



**UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa

**DIVISION DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA  
POSGRADO EN ENERGÍA Y MEDIO AMBIENTE**

**“Tolerancia de *Agrocybe af. pediades* a crecer en presencia de  
compuestos activos farmacéuticos”**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS (ENERGÍA Y MEDIO AMBIENTE)**

**Presenta:**

Diego Jason Flores Huerta  
Matricula: 2223803603  
Correo: jasonmon10@gmail.com

**Director(a) de Tesis:**

Dra. Araceli Tomasini Campocosio

**Asesor:**

Dr. Ulises Carrasco Navarro

**Jurado:**

**Presidente:** Dr. Héctor Hugo León Santiesteban

**Secretario:** Dr. Octavio Loera Corral

**Vocal:** Dra. Alba Mónica Montiel Gonzalez

Iztapalapa, Ciudad de México a 18 de Noviembre del 2025

Ciudad de México, 2025

“La maestría en Energía y Medio Ambiente de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa está incluido en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP) del del CONAHCYT, con la referencia 003893.”

## **Agradecimientos**

A la Dra. Araceli Tomasini Campocosio por la confianza me brindó, conocimientos, enseñanza, y su apoyo en todo momento que lo requiriera en la realización de este trabajo.

Al Dr. Ulises Carrasco Navarro por sus consejos, asesorías y disposición que mostró cada que lo necesité.

A la Dra. Judith M. de Lourdes Cardoso Martínez, profesora titular del Área de Polímeros del Depto. de Física de la UAM Iztapalapa, por permitirme usar el equipo HPLC para los análisis y cuantificaciones realizados en este trabajo.

A Luis Ricardo Moreno Rojo, Coordinador del Laboratorio de Calidad de Agua del Depto. de Física de la UAM Iztapalapa, por brindarme sus conocimientos y apoyo en el uso del HPLC.

A mis compañeros del laboratorio W-002, a la Dra. Wylma, Dra. Fernanda, Mtro. Gerardo quienes me ayudaron a integrarme al laboratorio de una manera rápida.

A Diego y Anay, por su apoyo y amistad brindada dentro y fuera del laboratorio.

A mi familia, mis padres y hermanas, quienes me han apoyado toda la vida.

A Fany, por siempre apoyarme incondicionalmente y ser mi inspiración en todo momento.

## Resumen

La contaminación del agua por contaminantes emergentes, como los compuestos activos farmacéuticos (CAFs), representa un problema ambiental creciente debido a su persistencia y efectos adversos en los ecosistemas acuáticos. En este estudio, se evaluó la capacidad del hongo *Agrocybe af. pediades* para tolerar y degradar los CAFs Trimetoprima (TMP), Ciprofloxacino (CPX) y Naproxeno (NPX). Se analizó su crecimiento en presencia de estos compuestos, su producción de enzima lacasa y la capacidad de esta enzima para degradar los fármacos.

Los resultados mostraron que *A. pediades* presentó un crecimiento estable en medios sólidos con diferentes concentraciones de CAFs, sin una inhibición significativa en su velocidad de crecimiento radial o producción de biomasa. Además, se determinó actividad lacasa mediante la oxidación del sustrato guayacol con el Extracto Crudo Enzimático (ECE) libre de biomasa. Sin embargo, al evaluar la degradación de los CAFs mediante HPLC, no se observó una disminución significativa en las concentraciones de TMP y NPX, mientras que en la concentración de CPX se tuvieron problemas en su cuantificación.

Estos resultados indican que *A. pediades* es tolerante a la presencia de CAFs y produce lacasa activa, aunque su capacidad para degradar estos fármacos requiere una mayor optimización de condiciones. Este estudio contribuye al conocimiento sobre el potencial de hongos en la biorremediación de contaminantes emergentes y sienta bases para futuras investigaciones en la aplicación de enzimas fúngicas en la degradación de fármacos en el medio ambiente.

# Índice General

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico .....	4
2.1. Presencia de CAFs en el medio ambiente.....	4
2.2. Propiedades y uso de TMP, CPX y NPX .....	6
2.2.1. Trimetoprima .....	6
2.2.2. Ciprofloxacino.....	7
2.2.3. Naproxeno.....	9
2.3. Biorremediación.....	10
3. Antecedentes .....	12
3.1. <i>Agroclybe af. pediades</i> como productor de lacasas.....	12
3.2. Uso de basidiomicetos para degradar CAFs.....	13
4. Justificación.....	14
5. Hipótesis .....	16
6. Preguntas de investigación.....	16
7. Objetivo general.....	16
8. Objetivos específicos .....	16
9. Metodología .....	17
9.1. Organismo y condiciones de cultivo.....	17
9.2. Compuestos Activos Farmacéuticos.....	17
9.3. Crecimiento de <i>A. af. pediades</i> con TMP, CPX y NPX en medio sólido .....	17
9.3.1. Preparación del inóculo .....	17
9.3.2. Tolerancia del crecimiento de <i>A. af. pediades</i> en presencia de TMP, CPX y NPX .....	18
9.4. Determinación de la Actividad Lacasa .....	21
9.4.1. Actividad Lacasa Cualitativa .....	21
9.4.2. Actividad Lacasa Cuantitativa .....	24
9.5. Degradación de CAFs en mezcla .....	26
10. Resultados .....	28
10.1. Tolerancia del crecimiento de <i>A. af. pediades</i> en presencia de TMP, CPX y NPX (Mezcla) .....	28
10.1.1. Crecimiento radial.....	28
10.1.2. Producción de biomasa .....	33

10.1.3. Velocidad máxima de crecimiento radial .....	37
10.2. Actividad enzimática .....	41
10.2.1. Determinación de la Actividad Lacasa Cualitativa .....	41
10.2.2. Determinación de la Actividad Lacasa Cuantitativa .....	44
10.3. Degradación de CAFs en mezcla .....	47
11. Discusión .....	49
11.1. Tolerancia del crecimiento de <i>A. af. pediades</i> en presencia de TMP, CPX y NPX ..	49
11.2. Actividad enzimática de la Lacasa .....	51
11.3. Degradación de CAFs .....	53
12. Conclusiones.....	54
13. Referencias .....	56
14. Anexos .....	62
14.1. Anexo 1. ....	62
14.2. Anexo 2. ....	64
14.3. Anexo 3. ....	67
14.4. Anexo 4. ....	70
14.5. Anexo 5. ....	71
14.6. Anexo 6. ....	72
14.7. Anexo 7. ....	78
14.8. Anexo 8. ....	79

## Índice de Figuras

1. Estructura química de la Trimetoprima (TMP).....	7
2. Estructura química del Ciprofloxacino (CPX). ....	8
3. Estructura química del Naproxeno (NPX). ....	9
4. Oxidación del guayacol mediante la actividad lacasa. ....	25
5. Morfología de crecimiento de <i>A. af. pediades</i> al día 10 de crecimiento, en el cultivo con solución etano/agua, control y con fármacos. ....	29
6. Crecimiento radial de <i>A. af. pediades</i> en presencia de la mezcla de fármacos, con solución etanol/agua y en cultivo control, sin la mezcla de fármacos. ....	29
7. Desviaciones estándar de los promedios del crecimiento radial en cada tratamiento. ....	30
8. Box plot de la distribución del crecimiento de <i>A. af. pediades</i> en presencia y ausencia de CAFs (F=CAFs, EA=Solución Etanol/agua). ....	31
9. Producción de biomasa seca. Los valores se obtuvieron a los 12 días de cultivo (F=CAFs, EA=Solución Etanol/agua). ....	33
10. Box plot de la distribución de los datos de biomasa producida por <i>A. af. pediades</i> en todos los tratamientos (F=CAFs, EA=Solución Etanol/agua). ....	36
11. Diagrama de cajas y bigotes de la distribución de las $V_{max}$ de crecimiento radial de <i>A. af. Pediades</i> (F=CAFs, EA=Solución Etanol/agua). ....	39
12. Halo de oxidación de los sustratos inducido por la lacasa extracelular producida por <i>A. af. Pediades</i> al día 5 de crecimiento. ....	41
13. Box plot de la distribución del crecimiento radial frente a DMP y guayacol. ....	43
14. Crecimiento de <i>A. af. pediades</i> en cultivo líquido a través de 20 días con una pendiente remarcada en la fase exponencial. ....	45
15. Curva progreso de la actividad enzimática del ECE del día 5. ....	46
16. Curvas de calibración de TMP, CPX y NPX a concentración máxima de 1250 $\mu\text{g/L}$ . ..	48
17. Cromatograma de HPLC a los 60 minutos de reacción, flecha azul indica el tiempo de retención de TMP, roja CPX y verde NPX. ....	48
18. Curva progreso de la actividad enzimática cuantitativa del día 6 con una pendiente ajustada del minuto 0 al 10.....	71
19. Curva progreso de la actividad enzimática cuantitativa del día 8 con una pendiente ajustada del minuto 0 al 10.....	71
20. Curva progreso de la actividad enzimática cuantitativa del día 10 con una pendiente ajustada del minuto 0 al 10.....	72
21. Cromatograma de la reacción A0 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.....	72
22. Cromatograma de la reacción B0 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.....	73
23. Cromatograma de la reacción C0 con sus tiempos de retención de cada fármaco	

y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.....	73
24. Cromatograma de la reacción A5 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.....	74
25. Cromatograma de la reacción B5 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.....	74
26. Cromatograma de la reacción C5 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.....	75
27. Cromatograma de la reacción A10 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.....	75
28. Cromatograma de la reacción B10 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.....	76
29. Cromatograma de la reacción C10 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.....	76
30. Cromatograma de la reacción A60 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.....	77
31. Cromatograma de la reacción B60 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.....	77
32. Cromatograma de la reacción C60 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.....	78
33. Cromatograma de la inyección de la mezcla de CAFs a 1000 µg/L. ....	78
34. Cromatograma de la inyección del ECE sin CAFs.....	79

## Índice de tablas

1. Composición del MM que se usó para los medios de cultivo. ....	18
2. Tratamientos experimentales de tolerancia en crecimiento frente a CAFs con diferentes concentraciones. ....	19
3. Tratamientos experimentales de actividad enzimática cualitativa con los diferentes sustratos y concentraciones y el número de réplicas. ....	22
4. ANOVA del crecimiento radial de <i>A. af. pediades</i> . ....	30
5. Estadística descriptiva del crecimiento de <i>A. af. pediades</i> frente a las diferentes concentraciones de CAFs, las medias de los tratamientos presentan valores similares, indicando que las diferencias no superan la variabilidad interna de los datos. ....	32
6. Análisis de Tukey-Kramer del crecimiento de <i>A. af. pediades</i> donde se comparan todos los tratamientos y no se encuentra diferencia significativa entre los grupos. ....	32
7. Datos de la biomasa producida por <i>A. af. pediades</i> en los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de sus réplicas. ....	34
8. Estadística descriptiva de la producción de biomasa frente a las diferentes concentraciones de CAFs. ....	35
9. ANOVA del peso seco producido. ....	35
10. Análisis de Tukey-Kramer de la biomasa producida donde se comparan todos los tratamientos y no se encuentra diferencia significativa entre los grupos. ....	37
11. $V_{max}$ de <i>A. af. pediades</i> en presencia de CAFs y la solución Etanol/Agua. Cada valor es el promedio de sus réplicas. ....	37
12. ANOVA de la $V_{max}$ del crecimiento. ....	38
13. Estadístico descriptivo de las $V_{max}$ de crecimiento radial de <i>A. af. pediades</i> frente a las diferentes concentraciones de CAFs. ....	40
14. Análisis de Tukey-Kramer de la $V_{max}$ del crecimiento radial <i>A. af. pediades</i> donde se comparan todos los tratamientos y no se encuentra diferencia significativa entre los grupos. ....	40
15. Estadística descriptiva del crecimiento radial de <i>A. af. Pediades</i> . ....	42
16. Datos de $V_{max}$ e IP en los tratamientos de actividad cualitativa. Cada valor es el promedio de sus réplicas. ....	42
17. ANOVA del crecimiento radial frente a los sustratos. ....	43
18. Análisis de Tukey-Kramer del crecimiento de <i>A. af. pediades</i> . ....	44
19. Valores de actividad enzimática de la lacasa extracelular producida por <i>A. af. pediades</i> a los diferentes días de cultivo. ....	47
20. Concentraciones residuales de fármacos en la reacción con lacasa extracelular en muestras con concentraciones iniciales de 2500 $\mu\text{g/L}$ . ....	49
21. Desglose estadístico del análisis Tukey-Kramer para diferencias significativas	

en el crecimiento radial de <i>A. af. Pediades</i> frente a los CAFs. ....	62
22. Desglose estadístico del análisis Tukey-Kramer para diferencias significativas en la producción de biomasa de <i>A. af. pediades</i> frente a los CAFs en cultivos sólidos.....	64
23. Desglose estadístico del análisis Tukey-Kramer para diferencias significativas en el crecimiento radial de <i>A. af. Pediades</i> frente a los CAFs. ....	67
24. Desglose estadístico del análisis Tukey-Kramer para diferencias significativas en el crecimiento radial de <i>A. af. Pediades</i> frente a los CAFs. ....	70

## Índice de diagramas

1. Estrategia experimental de la tolerancia a los CAFs.....	21
2. Estrategia experimental de la actividad enzimática cualitativa .....	23
3. Estrategia experimental de la actividad enzimática cuantitativa .....	26
4. Estrategia experimental de la degradación de CAFs en mezcla.....	28

## Índice de ecuaciones

1. Ecuación 1. ....	20
2. Ecuación 2. ....	23
3. Ecuación 3. ....	24
4. Ecuación 4. ....	25

## 1. Introducción

Debido a la actividad antropogénica, el agua ha sido uno de los recursos naturales más afectados directa e indirectamente por una gran variedad de compuestos químicos contaminantes. Estos compuestos son difícilmente degradables y su estancia en el ambiente puede durar desde días hasta años. Entre los compuestos químicos se encuentra un grupo conocido como contaminantes emergentes, dentro de estos se pueden encontrar desde bloqueadores solares, drogas lícitas e ilícitas, productos del cuidado personal, productos de contraste y compuestos activos farmacéuticos (CAFs).

Los CAFs brindan un beneficio inmediato a los humanos y a los animales, dentro del organismo son absorbidos y distribuidos hasta alcanzar el objetivo terapéutico. El compuesto activo puede actuar directamente o bien ser metabolizado para producir un compuesto con mayor actividad, y así llevar a cabo la acción terapéutica. Una vez realizada esta acción, se eliminan por medio del hígado y los riñones. Por último, los CAFs o sus metabolitos producidos durante el metabolismo, después de realizar su acción terapéutica son liberados del organismo a través de las vías urinarias y heces fecales (Kummerer et al 2009). Su presencia en ecosistemas acuáticos ha afectado de manera negativa la vida de distintos organismos, causando efectos como problemas endócrinos, modificación genética y estrés oxidativo (Batucan et al., 2022; Ríos y cols., 2022).

El aumento de la población mundial ha causado que el uso de productos de cuidado personal y medicamento se incremente de manera exponencial, siendo indispensable en la vida diaria de las personas. Además del uso humano, hay un uso veterinario de medicamentos ya sea para el cuidado de animales o para la estimulación del crecimiento animal en granjas (Meléndez y cols., 2020).

Un problema significativo es el vertido de medicamentos caducados o no utilizados en el drenaje, siendo una práctica común en numerosos países, incluso en aquellos con sistemas de devolución formal. Según Rogowska y Zimmermann (2022), esta manera inadecuada de eliminación representa un problema generalizado en la gestión de residuos sanitarios domésticos, ya que muchos hogares optan por desechar los fármacos por el inodoro o el fregadero, en lugar de recurrir a programas de recolección adecuados. Este comportamiento contribuye a la liberación de productos farmacéuticos activos en el drenaje y cuerpos de agua, incrementando significativamente los riesgos medioambientales y sanitarios relacionados con la contaminación por medicamentos persistentes.

En un trabajo realizado por Calderón y cols. (2019) se analizaron aguas residuales urbanas y hospitalarias de la Ciudad de México, y se reportaron la presencia de analgésicos/antiinflamatorios, hormonas, anticonvulsivos y antibióticos. Entre los antibióticos, reportaron la presencia de trimetoprima a 0.55 µg/L, ofloxacina a 0.29 µg/L y de sulfametoxazol 0.63 a µg/L.

Para remediar los problemas de contaminación de agua, las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) desempeñan un papel fundamental. Su objetivo principal es remover o reducir las concentraciones de contaminantes presentes en las aguas residuales, disminuyendo así los riesgos ambientales y sanitarios asociados a estos compuestos. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos y los avances en el tratamiento de aguas, la eliminación completa de los contaminantes emergentes sigue siendo un desafío (Lesley Joseph y cols., 2019).

Los CAFs son sustancias químicas presentes en productos de uso cotidiano, como fármacos y productos de cuidado personal. Estas sustancias suelen encontrarse en concentraciones muy bajas en el agua, lo que dificulta su detección y tratamiento. Además, la estructura química de muchos CAFs tiende a ser compleja y resistente a los procesos convencionales de degradación, lo que limita la eficacia de las PTAR tradicionales en su eliminación. Esto se traduce en que, aunque las plantas de tratamiento

logran reducir algunos contaminantes, otros persisten en el efluente final (Al-Wasify y cols., 2023).

En este contexto, se han estado explorando métodos alternativos de tratamiento que puedan complementar los procesos convencionales y uno de los métodos más amigables al medio ambiente ha sido la biorremediación. Esta se enfoca en degradar o remover contaminantes utilizando elementos biológicos tales como bacterias, plantas y hongos. Estos organismos son capaces de adsorber o secretar enzimas para metabolizar compuestos tóxicos en moléculas de menor tamaño, o polimerizar las moléculas, para formar moléculas más grandes (polímeros), resultando menos tóxicas para el ambiente (K., Narendra y cols., 2024

En específico, los hongos basidiomicetos son capaces de producir enzimas de tipo óxido-reductasas que permiten descomponer compuestos orgánicos como la lignina, jugando un papel clave en la descomposición de materia orgánica en los ecosistemas terrestres. Las enzimas como la Lignina Peroxidasa (LiP), Manganese Peroxidasa (MnP) y Lacasas, son ejemplo de esas enzimas producidas por los basidiomicetos, éstas son capaces de degradar la lignina, uno de los polímeros naturales más abundantes en la tierra. Estas enzimas no tienen una especificidad para atacar a algún sustrato, por lo que las hace capaces de degradar diferentes compuestos xenobióticos y algunos contaminantes orgánicos tóxicos (Torres-Farradá y cols., 2024).

En este trabajo se estudió el efecto de Trimetoprima (TMP), Ciprofloxacina (CPX) y Naproxeno (NPX) en el crecimiento de *Agrocybe af. pediades*. Se realizaron cultivos en medio sólido para estudiar su tolerancia en crecimiento a los fármacos. Se hizo un cultivo sumergido de *A. af. pediades* para determinar la actividad enzimática del hongo y finalmente se estudió la capacidad de las enzimas producidas por el hongo para degradar a los CAFs.

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Presencia de CAFs en el medio ambiente**

La presencia de fármacos en el ambiente es un problema cada vez más evidente y preocupante. Estos compuestos, diseñados específicamente para tener efectos fisiológicos en organismos vivos, ingresan al ambiente principalmente a través de las aguas residuales de hogares, hospitales humanos y veterinarios, y residuos industriales de las plantas farmacéuticas. El problema se magnifica cuando el uso de productos farmacéuticos se abusa para el cuidado y estimulación del crecimiento en cerdos o vacas, provocando que los fármacos se encuentren presentes en los residuos de excremento y orina. De la misma manera, si se usa el excremento como abono para tierras agrícolas se estaría introduciendo indirectamente en el medio ambiente (Ashiwaju y cols., 2023; Yacuoba et al 2021; Calderon et al., 2019; Mordačiková et al., 2025).

Las PTAR juegan un papel fundamental en el manejo de aguas residuales, pero su diseño original no contempló la remoción de fármacos, es por eso, que las PTAR se han convertido en una ruta principal por donde los residuos de fármacos llegan al ambiente acuático.

Aunque estos procedimientos son efectivos para manejar contaminantes comunes, no están adaptados para procesar las complejas estructuras químicas y la resistencia de distintos tipos de CAFs, como consecuencia, estos compuestos permanecerán en el agua tratada (Al-Wasify y cols., 2023).

Esta agua tratada posteriormente se vierte en cuerpos acuáticos naturales o se aprovecha para el riego en campos agrícolas, lo que resulta en la contaminación de ecosistemas tanto acuáticos como terrestres. Es interesante comprender que este proceso no persigue una trayectoria lineal del consumo a la liberación en el ambiente, formándose un círculo de retorno. Los componentes farmacéuticos pueden regresar a nuestra alimentación a través de vegetales regados con agua

contaminada o productos marinos provenientes de aguas afectadas (Ashiwaju y cols., 2023).

También es importante mencionar que los CAFs presentes en las aguas residuales, tratadas o no, finalmente llegan a las diferentes fuentes de aguas naturales, superficiales, profundas, marinas. Esto significa un riesgo para los ecosistemas, ya que muchas especies acuáticas, desde microorganismos hasta peces, están expuestas continuamente a estas sustancias que alteran sus procesos bioquímicos y fisiológicos. Los efectos tóxicos de los fármacos en el ambiente pueden variar ampliamente dependiendo del tipo de compuesto y su concentración, pero algunos estudios han mostrado que incluso en concentraciones bajas, ciertos fármacos pueden interferir con el desarrollo, la reproducción y el comportamiento de organismos acuáticos. Por ejemplo, se ha reportado toxicidad en peces, y se han observado efectos teratogénicos, inhibición de la reproducción, inhibición del crecimiento y problemas con el sistema inmunológico (Aib, H y cols., 2025).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tienen un papel terapéutico, reduciendo la inflamación y el dolor; actúan inhibiendo a las enzimas ciclooxigenasas (COX 1 y 2), donde esas enzimas se han caracterizado en distintas especies de peces. Se ha demostrado que un AINE como la indometacina altera el proceso de maduración de los ovocitos y la ovulación en el pez cebrá en una concentración de 100 mg/L y que el ibuprofeno modifica el desove en el pez arroz japonés (Jenna y cols., 2010).

Hablando de antibióticos, son una de las herramientas más valiosas de la medicina moderna, sin embargo, su efectividad se está viendo en riesgo debido a la aparición acelerada de resistencia bacteriana. Este fenómeno ocurre cuando las bacterias desarrollan mecanismos que les permiten mutarse para sobrevivir en presencia de antibióticos que anteriormente las eliminaban. La situación se ha agravado por varios factores: el uso indiscriminado de antibióticos en la práctica médica, la automedicación, los tratamientos incompletos y, especialmente, su empleo masivo en la industria ganadera como promotores de crecimiento.

Se ha demostrado que la presencia de antibióticos en el ambiente ha incrementado los mecanismos de resistencia en algunos microorganismos patógenos presentes

en diferentes cuerpos de agua. Las concentraciones de antibióticos encontradas en el agua han permitido la formación de organismos resistentes como *Aeromonas*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*. Cuando estos microorganismos infectan a los humanos, pueden aumentar la mortalidad en sus huéspedes debido a la ineficacia de los antibióticos utilizados para combatir las infecciones (Narvaez y cols., 2012).

Esta capacidad de adaptación bacteriana, combinada con la escasez de nuevos antibióticos en desarrollo, representa una crisis sanitaria global emergente, donde infecciones comunes podrían volverse potencialmente mortales si perdemos nuestra capacidad de tratar infecciones bacterianas efectivamente.

## **2.2. Propiedades y uso de TMP, CPX y NPX**

### **2.2.1. Trimetoprima (TMP)**

La TMP, es un antibiótico con acción bactericida, pertenece al grupo de las diaminopirimidinas. Actúa inhibiendo la síntesis de tetrahidrofolato e inhibe el crecimiento bacteriano al interferir en la síntesis de ácidos nucleicos. Presenta un espectro antibacteriano amplio, pero es inactivo frente a *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Chlamydia* y *Pneumocystis*, así como sobre bacterias anaeróbicas estrictas (DrugBank, 2024).

Es una molécula compleja (figura 1), su fórmula química es  $C_{14}H_{18}N_4O_3$  y tiene un peso molecular de 290.32 g/mol. La TMP se encuentra entre los antibióticos más utilizados en el mundo, su consumo es humano, veterinario y se emplea como aditivo para los alimentos en la industria ganadera para promocionar el aumento y aceleración del crecimiento animal. En un estudio realizado por De Liguoro y cols. (2012), determinaron que la TMP tiene efectos tóxicos en términos de desarrollo y reproducción en cuatro diferentes organismos de agua dulce: *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Lemna minor* (inhibición del crecimiento), *Daphnia magna* (inhibición de la reproducción y el crecimiento) y *Poecilia reticulata* (inhibición de la actividad de natación).

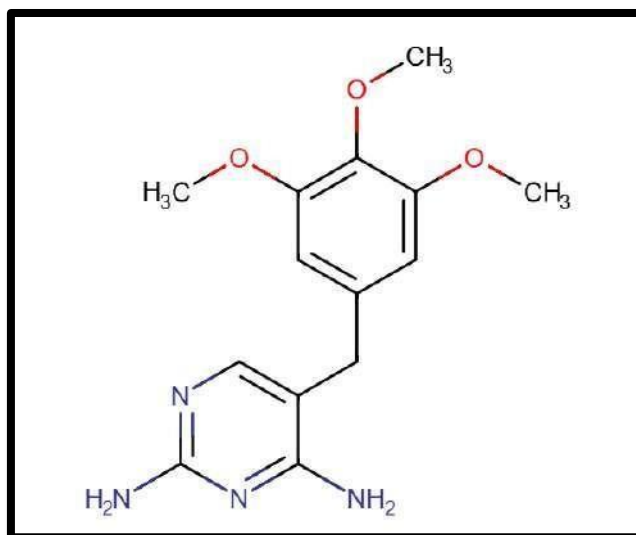


Figura 1. Estructura química de la Trimetoprima (TMP)

### 2.2.2. Ciprofloxacino (CPX)

El CPX es un antibiótico con acción bactericida, pertenece al grupo de las fluoroquinolonas, representa uno de los antibióticos más ampliamente utilizados en la medicina humana. Este fármaco destaca por su amplio uso terapéutico, siendo especialmente efectivo en el tratamiento de un amplio espectro de infecciones bacterianas que afectan diversos sistemas del organismo (DrugBank, 2024).

Es una molécula compleja, su fórmula química es  $C_{17}H_{18}FN_3O_3$  y tiene un peso molecular de 331.34 g/mol (figura 2).

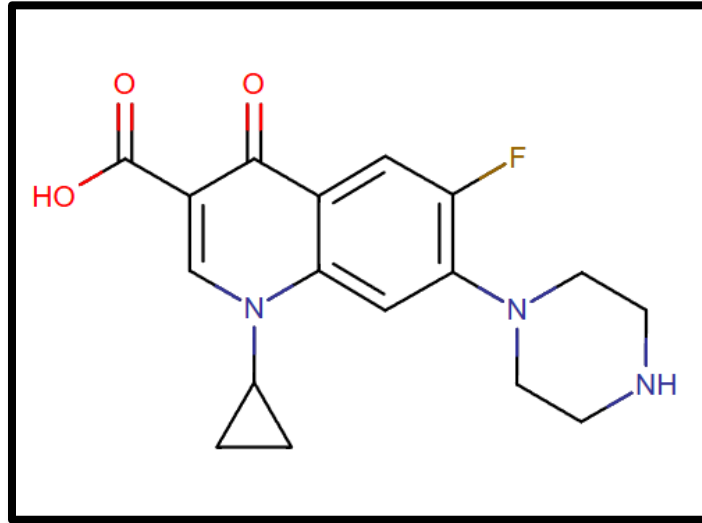


Figura 2. Estructura química del Ciprofloxacino (CPX)

Su aplicación clínica, como señalan Suárez y cols. (2011), abarca desde infecciones del tracto urinario, incluyendo cistitis y pielonefritis, hasta padecimientos en las vías respiratorias como neumonía y bronquitis, así como diversas infecciones gastrointestinales. En México, el CPX se ha posicionado como uno de los antibióticos más prescritos por los profesionales de la salud, lo cual ha generado preocupación en la comunidad médica debido a los patrones de resistencia bacteriana observados. Su relación con la bacteria *Escherichia coli*, uno de los patógenos más comunes en las infecciones humanas, frente a la cual se ha documentado, según estudios de Ponce de León (2018), presenta un índice de resistencia del 62% al antibiótico, comprometiendo la eficacia del tratamiento y planteando retos para el sistema de salud público, considerando que *E. coli* es uno de los principales agentes causantes de infecciones comunitarias y hospitalarias en el mundo.

Los antibióticos se utilizan frecuentemente como promotores de crecimiento en la industria ganadera, porcícola y avícola. Estos compuestos se administran en la alimentación de animales con el propósito de mejorar la absorción de nutrientes y, en algunos casos, prevenir enfermedades. Sin embargo, el uso extensivo de

antibióticos en la ganadería representa un riesgo ambiental ya que son excretados por los animales y terminan en fuentes de agua cercanas. En Venezuela, un estudio realizado por Abadía y cols. (2021) analizó la presencia de CPX, en productos avícolas. El estudio encontró concentraciones de CPX en muestras de músculo pectoral de pollo y huevos. Los resultados revelaron niveles de 0.56  $\mu\text{g/mL}$  en el músculo pectoral, 0.29  $\mu\text{g/mL}$  en huevos completos batidos, 0.25  $\mu\text{g/mL}$  en yemas separadas y 0.04  $\mu\text{g/mL}$  en claras separadas, lo que evidencia la persistencia de este compuesto en productos animales de consumo humano y plantea interrogantes sobre la potencial exposición indirecta a través de la dieta.

### 2.2.3. Naproxeno (NPX)

El NPX es un analgésico y antiinflamatorio no esterooidal de uso común en la medicina humana, indicado específicamente para el alivio del dolor y la reducción de la inflamación (DrugBank, 2024). Es una molécula compleja, su fórmula química es  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3$  y tiene un peso molecular de 230.26 g/mol (figura 3).

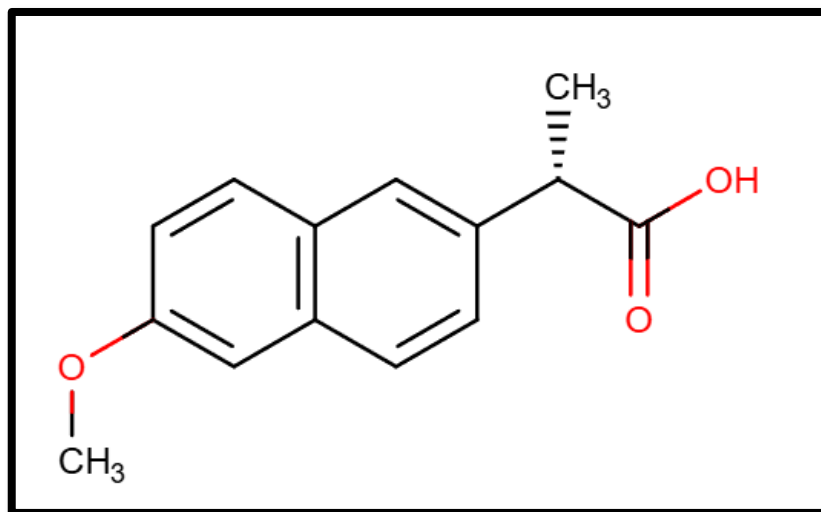


Figura 3. Estructura química del Naproxeno (NPX)

Dado que es un medicamento de libre venta, su consumo ha incrementado en los últimos años, en gran parte debido a su eficacia y disponibilidad para el tratamiento de diversos problemas. Sin embargo, su alta demanda y fácil acceso ha tenido un impacto ambiental considerable, pues el NPX, al igual que otros fármacos, llega a los cuerpos de agua superficiales y subterráneas, siendo detectable en concentraciones de hasta 32 ng/L en algunas áreas (Benotti y cols., 2009). La presencia de este compuesto en el ambiente acuático conlleva efectos negativos en diversas formas de vida acuática, causando alteraciones que incluyen problemas endocrinos, modificaciones genéticas y estrés oxidativo en organismos expuestos, lo cual impacta tanto a nivel individual como en las poblaciones (Ríos y cols., 2022).

### **2.3. Biorremediación**

En la actualidad, muchas investigaciones se centran en desarrollar y experimentar con diversos métodos que permitan eliminar contaminantes presentes en el medio ambiente, especialmente aquellos que son persistentes y difíciles de degradar. Uno de los métodos más respetuosos con el ambiente es la biorremediación, que se enfoca en el uso de organismos vivos para degradar o remover contaminantes. Esta estrategia emplea agentes biológicos como bacterias, plantas y hongos, los cuales poseen la capacidad de metabolizar compuestos tóxicos, transformándolos en moléculas más simples o, en algunos casos, uniéndolas para formar polímeros de mayor tamaño y menor toxicidad (K., Narendra y cols., 2024). A través de estos mecanismos, la biorremediación ofrece una opción sostenible y eficiente para la restauración de ecosistemas contaminados y la reducción de riesgos ambientales.

La biorremediación por hongos ha sido muy estudiada y presenta potencial de aplicación. Los hongos son organismos eucariotas caracterizados por la presencia de células con núcleo rodeado por una membrana y varios cromosomas, además de organelos citoplasmáticos también unidos a la membrana. A diferencia de los organismos autótrofos, los hongos son heterótrofos, lo que significa que no pueden sintetizar los compuestos necesarios para su metabolismo a partir de fuentes inorgánicas. En su lugar, obtienen nutrientes y energía al consumir materia orgánica

sintetizada por otros organismos, los cuales pueden parasitar, o bien, al descomponer material orgánico inerte en su entorno. Los hongos absorben sus nutrientes a través de su membrana celular, lo que les permite tomar directamente compuestos esenciales de su ambiente (Ellouze y cols., 2016).

En particular, los hongos basidiomicetos han atraído la atención de los investigadores debido a su gran potencial para la biorremediación. Estos hongos pertenecen a la división de los *Basidiomycota* y se caracterizan por producir estructuras reproductivas llamadas basidios, que generan y dispersan esporas en el ambiente, permitiéndoles adaptarse a una amplia variedad de hábitats. Desde un punto de vista macroscópico, los basidiomicetos suelen presentar cuerpos fructíferos conocidos como setas, con un micelio formado por hifas que se ramifican en el sustrato. A nivel microscópico, estos hongos producen micelio y esporas, lo que les confiere una gran adaptabilidad y resistencia en diversos ambientes.

Uno de los aspectos más relevantes de los basidiomicetos es su capacidad para producir enzimas de tipo oxidorreductasas, que son esenciales en la descomposición de compuestos orgánicos complejos como la lignina. Estas enzimas, entre las que destacan la Lignina Peroxidasa (LiP), la Manganese Peroxidasa (MnP) y las lacasas, desempeñan un papel fundamental en la degradación de la lignina, uno de los polímeros naturales más abundantes y complejos de la Tierra (Torres-Farradá y cols., 2024)

La habilidad de estas enzimas permite que los basidiomicetos contribuyan significativamente a la descomposición de la materia orgánica en los ecosistemas terrestres. Además, estas enzimas tienen la ventaja de no ser específicas para un sustrato en particular, lo que les otorga la capacidad de degradar una amplia gama de compuestos xenobióticos y otros contaminantes orgánicos tóxicos (Dinakarkumar y cols., 2024)

Gracias a su capacidad enzimática y a su baja especificidad, los hongos basidiomicetos se han utilizado con éxito para la remoción de diversos compuestos farmacéuticos en el ambiente. Estos hongos son capaces de degradar fármacos como antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos y antiepilépticos, entre otros, lo

que los convierte en una herramienta eficaz para tratar aguas contaminadas con residuos farmacéuticos. Su alta capacidad oxidativa y la similitud estructural de los compuestos farmacéuticos con la lignina les permite atacar un espectro amplio de contaminantes orgánicos, incluidos los hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos conocidos por su persistencia y toxicidad (Rojas, 2013).

El hongo con el que se trabajó es *Agrocybe af. pediades*, es una especie de hongo perteneciente a la familia *Strophariaceae*, dentro del orden Agaricales y de la división *Basidiomycota*. Sus basidiomas con un estípite corto, 2.5-6 cm de altura total, de color café amarillento (10 YR 8/6), cilíndrico, coriáceo, café amarillento (10 YR 7/6 a 10 YR 8/6), oscureciéndose al acercarse al píleo. Las esporas de *A. af. pediades* miden entre 9-13 x 6.6-7.5  $\mu\text{m}$ , son elípticas, lisas y de color café oscuro, y presentan un poro germinativo apical (Ortega-Ávila y cols., 2023). Este hongo es saprótrofo, lo que significa que contribuye a la descomposición de la materia orgánica en el suelo, jugando un papel fundamental en el reciclaje de nutrientes en los ecosistemas (González y cols., 2023)

### **3. Antecedentes**

#### **3.1. *Agrocybe af. pediades* como productor de lacasas**

En un estudio reciente, realizado por González y cols. (2023), se exploró la producción de lacasas por el hongo *A. af. pediades* bajo la presencia de compuestos como hexaclorobenceno (HCB) y sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ). Aunque se esperaba que estos compuestos pudieran actuar como inductores de la actividad enzimática, se observó que el HCB no incrementó la producción de lacasa. Sin embargo, el hongo mostró tolerancia y crecimiento en presencia de este contaminante tóxico, sugiriendo que *A. af. pediades* y sus lacasas podrían emplearse en estudios de degradación de xenobióticos, como el HCB y otros compuestos similares.

Las pruebas de zimografía revelaron únicamente una banda de actividad de lacasa constante en los diferentes tratamientos y tiempos evaluados, lo que indica que ni

el HCB ni el  $\text{CuSO}_4$  lograron inducir nuevas isoenzimas o aumentar la actividad de las ya presentes, a diferencia de otros hongos ligninolíticos, como *Pleurotus eryngii*, que sí presentan un aumento de actividad en presencia de cobre. Además, la caracterización enzimática determinó que el pH óptimo para la actividad de la lacasa de *A. af. pediades* es de 5.0, siendo desfavorable su actividad en medios alcalinos. Estos resultados resaltan la capacidad adaptativa de *A. af. pediades* en ambientes contaminados y su potencial uso en aplicaciones de biorremediación (González y cols. 2023).

### **3.2. Uso de basidiomicetos para degradar CAFs**

*Trametes versicolor*, ha sido ampliamente estudiado por sus capacidades en biorremediación y producción de enzimas lacasas. Este hongo ha demostrado ser efectivo en la degradación de diversos contaminantes en condiciones controladas.

En un estudio llevado a cabo por Jelic y cols. (2012), se evaluó la capacidad de *T. versicolor* para degradar carbamazepina (CBZ), un contaminante emergente en ambientes acuosos y de difícil remoción. El experimento se realizó en un biorreactor de lecho fluidizado pulsado con aire, operado tanto en modo de lote como en continuo, alcanzando 96% de degradación de CBZ. A lo largo del proceso, se detectaron diversos productos de degradación, entre los cuales se encuentran la acridona, acridina y otros compuestos derivados. La identificación de estos subproductos se logró mediante técnicas avanzadas como Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Espectrometría de Masas (MS) y Resonancia Magnética Nuclear (NMR), resaltando la capacidad de *T. versicolor* para transformar compuestos orgánicos complejos en productos menos tóxicos y potencialmente más biodegradables.

Otro estudio fue el de Marco y cols. (2010), quienes investigaron la degradación del NPX por *T. versicolor*. Los resultados indicaron que este hongo es capaz de transformar el NPX en varios sub-productos, en un proceso donde participaron dos enzimas clave: el citocromo P450 y la lacasa. El citocromo P450 fue responsable de la O-desmetilación del NPX, mientras que la lacasa facilitó la hidroxilación del

anillo aromático, ambos mecanismos cruciales para la degradación de este compuesto.

Recientemente, en un trabajo realizado por Tormo-Budowski y cols. (2021), se evaluó el uso de *T. versicolor* para la remoción de varios fármacos en aguas residuales sintéticas y reales. Utilizando dos configuraciones de biorreactores, el estudio demostró que *T. versicolor* pudo eliminar con éxito la TMP en un 98.2% tras 336 horas de operación en un biorreactor de tanque agitado. Estos hallazgos subrayan la adaptabilidad de *T. versicolor* para trabajar en diferentes sistemas de tratamiento y su eficacia en la remoción de contaminantes complejos en condiciones que simulan sistemas de aguas residuales reales.

Dado que no existe documentación sobre el uso de *A. af. pediades* en la degradación de CAFs, en este estudio se determinó la capacidad de *A. af. pediades* para degradar dichos compuestos

#### **4. Justificación**

Tomando en cuenta que los ecosistemas acuáticos enfrentan una creciente presencia de contaminantes, particularmente de origen farmacéutico, es necesario explorar alternativas de remediación ambiental que sean eficientes y amigables con el ambiente. Los hongos saprótrofos, como *A. af. pediades*, presentan características metabólicas que les permiten adaptarse y sobrevivir en condiciones adversas, incluyendo la capacidad de tolerar y posiblemente degradar compuestos tóxicos. Esta adaptabilidad sugiere que las enzimas extracelulares producidas por el hongo, entre ellas las enzimas oxidativas como las lacasas, podrían tener un gran potencial de aplicación en la biorremediación de contaminantes emergentes, lo cual convertiría a *A. af. pediades* en un modelo prometedor para este tipo de estudios.

La presencia de estos contaminantes en el agua plantea un desafío para los sistemas de tratamiento convencionales. Estudios previos sobre hongos ligninolíticos han demostrado que sus enzimas, como las lacasas, tienen capacidad

para degradar contaminantes orgánicos complejos debido a su actividad oxidativa y baja especificidad de sustrato. Por lo tanto, evaluar la capacidad de *A. af. pediades* para degradar estos fármacos a través de la actividad enzimática puede abrir nuevas rutas para el desarrollo de tecnologías sostenibles de remediación, contribuyendo así al manejo de la contaminación farmacéutica en el ambiente.

Desde el punto de vista social, esta investigación aborda una problemática urgente en México: la contaminación de cuerpos de agua por residuos farmacéuticos que afecta directamente la salud pública y los ecosistemas acuáticos de nuestro país. En diversas regiones de México, especialmente aquellas cercanas a zonas urbanas e industriales, se ha detectado la presencia creciente de compuestos farmacéuticos en aguas superficiales y subterráneas, lo que representa un riesgo para comunidades que dependen de estos recursos hídricos. El desarrollo de tecnologías de biorremediación basadas en organismos nativos como *A. af. pediades* no solo aportaría soluciones ambientalmente sostenibles, sino también económicamente viables para un país en desarrollo como el nuestro, donde la implementación de sistemas avanzados de tratamiento de agua puede resultar sumamente costosa. Los resultados de esta investigación podrían traducirse en la creación de procesos biotecnológicos accesibles que beneficien directamente a comunidades vulnerables, contribuyendo así a mejorar la calidad del agua y, por ende, la calidad de vida de la población mexicana.

Este trabajo se enfoca en entender el crecimiento y tolerancia de *A. af. pediades* frente a los CAFs seleccionados, trimetoprima (TMP), ciprofloxacino (CPX) y naproxeno (NPX), aportando información sobre su aplicación práctica en tecnologías de remediación. Una vez observada la tolerancia del *A. af. pediades* a crecer en medios sólidos y sumergido en presencia de TMP, COX y NPX se estudiará el potencial enzimático de *A. af. pediades* para ser utilizado como un recurso biotecnológico para la biorremediación de fármacos.

## 5. Hipótesis

*A. af. pediades* es capaz de crecer en presencia de TMP, CPX y NPX en medio de cultivo sólido, y la lacasa producida por este hongo tiene la capacidad de degradar estos fármacos mediante su actividad oxidativa, transformándolos en compuestos menos tóxicos para el ambiente.

## 6. Preguntas de investigación

- ¿Cómo es el crecimiento vegetativo del micelio de *A. af. pediades* en medios sólidos adicionados con trimetoprima, ciprofloxacino y naproxeno a diferentes concentraciones?
- ¿Cuál es el efecto del extracto crudo enzimático con actividad lacasa del cultivo líquido de *A. af. pediades* sobre las concentraciones iniciales de los fármacos TMP, CPX y NPX y la aparición de otros compuestos?

## 7. Objetivo general

- Determinar la tolerancia de *A. af. pediades* para crecer en presencia de TMP, CPX y NPX, en medios de cultivo sólido y determinar la capacidad del extracto crudo enzimático (lacasa), obtenido del crecimiento del hongo en cultivo líquido para degradar los CAFs.

## 8. Objetivos específicos

- Determinar la capacidad de crecimiento de *A. af. pediades* en presencia de TMP, CPX y NPX en medio sólido mediante los parámetros de velocidad de crecimiento radial y producción de biomasa, para determinar la tolerancia del hongo.
- Determinar la actividad de la lacasa extracelular, presente en el extracto crudo enzimático producida por *A. af. pediades* en cultivo líquido
- Determinar si la lacasa presente en el extracto crudo enzimático obtenido del crecimiento de *A. af. pediades* en cultivo líquido puede degradar TMP, CPX y NPX.

## **9. Metodología**

### **9.1. Organismo y condiciones de cultivo**

La cepa del hongo *A. af. pediades* fue obtenida de un bosque de *Juniperus deppeana*, ubicado en el municipio de Ixtacuixtla de Mariano Matamoros en el estado de Tlaxcala. La cepa con número de registro CM-CNRG 700 de la Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP forma parte de la colección de cepas fúngicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Para su propagación se realizaron cultivos en medio sólido en cajas de Petri (90 mm) con extracto de malta agar (EMA), el medio se esterilizó posterior a su preparación a 15 psi durante 15 minutos. Posterior a la inoculación se incubó a 28 °C por 10 días esperando una invasión completa del micelio en las cajas.

### **9.2. Compuestos Activos Farmacéuticos**

Los fármacos utilizados (TMP, CPX y NPX) se adquirieron en Sigma Aldrich. Las soluciones stock se prepararon con solución etanol/agua en proporción 1:1 en volumen a una concentración de 500 mg/L y se conservaron en refrigeración a 4°C.

### **9.3. Crecimiento de *A. af. pediades* con TMP, CPX y NPX en medio sólido.**

#### **9.3.1. Preparación del inóculo**

Se inocularon cajas Petri con un medio mínimo (MM) y micelio de *A. af. pediades*, y se incubaron a 28°C durante 5 días. Una vez propagado el hongo, se prepararon tres matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de L MM líquido (Téllez-Téllez y cols., 2008) y se esterilizó a 15 psi y 120°C durante 15 minutos. Posteriormente, se inocularon con 3 cilindros uniformes de agar de 8 mm que tenían el micelio y se incubaron a 28 °C en agitación a 150 rpm durante 10 días.

Al obtener un crecimiento micelial de *A. af. pediades* en los matraces, se licuó el caldo de cultivo junto con el micelio, posteriormente se tomaron alícuotas de 500 µL y se inocularon en cajas Petri con MM con agar y se incubaron a 28 °C durante 5 días. Estos cultivos se utilizaron como inóculos para los experimentos de tolerancia a los fármacos. La composición del MM se encuentra en la tabla 1.

### 9.3.2. Tolerancia del crecimiento de *A. af. pediades* en presencia de TMP, CPX y NPX

De los cultivos mencionados anteriormente, se tomaron cilindros uniformes de agar de 8 mm de diámetro que contenía el micelio para inocularse en el centro de las cajas de Petri con 25 mL de MM. Se realizaron tres tratamientos diferentes, MM con agar como control, MM con agar y la mezcla de los fármacos con diferentes concentraciones, y MM con agar y la solución de etanol/agua; que es en la que se disuelven los fármacos. Todos los tratamientos se incubaron en la misma condición que las anteriores.

Al medio sólido se le adicionaron 15 g de agar por litro y el MM tenía la siguiente composición con un pH de 6. La relación C/N es de 77.5 con la cuál crecen bien los basidiomicetos y producen enzimas ligninolíticas.

Tabla 1. Composición del MM que se usó para los medios de cultivo

Compuesto	Cantidad (g/l)
Glucosa	10
Extracto de levadura	0.6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4
FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.05
MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	0.05
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.001
<b>Relación C/N</b>	
4/0.0156 = 77.5 C/N	

Al MM se adicionaron 6 concentraciones diferentes de fármacos: 50, 100, 250, 1000, 2500 y 5000 µg/L. en mezcla. Se prepararon soluciones stock de TMP, CPX y NPX con una concentración inicial de 500 mg/L de cada fármaco y se realizaron las diluciones para tener las concentraciones problema.

Se hicieron cuatuplicados de cada concentración de fármacos, etanol/agua y seis controles, solo con el MM (tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos experimentales de tolerancia en crecimiento frente a CAFs con diferentes concentraciones.

Tratamiento	Concentración de CAFs (µg/L)	Volumen de la solución CAFs y Etanol/Agua	No. de Replicas
Control	0	MM + Inóculo	6
T1	50	MM + Inóculo + 0.025 mL CAFs	4
T2	100	MM + Inóculo + 0.05 mL CAFs	4
T3	250	MM + Inóculo + 0.125 mL CAFs	4
T4	1000	MM + Inóculo + 0.5 mL CAFs	4
T5	2500	MM + Inóculo + 1.25 mL CAFs	4
T6	5000	MM + Inóculo + 2.5 mL CAFs	4
T7	0	MM + Inóculo + 0.025 mL etanol/agua	4
T8	0	MM + Inóculo + 2.5 mL etanol/agua	4

Se tomaron en cuenta dos diferentes criterios de tolerancia para el crecimiento del hongo, los cuales serán:

- Velocidad de crecimiento radial: Con el uso de un vernier se midió el diámetro micelial que fue inoculado en el centro en periodos de 24 horas hasta que el micelio cubra por completo la superficie de cada caja de Petri.
- Generación de biomasa: Se extrajo la biomasa producida en las cajas de Petri a los 12 días de cultivo, antes de que el micelio invadiera toda la caja. La biomasa húmeda se pesó en papeles filtro y se puso en una estufa de secado a 80°C, posteriormente se pesó la biomasa seca.

Se realizaron análisis estadísticos como dispersiones lineales del crecimiento y gráficos de producción de biomasa, y se obtuvieron las velocidades máximas de crecimiento ( $V_{max}$ ) aplicando una regresión lineal mediante la ecuación 1 (León y cols. 2024):

$$\frac{dCR}{dt} = V_{max} \quad (1)$$

Donde:

$$\frac{dCR}{dt} = \text{Tasa de crecimiento diametral} \left( \frac{cm}{día} \right)$$

$t = \text{Tiempo (día)}$

$$V_{max} = \text{Velocidad máxima de crecimiento} \left( \frac{cm}{día} \right)$$

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el software estadístico NCSS para evaluar si existen diferencias significativas en el crecimiento radial y velocidades de crecimiento del hongo en presencia de diferentes concentraciones de cada fármaco. Adicionalmente, se procedió a realizar una prueba de Tukey-Kramer con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , independientemente de los resultados del ANOVA, con el fin de obtener un análisis más exhaustivo de las posibles diferencias entre todos los pares de tratamientos. Esta decisión metodológica permitió examinar con mayor detalle las tendencias y patrones en el crecimiento radial del hongo frente a las distintas concentraciones de los fármacos evaluados, proporcionando información

complementaria sobre el comportamiento del organismo en estas condiciones experimentales.

La metodología del experimento se representa de manera esquemática en el diagrama 1:

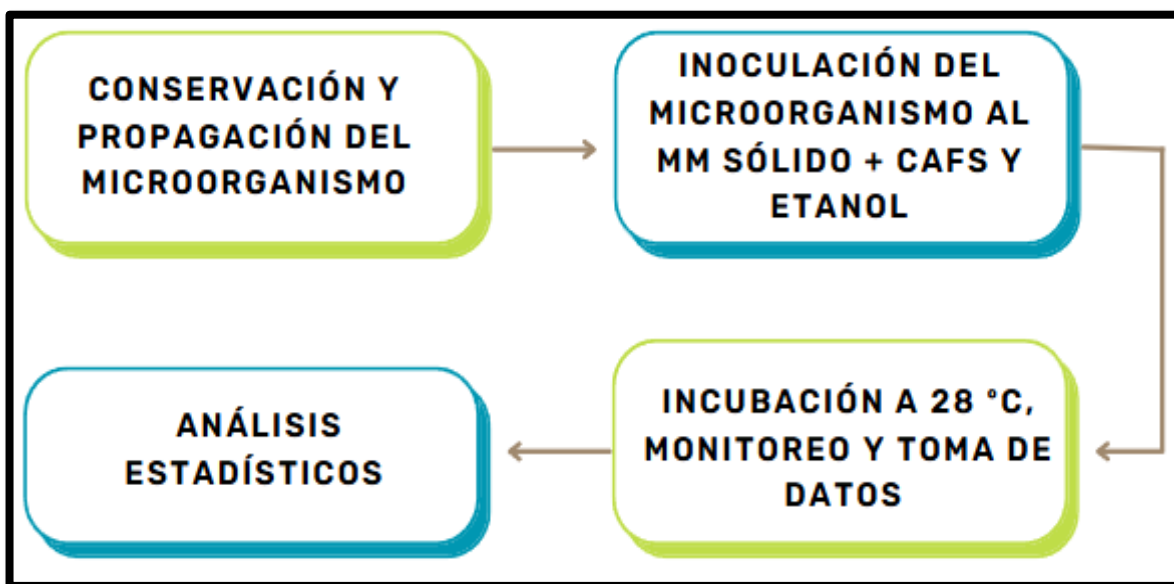


Diagrama 1. Estrategia experimental de la tolerancia a los CAFs

## 9.4. Determinación de la Actividad Lacasa

### 9.4.1. Actividad Lacasa Cualitativa

La actividad enzimática se define como la cantidad de enzima activa que consume un sustrato y lo va formando como un producto. (González (2017)). Para la actividad enzimática cualitativa se espera observar un halo de oxidación de dos sustratos diferentes debido a la actividad de la enzima lacasa producida por *A. af. pediades*. Se tomaron cilindros uniformes de agar de 8 mm de diámetro que tenían el micelio de *A. af. pediades* para inocularse en el centro de las cajas de Petri que contenían 25 mL de medio Papa Dextrosa Agar (PDA) con el sustrato Guayacol (4 mM) y el sustrato Dimetoxifenol (DMP) (4 mM). Se

realizaron 5 tratamientos diferentes y cada uno por cuatuplicado, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos experimentales de actividad enzimática cualitativa con los diferentes sustratos y concentraciones y el número de réplicas.

Tratamiento	Condiciones	Concentración Guayacol (mM)	Concentración Dimetoxifenol (mM)	No. de Replicas
Control	PDA + Inóculo	0	0	4
T1	PDA + Inóculo + Guayacol	4	0	4
T2	PDA + Inóculo + Dimetoxifenol	0	4	4
T3	PDA + Guayacol	4	0	4
T4	PDA + Dimetoxifenol	0	4	4

Se tomaron en cuenta dos criterios diferentes para la actividad enzimática cualitativa, los cuales fueron:

- Velocidad de crecimiento radial: Con el uso de un vernier se midió el diámetro micelial que fue inoculado en el centro en periodos de 24 horas durante 12 días.
- Índice de potencia: Se calculó el índice de potencia (IP) como en el trabajo realizado por González (2017), definido como la razón entre el diámetro del halo de oxidación y el diámetro de crecimiento de la colonia. Para estimar la magnitud real del halo de oxidación considerando la velocidad de crecimiento del micelio, se realizó el cálculo del índice de potencia (IP), utilizando la ecuación 2:

$$IP = \frac{\text{diámetro de oxidación}}{\text{diámetro del crecimiento del micelio}} \quad (2)$$

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$  mediante el software estadístico NCSS para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Posteriormente, se realizó una prueba post hoc de Tukey-Kramer, tanto en casos donde el ANOVA indicó diferencias significativas como en aquellos donde no, para obtener un análisis más amplio de las posibles diferencias entre los dos sustratos y el control. Este enfoque permitió evaluar con mayor precisión si el crecimiento radial del hongo en presencia de guayacol y DMP presenta patrones distintivos, proporcionando así información detallada sobre la interacción entre *A. af. pedicades* y estos compuestos fenólicos.

La metodología del experimento se representa de manera esquemática en el diagrama 2:

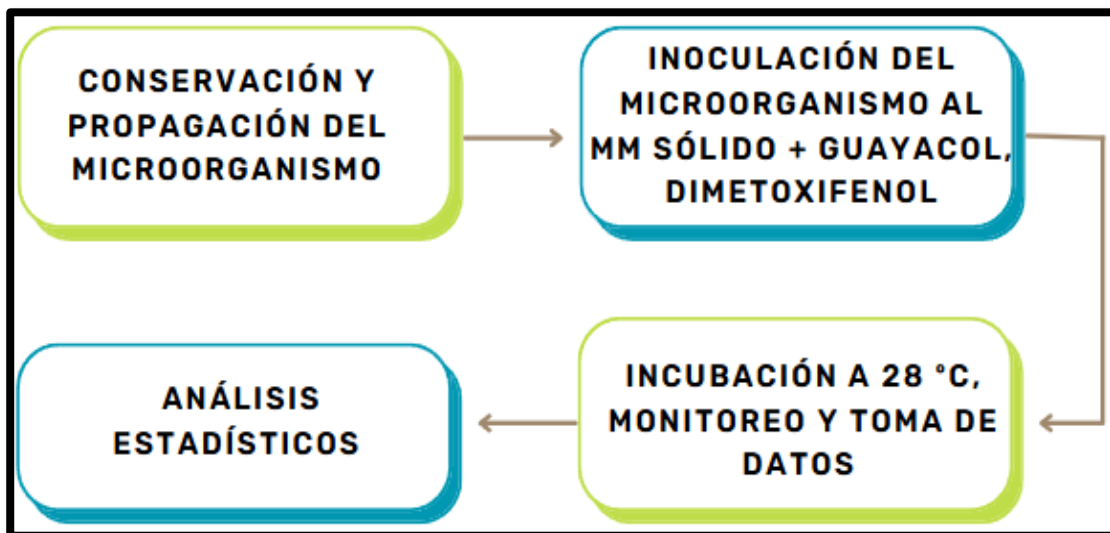


Diagrama 2. Estrategia experimental de la actividad enzimática cualitativa

#### 9.4.2. Actividad Lacasa Cuantitativa

Para la cuantificación de la actividad enzimática de lacasa se siguió la metodología propuesta por Mendoza (2024) donde se utilizó el valor obtenido del coeficiente de extinción molar del guayacol que fue de  $11414.9732 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para pH 5.

Para esto se inocularon 4 discos de micelio de *A. af. pediades* de 8 mm en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 40 mL de MM líquido y se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  con una agitación de 130 rpm por 20 días. Se tomaron muestras a diferentes tiempos, se filtraron para obtener la biomasa producida y se cuantificó en peso seco, para obtener una cinética de crecimiento de *A. af. pediades*. Se obtuvo el caldo de cultivo, libre de biomasa, llamado el extracto crudo enzimático (ECE) de los días 5, 6, 8 y 10, y se hicieron reaccionar con el sustrato guayacol para cuantificar la actividad enzimática.

Las reacciones de oxidación fueron en un volumen de 200  $\mu\text{L}$ , se partió desde una solución stock de guayacol a 100 mM y se llevó a cabo con una concentración final de 0.02 mM (2  $\mu\text{L}$ ) y 198  $\mu\text{L}$  de ECE directo, con pH 5, por triplicado. Las reacciones se cuantificaron mediante un espectrofotómetro de microplacas Biotek Epoch con un detector de UV-Vis integrado para obtener la absorbancia.

Se midió el cambio de la absorbancia con respecto al tiempo, cada 10 segundos durante 1 hora, siguiendo un método continuo para obtener una curva progreso tiempo vs absorbancia. A la curva progreso se le aplicó un ajuste lineal en el periodo lineal de la reacción para poder calcular la pendiente de la recta, la cual funciona como velocidad inicial de la reacción.

Siguiendo la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon * c * l \quad (3)$$

Donde A es la absorbancia,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar ( $\frac{\text{L}}{\mu\text{mol cm}}$ ), c es la concentración del tetrámero en unidades molares (M) y l es el paso óptico de la celda en cm. Utilizando la pendiente de la recta como velocidad inicial y el coeficiente de extinción molar del guayacol se obtuvo la actividad enzimática de la siguiente manera con la ecuación 3:

$$\text{Actividad enzimática de formación de producto} \left( \frac{\mu\text{mol de producto}}{L \text{ min}} \right) = \frac{V}{E_0} = \frac{\left( \frac{dA}{dt} \right)}{\varepsilon * l} \quad (4)$$

Donde:

$v$  = Velocidad inicial

$E_0$  = Concentración inicial de la enzima

$\frac{dA}{dt}$  = Cambio de la absorbancia con respecto al tiempo [ $\text{min}^{-1}$ ]

$\varepsilon$  = Coeficiente de extinción molar [ $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1} L$ ]

$l$  = Longitud de la celda [cm]

Posteriormente, se aplicó la estequiometría de la reacción, donde se necesitan 4 moles de guayacol para formar 1 mol de tetrámero, como en la figura 4.

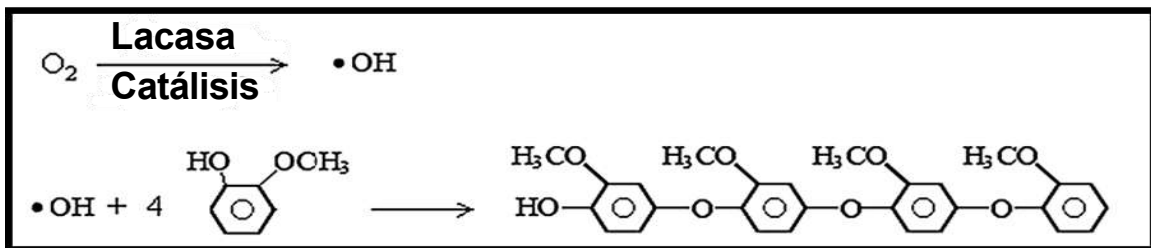


Figura 4. Oxidación del guayacol mediante la actividad lacasa (Jiang et al., 2011).

La metodología del experimento se representa de manera esquemática en el diagrama 3:



Diagrama 3. Estrategia experimental de la actividad enzimática cuantitativa

### 9.5. Degradación de CAFs en mezcla

Para la cuantificación de la degradación de CAFs se siguió la metodología propuesta por Mendoza (2024) con algunas modificaciones. Se inocularon 8 discos de micelio de *A. af. pedicades* de 8 mm en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 40 mL de MM líquido, asimismo se le añadió un inhibidor de proteasas y se incubaron a 28°C con una agitación de 130 rpm por 5 días, por triplicado. Se filtró la biomasa producida y se obtuvo el ECE del día 5, que se hizo reaccionar con la mezcla de CAFs.

Las reacciones de degradación se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 30 mL de ECE y 0.75 mL de una solución stock de fármacos individuales a 100 mg/L de concentración, para llegar a una concentración de 2500 µg/L de cada fármaco. Se tomaron muestras de 1.5 mL de la reacción y se añadieron

a viales de 2 mL a los tiempos 0, 5, 10 y 60 minutos. Posteriormente se diluyeron las muestras 1:1 antes de inyectar al HPLC.

La cuantificación de los CAFs se realizó utilizando el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) con detector UV (Agilent Technologies, serie 1260), compuesto por una bomba cuaternaria, un desgasificador y el detector de longitud de onda variable UV-VIS. La columna analítica fue una Phenomenex KINETEX C18 (15 cm, 150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m). La temperatura de la columna se mantuvo a 30°C y el volumen de inyección fue de 20  $\mu$ L. Las fases móviles fueron: ácido fórmico 0.1% en agua (A) y ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo (B). Para la separación de los CAFs se utilizó un gradiente lineal que comenzó en 0 min con 80% de A y terminó a los 17 min con 90% de B y 10% de A, con un flujo de 0.4 ml/min de fase móvil. La detección de los CAFs se realizó a una longitud de onda de 270 nm y su cuantificación se realizó con el método de estándar externo utilizando el software ChemStation (Agilent).

La metodología del experimento se representa de manera esquemática en el siguiente diagrama:



Diagrama 4. Estrategia experimental de la degradación de CAFs en mezcla

## 10. Resultados

### 10.1. Tolerancia del crecimiento de *A. af. pediades* en presencia de TMP, CPX y NPX (Mezcla)

#### 10.1.1. Crecimiento radial.

Se registraron los datos obtenidos por la formación del micelio de *A. af. pediades* cada 24 h, hasta el día 12, antes de que el micelio invadiera la caja Petri. Cada concentración de fármaco, etanol/agua y controles se realizaron con sus respectivas réplicas. Con esos datos se obtuvieron la velocidad media de crecimiento. La producción de biomasa en peso seco para cada tratamiento se obtuvo solamente a los 12 día de cultivo. En la figura 5 se observa el crecimiento de *A. af. pediades* al día 10 donde se puede observar

un crecimiento amorfo en los tratamientos con fármacos y etanol/agua, mientras que en el cultivo control el crecimiento es más homogéneo.

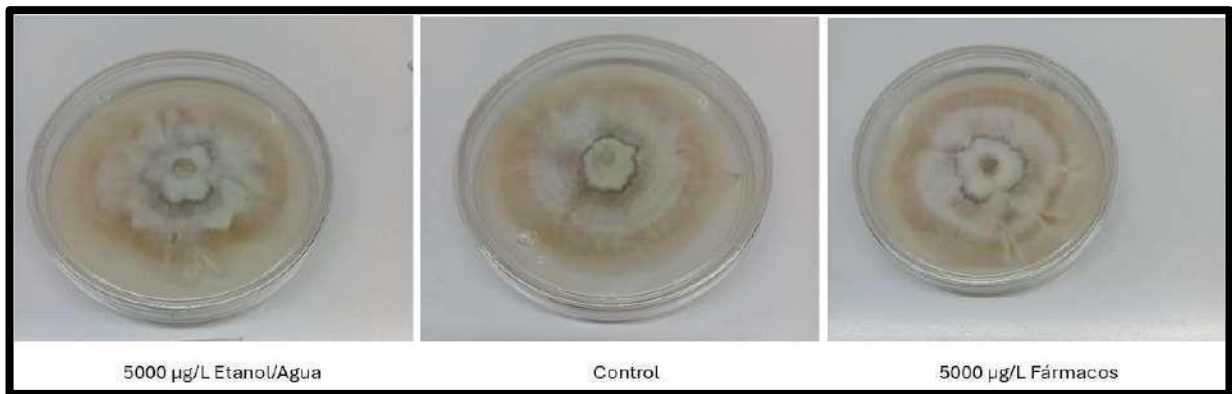


Figura 5. Morfología de crecimiento de *A. pediades* al día 10 de crecimiento, en el cultivo con solución etanol/agua, control y con fármacos.

La figura 6 muestra las cinéticas de crecimiento radial de *A. af. pediades* obtenidas de los datos de cada tratamiento y cada punto es el promedio del crecimiento radial de 4 a 6 valores, observándose un crecimiento exponencial de *A. af. pediades* a partir del segundo día de cultivo.

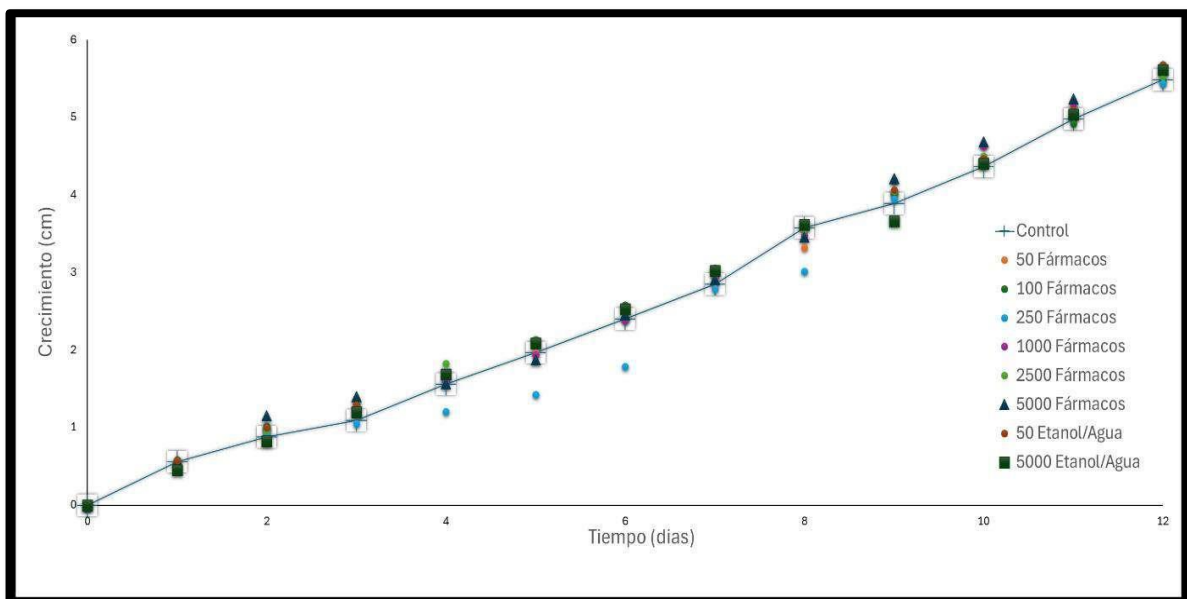


Figura 6. Crecimiento radial de *A. af. pediades* en presencia de la mezcla de fármacos, con solución etanol/agua y en cultivo control, sin la mezcla de fármacos.

Al graficar las desviaciones estándar de las medias (figura 7), es importante destacar que, aunque en el tratamiento 250 F se observó una ligera inhibición del crecimiento durante los días 4 a 8, las desviaciones estándar superpuestas sugieren que esta diferencia no es estadísticamente relevante. Estos resultados confirman que los fármacos a las concentraciones probadas, de 50 a 5000  $\mu\text{gL}^{-1}$ , no inhiben el crecimiento de *A. af. pediades*, demostrando la tolerancia del hongo a estos compuestos farmacéuticos en las concentraciones evaluadas.

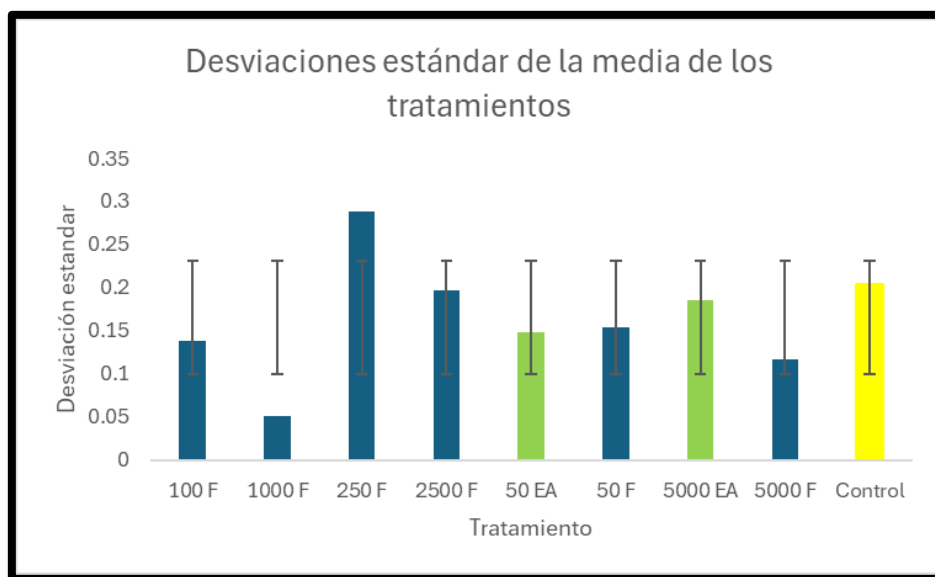


Figura 7. Desviaciones estándar de los promedios del crecimiento radial en cada tratamiento.

Se realizó la prueba ANOVA (tabla 4) con los datos del crecimiento radial y al obtener que el P-Value = 0.35820, se indica que no hay diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

Analysis of Variance Table						
Model Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	P-Value	Reject Equal Means at $\alpha = 0.05$ ?
Between (Tratamientos_)	8	0.2940954	0.03676192	1.1557	0.35820	No
Within (Error)	29	0.9225	0.03181034			
Adjusted Total	37	1.216595				
Total	38					

Tabla 4. ANOVA del crecimiento radial de *A. af. pediades*.

Asimismo, se realizó la prueba Tukey-Kramer para analizar a fondo si existían diferencias significativas en el crecimiento radial entre los diferentes tratamientos. El análisis arrojó un box plot (figura 8) que muestra el crecimiento radial de *A. af. pediades* bajo las diferentes condiciones experimentales. Es notable que la dispersión de las cajas de todos los tratamientos se solapa entre ellas, lo que sugiere visualmente la ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos.

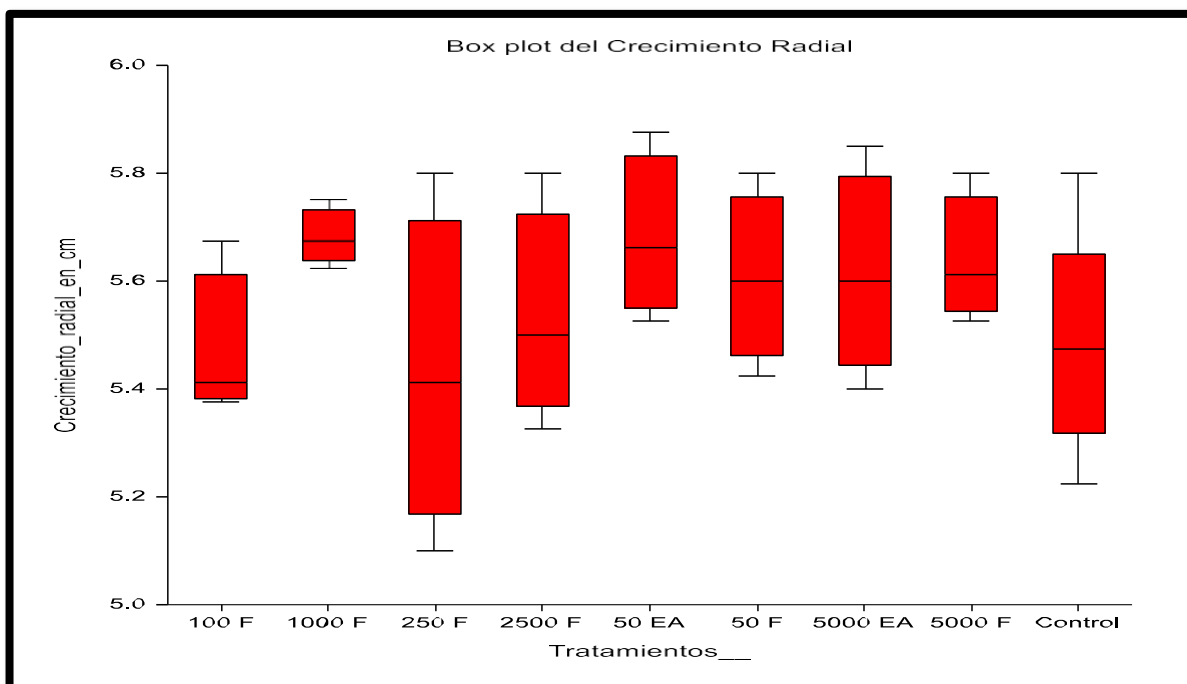


Figura 8. Box plot de la distribución del crecimiento de *A. af. pediades* en presencia y ausencia de CAFs (F=CAFs, EA=Solución Etanol/agua).

La estadística descriptiva (tabla 5) muestra que el crecimiento radial promedio para todas las 38 evaluaciones osciló alrededor de 5.5664 cm. El grupo control presentó una media de  $5.4875 \pm 0.2047$  cm, mientras que los tratamientos mostraron medias entre  $5.6375 \pm 0.1163$  cm (5000  $\mu\text{g/L}$  F) y  $5.6125 \text{ cm} \pm 0.1854$  (5000  $\mu\text{g/L}$  E/A). La desviación estándar más alta se observó en el tratamiento de 250  $\mu\text{L}$  F (0.2882 cm), mientras que la más baja se presentó en el tratamiento de 1000  $\mu\text{L}$  F (0.0515 cm).

Esto se confirma con los valores del efecto (Effect) que son cercanos a cero para todos los tratamientos, variando desde -0.1020 (100 µL F) hasta 0.1104 (1000 µL F y 50 µL EA).

Tabla 5. Estadística descriptiva del crecimiento de *A. af. pedicades* frente a las diferentes concentraciones de CAFs, las medias de los tratamientos presentan valores similares, y los efectos observados son pequeños, indicando que las diferencias no superan la variabilidad interna de los datos.

Descriptive Statistics						
Group	Count (ni)	Mean	Effect	Median	Standard Deviation	Standard Error $\sqrt{(MSE/ni)}$
All	38	5.566447	5.570833			
<b>Tratamientos__</b>						
100 µL F	4	5.46875	-0.1020833	5.4125	0.1390069	0.08917727
1000 µL F	4	5.68125	0.1104167	5.675	0.05153882	0.08917727
250 µL F	4	5.43125	-0.1395833	5.4125	0.2882237	0.08917727
2500 µL F	4	5.53125	-0.03958333	5.5	0.1972467	0.08917727
50 µL EA	4	5.68125	0.1104167	5.6625	0.1477258	0.08917727
50 µL F	4	5.60625	0.03541667	5.6	0.1546165	0.08917727
5000 µL EA	4	5.6125	0.04166667	5.6	0.185405	0.08917727
5000 µL F	4	5.6375	0.06666667	5.6125	0.1163687	0.08917727
Control	6	5.4875	-0.08333334	5.475	0.2047865	0.07281294

Asimismo, la prueba de Tukey-Kramer donde se utilizó un  $\alpha = 0.05$  arrojó sus resultados donde se compararon los datos de crecimiento y se verificó en conjunto con el ANOVA que no existe una diferencia significativa entre los grupos de tratamiento (tabla 6), el desglose completo del análisis se encuentra en el anexo 1.

Tabla 6. Análisis de Tukey-Kramer del crecimiento de *A. af. pedicades* donde se comparan todos los tratamientos y no se encuentra diferencia significativa entre los grupos.

Tukey-Kramer Multiple Comparison Test			
Comparison Term: Tratamientos__			
Group	Count	Mean	Different From Groups
100 µL F	4	5.46875	
1000 µL F	4	5.68125	
250 µL F	4	5.43125	
2500 µL F	4	5.53125	
50 µL EA	4	5.68125	
50 µL F	4	5.60625	
5000 µL EA	4	5.6125	
5000 µL F	4	5.6375	
Control	6	5.4875	

$\alpha = 0.05$ , Error Term = S(A), DF = 29, MSE = 0.03181034, Critical Value = 4.7315

### 10.1.2. Producción de biomasa

En cuanto a la producción de biomasa, se tomaron los cultivos a los 12 días, para cada tratamiento y sus réplicas, se fundió el agar que incluía el micelio y se filtró, y el micelio se secó en un horno a 80 °C durante 24 horas y finalmente se cuantificó el peso seco. En la figura 9 se muestran los resultados de la biomasa seca obtenida para cada tratamiento. En el cultivo el control, sin etanol y sin fármacos produjo  $0.2965 \pm 0.0184$  g, y en los cultivos con fármacos y con etanol/agua se obtuvieron valores similares.

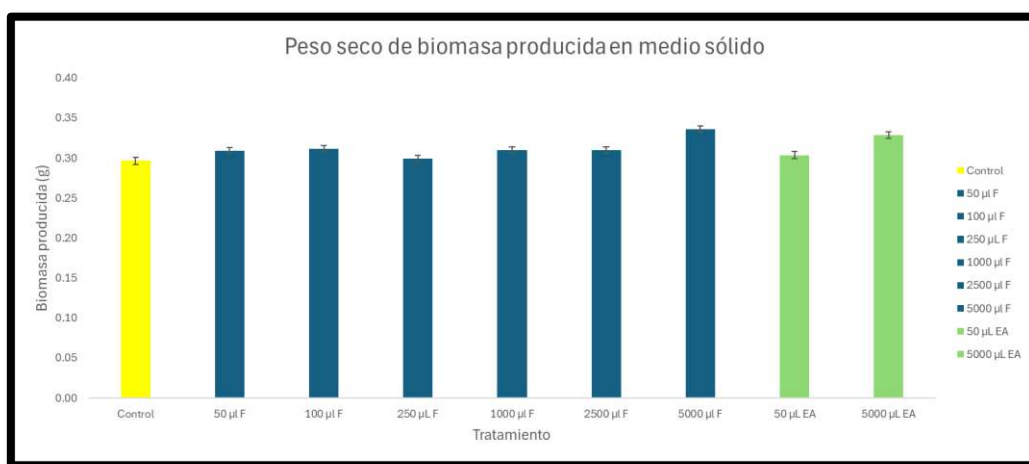


Figura 9. Producción de biomasa seca. Los valores se obtuvieron a los 12 días de cultivo (F=CAFs, EA=Solución Etanol/agua).

Asimismo, los datos obtenidos del peso seco (Tabla 7) se analizaron con una prueba ANOVA y posteriormente con la prueba prueba Tukey-Kramer para analizar si hubo diferencias significativas.

Tabla 7. Datos de la biomasa producida por *A. af. pedicades* en los diferentes tratamientos. Los valores son el promedio de sus réplicas.

Tratamiento	Promedio del peso seco $\pm$ DS (g)
Control	0.2965 $\pm$ 0.0184
50 $\mu$ l F	0.3090 $\pm$ 0.0277
100 $\mu$ l F	0.3115 $\pm$ 0.0133
250 $\mu$ L F	0.2991 $\pm$ 0.0240
1000 $\mu$ l F	0.3100 $\pm$ 0.0192
2500 $\mu$ l F	0.3099 $\pm$ 0.0152
5000 $\mu$ l F	0.3361 $\pm$ 0.0164
50 $\mu$ L EA	0.3036 $\pm$ 0.0197
5000 $\mu$ L EA	0.3286 $\pm$ 0.0234

La estadística descriptiva del peso seco (tabla 8) reveló los siguientes aspectos importantes:

La media global de producción de biomasa fue de 0.3107 g y se observa que los tratamientos con mayor producción de biomasa fueron 5000  $\mu$ L F y 5000  $\mu$ L EA, con medias de 0.3360  $\pm$  0.0164 y 0.3285  $\pm$  0.0234 g respectivamente, mostrando un ligero incremento respecto al resto de tratamientos, donde el grupo control presentó la menor producción de biomasa con una media de 0.2965  $\pm$  0.0128 g. La variabilidad en los datos, representada por la desviación estándar, fue mayor en el tratamiento de 50  $\mu$ L F (0.0277), mientras que el control mostró la menor variabilidad (0.0128).

Tabla 8. Estadística descriptiva de la producción de biomasa frente a las diferentes concentraciones de CAFs.

<b>Descriptive Statistics</b>						
<b>Group</b>	<b>Count (ni)</b>	<b>Mean</b>	<b>Effect</b>	<b>Median</b>	<b>Standard Deviation</b>	<b>Standard Error <math>\sqrt{(MSE/ni)}</math></b>
All	38	0.3107768	0.3115689			
<b>Tratamientos</b>						
100 $\mu$ L F	4	0.3115	-6.888889E-05	0.3107	0.01336488	0.009664591
1000 $\mu$ L F	4	0.309975	-0.001593889	0.3112	0.01928201	0.009664591
250 $\mu$ L F	4	0.299075	-0.01249389	0.3003	0.02403503	0.009664591
2500 $\mu$ L F	4	0.30985	-0.001718889	0.309	0.01521808	0.009664591
50 $\mu$ L EA	4	0.3036	-0.007968889	0.30335	0.01972055	0.009664591
50 $\mu$ L F	4	0.308975	-0.002593889	0.30565	0.02772272	0.009664591
5000 $\mu$ L EA	4	0.328575	0.01700611	0.3339	0.02343905	0.009664591
5000 $\mu$ L F	4	0.33605	0.02448111	0.33905	0.01643665	0.009664591
Control	6	0.29652	-0.01504889	0.2944	0.01284392	0.007891105

Para la prueba ANOVA (tabla 9), aunque puede haber algunas diferencias aparentes en los valores del peso seco entre los distintos tratamientos, especialmente comparando las concentraciones de 5000  $\mu$ L con las demás, estas diferencias no son estadísticamente significativas según el análisis ANOVA. Esto sugiere que, durante los 12 días de medición, los distintos tratamientos evaluados produjeron cantidades de peso seco que no difieren significativamente entre sí.

Tabla 9. ANOVA del peso seco producido

<b>Analysis of Variance Table</b>						
<b>Model Term</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>P-Value</b>	<b>Reject Equal Means at <math>\alpha = 0.05</math>?</b>
Between (Tratamientos___)	8	0.00581642	0.0007270525	1.9460	0.09075	No
Within (Error)	29	0.0108349	0.0003736173			
Adjusted Total	37	0.01665132				
Total	38					

Es importante señalar que el valor p (0.09075) está cercano al umbral de 0.05, lo que podría indicar una tendencia hacia algún efecto, pero no suficiente para ser considerado estadísticamente significativo con el criterio establecido.

Posteriormente, en el box plot (figura 10), la dispersión de las cajas entre los diferentes tratamientos respalda visualmente la ausencia de diferencias significativas en la producción de biomasa.

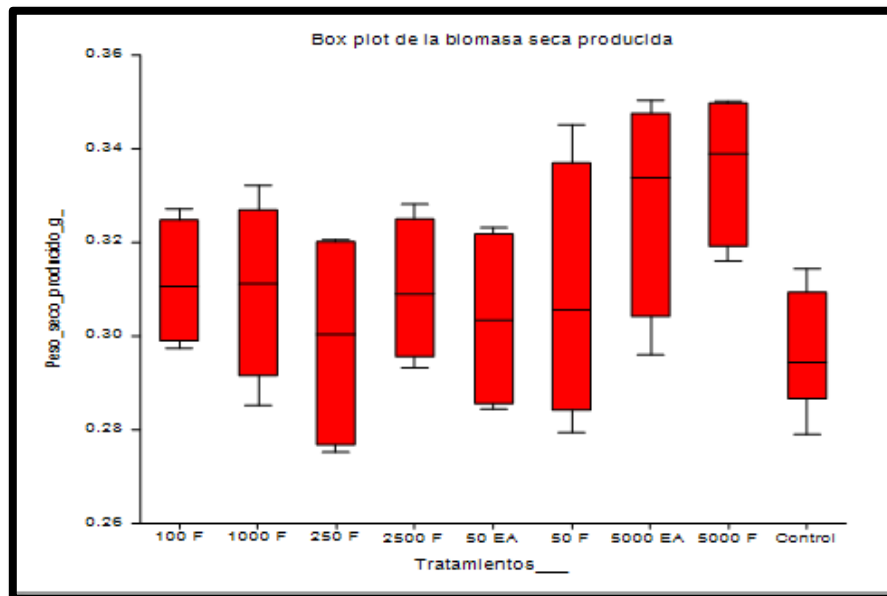


Figura 10. Box plot de la distribución de los datos de biomasa producida por *A. af. pediades* en todos los tratamientos (F=CAFs, EA=Solución Etanol/agua).

Asimismo, la prueba de Tukey-Kramer ( $\alpha = 0.05$ ) arrojó sus resultados donde se compararon los datos de peso seco producido y verificó que no existe una diferencia significativa entre los grupos de tratamiento (tabla 10), el desglose completo del análisis se encuentra en el anexo 2. Los resultados mostraron que *A. af. pediades* no presentó diferencias en su crecimiento en presencia de las diferentes concentraciones de CAFs y de las concentraciones de solución etanol/agua ensayadas en este estudio.

Tabla 10. Análisis de Tukey-Kramer de la biomasa producida donde se comparan todos los tratamientos y no se encuentra diferencia significativa entre los grupos.

Tukey-Kramer Multiple Comparison Test			
Comparison Term: Tratamientos			
Group	Count	Mean	Different From Groups
100 µL F	4	0.3115	
1000 µL F	4	0.309975	
250 µL F	4	0.299075	
2500 µL F	4	0.30985	
50 µL EA	4	0.3036	
50 µL F	4	0.308975	
5000 µL EA	4	0.328575	
5000 µL F	4	0.33605	
Control	6	0.29652	

$\alpha = 0.05$ , Error Term = S(A), DF = 29, MSE = 0.0003736173, Critical Value = 4.7315

### 10.1.3. Velocidad máxima de crecimiento radial

La velocidad máxima de crecimiento radial,  $V_{max}$ , es un parámetro que proporciona información sobre la tasa a la cual el hongo coloniza el sustrato a lo largo del tiempo. Se obtuvieron los valores de  $V_{max}$  para cada tratamiento con la ecuación (1). En la tabla 11 se presentan los datos promedio de cada tratamiento para el valor de  $V_{max}$ .

Los resultados muestran que los valores de  $V_{max}$  (velocidad máxima de crecimiento) de *A. af. pediades* se mantienen notablemente consistentes a través de todos los tratamientos evaluados, con valores que oscilan entre 0.4449 y 0.4700 cm/día.

Tabla 11.  $V_{max}$  de *A. af. pediades* en presencia de CAFs y la solución Etanol/Agua. Cada valor es el promedio de sus réplicas.

Tratamiento	Promedio de las $V_{max} \pm DS$ (cm/día)
Control	0.4509 $\pm$ 0.0229
50 µL Fármacos	0.45255 $\pm$ 0.0120
100 µL Fármacos	0.4449 $\pm$ 0.0199
250 µL Fármacos	0.4547 $\pm$ 0.0292
1000 µL Fármacos	0.4700 $\pm$ 0.0099
2500 µL Fármacos	0.4533 $\pm$ 0.0272
5000 µL Fármacos	0.4656 $\pm$ 0.0074
50 µL Etanol/Agua	0.4591 $\pm$ 0.0156
5000 µL Etanol/Agua	0.4555 $\pm$ 0.0221

Es particularmente interesante observar que el tratamiento con 1000  $\mu\text{L}$  de fármacos exhibe el valor más alto de  $V_{\text{max}}$  ( $0.4700 \pm 0.0099$  cm/día) y la menor desviación estándar entre todos los tratamientos, lo que indica un crecimiento más rápido y consistente en esta concentración específica. Por otro lado, los tratamientos con solvente etanol/agua (50  $\mu\text{L}$  y 5000  $\mu\text{L}$ ) muestran valores de  $V_{\text{max}}$  ( $0.4591 \pm 0.0156$  cm/día y  $0.4555 \pm 0.0221$  cm/día, respectivamente) similares a los tratamientos con fármacos, lo que sugiere que el vehículo de dilución tampoco ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo.

Las desviaciones estándar relativamente bajas en todos los tratamientos (entre  $\pm 0.0074$  y  $\pm 0.0292$ ) indican buena reproducibilidad experimental y refuerzan la conclusión de que *A. af. pedicades* mantiene su capacidad de crecimiento independientemente de la presencia de estos compuestos farmacéuticos, demostrando así su potencial tolerancia a estos contaminantes emergentes.

En el análisis ANOVA (tabla 12) muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de  $V_{\text{max}}$  entre los diferentes tratamientos evaluados ( $p = 0.77382 > 0.05$ ).

Tabla 12. ANOVA de la  $V_{\text{max}}$  del crecimiento

Analysis of Variance Table						
Model Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	P-Value	Reject Equal Means at $\alpha = 0.05$ ?
Between (Tratamientos_)	8	0.00192585	0.0002407313	0.5951	0.77382	No
Within (Error)	29	0.01173036	0.0004044951			
Adjusted Total	37	0.01365621				
Total	38					

Con los datos individuales de las  $V_{\text{max}}$  de cada tratamiento se obtuvo el box plot (figura 11). La superposición de la dispersión de las cajas entre todos los tratamientos, incluyendo el control, indica visualmente que la velocidad de crecimiento del hongo no se vio significativamente afectada por la presencia de los fármacos ni por la mezcla etanol/agua en ninguna de las concentraciones evaluadas.

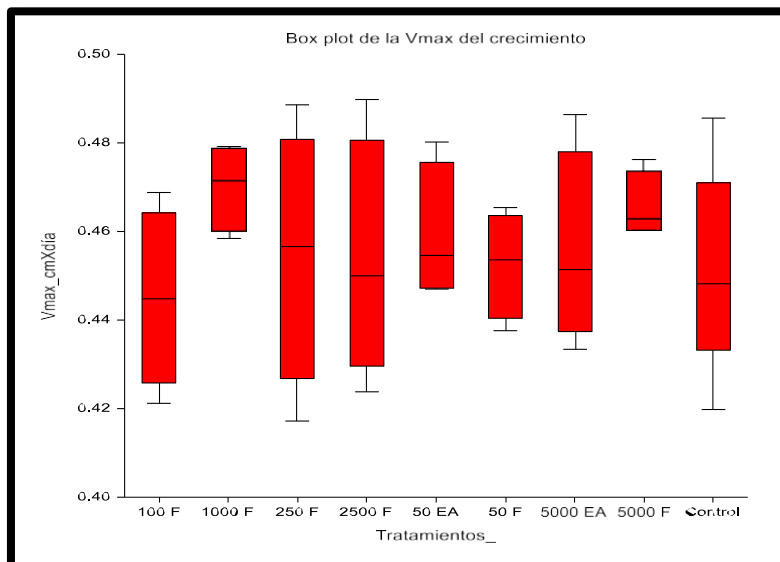


Figura 11. Diagrama de cajas y bigotes de la distribución de las  $V_{max}$  de crecimiento radial de *A. af. pediades* (F=CAFs, EA=Solución Etanol/agua).

La estadística descriptiva para los valores de  $V_{max}$  de *A. af. pediades* (tabla 13) revelan información sobre el comportamiento del hongo bajo diferentes condiciones experimentales.

El control, que representa el crecimiento natural del hongo sin adición de fármacos ni solventes, mostró un valor promedio de  $V_{max}$  de  $0.4509 \pm 0.0229$  cm/día. Esta variabilidad natural sirve como línea base para evaluar los posibles efectos de los tratamientos experimentales.

Entre los tratamientos con fármacos, la concentración de 1000  $\mu$ L (1000 F) presentó el valor más alto de  $V_{max}$  ( $0.4700 \pm 0.0099$  cm/día) y la menor variabilidad, lo que sugiere un crecimiento ligeramente más acelerado y consistente bajo estas condiciones. En contraste, la concentración de 100  $\mu$ L de fármacos (100 F) registró el valor más bajo de  $V_{max}$  ( $0.4449 \pm 0.0199$  cm/día) con una variabilidad

Los tratamientos con solución etanol/agua (EA) como control de solvente también mostraron valores de  $V_{max}$  comparables: 50  $\mu$ L EA ( $0.4591 \pm 0.01562967$  cm/día) y 5000  $\mu$ L EA ( $0.455575 \pm 0.02219675$  cm/día).

Tabla 13. Estadístico descriptivo de las Vmax de crecimiento radial de *A. af. pediales* frente a las diferentes concentraciones de CAFs.

<b>Descriptive Statistics</b>						
<u>Group</u>	<u>Count (ni)</u>	<u>Mean</u>	<u>Effect</u>	<u>Median</u>	<u>Standard Deviation</u>	<u>Standard Error <math>\sqrt{(MSE/ni)}</math></u>
All	38	0.4560368	0.4563204			
<b>Tratamientos_</b>						
100 $\mu$ L F	4	0.44495	-0.01137037	0.44485	0.01997173	0.01005603
1000 $\mu$ L F	4	0.47005	0.01372963	0.47135	0.009916484	0.01005603
250 $\mu$ L F	4	0.454725	-0.00159537	0.45655	0.02923758	0.01005603
2500 $\mu$ L F	4	0.45335	-0.00297037	0.44995	0.02729499	0.01005603
50 $\mu$ L EA	4	0.4591	0.00277963	0.45455	0.01562967	0.01005603
50 $\mu$ L F	4	0.45255	-0.00377037	0.4536	0.012068	0.01005603
5000 $\mu$ L EA	4	0.455575	-0.0007453703	0.4513	0.02219675	0.01005603
5000 $\mu$ L F	4	0.46565	0.00932963	0.463	0.007403377	0.01005603
Control	6	0.4509333	-0.005387037	0.44815	0.02292114	0.008210716

De igual manera que con los resultados anteriores, la prueba de Tukey-Kramer ( $\alpha = 0.05$ ) arrojó sus resultados donde se compararon los datos de las  $V_{max}$  (tabla 14). Estos resultados confirman que los CAFs a las diferentes concentraciones probadas y la solución etanol/agua sin CAFs no ejercen un efecto significativo sobre la velocidad de crecimiento del hongo. El desglose completo del análisis se encuentra en el anexo 3.

Tabla 14. Análisis de Tukey-Kramer de la Vmax del crecimiento radial *A. af. pediales* donde se comparan todos los tratamientos y no se encuentra diferencia significativa entre los grupos.

<b>Tukey-Kramer Multiple Comparison Test</b>			
Comparison Term: <u>Tratamientos_</u>			
<u>Group</u>	<u>Count</u>	<u>Mean</u>	<u>Different From Groups</u>
100 $\mu$ L F	4	0.44495	
1000 $\mu$ L F	4	0.47005	
250 $\mu$ L F	4	0.454725	
2500 $\mu$ L F	4	0.45335	
50 $\mu$ L EA	4	0.4591	
50 $\mu$ L F	4	0.45255	
5000 $\mu$ L EA	4	0.455575	
5000 $\mu$ L F	4	0.46565	
Control	6	0.4509333	

$\alpha = 0.05$ , Error Term = S(A), DF = 29, MSE = 0.0004044951, Critical Value = 4.7315

## 10.2. Actividad enzimática

### 10.2.1. Determinación de la Actividad Lacasa Cualitativa

Se registraron los datos del crecimiento radial del hongo frente a los dos sustratos, guayacol y 2,6-dimetoxifenol (DMP), asimismo se obtuvo la  $V_{max}$  de crecimiento y el Índice de potencia para cada tratamiento. En la figura 12 se observa el halo de oxidación formado por la lacasa producida por *A. af. pediades* al día 5 de crecimiento.

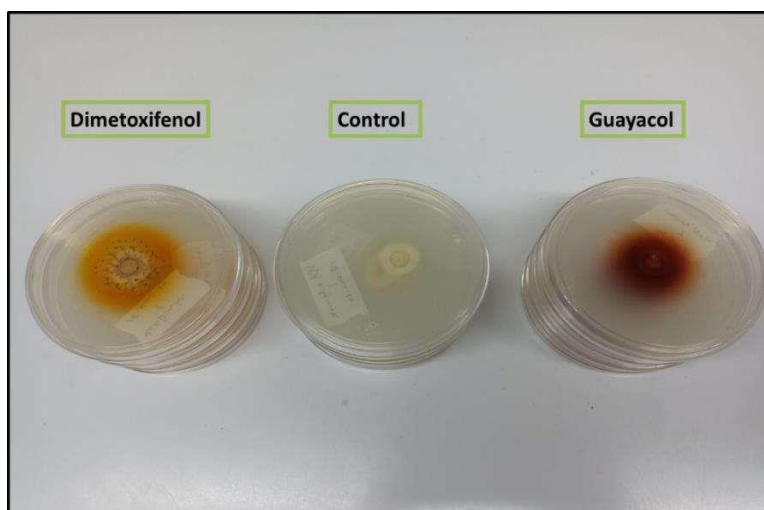


Figura 12. Halo de oxidación de los sustratos inducido por la lacasa extracelular producida por *A. af. pediades* al día 5 de crecimiento.

En los tratamientos sin inóculo con guayacol y DMP en el medio de cultivo no hubo reacción alguna ni oxidación de los sustratos a los 12 días. El halo de oxidación formado en el DMP fue de color naranja mientras que en el guayacol fue de color marrón. La estadística descriptiva (tabla 15) muestra un crecimiento radial final promedio después de 12 días fue mayor en el control con un valor de  $3.0562 \pm 0.0773$  cm, seguido del tratamiento con DMP con un valor de  $3.0375 \pm 0.1479$  cm y por último el tratamiento con guayacol con un valor de  $1.95 \pm 0.1594$  cm.

Tabla 15. Estadística descriptiva del crecimiento radial de *A. af. Peditades* frente a los sustratos y el control.

Descriptive Statistics						
Group	Count (ni)	Mean	Effect	Median	Standard Deviation	Standard Error $\sqrt{(MSE/ni)}$
All	12	2.68125	2.68125			
Tratamiento_						
Control	4	3.05625	0.375	3.075	0.0773924	0.0666341
Dimetoxifenol	4	3.0375	0.35625	3.0875	0.147902	0.0666341
Guayacol	4	1.95	-0.73125	2	0.159426	0.0666341

También se obtuvieron los valores de la  $V_{max}$  de crecimiento (tabla 16) y se muestra el valor promedio de la  $V_{max}$  y el IP. El tratamiento con guayacol mostró el mayor valor de IP con 2.9231, indicando mayor actividad cualitativa de lacasa. Asimismo el valor de  $V_{max}$  en el tratamiento fue menor confirmando el menor crecimiento observado con respecto a los otros tratamientos.

Tabla 16. Datos de  $V_{max}$  e IP en los tratamientos de actividad cualitativa. Cada valor es el promedio de sus réplicas.

Tratamiento	$V_{max} \pm DS$ (cm/día)	IP $\pm DS$
Control	$0.2562 \pm 0.0091$	x
Dimetoxifenol	$0.2533 \pm 0.0165$	$2.6996 \pm 0.1370$
Guayacol	$0.173 \pm 0.0169$	$2.9231 \pm 0.2565$

El resultado del ANOVA (tabla 17) muestra resultados altamente significativos al evaluar el crecimiento de *A. af. peditades* frente a los dos sustratos diferentes, guayacol y dimetoxifenol, junto con un control. El p-value = 0.0 indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre al menos dos de los tratamientos evaluados y posteriormente se realizó la prueba Tukey-Kramer para verificar la diferencia.

Tabla 17. ANOVA del crecimiento radial frente a los sustratos

Analysis of Variance Table						
Model Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	P-Value	Reject Equal Means at $\alpha = 0.05$ ?
Between (Tratamiento_)	2	3.209063	1.604531	90.3431	0.00000	Yes
Within (Error)	9	0.1598437	0.01776042			
Adjusted Total	11	3.368906				
Total	12					

Con los valores del crecimiento radial se obtuvo el box plot (figura 13) que muestra el crecimiento radial de *A. af. pediades* bajo las diferentes condiciones experimentales. El gráfico confirma de manera visual lo que el ANOVA había demostrado numéricamente, que existe un problema inhibitorio significativo sobre el crecimiento de *A. af. pediades*. La clara separación entre el guayacol y los otros dos tratamientos (sin superposición de las cajas) confirma que la diferencia no solo es estadísticamente significativa sino también biológicamente relevante, lo que respalda la conclusión de que *A. af. pediades* responde de manera diferencial a estos sustratos fenólicos estructuralmente similares, pero funcionalmente distintos en términos de su efecto sobre el crecimiento fúngico.

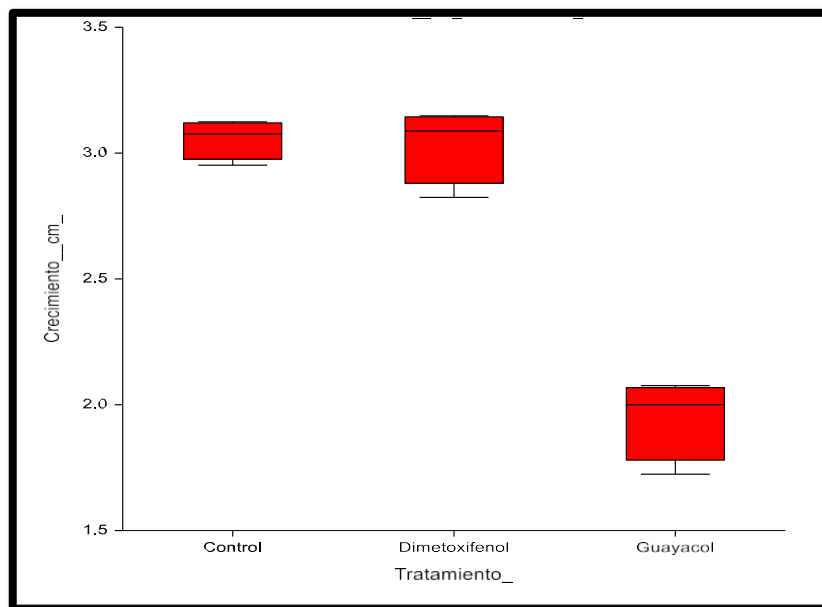


Figura 13. Box plot de la distribución del crecimiento radial frente a DMP y guayacol.

Asimismo, la prueba de Tukey-Kramer ( $\alpha = 0.05$ ) arrojó resultados donde se compararon los datos de crecimiento (tabla 18) y se verificó que sí existe una diferencia significativa entre el guayacol y los cultivos control y con DMP, el desglose completo del análisis se encuentra en el anexo 4.

Tabla 18. Análisis de Tukey-Kramer del crecimiento de *A. af. pediades* frente a los sustratos.

<b>Tukey-Kramer Multiple Comparison Test</b>			
Comparison Term: Tratamiento_			
<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>
Control	4	3.05625	Guayacol
Dimetoxifenol	4	3.0375	Guayacol
Guayacol	4	1.95	Control, Dimetoxifenol

$\alpha = 0.05$ , Error Term = S(A), DF = 9, MSE = 0.01776042, Critical Value = 3.9480

### 10.2.2. Determinación de la Actividad Lacasa Cuantitativa

Se obtuvo el peso seco del crecimiento de *A. af. pediades* en cultivo líquido tras 20 días de cultivo y se realizó una gráfica del peso seco de la biomasa. Se observa el crecimiento de *A. af. pediades* desde el inicio del cultivo y posteriormente a partir del día 5 se observa el comienzo de la fase exponencial de crecimiento hasta los días 12-13 de cultivo (figura 14), asimismo se obtuvo la  $\mu_{max}$  de crecimiento =  $0.0136 \text{ días}^{-1}$ .

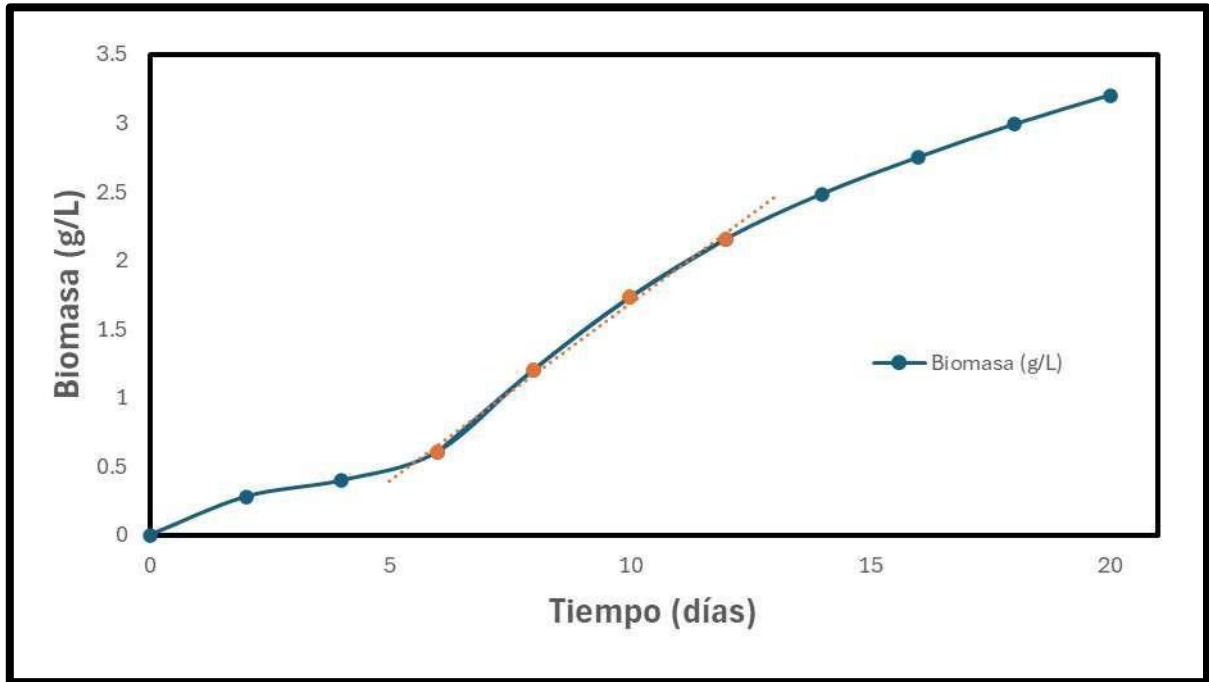


Figura 14. Crecimiento de *A. af. pediadetes* en cultivo líquido a través de 20 días con una pendiente remarcada en la fase exponencial

Durante el crecimiento del hongo, se obtuvieron los extractos crudos enzimáticos (ECE) libres de biomasa. Se tomaron las muestras de los días 5, 6, 8 y 10 para realizar la cuantificación de la actividad lacasa mediante la oxidación del sustrato guayacol, que fue el sustrato que mejor se oxidó y mostró un mayor valor en el IP para la actividad cualitativa. El pH de los ECE fue de 5.04 para el día 5, 4.98 para el día 6, 5.06 para el día 8 y 5.02 para el día 10.

Como dato importante, las peroxidasa, como la lignina, peroxidasa y manganeso peroxidasa pueden oxidar también el guayacol, pero en presencia de peróxido de hidrógeno. En las reacciones llevadas a cabo en este trabajo no se adicionó, por lo tanto, la oxidación del sustrato es únicamente debida a la presencia de lacasa.

En la figura 15 se muestra una curva progreso de la actividad enzimática del ECE del día 5, con una pendiente ajustada a los 10 minutos de reacción, en el día 5 fue donde se obtuvo un mayor valor de la pendiente de la recta con 0.00005. Las curvas de los días 6, 8 y 10 se encuentran en el anexo 5.

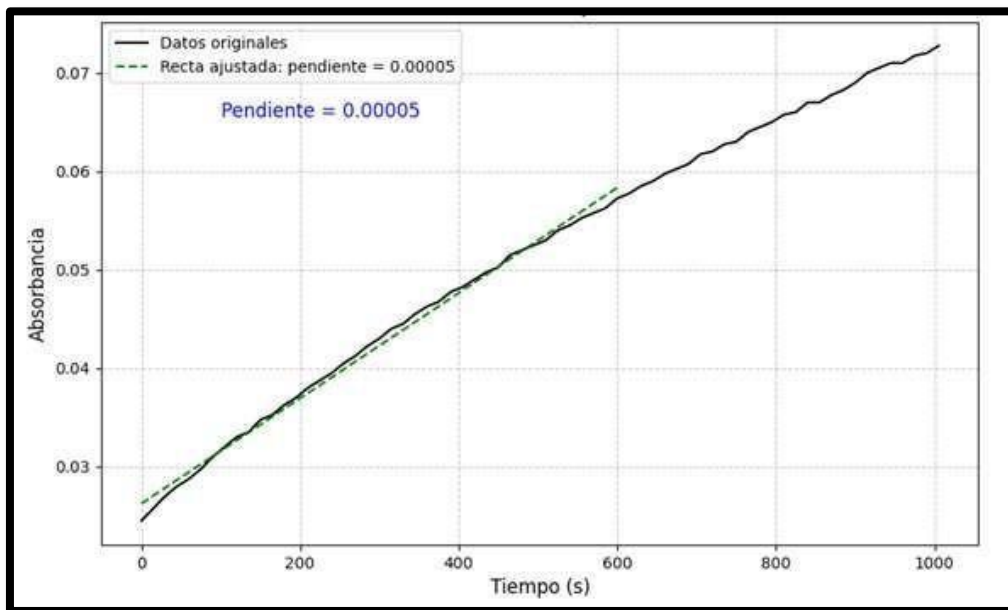


Figura 15. Curva progreso de la actividad enzimática del ECE del día 5.

Para conocer el valor de la actividad enzimática, se debió considerar el valor del coeficiente de extinción molar adecuado para el pH de los ECE, el cual fue de  $11414.9732 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para pH 5, el paso óptico de la celda y el cambio de la absorbancia con respecto al tiempo. Para la obtención del resultado se utilizó la ecuación (4).

Si bien, las curvas progreso están en función del producto formado durante la oxidación del guayacol, fue necesario utilizar la estequiometría de la reacción representada en la Figura 4 para transformarlas a unidades internacionales de actividad enzimática definida como  $\mu\text{mol}$  de producto por litro por minuto.

$$\left[ \frac{\mu\text{mol de guayacol oxidado}}{\text{L min}} \right]$$

Aplicando la ecuación (4), se obtuvieron los valores de la actividad enzimática de la oxidación del guayacol a los diferentes tiempos de muestreo y se muestran en la tabla 19. Los resultados muestran que la mayor actividad enzimática de los ECE se

obtuvo a los 5 días de cultivo, por lo tanto, a este tiempo se tomaron los ECE para realizar los ensayos de degradación de los CAFs.

Tabla 19. Valores de actividad enzimática de la lacasa extracelular producida por *A. af. pediades* a los diferentes días de cultivo.

Muestra del ECE	Actividad Enzimática ( $\mu\text{mol producto/L min}$ )
Día 5	1.1249
Día 6	0.579
Día 8	0.3557
Día 10	0.0576

### 10.3. Degradación de CAFs en mezcla

A 30 mL del ECE se le adicionaron 0.75 ml de la mezcla de los fármacos para tener una concentración de 2 500  $\mu\text{g/l}$  de cada uno de los fármacos. Estos ensayos se hicieron por triplicado. La concentración real de los CAFs no fue exactamente la que calculamos debido a problemas de pipeteo. Esta mezcla de reacción se incubó a 28°C a 80 rpm durante 60 min. Se tomaron muestras a los tiempos 0, 5, 10 y 60 minutos, para determinar la concentración de los fármacos a los diferentes tiempos de reacción. Cada tiempo se realizó por triplicado.

Antes de medir los CAFs residuales, se realizaron curvas de calibración (Figura 16), esto, para correlacionar las concentraciones conocidas de los fármacos con la señal (área) obtenida en el HPLC.

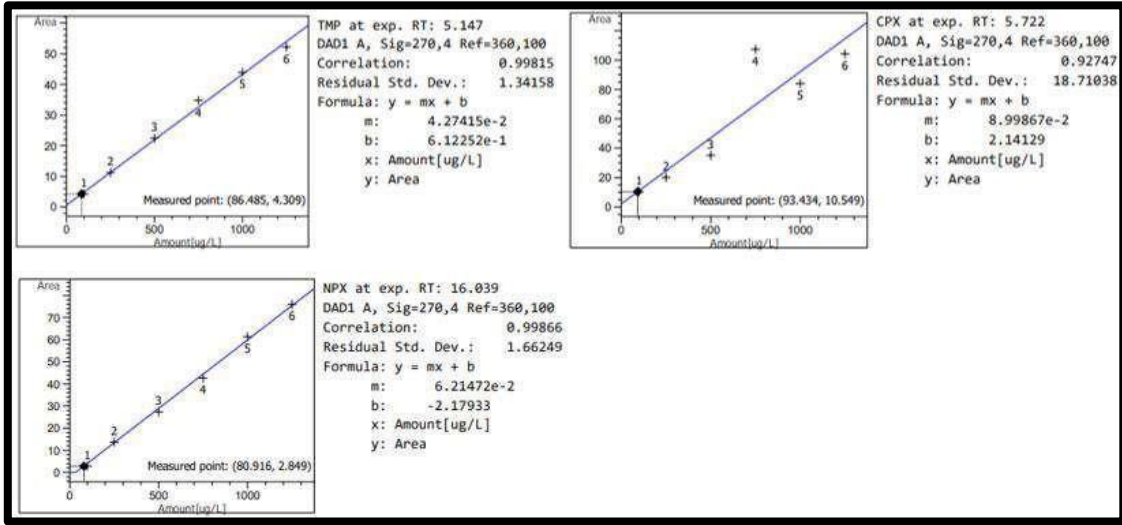


Figura 16. Curvas de calibración de TMP, CPX y NPX a una concentración máxima de 1250 µg/L.

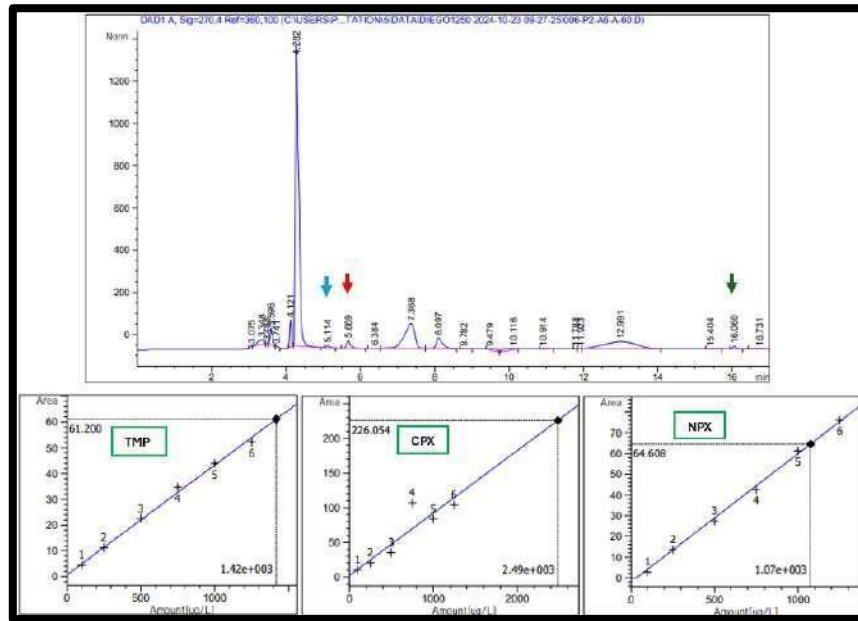


Figura 17. Cromatograma de HPLC a los 60 minutos de reacción, flecha azul indica el tiempo de retención de TMP, roja CPX y verde NPX.

Los triplicados de cada tiempo de reacción se inyectaron en el HPLC. Antes de inyectarlas, las muestras se diluyeron 1:1 y se obtuvieron los cromatogramas (figura 17). El resto de los cromatogramas con su valor de concentración obtenido y

tiempos de retención se incluyen en el anexo 6. Los resultados obtenidos son el promedio del triplicado de las concentraciones residuales junto con sus desviaciones estándar y se muestran en la tabla 16. Se observa 1.54% de disminución de la concentración de TMP y 1.57% NPX con respecto a la inicial. De CPX se observó 0.35% de disminución, en este caso la cuantificación de CPX fue mayor que la calculada.

Tabla 20. Concentraciones residuales de fármacos en la reacción con lacasa extracelular en muestras con concentraciones iniciales de 2500 µg/L.

Tiempo de reacción	[TMP] ± DS (µg/L)	[CPX] ± DS (µg/L)	[NPX] ± DS (µg/L)
0	2927.31 ± 6.52	5078.4 ± 48.22	2289.94 ± 78.00
5	2906.82 ± 25.53	5071.47 ± 56.68	2270.18 ± 76.86
10	2898.08 ± 17.42	5063.57 ± 277.42	2271.7 ± 78.53
60	2882.34 ± 40.94	5060.39 ± 82.56	2253.91 ± 95.06

## 11. Discusión

### 11.1. Tolerancia del crecimiento de *A. af. pediades* en presencia de TMP, CPX y NPX

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el hongo *A. af. pediades* mostró tolerancia frente a la exposición de CPX, TMP Y NPX en mezcla. Parámetros como el crecimiento radial, la  $V_{max}$  de crecimiento radial y la producción de biomasa son herramientas útiles para analizar el crecimiento de estos hongos en condiciones de cultivo sólido (Coello y cols. 2017).

El crecimiento radial del micelio no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, donde el promedio para todas las 38 evaluaciones osciló alrededor de 5.5664 cm a los 12 días de cultivo. Este comportamiento sugiere que los mecanismos de extensión del micelio de *A. af. pediades* no se afectan por la presencia de los compuestos farmacéuticos ni por el solvente utilizado.

En cuanto a la producción de biomasa, se observó un resultado interesante donde la concentración más alta (5000 µg/L) tanto de la mezcla de fármacos como el volumen adicionado de la solución etanol/agua (2.5 ml) mostraron una ligera tendencia a producir mayor biomasa (0.33605 y 0.32857 g respectivamente) en comparación con el control (0.29652 g). Aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, podrían sugerir la activación de mecanismos de respuesta al estrés que resultan en una mayor densificación del micelio, sin embargo, estadísticamente son iguales los crecimientos.

La  $V_{max}$  de crecimiento radial, con una media total entre todas las evaluaciones fue de 0.4560 cm/día y se mantuvo constante en todos los tratamientos. Este parámetro es particularmente relevante ya que sugiere que *A. af. pediades* no requiere períodos de adaptación para mantener su tasa de crecimiento en presencia de los compuestos evaluados. El valor contrastante de la  $V_{max}$  obtenida podría indicar que los mecanismos celulares de extensión del micelio y consumo de nutrientes no se ven afectados por las concentraciones de fármacos utilizadas.

La capacidad del hongo para mantener su crecimiento en presencia de estos compuestos podría atribuirse a diversos mecanismos de adaptación, ya que, cuando los microorganismos enfrentan restricciones nutricionales o condiciones adversas en el ambiente, desarrollan mecanismos que favorecen interacciones beneficiosas para su supervivencia (Rojas Barreto y cols. 2015).

Este comportamiento ha sido documentado por Hernández (2021), quien también trabajó con el hongo *A. af. pediades*, sometido a condiciones de estrés xenobiótico donde se utilizó hexaclorobenceno como agente contaminante dentro de su medio de cultivo. Se observó tolerancia del hongo para crecer en presencia de hexaclorobenceno, atribuyendo un cometabolismo, ya que el hongo es capaz de segregar enzimas relacionadas con la degradación de compuestos xenobióticos. La presencia

de sistemas enzimáticos, característicos de los hongos saprofitos, podrían facilitar la biotransformación de los compuestos farmacéuticos evaluados, o bien, estos compuestos no son tóxicos al hongo, por lo que crece de forma similar a los cultivos sin los fármacos.

El trabajo de León-Santiesteban y cols (2024) reporta la tolerancia del hongo filamentoso *Amyomyces rouxii* a crecer en presencia de CAFs y disruptores endocrinos a diferentes concentraciones. Los autores reportaron una inhibición del crecimiento radial únicamente con CPX y NPX en 27% y 48% respectivamente, con 100 % de inhibición con Carbamazepina (CBZ) a 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

La ausencia de efectos inhibitorios significativos en los tres parámetros analizados también sugiere que las concentraciones utilizadas en este estudio podrían estar por debajo de los niveles de toxicidad para *A. af. pediades*. Esto es particularmente relevante considerando que las concentraciones evaluadas (50-5000  $\mu\text{g/L}$ ) se encuentran dentro del rango de las concentraciones ambientales reportadas para estos fármacos en diversos ecosistemas (Calderón y cols., 2019).

## **11.2. Actividad enzimática de la Lacasa**

En el análisis cualitativo, la formación de halos de oxidación con ambos sustratos (guayacol y DMP) confirma la producción de lacasa extracelular por *A. af. pediades*. La coloración de los halos (naranja para DMP y marrón para guayacol) demuestra la producción de lacasa extracelular por *A. af. pediades* capaz de oxidar diferentes tipos de sustratos fenólicos y sugiere un potencial de amplio espectro de aplicación en la degradación de diversos compuestos aromáticos.

Los resultados de este trabajo mostraron que el índice de potencia (IP), fue mayor para el guayacol (2.9231) en comparación con el DMP (2.6996) lo que indica que, a pesar de que el crecimiento radial fue significativamente

menor en presencia de guayacol (1.95 cm frente a 3.0375 cm con DMP), la actividad enzimática fue mayor. Esto sugiere que la presencia de guayacol podría estar induciendo una mayor expresión de lacasa como respuesta al estrés producido, aun cuando el crecimiento del organismo se ve parcialmente inhibido. Resultados similares fueron reportados por Hernandez Sirio (2021).

Este comportamiento es consistente con estudios previos en otros hongos ligninolíticos donde la producción de enzimas ligninolíticas se incrementa en respuesta a condiciones de estrés. Baldrian (2003), señala el efecto de metales pesados en el crecimiento y producción enzimática, por ejemplo, el cobre aumenta la producción de lacasa en diferentes hongos ligninolíticos, como los basidiomicetos: *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* y *T. versicolor*.

En cuanto al análisis cuantitativo, el perfil de crecimiento en medio líquido muestra un patrón típico con una fase de adaptación inicial (días 0-4) seguida de una fase exponencial a partir del día 5. La coincidencia de la máxima actividad enzimática (1.1249  $\mu\text{mol}$  de guayacol oxidado/L min) con el día 5 de ECE es significativa, ya que sugiere que la producción de lacasa está relacionada con el metabolismo activo del crecimiento.

La disminución progresiva de la actividad enzimática observada en los días posteriores (0.5790 , 0.3557 y 0.0576  $\mu\text{mol}$  de guayacol oxidado/L min para los días 6, 8 y 10, respectivamente) podría atribuirse a diferentes factores, tales como: agotamiento de nutrientes esenciales en el medio de cultivo, particularmente fuentes de carbono y nitrógeno que son importantes para el metabolismo del hongo (Piscitelli y cols., 2011), la acumulación de metabolitos que podrían actuar como inhibidores de la actividad lacasa (Baldrian, 2006) y la posible degradación proteolítica de las enzimas extracelulares por proteasas fúngicas, un fenómeno presentado en cultivos prolongados (Strong y cols., 2011).

### 11.3. Degradación de CAFs

Los resultados obtenidos de los experimentos para determinar la degradación de la mezcla de fármacos mediante el extracto crudo enzimático (ECE) mostraron que éste degrada únicamente entre 0.35% y 1.5% de la concentración inicial de los fármacos individuales.

Se observó un comportamiento particular en el caso del ciprofloxacino (CPX), donde se detectó una mayor concentración de CPX de 5078.4 µg/L inicial. Este problema en la cuantificación no es fácil de explicar. La concentración de la solución stock que se utilizó para hacer los experimentos de degradación si tiene la concentración correcta (en el anexo 7 se presentan los resultados de la cuantificación de la CPX en mezcla a 1000 µg/L). Sin embargo, al adicionar la CPX al ECE e inyectarlo al HPLC la cuantificación de la CPX fue mayor. También se inyectó una muestra de ECE sin fármacos y no se observó ningún pico en el tiempo de retención en que sale la CPX (Anexo 8).

Prieto y cols. (2011), identificaron la formación de productos de transformación específicos durante la biodegradación de fluoroquinolonas. En su investigación, demostraron que las enzimas ligninolíticas pueden generar compuestos intermedios que interfieren con la detección del compuesto original, lo que podría explicar una interferencia en la cuantificación de la CPX.

Esta observación se fortalece con los resultados presentados por Čvančarová y cols. (2015), ellos documentaron extensivamente la biotransformación de antibióticos fluoroquinolónicos por acción de enzimas ligninolíticas. Sus estudios revelaron que, durante el proceso de transformación enzimática, se pueden generar diversos metabolitos que pueden interferir con la detección y cuantificación de los compuestos originales.

Otro factor posible sería que las condiciones del medio y sus componentes podrían afectar significativamente la detección del antibiótico, influyendo en la cuantificación del CPX. Otra explicación es que se haya puesto el doble de concentración en el momento de adicionar la CPX al ECE.

En cuanto a la cuantificación de TMP y NPX se observó el 1.5% de disminución de estos fármacos con respecto a su concentración inicial. Se podría sugerir el uso de mediadores redox, que en sistemas enzimáticos con lacasas podría ser una estrategia para mejorar la eficiencia en la degradación de los sustratos, especialmente para aquellos que son difíciles de degradar directamente por la enzima. Los mediadores actúan como intermediarios entre la lacasa y el sustrato, expandiendo significativamente el rango de compuestos que pueden ser oxidados por el sistema enzimático debido a que aumentan el potencial redox de la reacción. Con la incorporación de mediadores al ECE podría potencialmente observarse una degradación de los sustratos. Mendoza (2024), demostró que el añadir el mediador Siringaldehído a una enzima lacasa comercial afectó directamente a su actividad enzimática, y se logró degradar hasta en un 50% al ciprofloxacino y sulfametoxazol, y en 20% a la trimetoprima. Mientras que sin la presencia del mediador la lacasa comercial no degradó los fármacos.

En este contexto, los resultados sugieren utilizar mediadores, adicionados la ECE obtenido de los cultivos con *A. af. pediades* para incrementar el potencial redox y facilitar así la degradación de NPX y TMP. Podrían ser resultados muy interesantes ya que se podría demostrar la acción de los mediadores potenciando la actividad de una lacasa no purificada. También se sugiere la necesidad de implementar técnicas analíticas complementarias que permitan identificar y cuantificar los posibles productos de transformación, especialmente en el caso del CPX.

## **12. Conclusiones**

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que el hongo *A. af. pediades* es capaz de tolerar diferentes concentraciones de los fármacos trimetoprima (TMP), ciprofloxacino (CPX) y naproxeno (NPX) sin que su crecimiento radial, producción de biomasa o velocidad de crecimiento se afecten significativamente.

El análisis de la actividad enzimática confirmó que *A. af. pediades* produce lacasa extracelular, cuya actividad fue evaluada cualitativa y cuantitativamente. La

formación de halos de oxidación en presencia de guayacol y DMP demuestra la capacidad del hongo para secretar lacasa activa, siendo el guayacol el sustrato que indujo una mayor actividad enzimática. En el estudio cuantitativo, se observó que la actividad lacasa alcanzó su máximo en el día 5 de cultivo. En el estudio de degradación se realizó el experimento una sola vez (por triplicado), sería necesario proponer un diseño experimental para confirmar estadísticamente la degradación de los fármacos.

Estos resultados sugieren la necesidad de profundizar en el estudio de los mecanismos de acción de la lacasa de *A. af. pediades* sobre los CAFs, explorando posibles cofactores o condiciones experimentales que optimicen su actividad degradativa. En conjunto, este trabajo proporciona información sobre la tolerancia de *A. af. pediades* a contaminantes emergentes y su potencial como recurso biotecnológico para estrategias de biorremediación sostenible.

### 13. Referencias

- Abadía Patiño, L., Meneses Franco, A. C., Romero Suárez, M. E., Prin, J. L., y Gómez, F. R. (2021). Fluoroquinolonas en aves, huevos, alimentos avícolas y su impacto en la microbiota intestinal de aves. *Kasmera*, 49(1), e49132445.
- Aib, H., Parvez, M. S., & Czédli, H. M. (2025). Pharmaceuticals and Microplastics in Aquatic Environments: A Comprehensive Review of Pathways and Distribution, Toxicological and Ecological Effects. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 22(5), 799.
- Al-Wasify, Raed & Alruwaili, Majid & Aljohani, Fahad & Hamed, Shimaa & Ragab, Samar. (2023). The Efficiency of Wastewater Treatment Plants for the Removal of Antibiotics.
- Ashiwaju BI, Uzougbo CG, Orikpete OF. Environmental impact of pharmaceuticals: A comprehensive review. *Matrix Sci Pharma* 2023;7:85-94.
- Baldrian, Petr. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 32, Issue 1, 2003, Pages 78-91, ISSN 0141-0229
- Baldrian, Petr. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev.* 2006 Mar;30(2):215-42.
- Batucan S. N.P., Louis A. Tremblay, Grant L. Northcott, Christoph D. Matthaei, (2022) Medicating the environment? A critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms, *Environmental Advances*,7, 100164.
- Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Stanford, B. D., y Snyder, S. A. (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in us drinking water. *Environmental science & technology*, 43(3),597-603.
- Calderón, Aarón, Meraz, Monica y Tomasini, Araceli. (2019). Pharmaceuticals Present in Urban and Hospital Wastewaters in Mexico City. *Journal of Water Chemistry and Technology*. 41. 105-112.
- Coello-Loor, Carol & Avellaneda-Cevallos, Juan & Barrera-Álvarez, Alexandra & Peña-Galeas, Mayra & Yopez, Piedad & Racines-Macías, Elizabeth.

- (2017). Evaluación del crecimiento y producción de biomasa de dos cepas del género *Pleurotus* spp., cultivadas en un medio agar con diferentes sustratos. *Ciencia y Tecnología*. 10. 33-39.
- Čvančarová, M., Moeder, M., Filipová, A., & Cajthaml, T. (2015). Biotransformation of fluoroquinolone antibiotics by ligninolytic fungi- Metabolites, enzymes and residual antibacterial activity. *Chemosphere*. Volume 136. Pages 311-320, ISSN 0045-6535.
  - Dinakarkumar, Yuvaraj, Gnanasekaran Ramakrishnan, Koteswara Reddy Gujjula, Vishali Vasu, Priyadharishini Balamurugan, and Gayathri Murali. 2024. Fungal bioremediation: An overview of the mechanisms, applications and future perspectives. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 6: 293-302.
  - DrugBank. (2024). Trimethoprim (DB00440). DrugBank Online. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00440>
  - DrugBank. (2024). Ciprofloxacin (DB00537). DrugBank Online. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00537>
  - DrugBank. (2024). Naproxen (DB00788). DrugBank Online. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00788>
  - Ellouze, M., & Sayadi, S. (2016). White-Rot Fungi and their Enzymes as a Biotechnological Tool for Xenobiotic Bioremediation. InTech.
  - K., Narendra & Padman, Midhila & Mahadeva, Manjushree & Srinivasan, Subramani & Devarajan, Raajasubramanian. (2024). A comprehensive review of sustainable bioremediation techniques: Eco friendly solutions for waste and pollution management. *Waste Management Bulletin*.
  - González-González, P.; Gómez-Manzo, S.; Tomasini, A.; Martínez y Pérez, J.L.; García Nieto, E.; Anaya-Hernández, A.; Ortiz Ortiz, E.; Castillo Rodríguez, R.A.; Marcial-Quino, J.; Montiel-González, A.M. Laccase Production from *Agrocybe pediades*: Purification and Functional Characterization of a Consistent Laccase Isoenzyme in Liquid Culture. *Microorganisms* 2023, 11, 568.
  - Hernandez Sirio, A. (2021). Análisis de la capacidad de crecimiento de *Agrocybe pediades* en presencia de hexaclorobenceno. Tesis de maestría.

Universidad Autónoma de Tlaxcala.

- Jelic, A., Cruz Morató, C., Marco Urrea, E., Sarrà, M., Perez, S., Vicent, T., Barcelo, D. (2012). Degradation of carbamazepine by *trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates. *Water Research*, 46(4), 955-964.
- Jenna Corcoran, Matthew J. Winter & Charles R. Tyler (2010) Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish, *Critical Reviews in Toxicology*, 40:4, 287-304.
- Jiang, C., Ling, S., Wang, P., Liang, A., Chen, B., Wen, G., & Jiang, Z. (2011). A new and sensitive catalytic resonance scattering spectral assay for the detection of laccase using guaiacol as substrate. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*, 74 26(6), 500-505. MEDLINE Complete.
- Kümmerer K., (2009) The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges, *Journal of Environmental Management*, 90, Issue 8, 2354-2366.
- León-Santiesteban, Hugo & Severo, Estefanía & Tomasini, Araceli. (2024). Modeling radial growth of *Amylomyces rouxii* and its tolerance to selected pharmaceutical active compounds. *Biotecnia*. 26. 416-424.
- Lesley Joseph, Byung-Moon Jun, Min Jang, Chang Min Park, Juan C. Muñoz-Senmache, Arturo J. Hernández-Maldonado, Andreas Heyden, Miao Yu, Yeomin Yoon. (2019). Removal of contaminants of emerging concern by metal-organic framework nanoadsorbents: A review, *Chemical Engineering Journal*, Volume 369, 2019, Pages 928-946, ISSN 1385-8947.
- Marco De Liguoro, Vincenzo Di Leva, Mirco Dalla Bona, Roberta Merlanti, Giovanni Caporale, Giuseppe Radaelli. (2012). Sublethal effects of trimethoprim on four freshwater organisms, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 82, Pages 114-121, ISSN 0147-6513.
- Marco Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Blánquez, P., Vicent, T., y Caminal, G. (2010). Biodegradation of the analgesic naproxen by *trametes versicolor* and identification of intermediates using hplc-dad-ms and nmr. *Bioresource Technology*, 101(7), 2159-2166.

- Meléndez Marmolejo, J., García Saavedra, Y., Galván Romero, V., de León Martínez, L. D., Vargas Berrones, K., Mejía Saavedra, J., y Ramírez, R. F. (2020). Contaminantes emergentes. problemática ambiental asociada al uso de antibióticos. nuevas técnicas de detección, remediación y perspectivas de legislación en America latina. *Revista de Salud Ambiental*, 20(1), 53-61.
- Mendoza Santamaria, L. O. (2024). Estudio de la degradación de compuestos activos farmacéuticos por lacasa fúngica. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Mordačiková E., Marián Marton, Lucia Hojová, Gabriela Kuchtová, Kateřina Grabicová, Pavol Michniak, Tomáš Mackuľak, Roman Grabic, Marian Vojs, Andrea Vojs Staňová, (2025) A high-efficient electrochemical degradation of diclofenac in water on planar and microstructured 2D, and macroporous 3D boron-doped diamond electrodes: Identification of degradation and transformation products, *Chemosphere*, 372, 144000.
- Narvaez V., Jhon F.; Jimenez C., Claudio (2012). PHARMACEUTICAL PRODUCTS IN THE ENVIRONMENT: SOURCES, EFFECTS AND RISKS *Vitae*, vol. 19, núm. 1, 2012, pp. 93-108.
- Ortega-Ávila, Rut, Marcial-Quino, Jaime, Martínez-y Pérez, José Luis, Hernández-Cuevas, Laura V., Tomasini, Araceli, Ortiz-Ortiz, Elvia, & Montiel-González, Alba Mónica. (2023). Hongos saprótrofos neotropicales de bosque de *Juniperus deppeana* (Cupressaceae): aislamiento, identificación, cultivo in vitro y preservación. *Revista mexicana de biodiversidad*, 94, e945223.
- Piscitelli, Alessandra & Giardina, Paola & Lettera, Vincenzo & Pezzella, Cinzia & Sanna, Giovanni & Faraco, Vincenza. (2011). Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. *Current genomics*. 12. 104-12. 10.2174/138920211795564331.
- Ponce de León, S. e. a. (2018). Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México Reporte de los Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y Consumo de antibióticos. *Programa Universitario de Investigación en Salud*.
- Prieto, A., Möder, M., Rodil, R., Adrian, L., & Marco-Urrea, E. (2011).

Degradation of the antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin by a white-rot fungus and identification of degradation products. *Bioresource Technology*, 102(23), 10987-10995.

- Rebeca Tormo Budowski, Juan Carlos Cambronero Heinrichs, J. Esteban Durán, Mario Masís Mora, Didier Ramírez Morales, José Pablo Quirós Fournier, Carlos E. Rodríguez Rodríguez (2021). Removal of pharmaceuticals and ecotoxicological changes in wastewater using *Trametes versicolor*: A comparison of fungal stirred tank and trickle-bed bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, Volume 410, 2021, 128210, ISSN 1385-8947.
- Rogowska, J., & Zimmermann, A. (2022). *Household Pharmaceutical Waste Disposal as a Global Problem—A Review*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(23), 15798.
- Ríos, A. L. M., Gutiérrez Suarez, K., Carmona, Z., Ramos, C. G., y Oliveira, L. F. S. (2022). Pharmaceuticals as emerging pollutants: Case naproxen an overview. *Chemosphere*, 291, 132822.
- Rojas Barreto, J. A., & Hormaza Anaguano, A. (2015). Evaluación del crecimiento y compatibilidad de hongos de la podredumbre blanca. (Evaluation of Growth and Compatibility of white Rot Fungi.). *Ciencia En Desarrollo*, 5(2), 197-205.
- Rojas Ramírez, L. (2013). Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisorio con impacto en la agricultura. *Fitosanidad*.
- Solomon Pearl E, Berg LR, Martin DW. y Villee C. (2000). *Biología de Ville*. Edición. Mc. Graw Hill. 1305pp.
- Strong, James & Claus, Harald. (2011). Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* - CRIT REV ENVIRON SCI TECHNOL. 41. 373-434. 10.1080/10643380902945706.
- Suárez Olivares, A. T., y Vera Vidal, V. (2011). Uso y abuso del ciprofloxacino. *Medisan*, 15(3), 384-392.
- Téllez Téllez, M., Fernández, J. F., Montiel González, A.M., Sánchez, C. y Díaz Godínez, G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology*

and Biotechnology 81: 675-679.

- Torres-Farradá, G., Thijs, S., Rineau, F., Guerra, G., & Vangronsveld, J. (2024). White Rot Fungi as Tools for the Bioremediation of Xenobiotics: A Review. *Journal of Fungi*, 10(3), 167.
- Torres González D. (2017). Evaluación de la expresión de enzimas ligninocelulolíticas de dos especies de hongos saprótrofos aislados de un bosque de Juniperus en Tlaxcala. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Valdez Carrillo, M., Abrell, L., Ramírez Hernández, J. et al. Pharmaceuticals as emerging contaminants in the aquatic environment of Latin America: a review. *Environ Sci Pollut Res* 27, 44863-44891 (2020).
- Yacouba ZA, Lesage G, Mendret J, Zaviska F, Petit E and Brosillon S (2021) Fate and Toxicity of Carbamazepine and Its Degradation By-Products During Coupling of Ozonation and Nanofiltration for Urban Wastewater Reuse. *Front. Environ. Chem.* 2:798785.

## 14. Anexos

### 14.1. Anexo 1.

Desglose del análisis de Tukey Kramer para el crecimiento radial de *A. pedicades*.

Tabla 21. Desglose estadístico del análisis Tukey-Kramer para diferencias significativas en el crecimiento radial de *A. af. Pedicades* frente a los CAFs.

One-Way Analysis of Variance Report						
Tukey-Kramer's Simultaneous Confidence Intervals and P-Values for All-Pairs Mean Difference						
Comparisons						
95% Simultaneous Confidence Limits of the Difference						
Comparison	Count	Mean	Mean Difference	Lower	Upper	P-Value
<b>100 µL F</b>	<b>4</b>	<b>5.46875</b>				
- 1000 µL F	4	5.68125	-0.2125	-0.6344441	0.209444	0.72599
- 250 µL F	4	5.43125	0.0375	-0.3844441	0.459444	0.98113
- 2500 µL F	4	5.53125	-0.0625	-0.4844441	0.3594441	0.96570
- 50 µL EA	4	5.68125	-0.2125	-0.6344441	0.209444	0.72599
- 50 µL F	4	5.60625	-0.1375	-0.5594441	0.284444	0.89459
- 5000 µL EA	4	5.6125	-0.14375	-0.565694	0.278194	0.88589
- 5000 µL F	4	5.6375	-0.16875	-0.5906941	0.253194	0.84371
- Control	6	5.4875	-0.01875	-0.4039305	0.3664305	0.99020
<b>1000 µL F</b>	<b>4</b>	<b>5.68125</b>				
- 100 µL F	4	5.46875	0.2125	-0.209444	0.6344441	0.72599
- 250 µL F	4	5.43125	0.25	-0.1719441	0.671944	0.56523
- 2500 µL F	4	5.53125	0.15	-0.271944	0.5719441	0.87653
- 50 µL EA	4	5.68125	0	-0.4219441	0.4219441	1.00000
- 50 µL F	4	5.60625	0.075	-0.346944	0.496944	0.95686
- 5000 µL EA	4	5.6125	0.06875	-0.3531941	0.490694	0.96139
- 5000 µL F	4	5.6375	0.04375	-0.378194	0.465694	0.97752
- Control	6	5.4875	0.19375	-0.1914304	0.5789304	0.72691
<b>250 µL F</b>	<b>4</b>	<b>5.43125</b>				
- 100 µL F	4	5.46875	-0.0375	-0.459444	0.3844441	0.98113
- 1000 µL F	4	5.68125	-0.25	-0.671944	0.1719441	0.56523
- 2500 µL F	4	5.53125	-0.1	-0.521944	0.3219441	0.93622
- 50 µL EA	4	5.68125	-0.25	-0.671944	0.1719441	0.56523
- 50 µL F	4	5.60625	-0.175	-0.596944	0.2469441	0.83087
- 5000 µL EA	4	5.6125	-0.18125	-0.6031941	0.240694	0.81690
- 5000 µL F	4	5.6375	-0.20625	-0.628194	0.2156941	0.74734
- Control	6	5.4875	-0.05625	-0.4414304	0.3289305	0.96629
<b>2500 µL F</b>	<b>4</b>	<b>5.53125</b>				
- 100 µL F	4	5.46875	0.0625	-0.3594441	0.4844441	0.96570

- 1000 µL F	4	5.68125	-0.15	-0.5719441	0.271944	0.87653
- 250 µL F	4	5.43125	0.1	-0.3219441	0.521944	0.93622
- 50 µL EA	4	5.68125	-0.15	-0.5719441	0.271944	0.87653
- 50 µL F	4	5.60625	-0.075	-0.496944	0.346944	0.95686
- 5000 µL EA	4	5.6125	-0.08125	-0.503194	0.340694	0.95210
- 5000 µL F	4	5.6375	-0.10625	-0.5281941	0.315694	0.93031
- Control	6	5.4875	0.04375	-0.3414305	0.4289305	0.97502
<b>50 µL EA</b>						
- 100 µL F	4	5.46875	0.2125	-0.209444	0.6344441	0.72599
- 1000 µL F	4	5.68125	0	-0.4219441	0.4219441	1.00000
- 250 µL F	4	5.43125	0.25	-0.1719441	0.671944	0.56523
- 2500 µL F	4	5.53125	0.15	-0.271944	0.5719441	0.87653
- 50 µL F	4	5.60625	0.075	-0.346944	0.496944	0.95686
- 5000 µL EA	4	5.6125	0.06875	-0.3531941	0.490694	0.96139
- 5000 µL F	4	5.6375	0.04375	-0.378194	0.465694	0.97752
- Control	6	5.4875	0.19375	-0.1914304	0.5789304	0.72691
<b>50 µL F</b>						
- 100 µL F	4	5.46875	0.1375	-0.284444	0.5594441	0.89459
- 1000 µL F	4	5.68125	-0.075	-0.496944	0.346944	0.95686
- 250 µL F	4	5.43125	0.175	-0.2469441	0.596944	0.83087
- 2500 µL F	4	5.53125	0.075	-0.346944	0.496944	0.95686
- 50 µL EA	4	5.68125	-0.075	-0.496944	0.346944	0.95686
- 5000 µL EA	4	5.6125	-0.00625	-0.428194	0.4156941	0.99714
- 5000 µL F	4	5.6375	-0.03125	-0.4531941	0.3906941	0.98459
- Control	6	5.4875	0.11875	-0.2664305	0.5039304	0.90415
<b>5000 µL EA</b>						
- 100 µL F	4	5.46875	0.14375	-0.278194	0.565694	0.88589
- 1000 µL F	4	5.68125	-0.06875	-0.490694	0.3531941	0.96139
- 250 µL F	4	5.43125	0.18125	-0.240694	0.6031941	0.81690
- 2500 µL F	4	5.53125	0.08125	-0.340694	0.503194	0.95210
- 50 µL EA	4	5.68125	-0.06875	-0.490694	0.3531941	0.96139
- 50 µL F	4	5.60625	0.00625	-0.4156941	0.428194	0.99714
- 5000 µL F	4	5.6375	-0.025	-0.4469441	0.396944	0.98791
- Control	6	5.4875	0.125	-0.2601804	0.5101805	0.89535
<b>5000 µL F</b>						
- 100 µL F	4	5.46875	0.16875	-0.253194	0.5906941	0.84371
- 1000 µL F	4	5.68125	-0.04375	-0.465694	0.378194	0.97752
- 250 µL F	4	5.43125	0.20625	-0.2156941	0.628194	0.74734
- 2500 µL F	4	5.53125	0.10625	-0.315694	0.5281941	0.93031
- 50 µL EA	4	5.68125	-0.04375	-0.465694	0.378194	0.97752
- 50 µL F	4	5.60625	0.03125	-0.3906941	0.4531941	0.98459
- 5000 µL EA	4	5.6125	0.025	-0.396944	0.4469441	0.98791
- Control	6	5.4875	0.15	-0.2351805	0.5351804	0.85219
<b>Control</b>						
- 100 µL F	4	5.46875	0.01875	-0.3664305	0.4039305	0.99020
- 1000 µL F	4	5.68125	-0.19375	-0.5789304	0.1914304	0.72691
- 250 µL F	4	5.43125	0.05625	-0.3289305	0.4414304	0.96629
- 2500 µL F	4	5.53125	-0.04375	-0.4289305	0.3414305	0.97502
- 50 µL EA	4	5.68125	-0.19375	-0.5789304	0.1914304	0.72691
- 50 µL F	4	5.60625	-0.11875	-0.5039304	0.2664305	0.90415

- 5000 µL EA	4	5.6125	-0.125	-0.5101805	0.2601804	0.89535
- 5000 µL F	4	5.6375	-0.15	-0.5351804	0.2351805	0.85219
<hr/>						
α = 0.05, Error Term = S(A), DF = 29, MSE = 0.03181034, Critical Value = 4.7315						

## 14.2. Anexo 2.

Desglose del análisis de Tukey Kramer para la producción de biomasa de *A. af. Peditades*.

Tabla 22. Desglose estadístico del análisis Tukey-Kramer para diferencias significativas en la producción de biomasa de *A. peditades* frente a los CAFs en cultivos sólidos.

One-Way Analysis of Variance Report						
Tukey-Kramer's Simultaneous Confidence Intervals and P-Values for All-Pairs Mean Difference						
Comparisons						
95% Simultaneous						
Confidence Limits of the Difference						
Comparison	Count	Mean	Mean Difference	Lower	Upper	P-
Groups Value						
<b>100 µL F</b>	<b>4</b>	<b>0.3115</b>				
- 1000 µL F 0.04420321	4 0.04725321	0.309975 0.99342	0.001525	-		
- 250 µL F 0.03330321	4 0.05815321	0.299075 0.92180	0.012425	-		
- 2500 µL F 0.04407821	4 0.04737821	0.30985 0.99285	0.00165	-		
- 50 µL EA 0.03782821	4 0.05362821	0.3036 0.95841	0.0079	-		
- 50 µL F 0.04320321	4 0.04825321	0.308975 0.98879	0.002525	-		
- 5000 µL EA 0.06280321	4 0.02865321	0.328575 0.86423	-0.017075	-		
- 5000 µL F 0.0702782	4 0.02117821	0.33605 0.67188	-0.02455	-		
- Control 0.02676395	6 0.05672395	0.29652 0.87431	0.01498	-		
<b>1000 µL F</b>	<b>4</b>	<b>0.309975</b>				
- 100 µL F 0.04725321	4 0.04420321	0.3115 0.99342	-0.001525	-		
- 250 µL F 0.03482821	4 0.05662821	0.299075 0.93569	0.0109	-		
- 2500 µL F 0.04560321	4 0.04585321	0.30985 0.99948	0.000125	-		
- 50 µL EA 0.03935321	4 0.05210321	0.3036 0.96815	0.006375	-		
- 50 µL F 0.04472821	4 0.04672821	0.308975 0.99575	0.001	-		
- 5000 µL EA 0.06432821	4 0.02712821	0.328575 0.83793	-0.0186	-		
- 5000 µL F 0.0718032	4 0.01965321	0.33605 0.60982	-0.026075	-		

- Control	6	0.29652	0.013455	-
0.02828895	0.05519895	0.89659		
<b>250 µL F</b>	<b>4</b>	<b>0.299075</b>		
- 100 µL F	4	0.3115	-0.012425	-
0.05815321	0.03330321	0.92180		
- 1000 µL F	4	0.309975	-0.0109	-
0.05662821	0.03482821	0.93569		
- 2500 µL F	4	0.30985	-0.010775	-
0.05650321	0.03495321	0.93675		
- 50 µL EA	4	0.3036	-0.004525	-
0.05025321	0.04120321	0.97869		
- 50 µL F	4	0.308975	-0.0099	-
0.05562821	0.03582821	0.94387		
- 5000 µL EA	4	0.328575	-0.0295	-
0.07522821	0.01622821	0.45542		
- 5000 µL F	4	0.33605	-0.036975	-
0.08270321	0.008753207	0.18990		
- Control	6	0.29652	0.002555	-
0.03918895	0.04429895	0.98748		
<b>2500 µL F</b>	<b>4</b>	<b>0.30985</b>		
- 100 µL F	4	0.3115	-0.00165	-
0.04737821	0.04407821	0.99285		
- 1000 µL F	4	0.309975	-0.000125	-
0.04585321	0.04560321	0.99948		
- 250 µL F	4	0.299075	0.010775	-
0.03495321	0.05650321	0.93675		
- 50 µL EA	4	0.3036	0.00625	-
0.03947821	0.05197821	0.96890		
- 50 µL F	4	0.308975	0.000875	-
0.04485321	0.04660321	0.99629		
- 5000 µL EA	4	0.328575	-0.018725	-
0.06445321	0.02700321	0.83555		
- 5000 µL F	4	0.33605	-0.0262	-
0.07192821	0.01952821	0.60445		
- Control	6	0.29652	0.01333	-
0.02841395	0.05507395	0.89824		
<b>50 µL EA</b>	<b>4</b>	<b>0.3036</b>		
- 100 µL F	4	0.3115	-0.0079	-
0.05362821	0.03782821	0.95841		
- 1000 µL F	4	0.309975	-0.006375	-
0.05210321	0.03935321	0.96815		
- 250 µL F	4	0.299075	0.004525	-
0.04120321	0.05025321	0.97869		
- 2500 µL F	4	0.30985	-0.00625	-
0.05197821	0.03947821	0.96890		
- 50 µL F	4	0.308975	-0.005375	-
0.05110321	0.04035321	0.97400		
- 5000 µL EA	4	0.328575	-0.024975	-
0.07070321	0.02075321	0.65529		
- 5000 µL F	4	0.33605	-0.03245	-
0.0781782	0.01327821	0.33368		
- Control	6	0.29652	0.00708	-
0.03466395	0.04882395	0.95937		
<b>50 µL F</b>	<b>4</b>	<b>0.308975</b>		
- 100 µL F	4	0.3115	-0.002525	-
0.04825321	0.04320321	0.98879		

- 1000 µL F	4	0.309975	-0.001	-
0.04672821	0.04472821	0.99575		
- 250 µL F	4	0.299075	0.0099	-
0.03582821	0.05562821	0.94387		
- 2500 µL F	4	0.30985	-0.000875	-
0.04660321	0.04485321	0.99629		
- 50 µL EA	4	0.3036	0.005375	-
0.04035321	0.05110321	0.97400		
- 5000 µL EA	4	0.328575	-0.0196	-
0.06532821	0.02612821	0.81782		
- 5000 µL F	4	0.33605	-0.027075	-
0.07280321	0.01865321	0.56606		
- Control	6	0.29652	0.012455	-
0.02928895	0.05419895	0.90923		
<b>5000 µL EA</b>				
- 100 µL F	4	0.3115	0.017075	-
0.02865321	0.06280321	0.86423		
- 1000 µL F	4	0.309975	0.0186	-
0.02712821	0.06432821	0.83793		
- 250 µL F	4	0.299075	0.0295	-
0.01622821	0.07522821	0.45542		
- 2500 µL F	4	0.30985	0.018725	-
0.02700321	0.06445321	0.83555		
- 50 µL EA	4	0.3036	0.024975	-
0.02075321	0.07070321	0.65529		
- 50 µL F	4	0.308975	0.0196	-
0.02612821	0.06532821	0.81782		
- 5000 µL F	4	0.33605	-0.007475	-
0.05320321	0.03825321	0.96123		
- Control	6	0.29652	0.032055	-
0.009688951	0.07379895	0.24241		
<b>5000 µL F</b>				
- 100 µL F	4	0.3115	0.02455	-
0.02117821	0.0702782	0.67188		
- 1000 µL F	4	0.309975	0.026075	-
0.01965321	0.0718032	0.60982		
- 250 µL F	4	0.299075	0.036975	-
0.008753207	0.08270321	0.18990		
- 2500 µL F	4	0.30985	0.0262	-
0.01952821	0.07192821	0.60445		
- 50 µL EA	4	0.3036	0.03245	-
0.01327821	0.0781782	0.33368		
- 50 µL F	4	0.308975	0.027075	-
0.01865321	0.07280321	0.56606		
- 5000 µL EA	4	0.328575	0.007475	-
0.03825321	0.05320321	0.96123		
- Control	6	0.29652	0.03953	-
0.002213951	0.08127395	0.07427		
<b>Control</b>				
- 100 µL F	4	0.3115	-0.01498	-
0.05672395	0.02676395	0.87431		
- 1000 µL F	4	0.309975	-0.013455	-
0.05519895	0.02828895	0.89659		
- 250 µL F	4	0.299075	-0.002555	-
0.04429895	0.03918895	0.98748		
- 2500 µL F	4	0.30985	-0.01333	-
0.05507395	0.02841395	0.89824		
- 50 µL EA	4	0.3036	-0.00708	-

0.04882395	0.03466395	0.95937		
- 50 µL F	4	0.308975	-0.012455	-
0.05419895	0.02928895	0.90923		
- 5000 µL EA	4	0.328575	-0.032055	-
0.07379895	0.009688951	0.24241		
- 5000 µL F	4	0.33605	-0.03953	-
0.08127395	0.002213951	0.07427		
α = 0.05, Error Term = S(A), DF = 29, MSE = 0.0003736173, Critical Value = 4.7315				

### 14.3. Anexo 3.

Desglose del análisis de Tukey Kramer para la  $V_{max}$  de *A. pediades*.

Tabla 23. Desglose estadístico del análisis Tukey-Kramer para diferencias significativas en las  $V_{max}$  del crecimiento *A. pediades* frente a los CAFs en cultivos sólidos.

One-Way Analysis of Variance Report					
Dataset		C:\Users\Diego\Desktop\Datos Agrocybe NCSS\Velocidades Crecimiento.NCSS			
Response		Velocidad_Media_de_Crecimiento			
Factor		Tratamientos_			
Tukey-Kramer's Simultaneous Confidence Intervals and P-Values for All-Pairs Mean Difference					
Comparisons					
Comparison Term:		Tratamientos_			
95% Simultaneous Confidence Limits of the Difference					
Comparison	Count	Mean	Mean Difference	Lower	Upper P-
Groups Value					
<b>100 µL F</b>	<b>4</b>	<b>0.44495</b>			
- 1000 µL F	4	0.47005	-0.0251	-	
0.07268032	0.02248031	0.68793			
- 250 µL F	4	0.454725	-0.009775	-	
0.05735531	0.03780532	0.94775			
- 2500 µL F	4	0.45335	-0.0084	-	
0.05598032	0.03918032	0.95723			
- 50 µL EA	4	0.4591	-0.01415	-	
0.06173031	0.03343032	0.90971			
- 50 µL F	4	0.45255	-0.0076	-	
0.05518031	0.03998031	0.96234			
- 5000 µL EA	4	0.455575	-0.010625	-	
0.05820531	0.03695532	0.94139			
- 5000 µL F	4	0.46565	-0.0207	-	
0.06828032	0.02688032	0.81141			
- Control	6	0.4509333	-0.005983333	-	
0.04941802	0.03745135	0.96860			
<b>1000 µL F</b>	<b>4</b>	<b>0.47005</b>			

- 100 µL F	4	0.44495	0.0251	-
0.02248031	0.07268032	0.68793		
- 250 µL F	4	0.454725	0.015325	-
0.03225531	0.06290532	0.89672		
- 2500 µL F	4	0.45335	0.0167	-
0.03088032	0.06428032	0.87945		
- 50 µL EA	4	0.4591	0.01095	-
0.03663031	0.05853032	0.93884		
- 50 µL F	4	0.45255	0.0175	-
0.03008031	0.06508031	0.86820		
- 5000 µL EA	4	0.455575	0.014475	-
0.03310531	0.06205532	0.90626		
- 5000 µL F	4	0.46565	0.0044	-
0.04318032	0.05198032	0.98026		
- Control	6	0.4509333	0.01911667	-
0.02431802	0.06255136	0.80618		
<b>250 µL F</b>				
<b>4</b>				
<b>0.454725</b>				
- 100 µL F	4	0.44495	0.009775	-
0.03780532	0.05735531	0.94775		
- 1000 µL F	4	0.47005	-0.015325	-
0.06290532	0.03225531	0.89672		
- 2500 µL F	4	0.45335	0.001375	-
0.04620532	0.04895531	0.99433		
- 50 µL EA	4	0.4591	-0.004375	-
0.05195532	0.04320532	0.98039		
- 50 µL F	4	0.45255	0.002175	-
0.04540532	0.04975532	0.99084		
- 5000 µL EA	4	0.455575	-0.00085	-
0.04843032	0.04673032	0.99654		
- 5000 µL F	4	0.46565	-0.010925	-
0.05850532	0.03665531	0.93904		
- Control	6	0.4509333	0.003791667	-
0.03964302	0.04722635	0.98150		
<b>2500 µL F</b>				
<b>4</b>				
<b>0.45335</b>				
- 100 µL F	4	0.44495	0.0084	-
0.03918032	0.05598032	0.95723		
- 1000 µL F	4	0.47005	-0.0167	-
0.06428032	0.03088032	0.87945		
- 250 µL F	4	0.454725	-0.001375	-
0.04895531	0.04620532	0.99433		
- 50 µL EA	4	0.4591	-0.00575	-
0.05333032	0.04183032	0.97314		
- 50 µL F	4	0.45255	0.0008	-
0.04678031	0.04838032	0.99675		
- 5000 µL EA	4	0.455575	-0.002225	-
0.04980532	0.04535532	0.99061		
- 5000 µL F	4	0.46565	-0.0123	-
0.05988032	0.03528032	0.92752		
- Control	6	0.4509333	0.002416667	-
0.04101802	0.04585135	0.98870		
<b>50 µL EA</b>				
<b>4</b>				
<b>0.4591</b>				
- 100 µL F	4	0.44495	0.01415	-
0.03343032	0.06173031	0.90971		
- 1000 µL F	4	0.47005	-0.01095	-
0.05853032	0.03663031	0.93884		
- 250 µL F	4	0.454725	0.004375	-
0.04320532	0.05195532	0.98039		

- 2500 µL F	4	0.45335	0.00575	-
0.04183032	0.05333032	0.97314		
- 50 µL F	4	0.45255	0.00655	-
0.04103031	0.05413032	0.96863		
- 5000 µL EA	4	0.455575	0.003525	-
0.04405532	0.05110532	0.98458		
- 5000 µL F	4	0.46565	-0.00655	-
0.05413032	0.04103031	0.96863		
- Control	6	0.4509333	0.008166667	-
0.03526802	0.05160135	0.95358		
<b>50 µL F</b>				
- 100 µL F	4	0.44495	0.0076	-
0.03998031	0.05518031	0.96234		
- 1000 µL F	4	0.47005	-0.0175	-
0.06508031	0.03008031	0.86820		
- 250 µL F	4	0.454725	-0.002175	-
0.04975532	0.04540532	0.99084		
- 2500 µL F	4	0.45335	-0.0008	-
0.04838032	0.04678031	0.99675		
- 50 µL EA	4	0.4591	-0.00655	-
0.05413032	0.04103031	0.96863		
- 5000 µL EA	4	0.455575	-0.003025	-
0.05060532	0.04455531	0.98695		
- 5000 µL F	4	0.46565	-0.0131	-
0.06068031	0.03448031	0.92018		
- Control	6	0.4509333	0.001616667	-
0.04181802	0.04505135	0.99262		
<b>5000 µL EA</b>				
- 100 µL F	4	0.44495	0.010625	-
0.03695532	0.05820531	0.94139		
- 1000 µL F	4	0.47005	-0.014475	-
0.06205532	0.03310531	0.90626		
- 250 µL F	4	0.454725	0.00085	-
0.04673032	0.04843032	0.99654		
- 2500 µL F	4	0.45335	0.002225	-
0.04535532	0.04980532	0.99061		
- 50 µL EA	4	0.4591	-0.003525	-
0.05110532	0.04405532	0.98458		
- 50 µL F	4	0.45255	0.003025	-
0.04455531	0.05060532	0.98695		
- 5000 µL F	4	0.46565	-0.010075	-
0.05765532	0.03750531	0.94556		
- Control	6	0.4509333	0.004641667	-
0.03879302	0.04807635	0.97672		
<b>5000 µL F</b>				
- 100 µL F	4	0.44495	0.0207	-
0.02688032	0.06828032	0.81141		
- 1000 µL F	4	0.47005	-0.0044	-
0.05198032	0.04318032	0.98026		
- 250 µL F	4	0.454725	0.010925	-
0.03665531	0.05850532	0.93904		
- 2500 µL F	4	0.45335	0.0123	-
0.03528032	0.05988032	0.92752		
- 50 µL EA	4	0.4591	0.00655	-
0.04103031	0.05413032	0.96863		
- 50 µL F	4	0.45255	0.0131	-
0.03448031	0.06068031	0.92018		
- 5000 µL EA	4	0.455575	0.010075	-

0.03750531	0.05765532	0.94556		
- Control	6	0.4509333	0.01471667	-
0.02871802	0.05815135	0.88702		
<b>Control</b>	<b>6</b>	<b>0.4509333</b>		
- 100 µL F	4	0.44495	0.005983333	-
0.03745135	0.04941802	0.96860		
- 1000 µL F	4	0.47005	-0.01911667	-
0.06255136	0.02431802	0.80618		
- 250 µL F	4	0.454725	-0.003791667	-
0.04722635	0.03964302	0.98150		
- 2500 µL F	4	0.45335	-0.002416667	-
0.04585135	0.04101802	0.98870		
- 50 µL EA	4	0.4591	-0.008166667	-
0.05160135	0.03526802	0.95358		
- 50 µL F	4	0.45255	-0.001616667	-
0.04505135	0.04181802	0.99262		
- 5000 µL EA	4	0.455575	-0.004641667	-
0.04807635	0.03879302	0.97672		
- 5000 µL F	4	0.46565	-0.01471667	-
0.05815135	0.02871802	0.88702		
<hr/>				
α = 0.05, Error Term = S(A), DF = 29, MSE = 0.0004044951, Critical Value = 4.7315				

#### 14.4. Anexo 4.

Desglose del análisis de Tukey Kramer para el crecimiento de *A. pedicades* en la actividad enzimática cualitativa.

Tabla 24. Desglose estadístico del análisis Tukey-Kramer para diferencias significativas en el crecimiento de *A. pedicades* frente a los sustratos guayacol y dimetoxifenol en cultivos sólidos.

One-Way Analysis of Variance Report						
Tukey-Kramer's Simultaneous Confidence Intervals and P-Values for All-Pairs Mean Difference						
Comparisons						
95% Simultaneous Confidence Limits of the Difference						
Comparison	Count	Mean	Mean Difference	Lower	Upper	P-Value
<b>Control</b>	<b>4</b>	<b>3.05625</b>				
- Dimetoxifenol	4	3.0375	0.01875	-0.2443241	0.2818241	0.95807
- Guayacol	4	1.95	1.10625	0.8431759	1.369324	0.00000
<b>Dimetoxifenol</b>	<b>4</b>	<b>3.0375</b>				
- Control	4	3.05625	-0.01875	-0.2818241	0.2443241	0.95807
- Guayacol	4	1.95	1.0875	0.8244259	1.350574	0.00000
<b>Guayacol</b>	<b>4</b>	<b>1.95</b>				
- Control	4	3.05625	-1.10625	-1.369324	-0.8431759	0.00000
- Dimetoxifenol	4	3.0375	-1.0875	-1.350574	-0.8244259	0.00000

$\alpha = 0.05$ , Error Term = S(A), DF = 9, MSE = 0.01776042, Critical Value = 3.9480

## 14.5. Anexo 5.

Curvas progreso de la actividad enzimática cuantitativa de los días 6, 8 y 10.

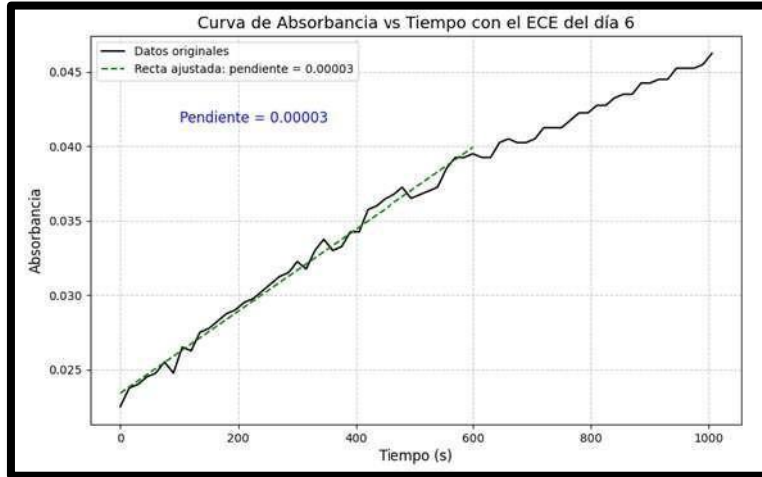


Figura 18. Curva progreso de la actividad enzimática cuantitativa del día 6 con una pendiente ajustada del minuto 0 al 10.

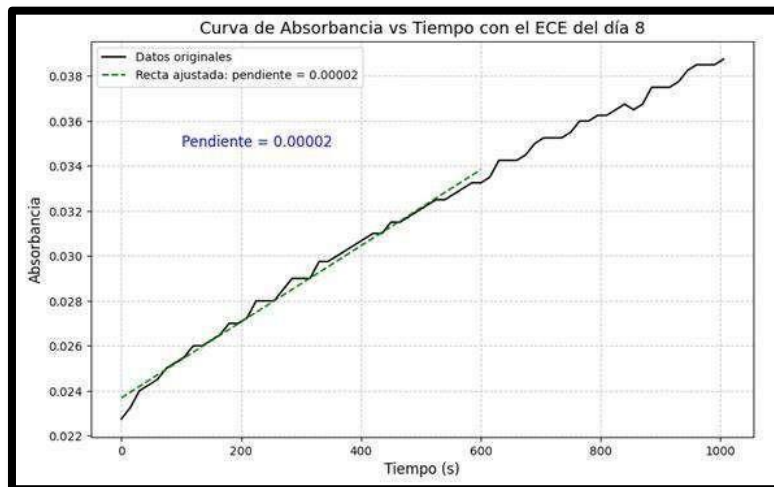


Figura 19. Curva progreso de la actividad enzimática cuantitativa del día 8 con una pendiente ajustada del minuto 0 al 10.

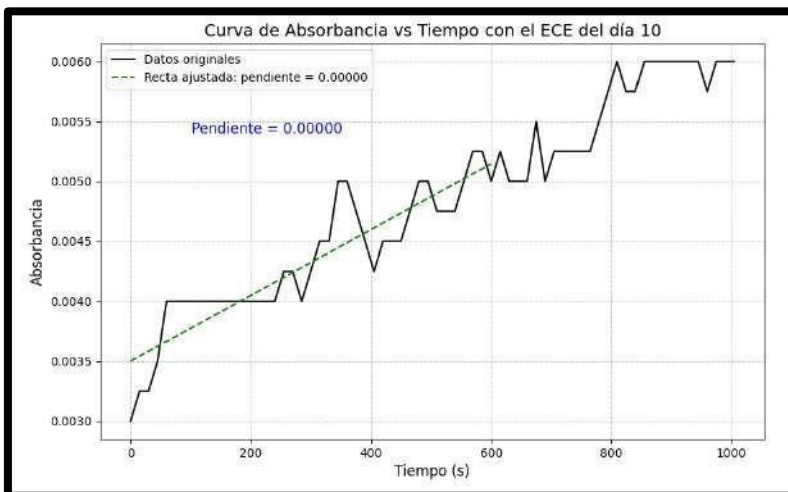


Figura 20. Curva progreso de la actividad enzimatica cuantitativa del día 10 con una pendiente ajustada del minuto 0 al 10.

#### 14.6. Anexo 6.

Resultados de cromatogramas y sus tiempos de retención obtenidos por HPLC. Se muestran los resultados obtenidos para los tiempos 0, 5, 10 y 60 minutos con sus triplicados A, B y C.

Tratamientos del tiempo 0:

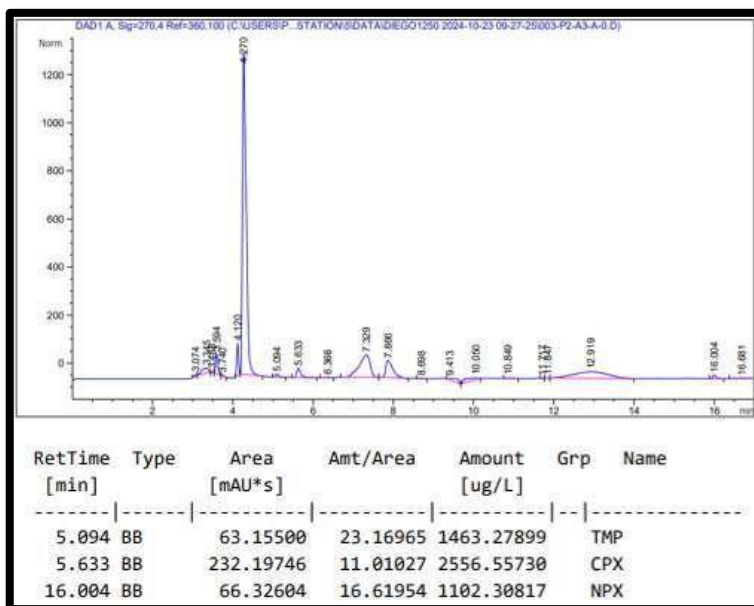


Figura 21. Cromatograma de la reacción A0 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.

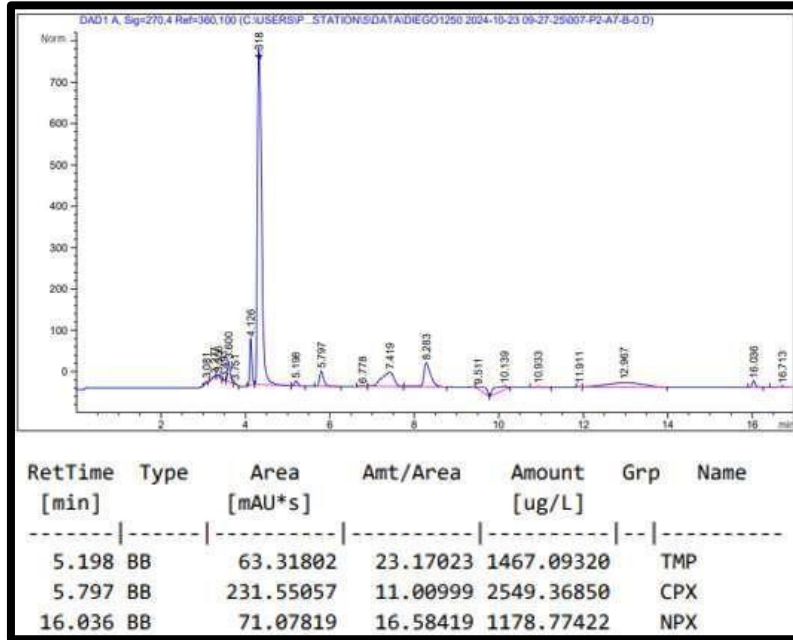


Figura 22. Cromatograma de la reacción B0 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.

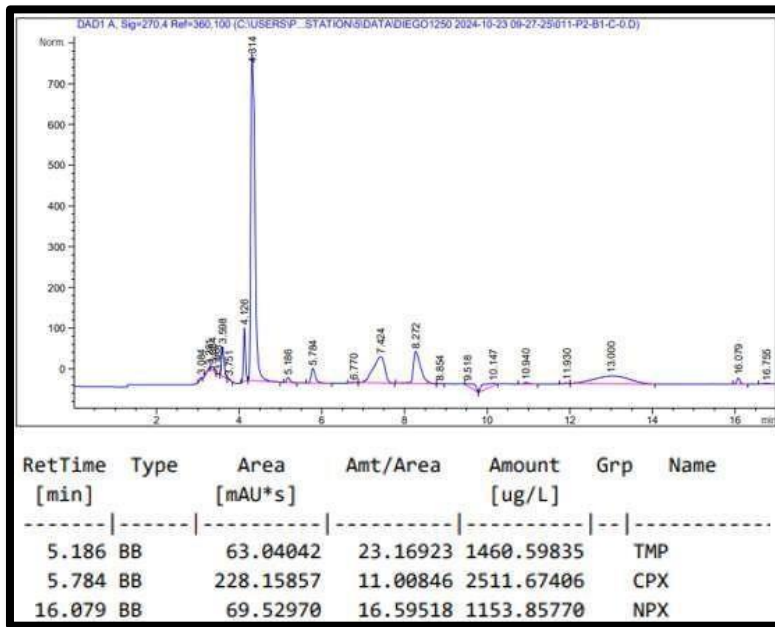


Figura 23. Cromatograma de la reacción C0 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.

Tratamientos del tiempo 5:

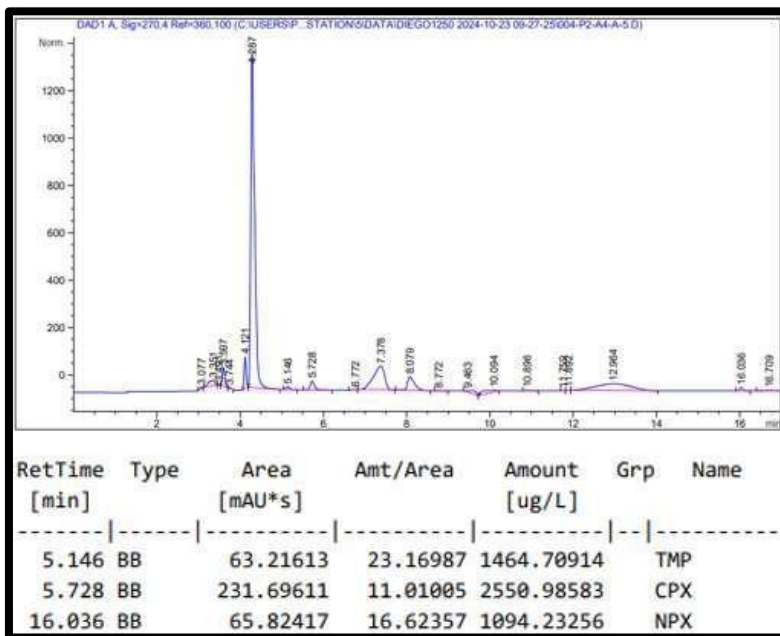


Figura 24. Cromatograma de la reacción A5 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.

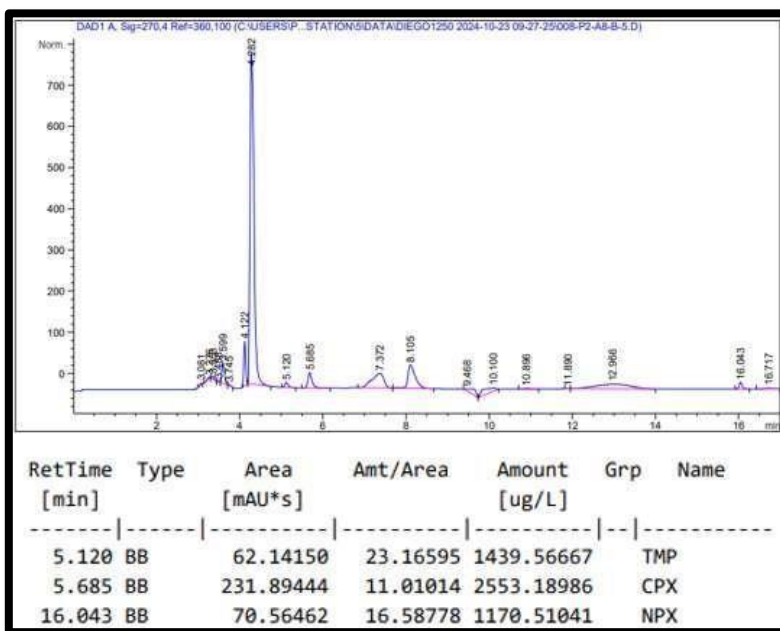


Figura 25. Cromatograma de la reacción B5 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.

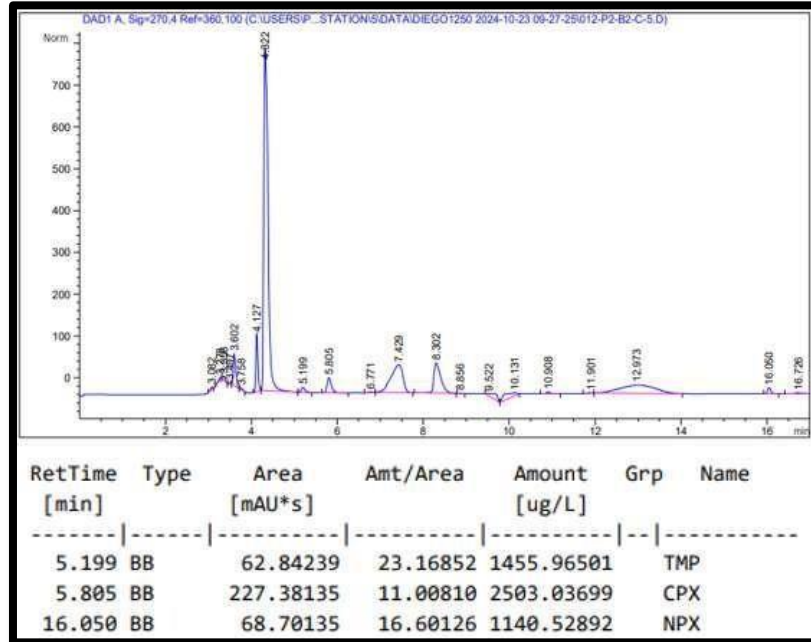


Figura 26. Cromatograma de la reacción C5 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.

Tratamientos del tiempo 10:

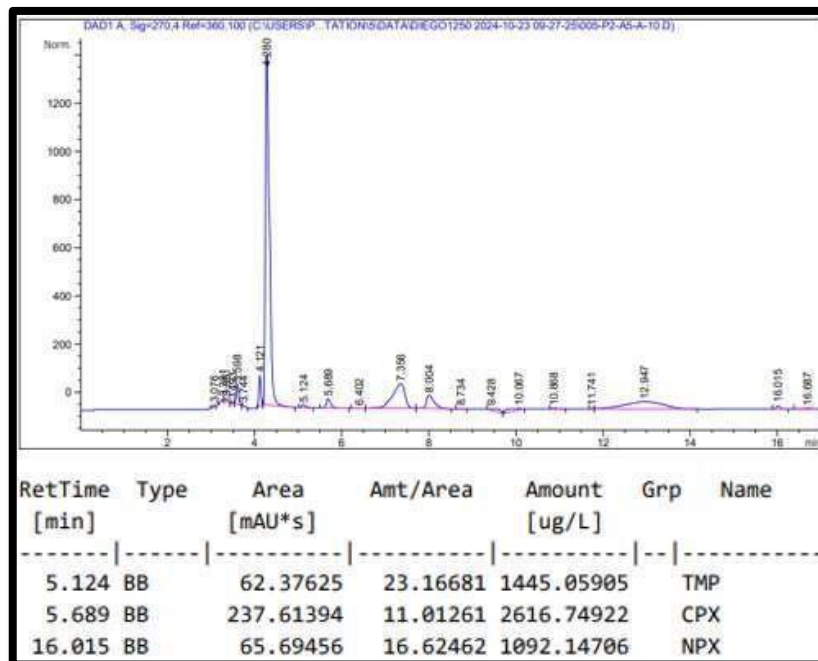


Figura 27. Cromatograma de la reacción A10 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.

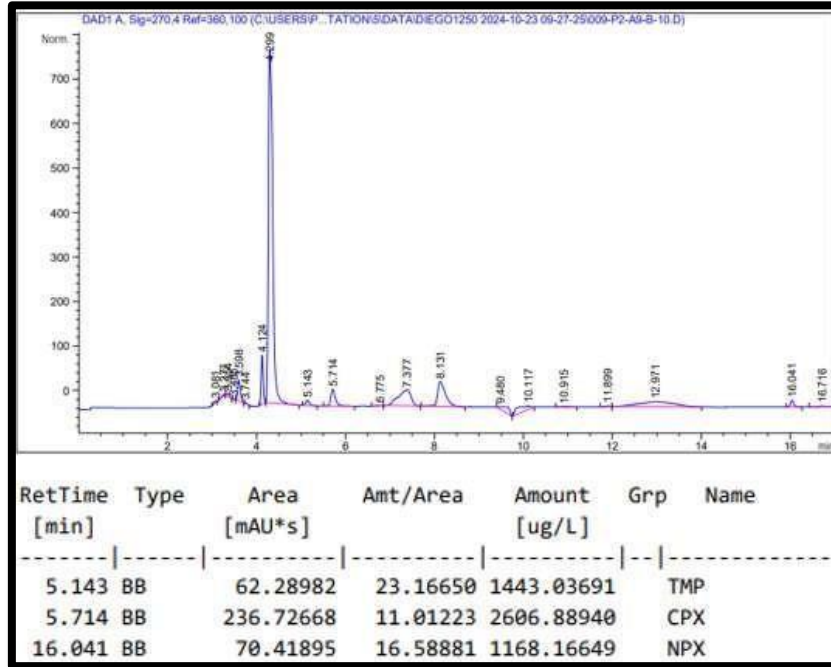


Figura 28. Cromatograma de la reacción B10 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.

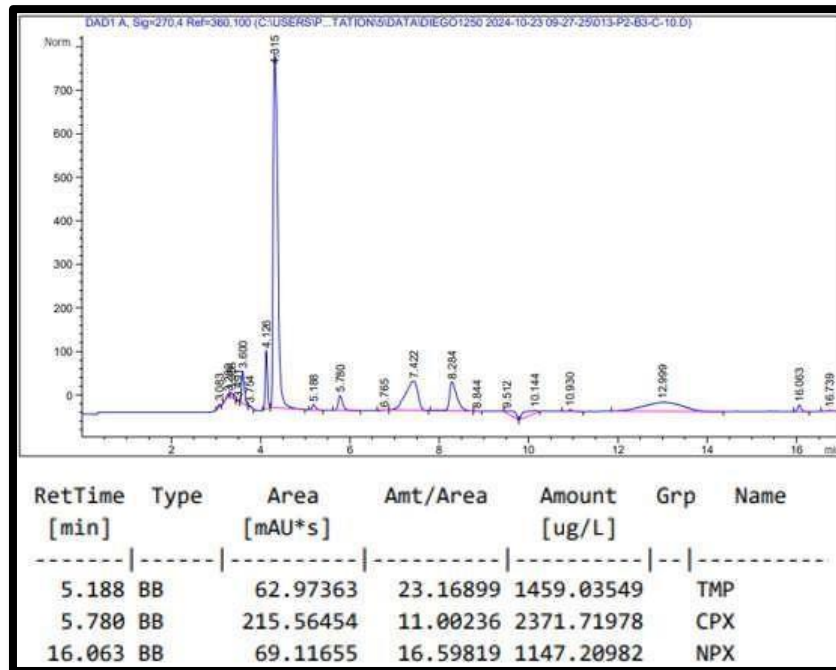


Figura 29. Cromatograma de la reacción C10 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.

Tratamientos del tiempo 60:

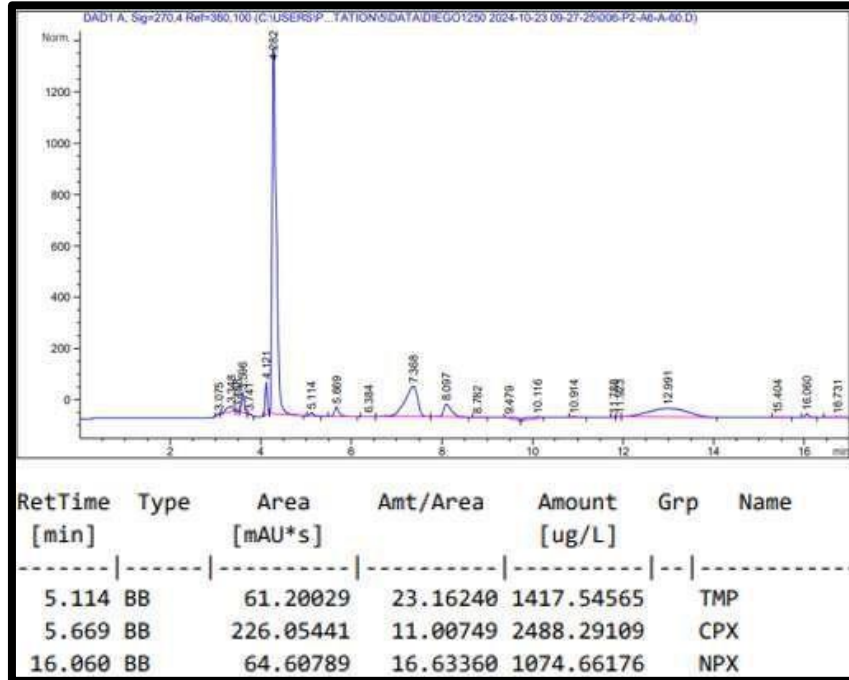


Figura 30. Cromatograma de la reacción A60 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.

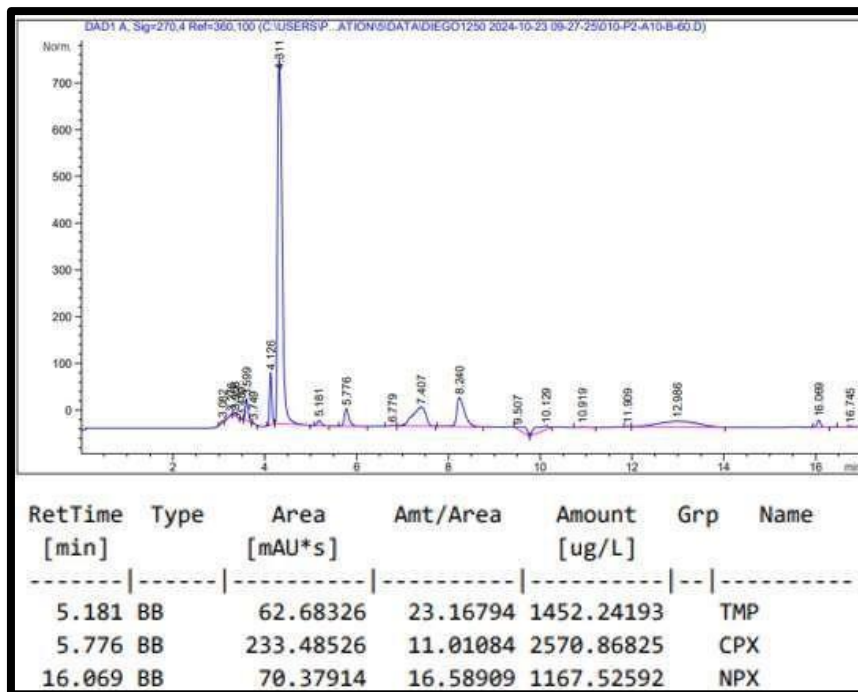


Figura 31. Cromatograma de la reacción B60 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.

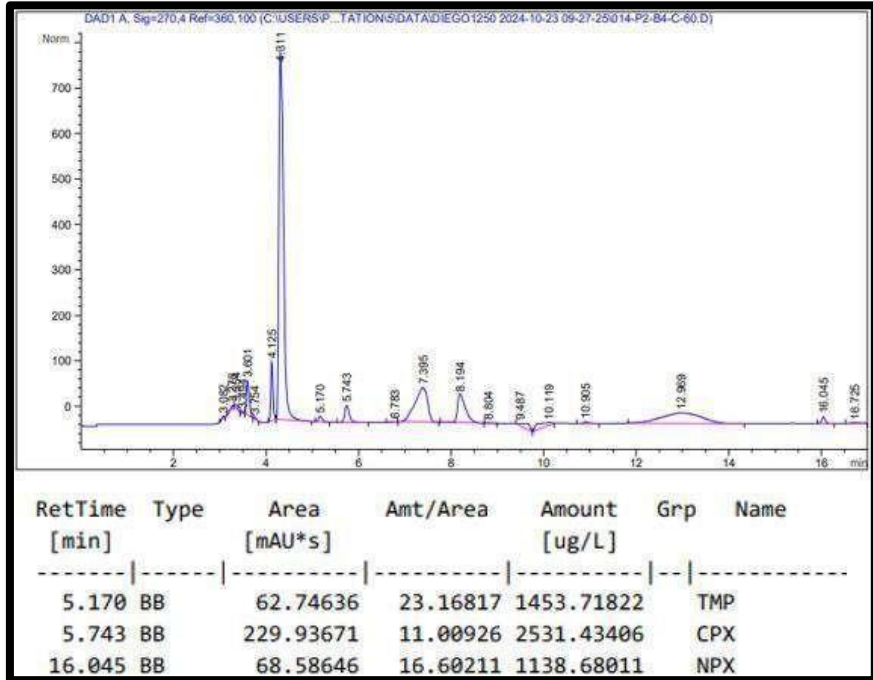


Figura 32. Cromatograma de la reacción C60 con sus tiempos de retención de cada fármaco y su concentración cuantificada con un factor de dilución de 2.

### 14.7. Anexo 7.

Resultados de cromatograma y sus tiempos de retención obtenidos por HPLC. Se muestran los resultados obtenidos para la inyección de la mezcla de CAFs a 1000 µg/L.

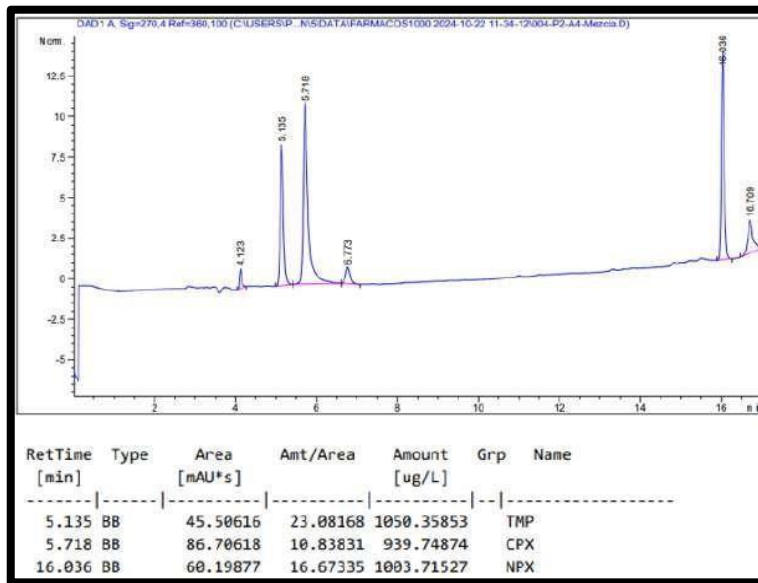


Figura 33. Cromatograma de la inyección de la mezcla de CAFs a 1000 µg/L.

## 14.8. Anexo 8.

Resultados del cromatograma obtenido por HPLC. Se muestran los resultados obtenidos para la inyección del ECE sin adición de CAFs.

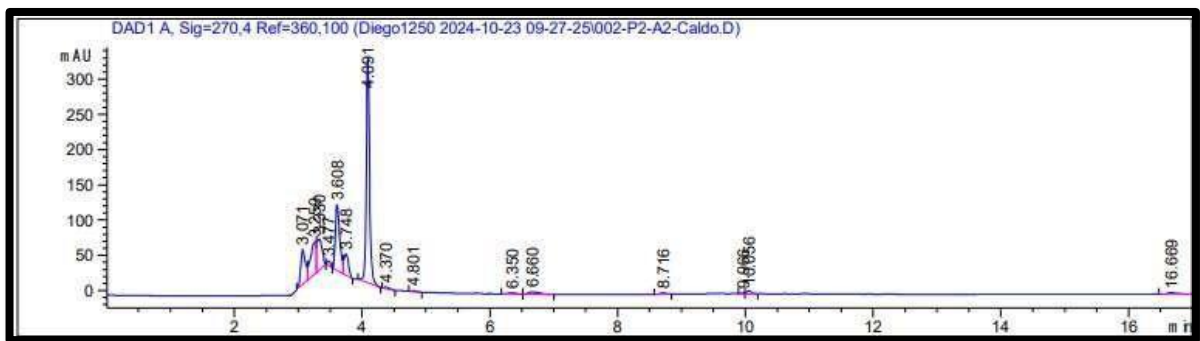


Figura 34. Cromatograma de la inyección del ECE sin CAFs.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO



No. 00132

Matrícula: 2223803603

Tolerancia de Agrocybe af. pedicadas a crecer en presencia de compuestos activos farmacéuticos.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 18 del mes de noviembre del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. HECTOR HUGO LEON SANTIESTEBAN  
DRA. ALBA MONICA MONTIEL GONZALEZ  
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

DIEGO JASON FLORES HUERTA  
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (ENERGÍA Y MEDIO AMBIENTE)


DE: DIEGO JASON FLORES HUERTA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

## Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ  
  
MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI  
  
DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE  
  
DR. HECTOR HUGO LEON SANTIESTEBAN

VOCAL  
  
DRA. ALBA MONICA MONTIEL GONZALEZ

SECRETARIO  
  
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL