *Science of the Total Environment*, 563–564(3), 366-376.

Töre, G., Meriç, S., Lofrano, G., & De Feo, G. (2012). Removal of Trace Pollutants from Wastewater in Constructed Wetlands. En *Emerging Compounds Removal from Wastewater: Natural and Solar Based Treatments* (1a ed., p. 39). Salerno: Springer.

Trouchon, T., & Lefebvre, S. (2016). A review of enrofloxacin for veterinary use. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 6, 40-58.

van der Aa, N.G.F.M., van Vlaardingen, P.L.A., van Leeuwen, L.C., Post, M. (2011). Assessment of potential risks of 11 pharmaceuticals for the environment using environmental information from public databases. RIVM (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, National Institute for Public Health), Bilthoven, Países Bajos.

Vázquez, M. (2007). Volmateria Cíclica. Consultado el 27 de mayo de 2017, disponible en: <http://kassandra.udea.edu.co/lms/moodle19/mod/resource/view.php?id=54362>

Vega, G. (2011). Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos. Comisión de Control Analítico Y Ampliación de Cobertura, México.

Vosough, M., Rashvand, M., Esfahani, H. M., Kargosha, K., & Salemi, A. (2015). Direct analysis of six antibiotics in wastewater samples using rapid high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector: A chemometric study towards green analytical chemistry. *Talanta*, 135, 7-17.

Wong, A., Santos, A. M., & Fatibello-Filho, O. (2018). Simultaneous determination of dopamine and cysteamine by flow injection with multiple pulse amperometric detection using a boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials*, 85, 68-73.

Wu, J., Zhang, L., & YAng, Z. (2010). A review on the analysis of emerging contaminants in aquatic environment. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40, 234-245.

Wu, S., Kusch, P., Brix, H., Vymazal, J., & Dong, R. (2014). Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: A nitrogen and organic matter targeted review. *Water Research*, 57, 40-55.

Xiaoyan, T., Suyu, W., Yang, Y., Ran, T., Yunv, D., Dan, A., & Li, L. (2015). Removal of six phthalic acid esters (PAEs) from domestic sewage by constructed wetlands. *Chemical Engineering Journal*, 275, 198-205.

Zhang, X., Jing, R., Feng, X., Dai, Y., Tao, R., Vymazal, J., Yang, Y., *et al.* (2018). Removal of acidic pharmaceuticals by small-scale constructed wetlands using different design configurations. *Science of the Total Environment*, 639, 640-647.

Zheng, W., Zhang, Z., Liu, R., & Lei, Z. (2017). Removal of veterinary antibiotics from anaerobically digested swine wastewater using an intermittently aerated sequencing batch reactor. *Journal of Environmental Sciences*, 1-10.

ANEXO 1

**ENCUESTA SOBRE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS Y MANEJO DE AGUAS
RESIDUALES EN LAS GRANJAS PORCÍCOLAS DE YUCATÁN**

Municipio: _____ Nombre de la granja: _____

Responsable: _____ Cabezas de cerdos: _____

1.-Sistema de producción

Tecnificado Semitecnificado privado Semitecnificado ejidal Producción familiar

2.-Tipo de granja

Ciclo completo Pie de cría Engorda

3.-Tipo de alimento que consumen los cerdos

Granos Mezcla comercial Premezcla

Marca o nombre del alimento

Uso o aplicación

4.- ¿Se utilizan suplementos en la alimentación de los cerdos? Sí No

Aditivos nutritivos

Aditivos no nutritivos

Vitaminas

Probióticos y/o prebióticos

Minerales

Enzimas

Proteínas

Acidificantes

Otros: _____

Otros: _____

5.-Se realiza acciones para la prevención y control de enfermedades Sí No

¿Qué enfermedades se buscan prevenir o controlar?

Infecciones respiratorias _____

Infecciones gastrointestinales _____

Infecciones parasitarias _____

Otras: _____

6.- ¿Se administran fármacos para la prevención o tratamiento de enfermedades? Sí No

¿Cuáles?

Antibióticos _____

Desparasitantes _____

Promotores de crecimiento _____

Analgésicos _____

Antiinflamatorios _____

Vacunas _____

Hormonas _____

Otros: _____

7.-Vía de administración de los fármacos

Con el alimento En el agua Directa (oral o inyección)

8.-Uso mayoritario del agua potable en la granja

Lavado de cerdos Lavado de excretas Bebederos

9.-En el lavado de las áreas ¿Se usan detergentes, desinfectantes o sanitizantes?: Sí No

¿Cuáles?: _____

10.- ¿Cuántos litros o m³ de agua residual son generados diariamente? _____

11.- ¿Se cuentan con rejillas, canaletas o tuberías para el agua residual en la granja?

Sí No

12.- ¿El sistema tiene separador de sólidos y grasas?

Sí No

13.- ¿Cuenta la granja con sistema de tratamiento para excretas y/o aguas residuales?

Sí No

14.- ¿Cuenta el sistema con un cárcamo de recepción? Sí No

15.- ¿Qué sistema utilizan para el tratamiento de las anteriores?

Biodigestor Laguna de estabilización Otro: _____

16.-Tiempo que requiere tratar los residuos y/o agua residual: _____

17.-Volumen de agua tratada por ciclo de tratamiento: _____

Observaciones: _____

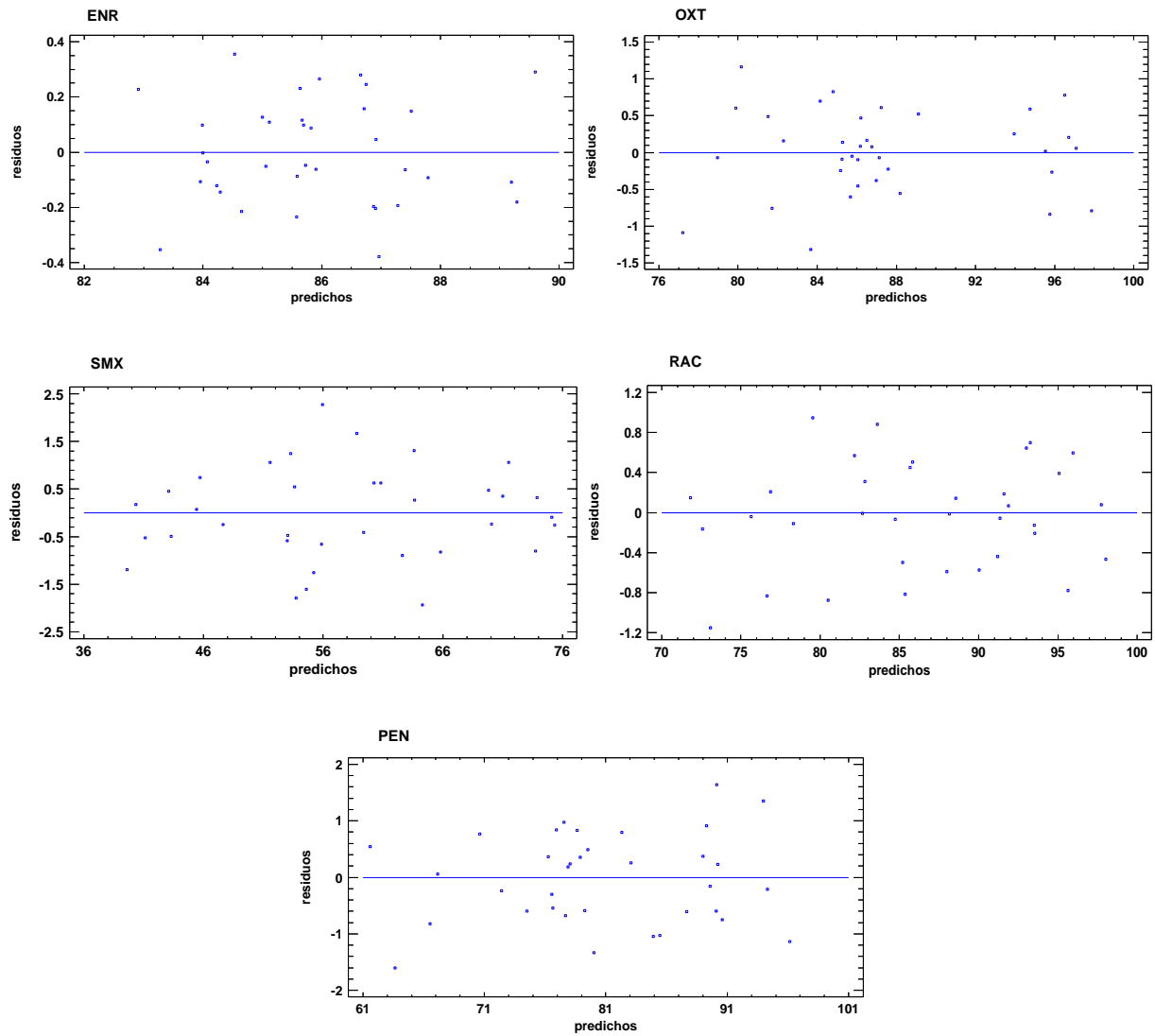
ANEXO 2

En la Tabla 32 se muestran los valores de P de la prueba de Kolmogorov-Smirnov, en donde el valor más pequeño es mayor o igual a 0.05, por lo que no se puede rechazar la idea de que los datos de porcentaje de remoción de cada uno de los fármacos provienen de una distribución normal con 95% de confianza.

Tabla 32: Valores de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para cada fármaco

Fármaco	D ⁺	D ⁻	D _n	Valor-P
Enrofloxacina	0.0821	0.0566	0.0821	0.9686
Sulfametoxazol	0.0730	0.0908	0.0908	0.9280
Oxitetraciclina	0.1973	0.1317	0.1973	0.1213
Ractopamina	0.0656	0.0948	0.0948	0.9028
Penicilina G	0.0918	0.1147	0.1147	0.7311

ANEXO 3



ENR: enrofloxacin, OXT: oxitetraciclina, RAC: ractopamina, SMX: sulfametoxazol, PEN: Penicilina

Figura 22: Gráficos de residuos para remoción de cada fármaco