

PROCESO DE DEGRADACIÓN DE ALCALOIDES SINTÉTICOS O NATURALES POR UN CONSORCIO MICROBIANO

RESUMEN

Las altas tasas de producción de alcaloides naturales y sintéticos que son fiscalizadas por parte de los gobiernos y sus autoridades han planteado la problemática de la alta contaminación que se genera al incinerar estas sustancias como mecanismo único aprobado a nivel mundial para el control y destrucción de estas sustancias de abuso, entre las que se encuentran, la cocaína base y el clorhidrato de cocaína y las drogas de síntesis. De este modo, esta invención soluciona de facto el problema de la degradación de alcaloides naturales y sintéticos por medios biológicos empleando microorganismos adaptados a concentraciones entre 5 y 80 g/L de alcaloides sintéticos o naturales en un medio acuoso con sales inorgánicas en sistemas de biorreactor. Con este procedimiento se alcanza una degradación del 95-99% de los alcaloides en 24-50 horas. Así, esta tecnología es diferente a la empleada habitualmente como lo es la incineración de manera controlada o a campo abierto de los alcaloides utilizando solventes como gasolina y otros precursores químicos encontrados en campo y que ocasionan daños al medio ambiente.

SECTOR TECNOLÓGICO

La presente invención se refiere a la degradación de alcaloides naturales o sintéticos empleando procesos con microorganismos; particularmente, se refiere a la degradación de alcaloides como cocaína, base o clorhidrato, y anfetaminas, entre otras, en muestras altamente concentradas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

En los últimos años se han incrementado los cultivos de planta de coca, así como la producción de alcaloides derivados de estas plantaciones, lo que, sumado a una política mundial de lucha contra las drogas, ha derivado en un aumento de las incautaciones de alcaloides como cocaína base, clorhidrato de cocaína y anfetaminas.

En países como Colombia, los alcaloides incautados por las autoridades ya sean cocaína base, clorhidrato de cocaína o los diferentes compuestos que conforman las anfetaminas son incinerados en condiciones controladas en hornos que alcanzan temperaturas de hasta de 3000°C como procedimiento estándar para su eliminación. En el campo, cuando las autoridades encuentran laboratorios clandestinos de producción de alcaloides, la estrategia es rociar con gasolina o algún otro líquido inflamable a las sustancias y prenderles fuego a campo abierto. Al quemarse las sustancias, emiten gases tóxicos a la atmósfera generando un impacto ambiental indeseado. Hoy en día no existen procesos alternativos para la disposición final de los alcaloides incautados o encontrados en campo que representen un menor riesgo de contaminación al medio ambiente.

En un estudio realizado por Phong K.Thai., Guangming Jiang., Wolfgang Gernjak., ZhiguoYuan., Foon Yin Lai., Jochen F. Mueller. (2014), Effects of sewer conditions on the degradation of selected illicit drug residues in wastewater. *Water Research* 48(1), 538-547. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.019>, monitorearon la estabilidad de drogas ilícitas en reactores de tratamiento de aguas residuales. En este estudio concluyen que la estabilidad de las biopelículas presentes en el reactor aumentó la degradación de cocaína. Aunque en este estudio hacen uso de tres tipos diferentes de reactores biológicos para el tratamiento de aguas residuales (reactor principal de aguas residuales, reactor de aguas residuales por gravedad y reactor control de aguas residuales), el enfoque que hacen es en el tratamiento de aguas residuales en las cuales las cantidades de alcaloides son muy bajas (10 ng/mL) y no se enfocan en un tratamiento exclusivamente para alcaloides naturales o sintéticos con microorganismos adaptados para tal fin en un reactor de tanque agitado. En ese estudio trabajan con estándares químicos de cocaína y no con alcaloides naturales tales como el clorhidrato de cocaína o cocaína base.

Por otra parte, el estudio realizado por Damien A. Devault, Thomas Néfau, Yves Levi, Sara Karolak. (2017) The removal of illicit drugs and morphine in two waste water treatment plants (WWTPs) under tropical conditions. *Environmental Science Pollution Research* 24, 25645–25655. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-6032-z>, se enfoca en el estudio de la eficiencia en la degradación de cocaína en dos plantas de tratamiento de aguas residuales en ambientes tropicales y con diferentes locaciones y tratamientos biológicos. En ese estudio trabajan con concentraciones bajas de alcaloides (aproximadamente 780 ng/L).

Existen diversos estudios realizados en los cuales se evalúa la eficiencia de remoción de alcaloides en las corrientes de aguas residuales que alimentan las plantas o reactores de tratamiento de aguas residuales. Estos estudios se enmarcan en el ámbito de tratamiento de aguas residuales y se enfocan en la eficacia de remoción del alcaloide presente en el agua residual por parte de la planta de tratamiento y trabajan con concentraciones pequeñas de alcaloides (en el orden de nano o microgramos por litro).

Por lo tanto, existe la necesidad de métodos para la disposición final de alcaloides, naturales o sintéticos, que permitan su procesamiento a altas concentraciones sin la emisión de gases nocivos o subproductos que impacten de manera negativa al ambiente.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un método para la disposición final de alcaloides naturales o sintéticos, tal como cocaína base, clorhidrato de cocaína, anfetaminas, entre otros, mediante un proceso biológico, en un sistema de biorreactor con un consorcio de microorganismos adaptado para la degradación de concentraciones altas de alcaloides naturales o sintéticos (en el orden de g/L), en donde el proceso degrada entre 95-99% de los alcaloides naturales o sintéticos en 24-50 horas.

El proceso de degradación biológica de alcaloides sintéticos o naturales por el consorcio microbiano comprende dos fases: la primera, o fase A, correspondiente a la fase de adaptación de los microorganismos a los alcaloides sintéticos o naturales y, la segunda, o fase B, consistente en la fase de degradación de alcaloides sintéticos o naturales. Con este proceso no hay emisión de gases tóxicos y es una tecnología más amigable con el medio ambiente, incluso en comparación con los sistemas de degradación de trazas de alcaloides en aguas residuales.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el proceso de adaptación de los microorganismos para la degradación de alcaloides naturales o sintéticos.

La Figura 2 muestra el proceso general para la biodegradación de los alcaloides naturales o sintéticos. La parte (1) presenta el tanque de recepción y adecuación de los alcaloides; en la sección (1A) se muestra el tanque de recepción y dilución ácida del alcaloide cocaína base; la parte (2) presenta el reactor de propagación; la sección (3) ilustra el reactor principal de degradación; las partes (4A), (4B), (4C), (4D), (4F) y (4G) muestran un conjunto de bombas y válvulas encargadas de la distribución de los flujos del proceso; la sección (5) presenta el compresor de aire que alimenta a las partes (2) y (3); y, la parte (6) presenta el colector de aguas de proceso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El proceso de degradación biológica de alcaloides sintéticos o naturales por el consorcio microbiano aquí descrito comprende dos fases a saber: primera, o fase A, correspondiente a la fase de adaptación de los microorganismos a los alcaloides sintéticos o naturales y, segunda, o fase B, consistente en la fase de degradación de alcaloides sintéticos o naturales.

Para efectos de la presente invención, por alcaloides sintéticos y naturales se entienden todos los compuestos químicos que pertenezcan a esta familia de compuestos, ya sean obtenidos por extracción de seres vivos que los contienen, o alcaloides naturales, así como los derivados de los alcaloides naturales y aquellos obtenidos mediante síntesis. Preferiblemente, alcaloides sintéticos y naturales corresponden a aquellos seleccionados de, pero no limitan a, cocaína, cocaína base, cocaína clorhidrato, anfetaminas, etc. Más preferiblemente, los alcaloides sintéticos y naturales objeto de la presente invención son aquellos incautados por las autoridades o, independientemente de su origen, aquellos que se encuentran en gran cantidad y/o en altas concentraciones (del orden de g/L), imposibilitando

su degradación mediante técnicas de tratamiento de trazas (del orden de ng/L), tales como las relacionadas con el tratamiento de aguas residuales de servicios públicos domiciliarios.

Fase A. Adaptación de los microorganismos a los alcaloides naturales o sintéticos:

La primera fase, esto es, la fase de adaptación de los microorganismos a los alcaloides sintéticos o naturales está compuesta por las siguientes subfases:

Subfase A1. Consiste en cultivar los diferentes tipos de bacterias (cepas) inicialmente en un caldo o medio nutritivo a escala de matraz con entre 50 mL y 300 mL, preferiblemente entre 100mL y 250 mL, más preferiblemente con 200 mL de cultivo con agitación constante de entre 100 rpm y 250 rpm, preferiblemente entre 150 rpm y 200rpm, más preferiblemente de 150 rpm, una temperatura entre 28°C y 37°C, preferiblemente entre 30°C y 35°C, más preferiblemente de 32 °C, durante entre 20h y 40h, preferiblemente entre 24h y 30h, más preferiblemente de 24 horas.

Subfase A2. De los microorganismos crecidos en la subfase A1, tomar entre el 10-30% v/v del volumen total de trabajo que se va a utilizar en esta etapa como semilla, preferiblemente entre 10-20%, más preferiblemente 15% y se inoculan en un medio compuesto por sales inorgánicas y que contiene como única fuente de carbono entre 20-80 ppm, preferiblemente entre 30-60 ppm, más preferiblemente 50 ppm de alcaloides naturales o sintéticos. El medio de sales inorgánicas en el cual se diluyen las diferentes concentraciones de los alcaloides está compuesto por: 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 g/L de K_2HPO_4 , 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9 g/L de Na_2HPO_4 , 1 mL/L de elementos trazas que contienen: 10 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2,25 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,23 g/L de H_3BO_3 , 0,2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ y 10 mL de HCl. El pH del medio de cultivo debe ser ajustado a 7,2 y se incuban a 100-250 rpm, preferiblemente entre 150-200 rpm, más preferiblemente 150 rpm, una temperatura entre 28°C y 37°C, preferiblemente entre 30°C y 35°C, más preferiblemente de 32 °C, durante entre 20h y 40h, preferiblemente entre 24h y 30h, más preferiblemente de 24 horas.

Subfase A3. De los microorganismos crecidos en la subfase A2, tomar entre el 10-30% v/v del volumen total de trabajo que se va a utilizar en esta etapa como semilla, preferiblemente entre 10-20%, más preferiblemente 15% y se inoculan en un medio de sales inorgánicas (el mismo descrito en la subfase A1, de esta fase A) que contiene entre 20-80 ppm, preferiblemente entre 30-60 ppm, más preferiblemente 50 ppm de alcaloides naturales o sintéticos y se incuban a 100-250 rpm, preferiblemente entre 150-200 rpm, más preferiblemente 150 rpm, una temperatura entre 28°C y 37°C, preferiblemente entre 30°C y 35°C, más preferiblemente de 32 °C, durante entre 20h y 40h, preferiblemente entre 24h y 30h, más preferiblemente de 24 horas.

El objetivo de estas primeras tres subfases en la fase A de adaptación (A1, A2 y A3), es agotar los nutrientes del caldo nutritivo presentes en el primer cultivo (subfase A1 de esta fase A), para garantizar que la única fuente de carbono subsecuente sean los alcaloides naturales o sintéticos.

Subfase A4. Una vez se obtiene el cultivo de bacterias libre de caldo o medio nutritivo en la subfase A3, crecer nuevamente las cepas bacterianas en medio de sales inorgánicas con

entre 20-80 ppm, preferiblemente entre 30-60 ppm, más preferiblemente 50 ppm de alcaloides naturales o sintéticos a las mismas condiciones de la subfase A3, de esta fase A y se realiza un seguimiento del crecimiento bacteriano por medio de espectrofotometría UV visible (densidad óptica, DO). Este crecimiento se determina a una longitud de onda de 600 nm, teniendo en cuenta que los resultados obtenidos son cualitativos, ya que en esta etapa no se realiza una curva de calibración que permita conocer la concentración bacteriana. Esto con el fin de observar el comportamiento del microorganismo con respecto al sustrato y determinar posibles variaciones en el crecimiento de las bacterias sometidas a esta condición de estrés, por ausencia de cantidades suficientes de fuente de carbono.

Subfase A5. Elaborar curva de calibración a los microorganismos adaptados de la subfase A4 para establecer los parámetros cinéticos pertinentes (aumento de la DO). Para esta evaluación cualitativa, se toma 1 mL de muestra cada 2 horas durante las primeras 12 horas de crecimiento de los microorganismos para análisis de turbidez por espectrofotometría (DO), posteriormente se toman muestras a las 24, 48 y 72 horas hasta completar un total de 240 horas (10 días) y se mide la DO a cada muestra. Con los resultados obtenidos se elaboran las curvas de crecimiento respectivas.

Subfase A6. Luego, de los microorganismos cultivados anteriormente en la subfase A4, tomar como semilla, entre el 10-30% v/v del volumen total de trabajo que se va a utilizar en esta etapa como semilla, preferiblemente entre 10-20%, más preferiblemente 15% del total del medio de cultivo nuevo y se crecen en medio de sales inorgánicas descrito en la subfase A1, con entre 50-200 ppm, preferiblemente entre 80-150 ppm, más preferiblemente 100 ppm de alcaloides naturales o sintéticos a 100-250 rpm, preferiblemente entre 150-200 rpm, más preferiblemente 150 rpm, una temperatura entre 28°C y 37°C, preferiblemente entre 30°C y 35°C, más preferiblemente de 32 °C, durante entre 20h y 40h, preferiblemente entre 24h y 30h, más preferiblemente de 24 horas.

Subfase A7. Volver a hacer seguimiento de crecimiento por medio de espectrofotometría por 10 días, siguiendo el protocolo descrito en la subfase A5.

Subfase A8. Realizar procedimientos iguales a los descritos anteriormente en las subfases A5-A7, pero incrementando en cada cultivo siguiente, el doble de la concentración precedente de alcaloides naturales o sintéticos hasta alcanzar una adaptación de los microorganismos a concentraciones de alcaloides naturales o sintéticos entre 5-80 g/L.

Fase B. Degradar los alcaloides naturales o sintéticos

La segunda fase, esto es, la degradación de alcaloides sintéticos o naturales tiene por objeto trabajar con los microorganismos previamente adaptados a los alcaloides naturales o sintéticos en la fase A de esta invención y llevarlos a un reactor automatizado con volúmenes de trabajo entre 1-100 litros. El medio de cultivo es igual al medio con sales inorgánicas utilizado en la fase A (descrito en la subfase A1) y las concentraciones de alcaloide iniciales van desde 5-80 g/L. Para obtener una degradación del 95-99% de alcaloide se deben tener las siguientes condiciones de operación del equipo: Operación en sistema por lotes (batch), el pH del medio de cultivo debe ser ajustado a 7,2, tasa de aireación constante de 1-5 L/min, temperatura de 28-35°C, agitación constante de 100-300 rpm, 3-6 g/L de consorcio bacteriano y 24-50 horas de cultivo.

La degradación de alcaloides sintéticos o naturales, fase B, comprende las siguientes subfases:

Subfase B1. Recibir y pesar el alcaloide incautado (entre 5-80 g/L) y diluir en el tanque (1) que contiene una solución de sales inorgánicas compuesta por: 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 g/L de K_2HPO_4 , 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9,0 g/L de Na_2HPO_4 , y 1 mL/L de una solución de elementos traza que contiene: 10,0 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,25 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,23 g/L de H_3BO_4 , 0,2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ y 10 mL de HCl. El pH final de la solución debe ajustarse a 7,2.

Si el alcaloide recepcionado es cocaína base, esta debe ser recepcionada, pesada y diluida en el tanque (1A) con una solución acuosa de HCl 0,1N a 50°C para trabajar la sustancia en forma clorhidrato y evitar precipitación en el medio salino. Una vez la cocaína base está diluida, se le agregan los mismos compuestos que al tanque (1) como son: 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 g/L de K_2HPO_4 , 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9,0 g/L de Na_2HPO_4 y 1 mL/L de una solución de elementos traza que contiene: 10,0 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,25 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,23 g/L de H_3BO_4 , 0,2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, y 10 mL de HCl. El pH final de la solución debe ajustarse a 7,2.

Subfase B2. Transportar el medio de cultivo que contiene el alcaloide diluido desde el tanque (1) o si se trabaja con cocaína base desde el (1A), hacia el reactor de propagación (2) en condiciones de operación como se relaciona a continuación: tasa de aireación constante de 1-5 L/min, temperatura de 28-35°C, agitación constante de 100-300 rpm, OD inicial de entre 0.2-1.0 de consorcio microbiano y entre 24-50 horas de cultivo, con el fin de aumentar la biomasa del consorcio microbiano. El consorcio microbiano consta de las siguientes bacterias: *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Lysinibacillus sp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Stenotrophomonas geniculata*.

Subfase B3. Transportar el medio con alcaloide diluido desde el reactor (1) o si se trabaja con cocaína base desde el reactor (1A), hacia el biorreactor principal (3) que opera a las mismas condiciones que el reactor de propagación (2): tasa de aireación constante de entre 1-5 L/min generado con compresor de aire (5), temperatura de entre 28-35°C, agitación constante de entre 100-300 rpm. El inóculo de microorganismos se realiza transportando un volumen de entre el 5-30% v/v del volumen total del biorreactor principal (3), desde el reactor de propagación (2) hacia el biorreactor principal (3). El proceso se deja en operación entre 24-50 horas controlando las variables de operación.

Subfase B4. Detener el control de variables una vez se haya transcurrido el tiempo de operación y al líquido resultante del biorreactor principal (3), se le realiza una Prueba de Identificación Preliminar Homologada (PIPH) para alcaloides cuyo resultado es negativo dado la alta tasa de consumo del sustrato por parte del consorcio bacteriano, comprobando así la no presencia de alcaloides en el líquido, y su posterior transporte al tanque colector de aguas de proceso (6) para su disposición final y tratamiento como aguas residuales.

Forma preferida de realizar la invención

Se utiliza el procedimiento descrito en la Fase A para la adaptación de un consorcio microbiano a concentraciones altas de alcaloides en un sistema de biorreactor. Una vez se ha seleccionado y adaptado el consorcio microbiano a altas concentraciones de alcaloides naturales o sintéticos, está listo para ser utilizado en el proceso de degradación de los alcaloides. En la Figura 2 se presenta una forma preferida de realizar la invención. Para el proceso de adecuación de los alcaloides naturales o sintéticos, se recibe el alcaloide natural o sintético y se pesan preferiblemente 50 g/L y se diluyen en el tanque (1) que contiene una solución de sales inorgánicas compuesta por: 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 g/L de K_2HPO_4 , 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9,0 g/L de Na_2HPO_4 y 1 mL/L de una solución de elementos traza que contiene: 10,0 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,25 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,23 g/L de H_3BO_4 , 0,2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ y 10 mL de HCl. El pH final de la solución debe ajustarse a 7,2, preferiblemente con una solución 1N de NaOH.

Se transporta el medio de cultivo que contiene el alcaloide desde el tanque (1) o si se trabaja con cocaína base desde el (1A) hacia el reactor de propagación (2) en condiciones de operación como se relaciona a continuación: tasa de aireación constante de 3,7 L/min usando compresor de aire (5), temperatura de 32°C, agitación constante de 150 rpm, OD inicial de 0,6 de consorcio microbiano y preferentemente 45 horas de cultivo, con el fin de aumentar la biomasa del consorcio microbiano y conformar la semilla. Para la degradación de los alcaloides naturales o sintéticos, se transporta el medio con alcaloide desde el reactor (1) o si se trabaja con cocaína base desde el reactor (1A) hacia el biorreactor principal (3) que opera a las mismas condiciones que el reactor de propagación (2): tasa de aireación constante de 3,7 L/min usando compresor de aire (5), temperatura de 32°C, agitación constante de 150 rpm. El inóculo de microorganismos se realiza transportando un volumen preferiblemente del 15% v/v del volumen total del biorreactor principal (3), desde el reactor de propagación (2) hacia el biorreactor principal (3). El proceso se deja en operación preferentemente 30 horas controlando las variables de operación.

Transcurrido el tiempo de operación se detiene el control de las variables y al líquido resultante del biorreactor principal (3), se le realiza una Prueba de Identificación Preliminar Homologada (PIPH) para alcaloides cuyo resultado es negativo dado la alta tasa de consumo del sustrato por parte del consorcio bacteriano, comprobando así la no presencia de alcaloides en el líquido y su posterior transporte al tanque colector de aguas de proceso (6) para su disposición final y tratamiento como aguas residuales.