



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GIRÓN
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRODUCIDOS EN LA BIODEGRADACIÓN DE
CARBAMAZEPINA POR HONGOS**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
Ingeniera Biotecnóloga**

AUTORAS: MAYBE JACQUELINE ESPINOZA NOQUEZ

MÓNICA MARIBEL PULUPA ALVARO

TUTORA: GABRIELA INÉS MÉNDEZ SILVA

Quito-Ecuador

2024

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

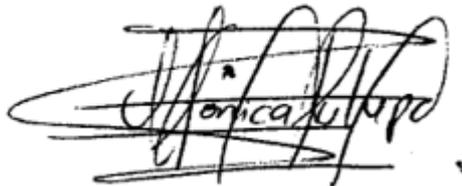
Nosotros, Maybe Jacqueline Espinoza Noquez con documento de identificación N° 1720486180 y Mónica Maribel Pulupa Alvaro con documento de identificación N°1753050036; manifestamos que: Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 08 de Agosto del año 2024

Atentamente,



Maybe Jacqueline Espinoza Noquez
1720486180



Mónica Maribel Pulupa Alvaro
1753050036

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Maybe Jacqueline Espinoza Noquez con documento de identificación No.1720486180 y Mónica Maribel Pulupa Alvaro con documento de identificación No. 1753050036, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “ Identificación de metabolitos producidos en la biodegradación de carbamazepina por hongos”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniería biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

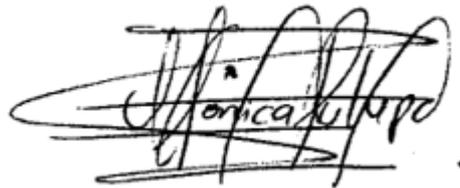
En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 08 de Agosto del año 2024

Atentamente,



Maybe Jacqueline Espinoza Noquez
1720486180



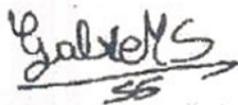
Mónica Maribel Pulupa Alvaro
1753050036

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Gabriela Inés Méndez Silva con documento de identificación N° <número de cédula del docente>, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: TEMA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRODUCIDOS EN LA BIODEGRADACIÓN DE CARBAMAZEPINA POR HONGOS, realizado por Maybe Jacqueline Espinoza Noquez con documento de identificación N° 1720486180 y por Mónica Maribel Pulupa Alvaro, con documento de identificación N° 1753050036, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 08 de Agosto del año 2024

Atentamente,

Handwritten signature of Gabriela Ines Mendez Silva in black ink, with the number 35 written below it.

Ing. Gabriela Ines Mendez Silva Magister

1722305057

Dedicatoria y agradecimiento (opcional, con lenguaje formal)

Resumen

La Carbamazepina (CBZ) es uno de los fármacos que se encuentra contaminando las fuentes hídricas del Ecuador afectando a toda la comunidad biótica que la rodea. En la actualidad, como medida para la biorremediación surge el uso de hongos, los cuales cuentan con enzimas como peroxidasas y lacasas lo que les permiten tener una alta capacidad de remoción comparada con las bacterias. Dentro del proceso de degradación, se debe tomar en cuenta la formación de metabolitos intermedios ya que pueden influir en la toxicidad del impacto ambiental.

De modo que, se realizó una recopilación bibliográfica en fuentes de datos como Google scholar, Scielo, ScienceDirect y Scopus desde los años 2019 al 2024 a cerca de metodologías que se usan para la identificación de metabolitos secundarios que se generan después de la degradación de (CBZ) para lo que inicialmente, se identificó bibliográficamente al hongo *Pleurotus ostreatus* el cual tiene una capacidad degradativa del 99% y con este se planteó un diseño experimental relacionado a un ensayo de degradación en donde se tomaron en cuenta factores como: pH de 5 a 6 y temperatura de 20°C.

Mediante la revisión bibliográfica se eligió el método Cromatografía de capa fina (TLC), con el que se planteó la metodología para la realización del ensayo que permitirá la identificación de metabolitos intermedios obtenidos durante la biodegradación de CBZ considerando que los ensayos se realizarán en las instalaciones de la Universidad Politécnica Salesiana.

Finalmente se planteó un presupuesto estimado en donde abarca todos los ensayos de degradación e identificación.

Palabras clave: Carbamazepina, degradación, metabolitos intermedios, enzimas

Abstract

Carbamazepine (CBZ) is one of the drugs that is found contaminating the water sources of Ecuador, affecting the entire biotic community that surrounds it. Currently, as a measure for bioremediation, the use of fungi arises, which have enzymes such as peroxidases and laccases, which allows them to have a high removal capacity compared to bacteria. Within the degradation process, the formation of intermediate metabolites must be taken into account since it would determine the efficiency of the degradation. So, a bibliographic compilation was carried out in data sources such as Google scholar, Scielo, ScienceDirect and Scopus from the years 2019 to 2024 about methodologies that are used for the identification of secondary metabolites that are generated after the degradation of (CBZ) for which initially, the fungus *Pleurotus ostreatus* was identified bibliographically, which has a degradative capacity of 99% and with this an experimental design related to a degradation test was proposed where factors such as: pH from 5 to 6 and temperature of 20°C.

Through the bibliographic review, the Thin Layer Chromatography (TLC) method was chosen, with which the methodology for carrying out the test was proposed that will allow the identification of intermediate metabolites obtained during the biodegradation of CBZ considering that the tests will be carried out in the facilities from the Salesian Polytechnic University.

Finally, an estimated budget was proposed that covers all degradation and identification tests.

Keywords: Carbamazepine, degradation, intermediate metabolites, enzymes.

Índice de contenidos

Contenido

1	Introducción	1
2	Fundamentación teórica	4
2.1	Contaminación del agua.....	4
2.2	Carbamazepina.....	4
2.3	Degradación de carbamazepina.....	6
2.4	Metabolitos intermedios durante procesos de degradación.....	7
3	Materiales y métodos	9
3.1	Alcance de la investigación.....	9
4	Resultados y discusión	11
4.1	Hongos utilizados en la degradación de carbamazepina.....	11
4.2	<i>Pleurotus ostreatus</i>	14
4.2.1	Caracterización del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	15
4.3	Ensayo de degradación de carbamazepina con <i>Pleurotus ostreatus</i>	20
4.4	Detección de metabolitos intermedios resultado de la degradación de carbamazepina.....	29
4.4.1	Detección de metabolitos por TLC.....	32
5	Presupuesto	35
6	Conclusiones y recomendaciones	39
7	Bibliografía	41

Índice de figuras

Figura 1 <i>P.ostreatus</i> identificación macroscópica.....	17
Figura 2 <i>P.ostreatus</i> identificación microscópica	18
Figura 3 Electroforesis <i>Pleurotus</i>	20
Figura 4 Preparación del estándar de CBZ	21
Figura 5 Siembra de <i>Pleurotus ostreatus</i> en el medio Czapek-Dox modificado con CBZ	22
Figura 6 Preparación de la muestra.....	23
Figura 7 Procedimiento de la prueba catalasa.....	24
Figura 8 Procedimiento de la prueba oxidasa	25
Figura 9 Resultado positivo a la prueba catalasa	25
Figura 10 Resultados de la prueba oxidasa	25
Figura 11 Procedimiento de la prueba de lacasas	26
Figura 12 Prueba positiva a lacasas	26
Figura 13 Procedimiento de la prueba peroxidasa	27
Figura 14 Resultado positivo a peroxidasa	28
Figura 15 Diseño experimental DBCA	28
Figura 16 Preparación de la muestra.....	33
Figura 17 Procedimiento de TLC.....	34
Figura 18 Placa de TLC obtenida después de 45min.....	35

Índice de tablas

Tabla 1 Concentración de CBZ en ríos del Ecuador.....	5
Tabla 2 Hongos usados en la degradación de carbamazepina	11
Tabla 3 Métodos de identificación de metabolitos intermedios	30
Tabla 4 Presupuesto general	35
Tabla 5 Costo de equipos de laboratorio.....	37
Tabla 6 Presupuesto total	38

1 Introducción

El Ecuador cuenta con una gran cantidad de recursos hídricos que de acuerdo con Calero & Delgado (2022), tiene una reserva de agua que se aproxima a 289.000.000.000 m³/año, la cual se distribuye en lagos, embalses, lagunas, que son ubicados principalmente en las cuencas hidrográficas del océano Pacífico y la amazónica, siendo una de las reservas hídricas más grandes por superficie a nivel global. Sin embargo, la contaminación dada por productos farmacéuticos o llamados contaminantes emergentes han generado un impacto negativo en el medio ambiente afectando a estos recursos (Prado, 2021).

La presencia de productos farmacéuticos en el medio ambiente genera un impacto negativo en los ecosistemas y la salud humana. Este hecho se atribuye a los principios activos que tienen los fármacos, los cuales cuentan con propiedades ionizantes que mantienen la estabilidad y composición del mismo, manteniendo así la actividad biológica en el ser humano; sin embargo, estas propiedades son las responsables de su introducción en los cuerpos del agua, que se da comúnmente por los vertidos de las industrias de fármacos, los residuos hospitalarios y la eliminación inadecuada de medicamentos vencidos o desconocidos. Los fármacos al ser de naturaleza compleja pueden representar un alto grado de toxicidad y cuando entran en contacto con el medio ambiente tienden acumularse y persistir, haciendo más difícil su eliminación (Cartagena, 2011).

La carbamazepina (CBZ) es un medicamento que actúa en el cerebro como estabilizador, empleado para tratar síntomas psicológicos y de comportamiento usado principalmente en el control y prevención de la epilepsia, trastorno de bipolaridad hasta depresión (CPNP, 2016), debido a su composición, este producto farmacéutico se convierte en uno de los contaminantes que se acumulan en los cuerpos de agua y en las aguas residuales; esta acumulación perjudica a toda la comunidad biótica que lo rodea, desde microorganismos, plantas, animales e inclusive a las personas que se encuentren cerca de las fuentes (Pacheco, 2021), por lo que los contaminantes requieren de tratamientos especiales para su remoción (García, 2020). En la investigación realizada por Voloshenko (2015) se tomaron muestras a lo largo del río San Pedro-Guayllabamba-Esmeraldas y se

determinó que las concentraciones de carbamazepina varían en un rango de 11,5 a 830 $\mu\text{g/L}$, mientras que en otro estudio realizado por García (2020), se tomaron muestras en el río Tahuando, tramo Olmedo- Ibarra en el que se detectaron concentraciones de 0,125 $\mu\text{g/L}$ y 0,453 $\mu\text{g/L}$. La diferencia de concentraciones entre los estudios se ve alterada por las descargas residuales de las zonas aledañas del sitio y la actividad antropogénica que persiste a lo largo del río San Pedro-Guayllabamba-Esmeraldas.

Por ello, la biorremediación que hace uso de sistemas biológicos como microorganismos o sus derivados emerge como una alternativa valiosa que a través de su actividad biológica permite transformar, reducir o destruir contaminantes del medio ambiente (Cota et al., 2019).

En la actualidad se buscan alternativas fiables para abordar esta contaminación ambiental y una alternativa es el uso de bacterias y hongos que han servido para ensayos de biorremediación, en los que se ha podido determinar que los hongos son más efectivos pues los porcentajes de remoción superan a la de las bacterias debido a que los hongos tienen más cantidad de enzimas como las lacasas o peroxidases (Ramón, 2020). Es de importancia recalcar que el proceso de degradación ideal es cuando el contaminante se degrada completamente, sin embargo, en un caso real la formación de intermediarios es inevitable y resultan ser no beneficiosos. Hernández (2020) menciona que durante la degradación de contaminantes y debido a los cambios en la parte estructural de las moléculas, se obtienen compuestos más complejos y de elevada toxicidad como “10,11-dioxo-10,11-dihidro-5H-dibenzo”, entre otros; que pueden ser perjudiciales para la salud al consumir agua o comida contaminada.

Por ende, se postula que el uso de hongos es capaz de biodegradar la carbamazepina y con ello es capaz de producir diferentes metabolitos desconocidos cuya identificación, caracterización y cuantificación es fundamental para comprender el mecanismo de biodegradación. Sin embargo el contexto específico de Ecuador, la ausencia de investigaciones previas y la escasez de información sobre la biodegradación de carbamazepina por hongos implica también la ausencia o limitación de protocolos de remediación en áreas contaminadas por dicho fármaco; por ello para la resolución del

caso, se realizará una indagación sobre métodos de identificación de metabolitos intermedios generados durante el proceso de biodegradación de carbamazepina por hongos; entre las actividades a realizar están: investigar un hongo que más se asocie con la degradación de la carbamazepina; plantear la metodología de un ensayo de degradación de carbamazepina por el hongo anteriormente investigado; indagar sobre métodos de identificación de metabolitos intermedios generados durante el proceso de biodegradación de carbamazepina por hongos; seleccionar un método de los anteriormente investigados y plantear la metodología de éste para la identificación de metabolitos intermedios resultantes de la degradación de carbamazepina; por último se determinará un presupuesto aproximado asociado a la investigación de metabolitos intermedios.

2 Fundamentación teórica

2.1 Contaminación del agua

La contaminación del agua representa un desafío global debido a los efectos negativos en la biodiversidad y salud del ser humano, ya que se ha puesto en peligro la seguridad de seres vivos y del medio ambiente. La principal fuente de contaminación son las aguas residuales, producto de las actividades humanas que aumentan la acidificación y alteran la calidad de ríos, lagos, y otras fuentes de agua (Morales & Loor, 2023).

En América Latina, de acuerdo con diferentes estudios asociados a la contaminación de aguas residuales se detectaron alrededor de 51 contaminantes emergentes, Ecuador fue el país con más muestras tomadas seguido de México, Brasil, Colombia, Argentina y Venezuela, donde de manera general la cafeína presentó las concentraciones más altas (5,597 µg/L), seguida de la benzoilcgonina (1,065 µg/L) y la carbamazepina (830 µg/L) (Checa Artos et al., 2021).

La liberación continua de productos farmacéuticos al agua es motivo de preocupación debido a la toxicidad directa en la biota acuática.

2.2 Carbamazepina

La carbamazepina (CBZ) es un fármaco antiepiléptico detectado principalmente en aguas residuales, subterráneas y superficiales. Es considerado como un contaminante emergente ya que sus características químicas y mecanismos de acción pueden llegar a ser perjudiciales al medio ambiente (Solis, 2013).

Los contaminantes emergentes tienen varias vías de inserción al medio ambiente, una de ellas es la excreción en orina por parte del ser humano en un 72% de la dosis oral administrada en la CBZ, mientras que el 28% se elimina por medio de las heces, comúnmente la CBZ se excreta al medio ambiente en forma de metabolitos hidroxilados y conjugados. Los vertimientos de las industrias farmacéuticas, la expulsión directa al medio ambiente de medicamentos de hogares y hospitales que son desechados con el resto de basura doméstica también contribuyen con la contaminación (Almeida et al., 2021; Lozano, 2004).

La presencia de CBZ detectada en los ríos del Ecuador se muestra en la Tabla 1

Tabla 1 Concentración de CBZ en ríos del Ecuador

Río	Concentración (ug/L)	Año de estudio	Fuente
Río Machángara S	598	2015	(Voloshenko-Rossin et al., 2015)
Río Machángara N	830		
Río Monjas	670		
Guayllabamba (puente)	355		
Río Guayllabamba	195		
Río Esmeraldas b/t	11,5		
Río Esmeraldas a/t	16		
Río Tahuando	0,125 a 0,453	2020	(García, 2020)
Río San Pedro	116,68	2021	(Pacheco, 2021)

Elaborado por: (Las autoras., 2024)

La presencia de este contaminante es un riesgo en el medio ambiente debido a su toxicidad y persistencia, sus componentes bioacumulables provocan efectos principalmente en el medio marino, por ejemplo en los bivalvos, al ser organismos filtradores entran en contacto con grandes cantidades de agua para respirar y alimentarse, esta exposición resulta en la acumulación de CBZ comúnmente en tejidos que se transfieren a través de los depredadores que los consumen, incluyendo el consumo directo por parte del ser humano, por ende de una u otra forma la transferencia de contaminantes llegan a cadena alimenticia por lo que hay mayor riesgo de toxicidad en seres vivos (Almeida et al., 2014).

La resistencia del fármaco es preocupante, de hecho, un estudio realizado por Schapira (2020) se examinó la exposición involuntaria de CBZ, se detectó CBZ residual en la orina de las personas adultas asociadas al vegetarianismo, esta exposición se debe al uso de aguas residuales tratadas para el riego agrícola demostrando así la absorción y acumulación en cultivos. Además, estudios toxicológicos asocian a la CBZ a problemas del desarrollo neurológico y malformaciones congénitas

(Akao et al., 2022). Debido a las propiedades fisicoquímicas de la CBZ, su eliminación o transformación se ve obstaculizada, aunque ya hayan pasado por un sistema de tratamiento, no se degradan (Baquero, 2022).

Así mismo, el enfoque se centra en los metabolitos, productos del proceso de degradación que comúnmente son ignorados y que se ha visto que pueden llegar a ser más tóxicos que los compuestos de los cuales se generan (Donaires et al., 2022).

2.3 Degradación de carbamazepina

Existen tratamientos que se pueden usar para la biodegradación de fármacos como la fotocatálisis y la degradación biológica.

Referente a la fotocatálisis es una metodología que se basa en la reducción de moléculas orgánicas debido al proceso catalítico en el cual éstas se reducen y oxidan bajo irradiación en la superficie de los semiconductores (Rouibah et al., 2021). Este proceso se resume en tres pasos: la absorción, excitación y reacción de fotones; el proceso da inicio con la actividad fotocatalítica cuando un fotocatalizador absorbe luz con suficiente energía provocando que los electrones pasen a un nivel de energía superior generando “agujeros”, los agujeros y electrones viajan al fotocatalizador e interactúan con sustancias produciendo una reacción química que alteran, transforman o degradan a las sustancias como los contaminantes que están en el entorno del fotocatalizador conduciendo así la degradación de los mismos (Bai et al., 2022). Si bien la fotocatálisis es una herramienta útil para la degradación de fármacos, ésta puede resultar ser costosa puesto que en el proceso requiere de una alta demanda de energía que eleva los costos operativos además de que, a un largo plazo, el equipo, requiere de mantenimiento afectando al proceso de degradabilidad y reduciendo la posibilidad de un escalado (Zvinowanda et al., 2023).

Mientras que, la degradación biológica se define como la eliminación, degradación, transformación e inclusive metabolización de contaminantes ambientales como pesticidas, fármacos y otros residuos usando organismos vivos como plantas, hongos, levaduras y bacterias presentes en el entorno haciendo que los contaminantes pasen de un carácter tóxico a inofensivo para el medio ambiente y

sobre todo a la salud humana. Según Kumar (2020), el fundamento de las técnicas de degradación biológica se basan en determinar los tipos de moléculas, células y rutas metabólicas que tienen diferentes organismos y como las usan para la remediación.

De acuerdo con Kandhasamy (2022) existen tres tipos de procesos de remediación biológica como: la atenuación natural que se refiere a la reducción del contaminante por parte de microorganismos, la bioestimulación que implica proporcionar oxígeno y nutrientes al medio, y la bioaumentación en el que se agregan microorganismos que ayudan a la eficiencia del sistema.

El uso de microorganismos como hongos y bacterias han sido métodos que se han venido usando para la biodegradación de fármacos. Referente a las bacterias su mecanismo principal es usar como fuente de carbono y energía a los contaminantes y junto a la liberación de enzimas como la peroxidasa, dioxigenasa, monooxigenasa y lacasa que las bacterias presentan provocan una degradación de los mismos contaminantes (Khan & Murphy, 2021). En hongos, la degradación se da por la actividad metabólica donde se producen varias enzimas que desencadenan la descomposición de componentes orgánicos, dependiendo del tipo de hongo se puede inducir su forma de biodegradación por ejemplo por ataque oxidativo o conjugación, lo que dependerá del objetivo. El uso de hongos es una alternativa útil puesto que su capacidad de adaptación a diferentes sustratos y condiciones ambientales facilita la degradación de una diversidad de contaminantes (Singh et al., 2020).

2.4 Metabolitos intermedios producidos durante procesos de biodegradación

De forma general los metabolitos secundarios se definen como sustancias que tienen una capacidad mejorada que se forman durante la metabolización de un compuesto químico, la capacidad mejorada se refiere a que las sustancias obtenidas resultan tener una actividad química y tóxica diferente al compuesto inicial que puede ser no benéfica en el proceso de biodegradación. (Tam et al., 2021)

De acuerdo con Hernández (2020) durante la degradación de contaminantes y debido a los cambios en la parte estructural de las moléculas, se obtienen compuestos de diferente naturaleza, siendo unos más complejos y de elevada toxicidad como “10,11-dioxo-10,11-dihidro-5H-dibenzo”, entre otros; que pueden ser perjudiciales para la salud al consumir agua contaminada o alimentos que fueron

regados por ésta (González et al., 2023), es por ello la importancia del estudio de los metabolitos generados luego de un proceso de degradación.

3 Materiales y métodos

3.1 Alcance de la investigación

El presente trabajo se basó en la resolución de un caso de estudio, a través de la recopilación de información bibliográfica, en bases de datos científicas como Google scholar, Scielo, ScienceDirect y Scopus cuyas investigaciones van desde los años 2019 al 2024 tanto en el idioma español, así como inglés. Se incluyeron términos de búsqueda como: “carbamazepina”, “biodegradación”, “identificación”, “metabolitos”, “remediación”, se priorizaron estudios que detallaban métodos analíticos utilizados para identificar metabolitos en el contexto de la biodegradación de carbamazepina por hongos.

Esta información se analizó críticamente para proporcionar una visión comprehensiva de los métodos de identificación de metabolitos generados en procesos de degradación, finalmente se incluyó un presupuesto de la aplicación de la presente propuesta a nivel práctico considerando que se lo realizaría dentro de los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana.

3.2 Ensayo de degradación de carbamazepina

Se realizó una indagación bibliográfica acerca de hongos que estén asociados con la degradación del fármaco, a partir de esta información se seleccionó una especie de hongo con capacidad degradadora. Con el hongo elegido se planteó un posible diseño experimental asociado a un ensayo de biodegradación de carbamazepina; en donde se definieron aspectos como: tipo de muestra a utilizar para aislar el hongo de interés, tipo de agua a tratar sintética o natural, (sintética referida a que se colocará el contaminante en un caldo de cultivo y natural referido a que se usará una muestra de agua tomada directamente de la naturaleza). Se mencionará las condiciones en los cuales el ensayo de degradación se desarrollará, considerando temperatura, tiempo, concentración del contaminante, cantidad de inóculo, tipo de medio de cultivo, número de tratamientos a aplicar (Gutiérrez, Jiménez, et al., 2022). Adicionalmente se sugirió un diseño estadístico como manera de interpretar los datos que se van a obtener.

3.3 Método de detección de metabolitos resultantes de los ensayos de degradación

Se realizó una indagación bibliográfica acerca de las metodologías utilizadas para la identificación de metabolitos secundarios que se generan después de la degradación de CBZ (Carbamazepina), para ello se recopiló información de distintas bases de datos a cerca de diferentes metodologías usadas para la detección de metabolitos intermedios después del proceso de degradación de fármacos; de las cuales se evaluaron las ventajas y desventajas que tienen las mismas con la finalidad de compararlas y elegir la más adecuada, de la cual, se propuso la metodología para el desarrollo a futuro de un caso práctico dentro de los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana además de ser el principal aspecto que se consideró para la propuesta aproximada del presupuesto.

4 Resultados y discusión

La solución al caso planteado se divide en 4 fases, se partirá primero con la recopilación de información bibliográfica acerca de hongos usados para la degradación de carbamazepina; en segundo lugar, se especificará al mejor hongo que degrada, especificando sus condiciones y características de crecimiento; en tercer lugar se planteará un ensayo de degradación con el hongo elegido, seguido, mediante una recopilación de información se determinará la metodología para la detección de metabolitos intermedios: para finalmente presentar un presupuesto para las metodologías propuestas, que serán a futuro realizadas en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana.

4.1 Hongos utilizados en la degradación de carbamazepina

Se realizó la búsqueda de información en 8 artículos científicos relevantes, enfocados en diferentes hongos que degradan la CBZ, con la finalidad de obtener información necesaria para definir aquel que posee una capacidad de degradación superior, la información recolectada fue tomada de las bases de datos como: Taylor & Francis, Springer Link y Google académico las cuales se representan en la Tabla 2.

Tabla 2 Hongos usados en la degradación de carbamazepina

Nombre del hongo	Porcentaje de degradación	Cantidad de inóculo	Concentración del contaminante	Cita
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus</i> <i>microsporus</i> y <i>T. polizona</i>	70%	0,1 g de peso seco	1 ppm	(Kasonga et al., 2021)
<i>Mucor</i> <i>circinelloides</i> y	70%	0,1 g de peso seco	5 ppm	(Kasonga et al., 2021)

<i>Trichoderma longibrachiatum</i>				
<i>Aspergillus niger</i> y <i>Rhizopus microsporus.</i>	72%, 15%	0,1 g de peso seco	5 ppm	(Kasonga et al., 2021)
<i>Aspergillus niger</i> y <i>Rhizopus microsporus.</i>	70%, 65%	0,1 g de peso seco	10 ppm	(Kasonga et al., 2021)
<i>Trametes versicolor</i>	82%	0,08 g de peso seco	1,25 ppm	(Alharbi et al., 2019)
<i>Trametes versicolor</i>	49%	0,08 g de peso seco	5 ppm	(Alharbi et al., 2019)
<i>Aspergillus niger</i>	66%, 72%, 91%	10 g/L	5 ppm 10 ppm 15 ppm	(Darabi et al., 2024)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	99%	No especifica	0,025 ppm	(Emily et al., 2022)
<i>Trametes versicolor</i>	82%	0,5 g de pellet	10 ppm	(Sanchez, 2022)
<i>Penicillium sp.</i>	91%	0,5 g de pellet	10 ppm	(Sanchez, 2022)
<i>Aspergillus niger</i>	70%	0,75 g	1 ppm	(Concha & Hernández, 2023)
<i>Trametes polyzona</i> ,, <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , <i>Mucor circinelloides</i> y <i>Rhizopus microsporus.</i>	91,94% ± 0,05%	120 mL	1 ppm	(Kasonga et al., 2022)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	99%	Disco de 5 mm de diámetro de micelio de una	10 ppm	(Nasir et al., 2017)

		colonia recién cultivada.		
--	--	------------------------------	--	--

Elaborado por: (Las autoras., 2024)

Se ha podido determinar que entre los artículos revisados el hongo más estudiado a manera de consorcio es *Aspergillus niger* puesto que se encontró en la mitad de los artículos revisados. Este hongo tiene una capacidad de degradación entre el 60 al 91,94%; cuyos valores de degradación, en su mayoría, no varían por la concentración de CBZ, es decir que, a concentraciones de 1 ppm, 5 ppm y 10 ppm del contaminante, el hongo mantiene un porcentaje de remoción de hasta un 70%. Sin embargo, en uno de los cuatro estudios acerca de *Aspergillus niger*, se concluyó que al aumentar la concentración de CBZ la capacidad degradativa aumenta, por lo que su degradación es proporcional a la concentración de CBZ, presentados en los siguientes resultados, para una concentración de 5 ppm tiene una remoción del 66%, para 10 ppm un 72% y para 15 ppm la remoción es del 91% (Darabi et al., 2024). Esto se debe a que el hongo *Aspergillus niger* tiene la capacidad de sintetizar al contaminante de manera rápida debido a que posee un metabolismo lábil y una buena capacidad de adaptación a diferentes medios, utilizando cambios fisiológicos como el crecimiento de conidióforos sin la necesidad de tener una alteración genética (Isaichkin et al., 2021).

Adicionalmente, con la indagación bibliográfica se pudo determinar que el porcentaje más bajo de degradación corresponde al hongo *Rhizopus microsporus*, el cual fue probado a una concentración del contaminante de 5 ppm con una capacidad de degradación del 15%, seguido del *Trametes versicolor* con un porcentaje de degradación del 49%, respecto a este último se puede evidenciar que a medida que la concentración del contaminante aumenta la capacidad de degradación del hongo disminuye. La diferencia de degradación de éstos hongos comparados con la de *Aspergillus niger* se debe a que no poseen una capacidad rápida de adaptación a diferentes sustratos impidiéndole colonizar rápidamente (Aguilera et al., 2021)

A pesar de que el hongo *Aspergillus niger* es el más estudiado, 2 de los estudios mencionan que el hongo que posee un mayor porcentaje de degradación es *Pleurotus ostreatus* con una capacidad de

degradación de 99% probada a una concentración del contaminante de 10 ppm y 0,025 ppm; es por ello por lo que en la propuesta de ensayo de degradación que se plantea posteriormente, se selecciona este hongo.

4.2 *Pleurotus ostreatus*

En base a la recopilación bibliográfica se determinó que *Pleurotus ostreatus*, es uno de los hongos con mayor potencial de degradación, por lo que a continuación se presentan aspectos importantes a considerar sobre este hongo. El hongo pertenece al género *Pleurotus* que se caracteriza por su capacidad de producir moléculas bioactivas debido a que poseen ácidos grasos, esteroides y polisacáridos, son adaptables, resistentes y comúnmente no requieren de condiciones específicas de crecimiento. Para la investigación se planteará el uso de *Pleurotus ostreatus* también conocido como “hongo ostra”, comúnmente usado en la biotecnología ambiental por la capacidad de transformar o degradar residuos usando diversas enzimas para la producción de biomasa. El uso de este hongo en la micorremediación de suelos y agua contaminados se debe principalmente a que su mecanismo de biodegradación está asociado a enzimas como el manganeso peroxidasa, la lignina peroxidasa y la lacasa (El-Ramady et al., 2022).

Según la revisión de Valerie (2022) *Pleurotus ostreatus*, específicamente la cepa PC9, gracias a la acción de las enzimas como la lacasa, manganeso peroxidasa, citocromo P450, epóxido hidrolasa y aldehído oxidasa genera una variedad de metabolitos finales a partir de la degradación de CBZ como 10-metoxicarbamazepina (10-metoxi-CBZ), acridona, 1-(2-Benzaldehído) -(1H,3H)-quinazolina-2,4-ona (BaQD), 10-hidroxicarbamazepina (10-OH-CBZ). El hongo también puede expresar manganeso peroxidasa (MnP), epóxido hidrolasa (EH) y aldehído oxidasa (AO), también cabe mencionar la enzima extracelular MnPoxida que puede degradar la CBZ en epoxi-CBZ u otros derivados arílicos.

Además, en la degradación de CBZ por *Pleurotus ostreatus*, los productos identificados de la biotransformación en estado líquido son 10,11-epoxi carbamazepina y 10,11-dihidroxi carbamazepina, y en condiciones de fermentación de estado sólido las rutas acridina y 10,11-dihidroxi

carbamazepina metabolizo 10,11-epoxi carbamazepina (Jiménez, 2018). En la mayoría de artículos se nombra que 10,11-epoxi carbamazepina es considerado el metabolito principal producido por la degradación de CBZ, el mismo que se considera que tienen efectos tóxicos (Aguila, 2016).

Según el trabajo realizado por Zind (2021) se nombran metabolitos como 3-Hidroxicarbamazepina (3OH-CBZ), 10,11-Epoxicarbamazepina (CBZ-epox), 10,11-dihidro-10,11-trans-dihidroxicarbamazepina (Trans-CBZ) que provienen del compuesto original y Dibenzazepina (Dibenz) que es un metabolito de CBZ producto de la degradación de la EDAR. En el mismo estudio se cuantificó la presencia de estos metabolitos en algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*), invertebrados (*Daphnia magna*) y peces (*Pimephales promelas*) de manera que se identificó que Dibenz es el más tóxico para las 3 especies, en las algas el metabolito 3OH-CBZ demostró la misma toxicidad que el compuesto original (carbamazepina) y lo mismo sucede con CBZ-epox en peces, sin embargo en los dáfnidos, los metabolitos 3OH-CBZ y CBZ-epox es 3 veces más tóxico que el compuesto original y Trans -CBZ es 65 veces menos tóxico, por lo que se concluye que la toxicidad de los metabolitos van a variar significativamente dependiendo del organismo y los diferentes parámetros fisiológicos y epigenéticos que influyen en él.

Aunque se reconoce que algunos de estos metabolitos son tóxicos incluso más tóxicos que el compuesto original, en la actualidad la falta de información científica limita la comprensión sobre la magnitud exacta de su toxicidad, sin embargo, hay que reconocer que los metabolitos pueden tener efectos adversos en la salud humana y medio acuático resaltando la necesidad de investigaciones adicionales.

4.2.1 Caracterización del hongo *Pleurotus ostreatus*

Para el desarrollo del caso, se propone que el micelio del hongo *Pleurotus ostreatus* se obtendrá de la empresa Intiwasi ubicada en Tumbaco-Quito y se usará la semilla de sorgo como el medio de masificación del hongo. Para ello se seguirá la metodología de Angulo (2022), en el cual primero se preparará las semillas, para su esterilización, lavar las semillas con agua de grifo varias veces hasta que el agua se encuentre transparente, remojar las semillas en agua con 10 g de cal y 15 g de yeso por

12 horas. Se colocará las semillas de sorgo en un recipiente metálico con agua seguido colocar sobre una hornilla hasta que hierva, ya escurrida el agua, dejar secar las semillas en un ambiente aséptico expuesto al sol cerca a la ventana. Las semillas estarán listas cuando no presenten humedad y haya ausencia de conglomerados. Después se colocará las semillas en bolsas de polipropileno (20 x 35 cm) se cerrará bien y se llevará a la autoclave a 8,23 atm, 121°C por 90 minutos. Posteriormente se llevará a cabo la inoculación en las semillas, para ello se cortará cuadrados de 1 x 1 cm del micelio y se colocará 9 trozos ya cortados al cerrar la funda se colocará un pedazo de tubo PVC con un tampón de algodón para facilitar la respiración del hongo, después se colocará la funda estante oscuro a temperatura ambiente (17 a 20°C) y se deberá agitar la bolsa cada 10 días. Para el aislamiento, se realizará dentro de la cámara de flujo laminar, se cortará cuadrados de 1.5 x 1 cm del micelio y se colocará en medio PDA previamente autoclavado a 121 °C por 15min. Sellar la caja con Parafilm e incubar 12 a 15 días a temperatura constante de 20°C.

- Identificación macroscópica y microscópica

Para la identificación macroscópica, en medio PDA la colonia del hongo se observará blanca en la parte superior y en la base será de color blanco con halos de textura algodonosa, liso, no esporulento y la mayoría de las veces de forma circular o con distribución uniforme, la densidad alta con exudado ausente como se muestra en la Figura 1, también se podría ver la formación de anillos concéntricos (Angulo et al., 2022; Imbaquingo & Oña, 2019).

Identificación macroscópica de *Pleurotus*

ostreatus



Figura 1 *P.ostreatus* identificación macroscópica

Fuente: (Maldonado, 2017)

Posteriormente, se realizará la identificación microscópica, para la cual se colocará el micelio en un portaobjetos junto una gota de lactofenol se observará las siguientes estructuras mostradas en la Figura 2 un conjunto de hifas septadas, ramificaciones alargadas delgadas, basidios largos y entrecruzados como una malla, basidioesporas esféricas y ovaladas con paredes delgadas, hilianas y lisas. Esporas 7.0 - 9.0 x 3.0 - 4.0 μm , cilíndricas a elipsoides, hialinas, lisas, de pared delgada, inamiloides (Cevallos & García, 2018; Perez, 2006; Quevedo & Quinde, 2023).

Identificación microscópica de *Pleurotus ostreatus*

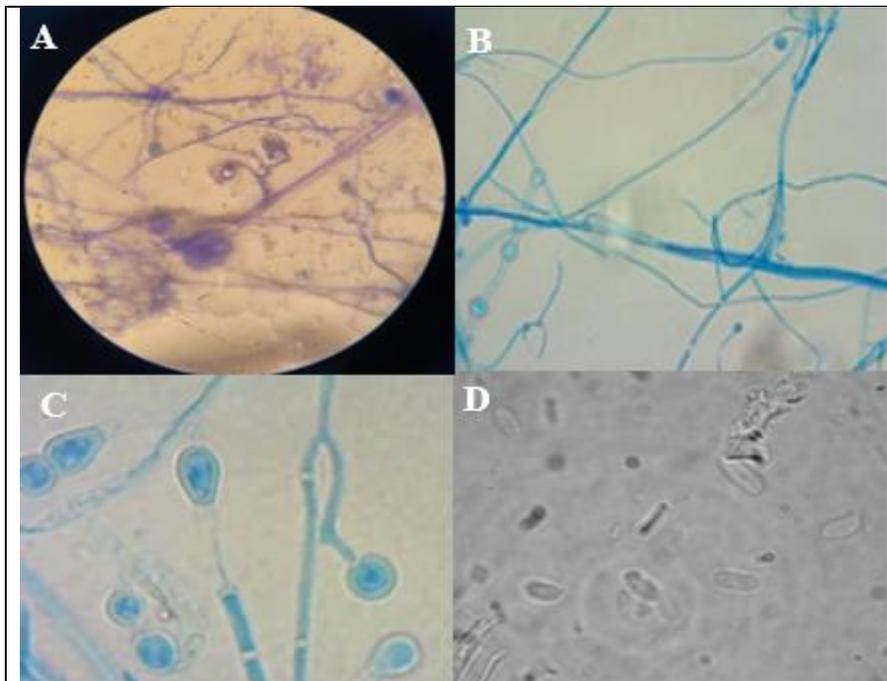


Figura 2 *P.ostreatus* identificación microscópica

Fuente: (Cevallos & García, 2018; Perez, 2006; Quevedo & Quinde, 2023)

Nota: A.*P.ostreatus* desde el microscopio 40X, B.Basidios, C.Basidiesporas, E.Esporas

- Identificación molecular

Para la identificación molecular se seguirá la metodología realizada por Cevallos (2018), Se tomará 50 mg del hongo, poner en tubos eppendorf con 500 μ L de buffer lisis, homogeneizar la muestra con un agitador de vidrio y vórtex. Incubar en el termobloque por 20 min a 37°C, después agregar 500 μ L de fenolcloroformo (1:1) a 4°C y llevar al vórtex por 5 min, centrifugar a 13000 rpm por 30 min. Transferir solo el sobrenadante a un tubo de 1,5 mL que contendrá 400 μ L de cloroformo a -20 °C, y llevar al vórtex por 1 min y centrifugar a 13000 rpm por 5 min. Tomar el sobrenadante y poner en un tubo que contendrá 4 μ L de ARNasa (10 mg/ mL) e incubar por 30 minutos a 37 °C. Después se agregará 500 μ L de isopropanol (4°C), mezclar por inversión durante 1 min, seguido incubar a -20 °C por 15 min y centrifugar a 13000 rpm por 5 min. Desechar el sobrenadante y conservar el pellet, después añadir 500 μ L de etanol a 70 % a -20 °C y llevar al vórtex por 1 min, centrifugar a 13000 rpm por 5 min, desechar el sobrenadante y agregar 50 μ L de TE y almacenar a -20 °C (El análisis de la cantidad y calidad del ADN aislado se realizó mediante espectrofotómetro Nanodrop)

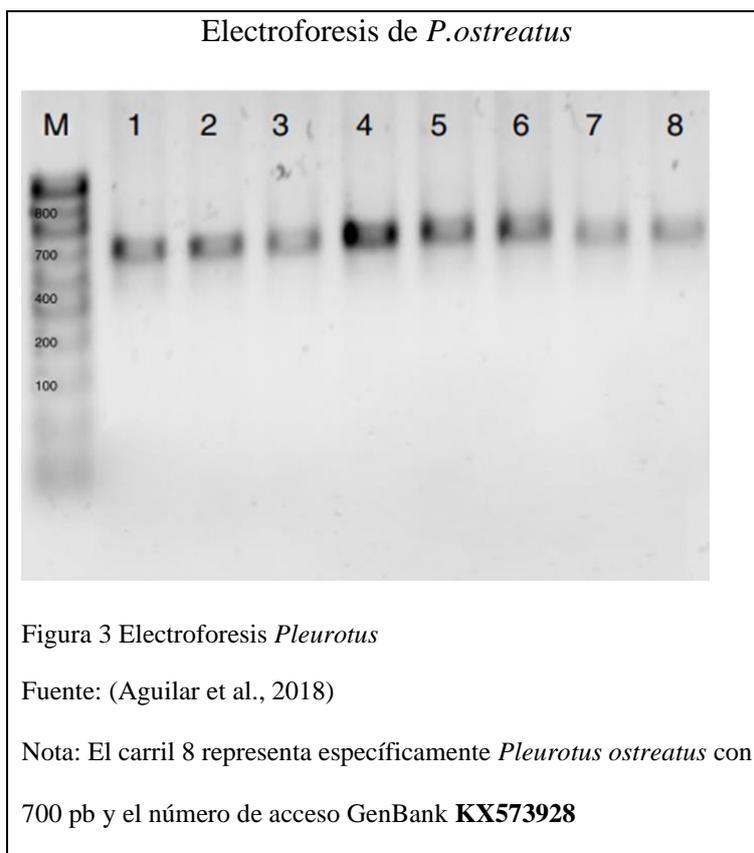
(El gen 5.8S es mucho más conservado en comparación con las regiones ITS. La secuencia de 5.8S rRNA cambia muy poco entre diferentes especies, lo que lo hace menos útil para distinguir entre especies cercanas, pero útil para asegurar la alineación correcta de las regiones ITS durante el análisis.)

Para la amplificación y posterior secuenciación de ADN se hará uso de la región espaciadora transcrita interna (ITS) y el gen de ARN 5.8S con cebadores ITS1 (TCCGTA GGTGAACCT), ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), mediante PCR convencional, para ello en tubos de 0.2 mL colocar 12.5 µL de Master Mix Go Taq polimerasa marca Promega, 0.5 µL de primer ITS 1 Forward, 0.5 µL de primer ITS 4 Reverse, 10 µL de agua libre de nucleasas, 0.5 µL DMSO (dimetil sulfóxido) y 1 µL de ADN, el volumen final deberá contener 25 µL (según el manual de promega M7841) (Cevallos, 2018).

Las condiciones para el termociclador son de 95 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 51 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 min, seguido de 72 °C por 10 min. Los productos obtenidos por PCR se observarán por electroforesis horizontal en el gel de agarosa al 1% con 5 µL Syber safe por cada 50 mL de TBE 1X. Se prepara la muestra para ello mezclar 5 µl de ADN producto de la PCR con 5 µL de Tampón de carga Blue Juice 2X, llevar al vórtex por 1 min y colocar la muestra en los pocillos. Correr la muestra a 90 V por 40 min y revelar el gel. Para el proceso de secuenciación, se colocará 20 µL de producto de PCR a una concentración de 20 ng en tubos eppendorf de 1.5 mL se mandará a secuenciación de acuerdo con el equipo disponible, las secuencias generadas se compararán con GenBank (Cevallos & García, 2018; Rugolo et al., 2019).

De acuerdo con el artículo de Aguilar (2018), se indica que la amplificación de la región ITS para la identificación del género *Pleurotus* se encuentran en rangos de 600 pb a 800 pb (datos que fueron comparados con otros estudios). En el estudio se realizó la caracterización molecular de diferentes cepas de *Pleurotus djamor* obtenidas de diferentes partes de México, sin embargo al realizar en análisis molecular basado en secuencias ITS la cepa CC059 obtenida del Colegio de Posgraduados en Puebla reveló una identidad del 100% con *Pleurotus ostreatus*, los productos de PCR amplificados

para esta cepa se observan en el carril 8 mostrada en la Figura 3 donde se produjo un solo producto de amplificación con un tamaño de 700-800 pb.



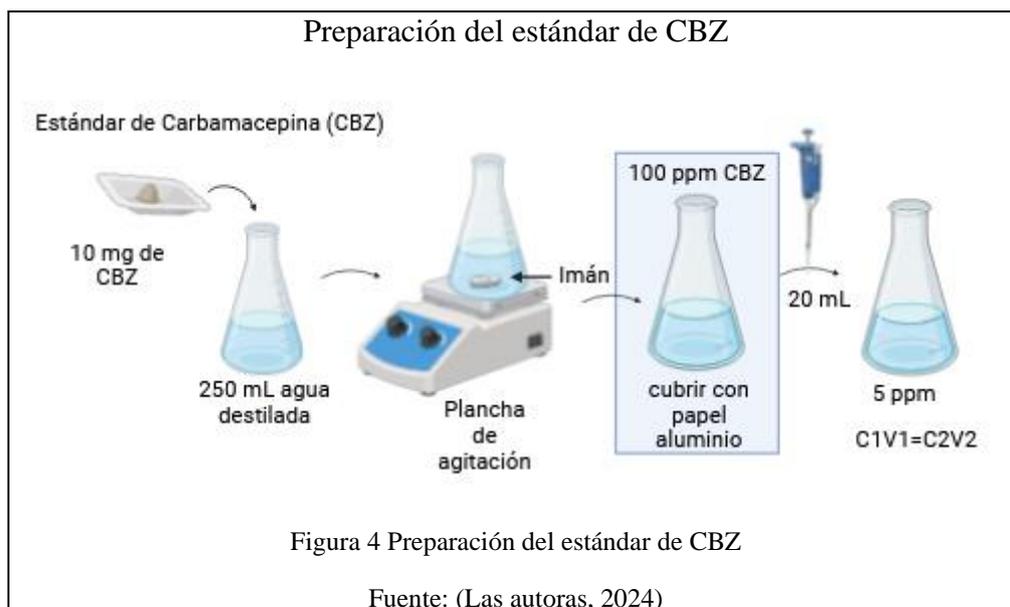
4.3 Ensayo de degradación de carbamazepina con *Pleurotus ostreatus*

Se partirán de cepas fúngicas puras que ya fueron identificadas anteriormente, es decir que este cultivo va a tener únicamente el hongo *Pleurotus ostreatus*.

Para todo este proceso se cuidará la esterilidad para evitar la contaminación de los medios y por ende algún tipo de resultado erróneo. Se iniciará con la preparación del medio Czapek-Dox modificado el cual está compuesto por $NaNO_3$ (2 g/L), K_2HPO_4 (1 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g/L), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01 g/L) y NaCl (0,5 g/L) el cual será enviado al autoclave para su debida esterilización (Levakov et al., 2022).

Se realizarán estándares de CBZ para poder probar a diferentes concentraciones la capacidad de biodegradación del hongo: para la concentración madre se usará un volumen de 25 mL de agua destilada, se añadirá 10 mg del contaminante, se colocará un imán en el interior del matraz que se

está usando y se lo llevará a una plancha de agitación para que dentro de la mezcla se incorporen en su totalidad sus componentes obteniendo al final una concentración de 100 ppm tal como lo muestra la Figura 4 . Para poner a prueba diferentes concentraciones del contaminante se usará la fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$ y se evaluarán concentraciones de 0,010 ppm, 0,050 ppm, 0,10 ppm, 0,50 ppm, 1 ppm, 5ppm, 10 ppm, 15 ppm, ya que la CBZ que se encuentra en ríos tienen aproximadamente estas concentraciones tal y como se lo describe en la Tabla 1.

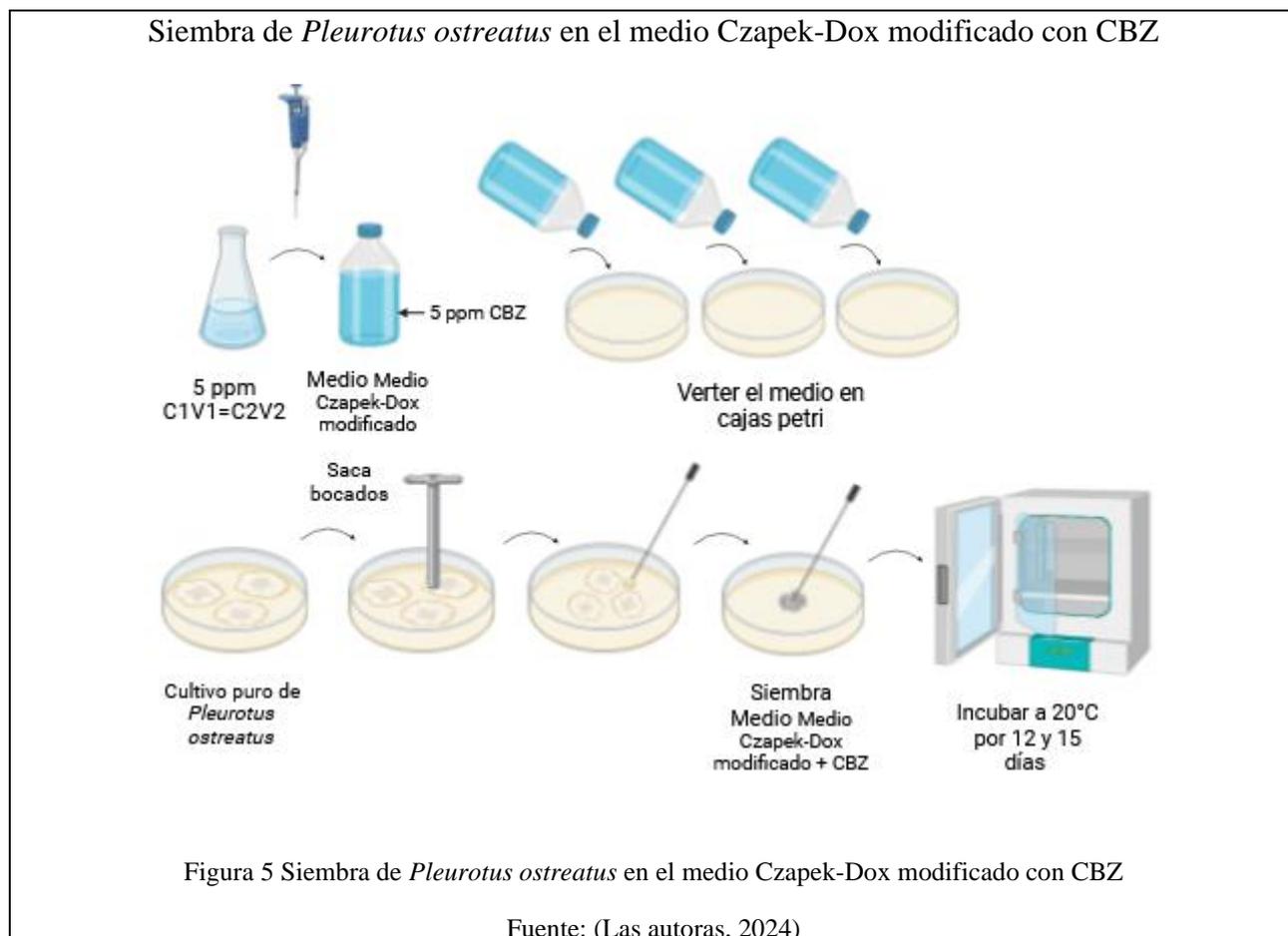


Para este estudio se evaluarán 8 tratamientos con tres repeticiones y como testigo se sembrará el hongo *Pleurotus ostreatus* en el medio Agar Papa Dextrosa (PDA). La única diferencia entre los tratamientos será la concentración del contaminante, distribuidos de la siguiente manera: Control (T0), 0,010 ppm (T1), 0,050 ppm (T2), 0,10 ppm (T3), 0,50 ppm (T4), 1 ppm (T5), 5ppm (T6), 10 ppm (T7), 15 ppm (T8)

Para cada tratamiento se mantendrán las condiciones de pH de 5 a 6 y temperatura de 20°C pues a esta temperatura el hongo crece eficazmente referente al tiempo de incubación se evaluarán a los 12 y 15 días siendo éstos los parámetros que se mantendrán estables y no tendrán alguna variación durante el ensayo de degradación (Angulo et al., 2022; Imbaquingo & Oña, 2019).

Para todos los tratamientos, antes de verter el medio Czapek-Dox modificado en cajas Petri se adicionarán los estándares de CBZ cuidando de la exposición al sol puesto que de acuerdo con

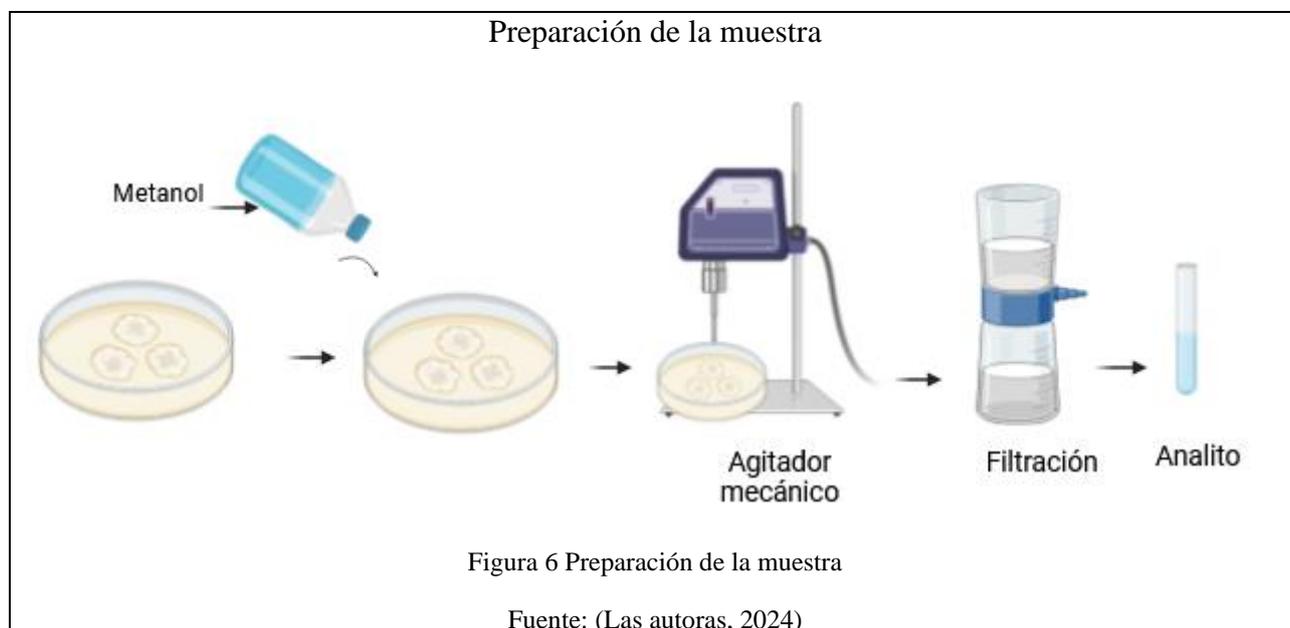
(Levakov et al., 2022) es una sustancia que tiende a ser fotosensible, vertido el medio en las placas Petri y esperando a que se solidifique se procederá a tomar muestras del hongo para sembrar, para ello, partiendo del cultivo puro de *Pleurotus ostreatus* y bajo una cámara de flujo laminar se procederá a tomar una muestra del hongo con ayuda de un sacabocados previamente esterilizados, con ayuda de un aza de siembra o pinzas se colocará la muestra sobre el medio de cultivo ajustándolo al medio de la placa así como se indica en la Figura 5 (Jimenez, 2018).



Para medir la biomasa micelial de las placas, después de los 15 días de incubación se tomarán las placas Petri y se realizará la separación del micelio, para ello las placas sin tapa se llevarán al microondas durante 40 segundos con una potencia de 10%, usando una balanza analítica, el micelio separado se pesará sobre un papel filtro de peso conocido después de haber esperado aproximadamente 30 min a que el papel filtro absorba el agua contenida; la medida resultante será el peso inicial, para el peso final, la muestra se incubará a 65°C durante 4 horas, se dejará enfriar por 30

minutos y se volverá a pesar, para la determinación del peso seco del micelio se restará la masa final de la masa inicial obteniendo al final gramos de micelio por cada caja Petri (Jimenez, 2018).

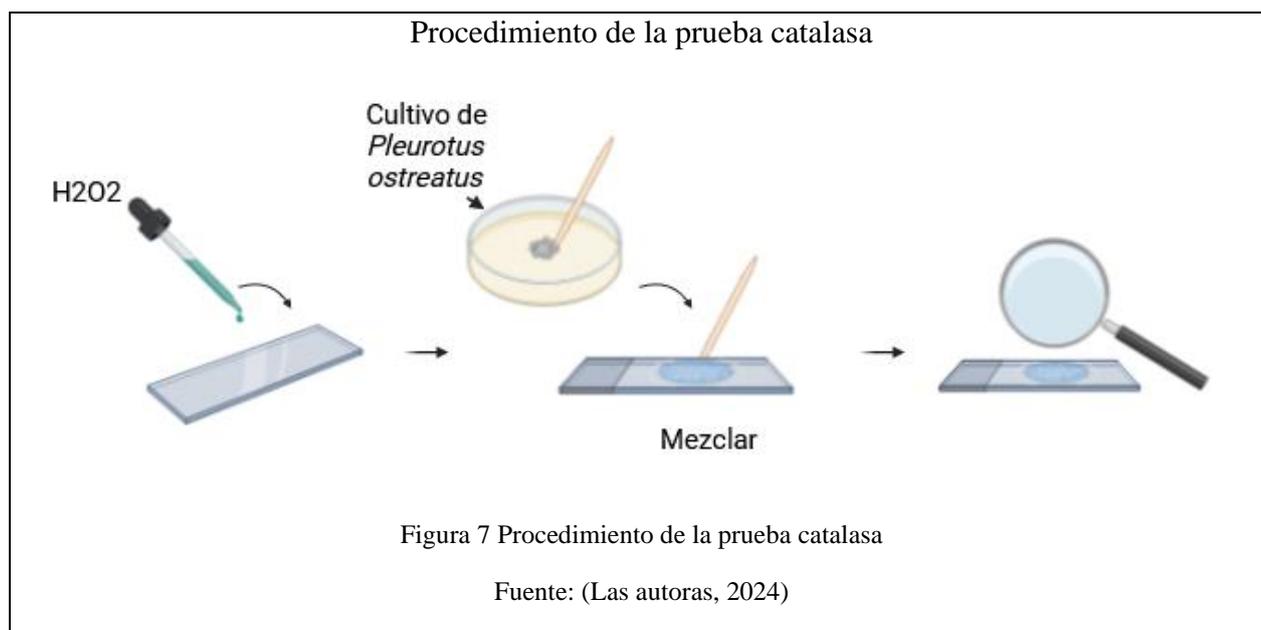
Para la obtención del analito se realizará una extracción en fase sólida para lo cual se usará una cámara de vidrio y una bomba al vacío, así como cartuchos en donde se pondrá la muestra sólida para la extracción. La metodología se observa en la Figura 6, la cual consiste en adicionar metanol 1/10 peso/volumen al medio de cultivo que permitirá la extracción del contaminante, seguido se procederá a llevarlo a un agitador mecánico el cual facilitará la separación de la parte sólida y líquida, finalmente se realizará una filtración para recuperar la fase líquida, aquella que se usará para el próximo ensayo (Lobos, 2020).



La cantidad de contaminante se evaluará usando la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) acoplada a la espectrometría de masas (MS) en el rango de 1800 en el rango de 200 a 900 nm para lo cual se extraerá 1mL de cada muestra y se someterá a ultra centrifugación de 14000 rpm por 5 min con la finalidad de eliminar residuos de hongos, se tomará el sobrenadante y se colocará en los capilares. Las condiciones para este procedimiento son que todas las muestras serán analizadas a una temperatura de 25°C con un volumen de inyección de 20 μ L, velocidad de flujo de 0,3 mL/ min además de contar con las fases móviles que contienen 0,1% de ácido fórmico en agua/acetonitrilo (50:50, v/v) (Buratti et al., 2023; Linhartová et al., 2020).

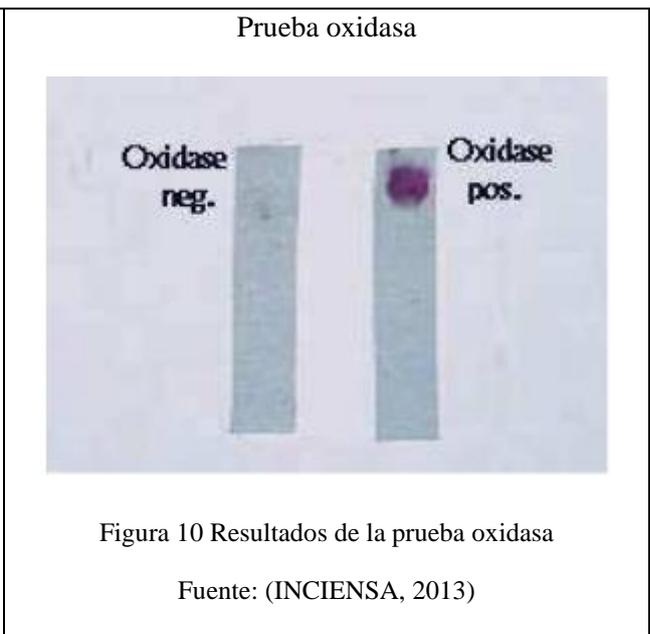
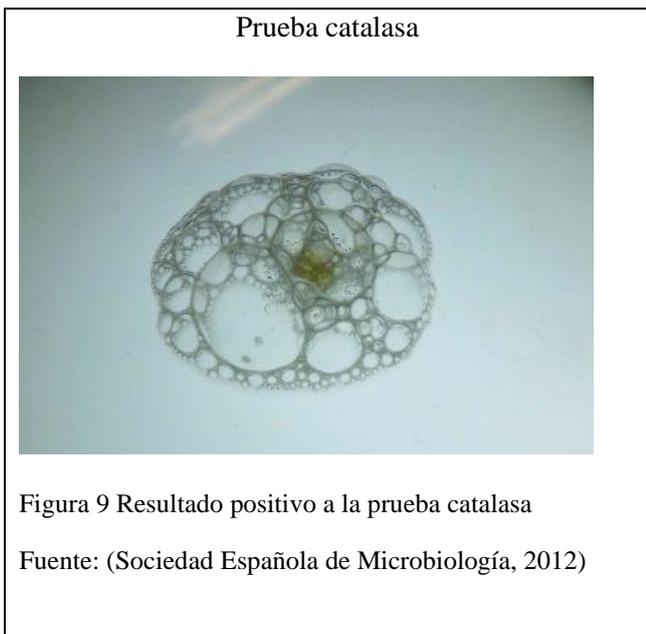
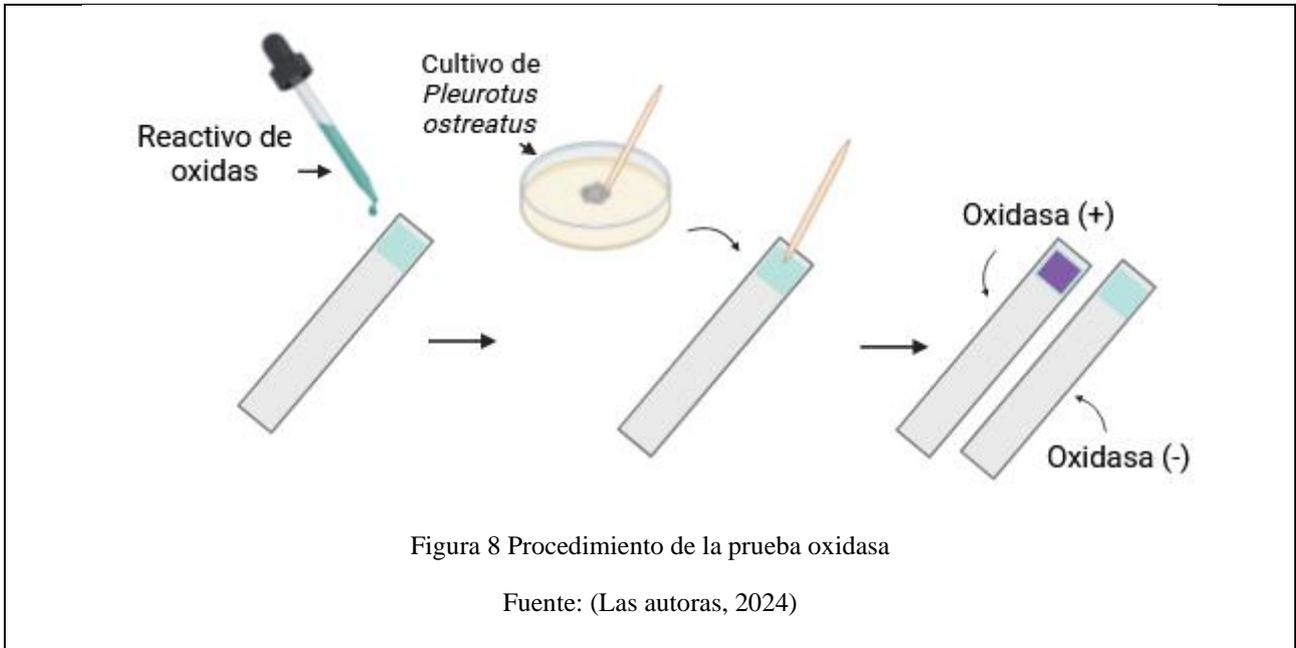
Para la evaluación de la cinética de crecimiento se usará el método anterior mencionado, en el que se usará la técnica de HPLC – MS, este ensayo se realizará a los 5, 10, 15 y 20 días después de la prueba de degradación con la finalidad de recaudar datos que permitirán a futuro formar curvas para la evaluación del crecimiento.

Para evaluar la actividad enzimática de los hongos se realizarán pruebas como oxidasa, catalasa, lacasa y peroxidasa para determinar el tipo de enzimas que participan en el proceso de biodegradación. Para la prueba de catalasa, como se observa en Figura 7, se tomarán una o dos gotas de H₂O₂ al 3% y se colocará en un portaobjetos y con un palillo estéril se tomará una pequeña muestra del hongo, se mezclará y se observarán los resultados, los cuales se observan en la Figura 9 (Corrales et al., 2022).



Para la prueba de oxidasa se seguirá el procedimiento como se muestra en la Figura 8 se verterán unas gotas de diclorhidrato de te-trametil-p-fenilendiamina (reactivo de oxidasa) en una tira de papel filtro y sobre ella se extenderá una colonia del hongo, cuyos resultados se muestran similares a la Figura 10 (Corrales et al., 2022).

Procedimiento de la prueba oxidasa

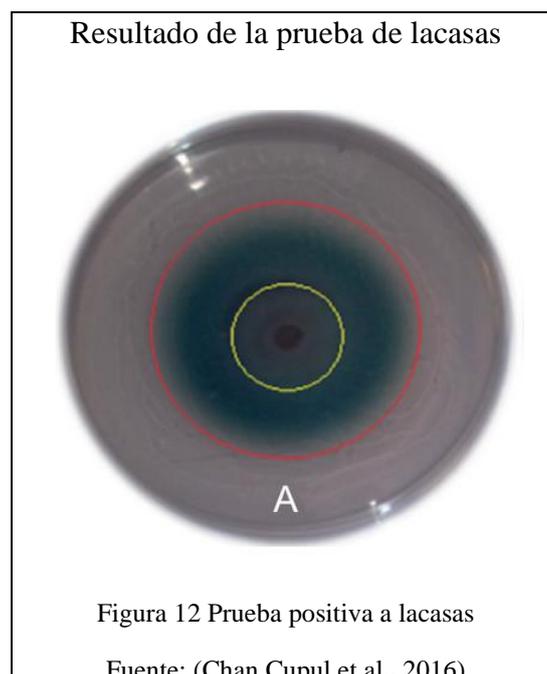
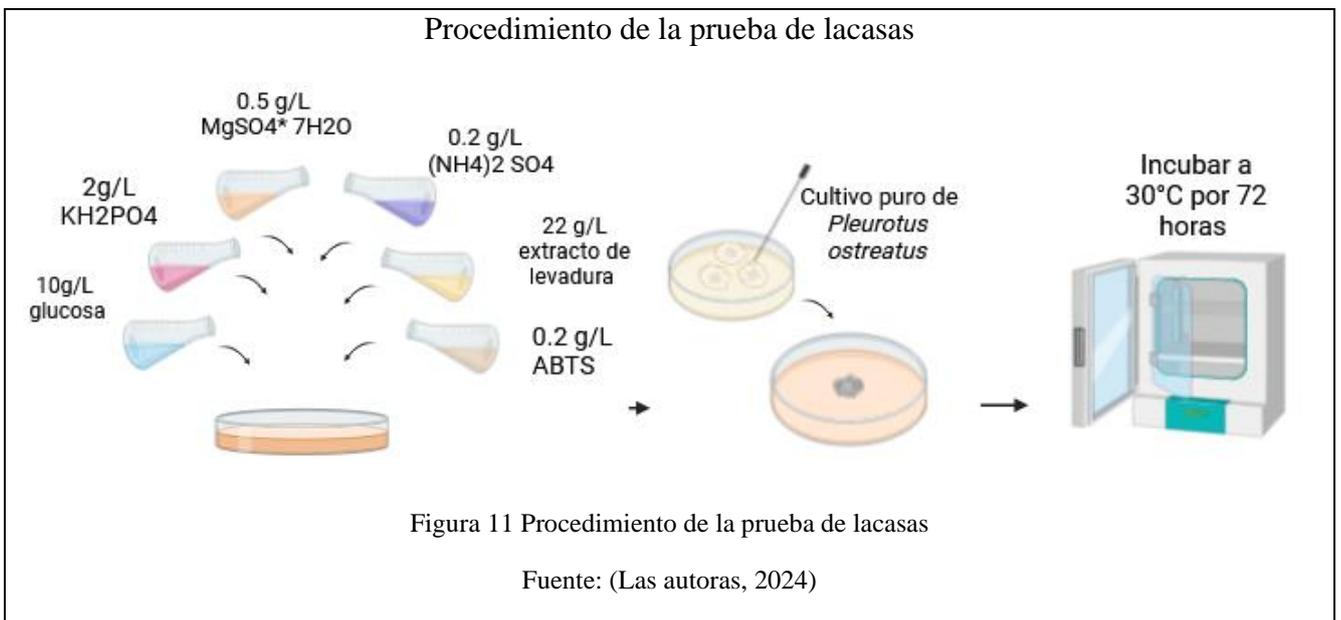


Referente a la prueba catalasa, la presencia de burbujas como resultado positivo se debe a que el hongo presenta la enzima catalasa, el cual tiene la capacidad de sintetizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso (Gómez, 2024).

Por otra parte, un resultado positivo para la prueba de oxidasa es sinónimo que el hongo tiene presente el complejo enzimático citocromo oxidasa lo que le permite al hidrogeno iniciar con la oxidación del citocromo dentro de la cadena respiratoria, por lo que al adicionar el reactivo de oxidasa en una muestra

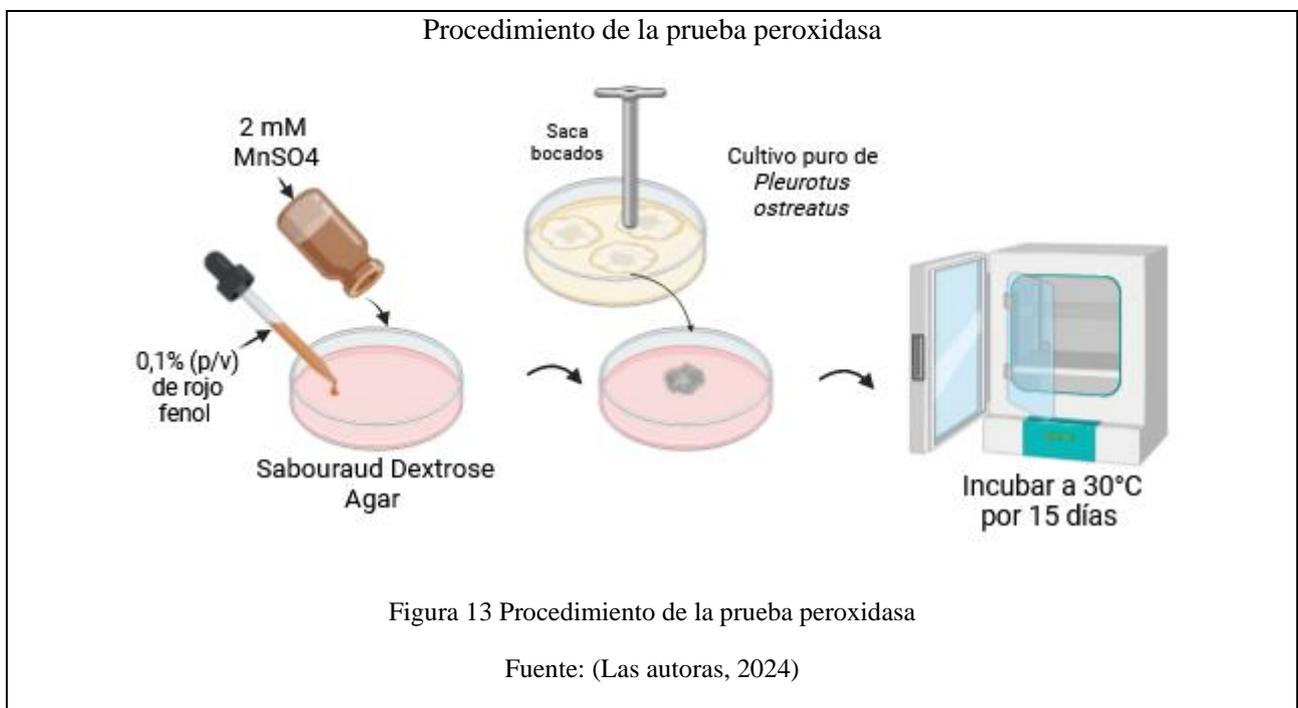
del hongo, éste activa su complejo enzimático y lo oxida, permitiendo ver un color violeta (Campos, 2023).

Para la prueba de lacasas se determinará mediante un ensayo cualitativo como lo indica en la Figura 11 en el que se usará el método de coloración (ABTS) el cual será preparado con 10g/L de glucosa, 2g/L de KH_2PO_4 , 0.5 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 22 g/L de extracto de levadura y 0.2g/L de ABTS, se sembrará el hongo en la mitad de la caja se incubará a una temperatura de 30°C durante 72 horas y se observará si existe la presencia del halo color azul verdoso como se presenta en la Figura 12 (Montoya et al., 2022)

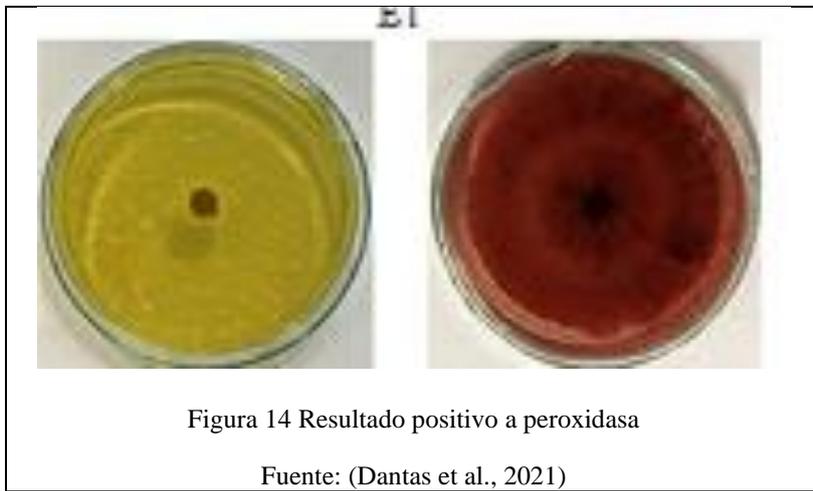


De acuerdo con (Rodríguez et al., 2021) el halo color azul verdoso se debe que el hongo cuenta con la enzima lacasa, que al entrar en reacción con el medio (ABTS), el cobre tipo I presente en esta enzima reacciona e inicia con la oxidación del medio por lo que se puede observar una decoloración. Para la determinación de peroxidadas se seguirá el protocolo descrito por (Dantas et al., 2021) el cual se representa gráficamente en la Figura 13 en donde se utiliza el medio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) en la que se adicionará 2 mM $MnSO_4$ y 0,1% (p/v) de rojo fenol para después inocular un disco de 1 cm de diámetro de colonias puras del hongo, el que será ubicado en el centro de la caja Petri. Los resultados se observan en la Figura 14 que corresponde a las condiciones de incubación de 30°C con 15 días transcurridos.

El ensayo positivo a peroxidadas se da con el cambio de color del medio, esto se debe a que el hongo al contar con enzimas peroxidadas al entrar en contacto con el sustrato $MnSO_4$, comenzará a catalizarlo. Este proceso se podrá observar gracias al indicador de rojo fenol, puesto que, cambiará de color debido a la alteración de pH causada por el proceso de catálisis (Tandjaoui et al., 2019).



Resultado positivo a peroxidasa



Para la evaluación estadística se plantea 8 tratamientos con 3 repeticiones y 1 control, teniendo un total de 27 unidades experimentales, la variable principal a evaluar será la cantidad de contaminante degradado, para ello se hará un ANOVA con un diseño experimental que consistirá en un DBCA usando el programa analítico infostat y como prueba complementaria realizar una prueba post hoc como Tukey para tener una comparación más precisa y poder determinar el tratamiento con mayor degradación (Cevallos & García, 2018)

Diseño de bloques completamente al azar (DBCA)

Tratamientos		Repeticiones		
Tratamientos	dosis	I	II	III
T0	control	T0	T5	T8
T1	0,010 ppm	T2	T4	T1
T2	0,050 ppm	T4	T0	T3
T3	0,10 ppm	T6	T1	T4
T4	0,50 ppm	T8	T2	T7
T5	1 ppm	T1	T3	T0
T6	5ppm	T3	T6	T2
T7	10 ppm	T5	T7	T6
T8	15 ppm	T7	T8	T5

Figura 15 Diseño experimental DBCA

Fuente: (Las autoras, 2024)

4.4 Indagación bibliográfica de métodos de detección de metabolitos intermedios resultado de la degradación de carbamazepina

En cuanto a la recopilación bibliográfica sobre los metabolitos intermedios que se presentan en la Tabla 3 se han dispuesto varias metodologías que se usan para su identificación, las cuales se describen a continuación:

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las técnicas usadas que separa, detecta y cuantifica sustancias complejas permitiendo la detección de metabolitos de interés farmacológico, está compuesta por una fase móvil y una fase estacionaria que con factores como: el tamaño de columna, temperatura, el tipo de gradiente y longitud de onda favorecen a la existencia de diversas interacciones químicas entre la muestra y columna obteniendo resultados rápidos, eficaces y específicos (Chawla & Chaudhary, 2019).

La cromatografía de capa fina (TLC) es una técnica que se sirve para la separación de mezclas bioquímicas usando una placa en donde los requisitos para la realización de esta son mínimos, en esta técnica se logra la separación de sustancias obteniendo un reporte óptico en el gel (Cheng & Shiea, 2023).

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) estudia la absorción de radiofrecuencia de las moléculas, los núcleos de las moléculas implicadas en el campo magnético absorben energía y llegan a un estado excitado, el espectro de RMN proporciona información de las interacciones magnéticas reflejada en picos de resonancia (Patricia & Escobar, 2017).

QSAR es una técnica computacional que se basa en la relación estructura y actividad cuantitativa establecido para el análisis de datos químicos, los modelos se desarrollan por las relaciones de los valores empíricos, lineales o no lineales a partir de la estructura molecular (Muratov et al., 2020).

Xeno Net es una metodología computacional que se encarga de predecir rutas metabólicas tomando en cuenta como entrada a un sustrato y a un producto además que permite secuenciar las vías de

metabolitos intermedios y calcular la probabilidad de aparición de estos que están presentes en sustancias tóxicas así como en fármacos, cuenta con un conjunto de datos diversos en donde presentan 17 054 redes metabólicas obtenidas de la literatura.(Flynn et al., 2020)

Tabla 3 Métodos de identificación de metabolitos intermedios

Nombre de la técnica	Ventajas	Desventajas	Referencia
Cromatografía líquida de ultra alta resolución (HPLC) con espectrometría de masas.	Referente a los resultados muestra una alta, sensibilidad, exactitud, linealidad y especificidad. Se determinó que tiene un coeficiente de correlación lineal superior a 0,99 además de tener un porcentaje de recuperación del 85-115%.	Puede resultar costosa.	(Baksam et al., 2021)
Cromatografía líquida de ultra alta resolución (HPLC)	Se describe que el método usado utiliza reactivos poco costosos y comunes que permitió la separación y cuantificación de compuestos; obteniéndose una recuperación de compuestos del 102,99% y 102,91% además de presentar una máxima	El tiempo usado para el proceso cromatográfico corresponde a 21 min lo que es considerado un tiempo extenso además de acuerdo con los resultados de las pruebas de especificidad se determinó que el número correspondiente a las impurezas del 0,3% son significativas.	(Neagu et al., 2023)

	desviación estándar relativa de 2,5%.		
Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear RMN	Proporciona información física química, electrónica y estructural de las moléculas	Las moléculas, deben de tener elementos capaces de absorber RMN	(Patricia & Escobar, 2017)
QSAR	Útil para la predicción de un modelado en función de la estructura química y también ayudaría a la optimización de condiciones de biodegradación.	La interpretación se limita a las correlaciones estadísticas entre la estructura química.	(Muratov et al., 2020)
XenoNet	Al ser una herramienta informática resulta ser un método económico que tienen una precisión del 93,6% en la determinación de las rutas metabólicas y una precisión de 51,9%	La tasa de recuperación de metabolitos intermedios corresponde al 46% resultando ser muy baja, también al ser una herramienta nueva no es 100% efectiva respecto al	(Flynn et al., 2020)

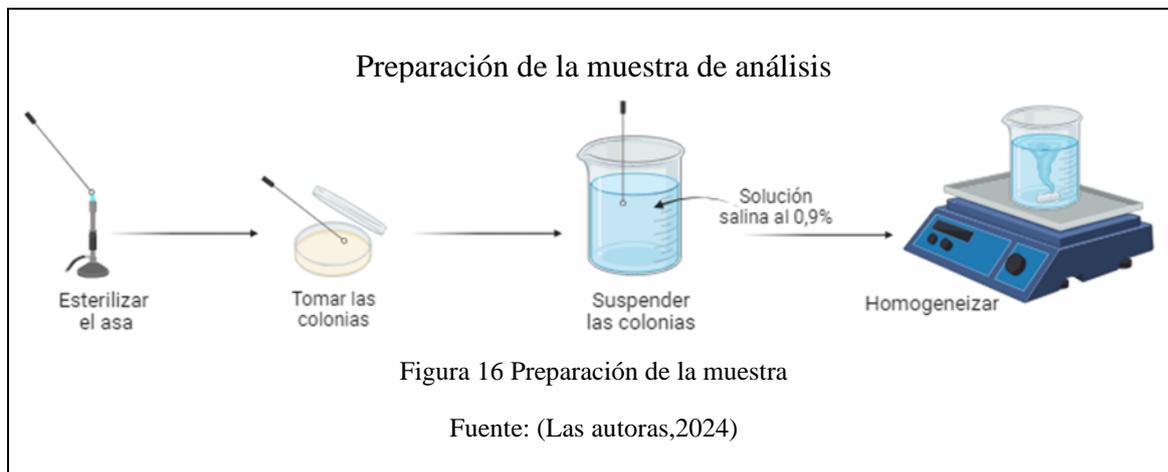
	referente a la identificación de metabolitos intermedios.	tema de los metabolitos intermedios.	
Cromatografía de capa fina (TLC)	No se requiere de procesos adicionales para la predicción de sustancias puestas a prueba además de optimizar tiempo y de obtener un resultado que se puede visualizar usando métodos ópticos sencillos.	Posee una sensibilidad limitada que al analizar muestras complejas puede resultar no beneficiosas para obtener un buen resultado también se recalca que en esta técnica no se puede realizar un análisis cuantitativo.	(Cheng & Shiea, 2023)

Elaborado por: (Las autoras., 2024)

Para determinar que método es el más adecuado para la identificación de metabolitos secundarios, se recopiló información sobre las técnicas más utilizadas, en las cuales se destacan la técnica de cromatografía líquida puesto que los resultados al final de la experimentación son cuantificables sin embargo todo el proceso es costoso, otra de las técnicas que se suelen usar de acuerdo con la recopilación de datos es la cromatografía de capa fina que si bien no se obtiene al final una respuesta cuantificable, si se puede obtener un resultados visible en donde se puede analizar la placa mediante técnicas de visualización ópticas como el uso de una lámpara UV, es por ello que la técnica más que se seleccionará es la cromatografía de capa fina (TLC).

4.4.1 Detección de metabolitos por TLC

Para la resolución de este caso, se planteó el uso de la técnica de TLC, en la cual se plantea el siguiente procedimiento a aplicar, para ello hay que preparar la muestra de análisis, se seleccionará de 4 a 5 colonias y con ayuda del asa de siembra colocar en un vaso de precipitación que contendrá solución salina al 0,9%, llevar al vortex hasta que la solución esté homogeneizada, obtener una solución de aproximadamente 1×10^8 UFC/ mL (Altamirano et al., 2020)



Para realiza la técnica de cromatografía de capa fina (TLC), preparar la cámara cromatográfica, en la cámara se añadirá la fase móvil que consta de acetato de etilo como eluyente, cerrar la cámara y dejar por 30 min para permitir la saturación de la atmósfera. En la placa de plástico de gel de sílice (F₂₅₄) medir 1 cm desde borde inferior y marcar ligeramente una línea con un lápiz, tomar un capilar de vidrio y recoger la muestra. Colocar la muestra en forma de punto en la placa y colocar en la cámara cromatográfica. Cerrar la cámara cromatográfica y dejar que el eluyente ascienda por capilaridad 10 cm de distancia desde el punto de siembra. Sacar la placa, dejar secar y revelar bajo una lámpara de luz violeta de 254nm como se observa en la Figura 17 seguido realizar la medición de recorrido de cada metabolito para calcular el R_f (Parco & Rodriguez, 2018; Silva et al., 2017).

Procedimiento de cromatografía de capa fina (TLC)

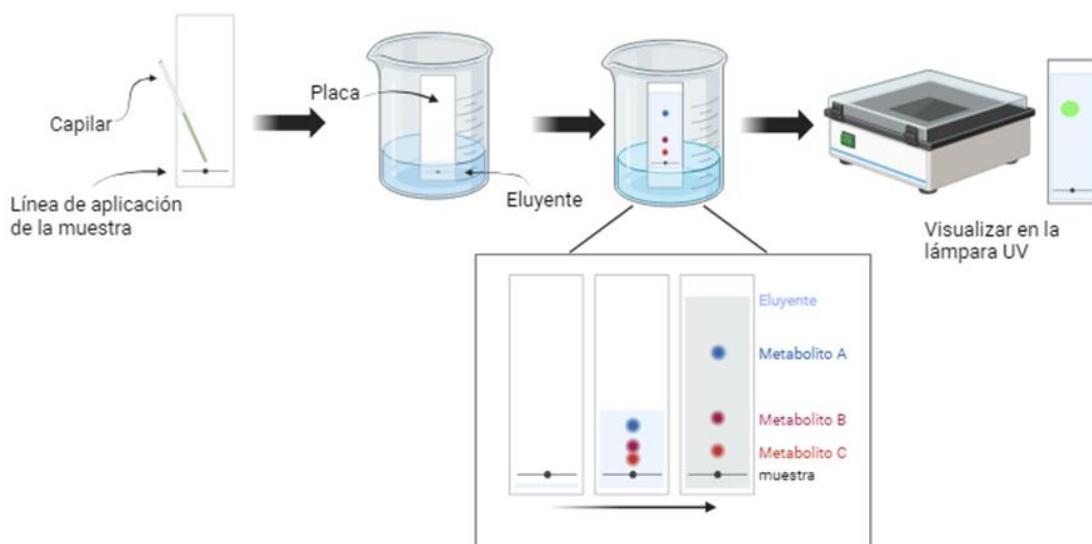


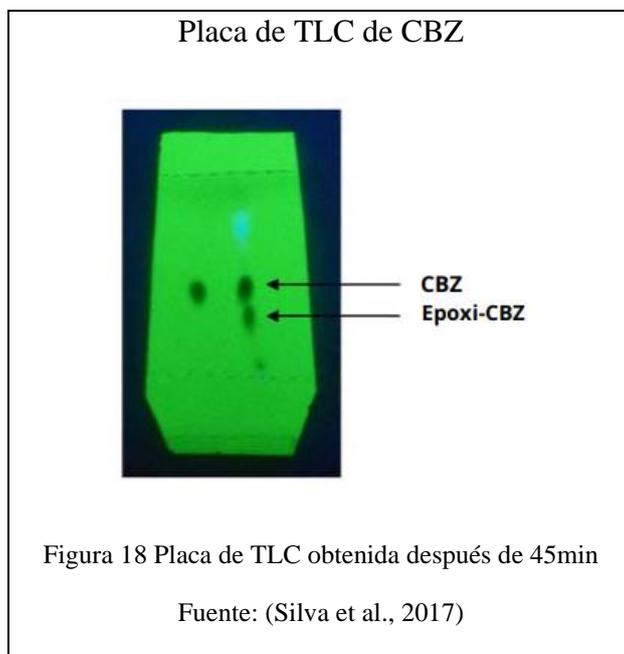
Figura 17 Procedimiento de TLC

Elaborado por: (Las autoras., 2024)

Para la caracterización e identificación se deberá calcular el factor de retención (R_f) que se define como la distancia recorrida por el compuesto de interés con respecto a la distancia total del eluyente, el R_f calculado de cada banda deberá de ser comparado con los valores estándar de compuesto de interés obtenidos comúnmente en bases de datos, para calcular el R_f se deberá aplicar la siguiente ecuación (Armenta et al., 2022).

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la muestra}}{\text{distancia recorrida por el solvente}}$$

Por ejemplo, en el artículo de Silva (2017) sintetizó 10,11-epóxido (Epoxi-CBZ) mediante la reacción de la carbamazepina (CBZ) con peróxido de hidrógeno y como resultado de la placa de TLC mostrada en la Figura 18 se observa al lado izquierdo el control de la carbamazepina ($R_f=0,25$) y el lado izquierdo la muestra con una nueva mancha correspondiente a Epóxido-CBZ que obtuvo un $R_f=0,18$. La identificación de este metabolito se realizó mediante espectroscopía de RMN que confirmó su estructura.



5 Presupuesto

A continuación, en la Tabla 4 se detalla el presupuesto el cual está dividido de acuerdo con los diferentes ensayos que se realizará para la identificación de metabolitos intermedios producidos por la degradación de Carbamazepina por hongos.

Tabla 4 Presupuesto general

PRESUPUESTO GENERAL DETALLADO			
Prueba	Detalle	Descripción	Costo
Esterilización del grano	Semillas de sorgo	1 kilogramo	\$ 12,00
	Bolsas de polipropileno	1 docena	\$ 6,00
	Cal	10 gramos	\$ 0,50
	Yeso	15 gramos	\$ 0,50
Inoculación en sustrato	Micelio de <i>P.ostreatus</i>	1 kilogramo	\$ 10,00
Aislamiento de <i>P.ostreatus</i>	Medio PDA	30 gramos	\$ 3,00
Identificación Microscópica	Lactofenol	1 unidad	\$ 20,00
Identificación molecular			
Extracción de ADN	Buffer lisis	1 unidad	\$ 44,29
	Fenolcloroformo	100 mL	\$ 8,00
	Cloroformo	100 mL	\$ 6,00
	ARNasa	1 frasco (25 miligramos)	\$ 62,26
	Etanol 70%	100 mL	\$ 3,00

	Isopropanol	100 mL	\$ 4,00
	TE	1 frasco(500mL)	\$ 61,20
Amplificación de ADN	Primer Forward ITS1 (TCCGTA GGTGAACCT)	1 unidad (450 µl)	\$ 132,00
	Primer Reverse ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)	1 unidad (450 µl)	\$ 132,00
	Master Mix Go Taq	1 unidad	\$ 59,00
	Agua libre de nucleasas	1 frasco 500 mL	\$ 29,90
	DMSO	1 frasco 250 mL	\$ 16,50
Electroforesis horizontal	Agarosa	500 gramos	\$ 31,00
	Syber safe	1 frasco (400 µL)	\$ 131,85
	Buffer TBE 1X	1 frasco (4 Litros)	\$ 78,00
	Blue Juice 2X	1 frasco (500 mL)	\$ 62,00
	ladder	1 frasco (50 µg)	\$ 86,10
Ensayo de degradación			
Prueba	Detalle	Descripción	Costo
Medio Czapek-Dox modificado	$NaNO_3$	1000 gramos	\$ 5,00
	K_2HPO_4	1 libra	\$ 14,36
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	227 gramos	\$ 39,00
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	250 gramos	\$ 45,15
	Medio PDA	500 gramos	\$ 64,40
	NaCl	500 gramos	\$ 49,98
Estándares de Carbamazepina	Carbamazepina	180 gramos	\$ 158,85
	Papel aluminio	Caja	\$ 3,50
Biomasa micelial	Papel filtro	pliego	\$ 0,75
Obtención del analito para HPLC	Metanol	4 litros	\$ 50,00
HPLC	Ácido fórmico	1 litro	\$ 47,00
	Acetonitrilo	4 litros	\$ 135,00
Pruebas enzimáticas	H_2O_2	100 mL	\$ 3,50
	Palillos	Caja	\$ 0,40
	Reactivo de oxidasa	100 mL	\$ 25,00
	Glucosa	1000 gramos	\$ 3,30
	KH_2PO_4	1000 gramos	\$ 21,90
	$(NH_4)_2SO_4$	100 gramos	\$ 27,24
	Extracto de levadura	500 gramos	\$ 24,80
	ABTS	100 mL	\$ 95,13
	Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	100 gramos	\$ 40,00
	$MnSO_4$	1,5 lb	\$ 16,99
	Rojo fenol	240 mL	\$ 17,00
Detección de metabolitos por TLC	Solución Salina 0,9%	1 frasco	\$ 1,50
	Acetato de etilo	1 litro	\$ 7,00

	Placa de plástico de gel de sílice (F ₂₅₄)	Pack de 20	\$ 52,00
	Capilar de vidrio	1 caja	\$ 5,00
		Total	\$1.952,85

Elaborado por: (Las autoras., 2024)

El presupuesto general se elaboró considerando los precios individuales ofrecidos por las empresas, además tener en cuenta que algunas de ellas ofrecen la posibilidad de adquirir cantidades específicas según necesidades individuales, dicho eso se tiene un total de 1952,85.

Además, que en el presupuesto general no se tomó en cuenta la infraestructura y ciertos materiales porque se lo realizaría en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana, sin embargo, en la Tabla 5 se detalla el costo por ensayo de los equipos que se usarían dentro de los laboratorios calculado por el tiempo de uso de cada uno.

Tabla 5 Costo de equipos de laboratorio

Equipo	Costo/hora
Incubadora	\$1,89
Autoclave	\$2,33
Cámara de flujo laminar	\$2,20
Plancha de calentamiento con agitación	\$1,89
Equipo de filtración al vacío	\$1,99
Equipos HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia)	\$31,01
Aplicador TLC	\$2,71
Termociclador PCR Convencional	\$6,00
Cámara de electroforesis horizontal	\$2,07
Microondas	\$2,05
Secuenciador	\$30,49
Total	\$84,63

Fuente: (Base de datos laboratorios CIVABI, 2024)

Finalmente, de acuerdo con la Tabla 6 para el presupuesto total se tomó en cuenta tanto el presupuesto general de reactivos que se usarán para el desarrollo de todos los ensayos, así como el costo de los equipos del laboratorio obteniendo un total de \$ 2037,48.

Tabla 6 Presupuesto total

Detalle	Costo
Presupuesto general	\$ 1952,85
Costo de equipos	\$ 84,63
Total	\$ 2037,48

Elaborado por: (Las autoras., 2024)

6 Conclusiones y recomendaciones

La contaminación de los recursos hídricos en el Ecuador se ha visto afectados por la presencia de productos farmacéuticos, el inadecuado desecho de medicamentos caducados, el vertimiento de residuos y actividades antropogénicas han generado efectos negativos en el medio acuático afectando directamente al ser humano, la carbamazepina es uno de los medicamentos que se ha detectado en diferentes ríos del país y en concentraciones variables de 0,125 a 830 ug/L.

La CBZ resulta ser persistente y tiene gran capacidad de bioacumulación por lo que hace su degradación compleja y costosa, además investigaciones han revelado la presencia de metabolitos secundarios producidos por la degradación, que incluso pueden llegar a ser más tóxicos que el compuesto original, los metabolitos más conocidos son 10,11-epoxi carbamazepina y 10,11-dihidroxi carbamazepina ante esto viene la necesidad de alternativas viables que garanticen una mayor degradación por eso se hace uso de la biorremediación.

A través de la revisión bibliográfica se identificaron varios hongos con capacidad degradadora de CBZ, sin embargo para plantear la resolución del caso, se seleccionó *Pleurotus ostreatus* por su capacidad de degradación del 99% a concentraciones del contaminante de 0.025 ppm a 10 ppm, siendo su principal mecanismo de acción la producción de enzimas bioactivas como lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa que facilitan la biotransformación y degradación de metabolitos.

La falta de datos estándar sobre las concentraciones impide una comparación precisa sobre la toxicidad de CBZ, sin embargo, varios de los metabolitos han demostrado alta toxicidad provocando riesgos al organismo en el que se encuentran.

El uso de cromatografía de capa fina (TLC) para la detección de metabolitos limita mucho la identificación y la caracterización por falta del factor de retención (Rf) estándar de los metabolitos que se supone que se encuentran, sin embargo, se recomienda usar técnicas complementarias como Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Cromatografía líquida de ultra alta resolución (HPLC).

7 Bibliografía

- Aguila, J. (2016). Desarrollo y validación del método analítico cuantitativo de carbamazepina y de su metabolito 10,11-epoxicarbamazepina en plasma. In 2016. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Aguilar, L., Zárate, P. B., Villanueva, R., Yáñez, J., Garín, M. E., Guadarrama, P. C., & Valencia del Toro, G. (2018). Use of ITS and ISSR markers in the molecular characterisation of *Pleurotus djamor* hybrid strains. *Revista Iberoamericana de Micología*, 35(1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.06.003>
- Aguilera, A., Higuera, J., & Univio, E. (2021). Hongos fitopatógenos en ambientes terrestres y acuáticos presentes en latinoamérica. *ANALES RANF*, 87, 371–380. <https://orcid.org/0000-0003-2892-6916>
- Akao, P. K., Kaplan, A., Avisar, D., Dhir, A., Avni, A., & Mamane, H. (2022). Removal of carbamazepine, venlafaxine and iohexol from wastewater effluent using coupled microalgal–bacterial biofilm. *Chemosphere*, 308, 136399. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.136399>
- Alharbi, S. K., Nghiem, L. D., van de Merwe, J. P., Leusch, F. D. L., Asif, M. B., Hai, F. I., & Price, W. E. (2019). Degradation of diclofenac, trimethoprim, carbamazepine, and sulfamethoxazole by laccase from *Trametes versicolor*: Transformation products and toxicity of treated effluent. *Biocatalysis and Biotransformation*, 37(6), 399–408. <https://doi.org/10.1080/10242422.2019.1580268>
- Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V. I., Schneider, R. J., Soares, A. M. V. M., Figueira, E., & Freitas, R. (2014). Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems: Effects on bivalves. *Aquatic Toxicology*, 156, 74–87. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2014.08.002>
- Almeida, Â., Soares, A., Esteves, V., & Freitas, R. (2021). Occurrence of the antiepileptic carbamazepine in water and bivalves from marine environments: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 86, 103661. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2021.103661>
- Altamirano, L., Quispillo, M., Ubon, I., & Viteri, J. (2020). Identificación de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Callistemon speciosus* (escobillón rojo). *AVFT*, 39(2). <https://doi.org/10.5281/zenodo.4068500>
- Angulo, F. M., Mamani, B., & Nova, M. (2022a). Crecimiento in vitro de hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) en diferentes medios de cultivo. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 9(1), 14–22. <https://doi.org/10.53287/yspr1253nr82s>
- Angulo, F. M., Mamani, B., & Nova, M. (2022b). Crecimiento in vitro de hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) en diferentes medios de cultivo. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 9(1), 14–22. <https://doi.org/10.53287/yspr1253nr82s>
- Armenta, J. A., Extocapan, J., Ávila, M., Juárez, L., García, Y. M., & Espinoza, F. J. (2022). *Fraccionamiento y elucidación de compuestos bioactivos de Reseda luteola por CC y TLC*. <http://remcid.utgz.edu.mx>
- Bai, X., Chen, W., Wang, B., Sun, T., Wu, B., & Wang, Y. (2022). Photocatalytic Degradation of Some Typical Antibiotics: Recent Advances and Future Outlooks. *International Journal of Molecular Sciences 2022*, Vol. 23, Page 8130, 23(15), 8130. <https://doi.org/10.3390/IJMS23158130>
- Baksam, V. K., Saritha, N., Mohan, S. K., Shandilya, S., & Kumar, P. (2021). Identification and characterization of Prothionamide degradation impurities by mass spectrometry, NMR spectroscopy, and ultra high performance liquid chromatography method development. *Journal of Separation Science*, 44(10), 2078–2088. <https://doi.org/10.1002/JSSC.202100050>
- Baquero, E. (2022). *Efecto de la carbamazepina y el diclofenaco sobre el comportamiento de un reactor anaerobio de lecho granular expandido (EGSB) y un reactor secuenciado por lotes (SBR)* [Universidad

de Antioquia].

https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/25897/1/BaqueroEva_2022_CarbamazepinaDiclofenacoReactor.pdf

- Buratti, S., Rinaldi, F., Calleri, E., Bernardi, M., Oliva, D., Malgaretti, M., De Girolamo, G., Barucco, B., Girometta, C. E., & Savino, E. (2023). Ganoderma resinaceum and Perenniporia fraxinea: Two Promising Wood Decay Fungi for Pharmaceutical Degradation. *Journal of Fungi* 2023, Vol. 9, Page 555, 9(5), 555. <https://doi.org/10.3390/JOF9050555>
- Calero, J., & Delgado, B. (2022). *Evaluación de la red de riego de cultivos en la hacienda florenia ubicada en el recinto pijio, cantón paján de la provincia de manabí* [Universidad de Guayaquil]. <https://repositorio.ug.edu.ec/server/api/core/bitstreams/74abb279-beaa-44a5-936f-c84764b86905/content>
- Campos, E. (2023). *Rediseño e implementación de un programa de monitoreo ambiental en la UEB citostáticos* [Universidad de La Habana]. [https://fototeca.uh.cu/files/original/2163077/Campos_Fagundo_Elizabeth_\[2023\].pdf](https://fototeca.uh.cu/files/original/2163077/Campos_Fagundo_Elizabeth_[2023].pdf)
- Cartagena, C. J. (2011). Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos. *Revista Lasallista de Investigación*, 8(2), 143–153.
- Cevallos, T., & García, J. (2018). *Evaluación de la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando Aspergillus niger, Pleurotus ostreatus y Pseudomonas aeruginosa*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Chan Cupul, W., Heredia Abarca, G. P., Rodríguez Vázquez, R., Chan Cupul, W., Heredia Abarca, G. P., & Rodríguez Vázquez, R. (2016). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 32(3), 339–351. <https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.03.08>
- Chawla, G., & Chaudhary, K. (2019). A review of HPLC technique covering its pharmaceutical, environmental, forensic, clinical and other applications. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis* 2019, Vol. 6, Pages 27-39, 6(2), 27–39. <https://doi.org/10.18231/J.IJPCA.2019.006>
- Checa Artos, M., Sosa del Castillo, D., Ruiz Barzola, O., & Barcos Arias, M. (2021). Presence of pharmaceutical products in water and its impact on the environment. *Bionatura*, 6(1), 1618–1627. <https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.27>
- Cheng, S., & Shiea, J. (2023). Advanced spectroscopic detectors for identification and quantification: mass spectrometry. *Instrumental Thin-Layer Chromatography, Second Edition*, 181–211. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99970-0.00010-7>
- Concha, L., & Hernández, S. (2023). *Evaluación del sinergismo entre especies bacterianas y fúngicas, con capacidades metabólicas específicas en el consumo del contaminante emergente carbamazepina*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/25357>
- Corrales, L. C., Caycedo, L., & Quijano, S. (2022). Catalisis, enzimas y pruebas rápidas. *Nova*, 20(39), 121–150. <https://doi.org/10.22490/24629448.6591>
- Cota, K., Nuñez, J. A., Delgado, M., & Martínez, A. (2019). Biorremediación: Actualidad de conceptos y aplicaciones. *Biocencia*, 21(1), 37–44. <http://biocencia.unison.mx>
- CPNP. (2016). *Hoja informativa del medicamento :Carbamazepina*. SMIadviser. https://smiadviser.org/wp-content/uploads/2020/02/ESP_tegretol.pdf

- Dantas, C. P., Pinchemel, J. P. D., DE JESUS, G. M., Pimentel, M. B., Oliveira, O. M. C., Queiroz, A. F. S., & Lima, D. F. (2021). Bioprospection of ligninolytic enzymes from marine origin filamentous fungi. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 93, e20210296. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120210296>
- Darabi, K., Azhdarpoor, A., & Dehghani, M. (2024). Evaluation of carbamazepine removal from aqueous medium using a combined method of ozonation and calcium alginate immobilized *Aspergillus niger*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(3), 3513–3522. <https://doi.org/10.1007/S13399-022-02539-5/METRICS>
- Donaires, T., Quille, G., Turpo, J., & Zapana, Y. (2022). *Contaminantes emergentes en aguas residuales de la Laguna de Espinar Puno, 2022*. <https://vriunap.pe/fedu/upload/2022/p00000502-3-Proy.pdf>
- El-Ramady, H., Abdalla, N., Fawzy, Z., Badgar, K., Llanaj, X., Törőš, G., Hajdú, P., Eid, Y., & Prokisch, J. (2022). Green Biotechnology of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus* L.): A Sustainable Strategy for Myco-Remediation and Bio-Fermentation. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 14, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/su14063667>
- Emily, V., Rui, W. R., Hara, Y., Adnan, A. M., Hock, O. G., & Kee, W. K. (2022). Fungal and bacterial species in degrading carbamazepine: a metabolite perspective: Mini-review. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 10(5), 922–931. [https://doi.org/10.18006/2022.10\(5\).922.931](https://doi.org/10.18006/2022.10(5).922.931)
- Flynn, N. R., Dang, N. Le, Ward, M. D., & Swamidass, S. J. (2020). XenoNet: Inference and Likelihood of Intermediate Metabolite Formation. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(7), 3431–3449. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.0C00361/SUPPL_FILE/CI0C00361_SI_001.ZIP
- García, A. (2020). *Evaluación de la concentración de contaminantes emergentes en el río Tahuando, en Ibarra - Ecuador [ESPE]*. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/22376/1/T-ESPE-043719.pdf>
- Gómez, K. (2024). *Desarrollo de actividades de mantenimiento de siete cepas de referencia utilizadas en el Laboratorio de Alimentos y Toxicología del Instituto Nacional de Salud*. <https://ri.ues.edu.sv>
- González, L., Flores, R., Díaz, L., Galván, V., Meléndez, J., & Vargas, K. (2023). Polímeros de impresión molecular (MIPs) y su utilidad en procesos de extracción y coadyuvante en la degradación mediante el proceso de O₃/UV de 4-nonilfenol (4-NF) y bisfenol A (BPA). | Revista de Salud Ambiental. *Revista de Salud Ambiental*, 23(1). <https://www.ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/1167>
- Gutiérrez, A., Jiménez, T., Tapia, A., & Romero, O. (2022). Degradación de diésel por sustrato residual de *Agaricus bisporus* a nivel microcosmos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(2), 223–234. <https://doi.org/10.29312/REMEXCA.V13I2.2656>
- Hernández, R. (2020a). *Degradación fotocatalítica de fármacos de un efluente hospitalario: identificación de los intermediarios y subproductos de reacción*.
- Hernández, R. (2020b). *Degradación fotocatalítica de fármacos de un efluente hospitalario: identificación de los intermediarios y subproductos de reacción*. <http://eprints.uanl.mx/21463/>
- Imbaquingo, C., & Oña, E. (2019). *Biorremediación de agua contaminada con arsénico proveniente de la parroquia Toacaso, mediante el uso de Pleurotus ostreatus, Trichoderma harzianum y Pseudomonas aeruginosa*. Universidad Politécnica Salesiana.
- INCIENSA. (2013, August). *Recomendaciones generales para la vigilancia de laboratorio del cólera en las diarreas*. https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/Manuales/Recomendaciones%20generales%20para%20la%20vigilancia%20de%20laboratorio%20del%20colera%20en%20las%20diarreas.pdf

- Isaichkin, V. A., Александрович, И. В., Selezneva, E. S., Сергеевна, С. Е., Korchikov, E. S., & Сергеевич, К. Е. (2021). Resistance of *Aspergillus niger* Tiegh. to the effect of amide anesthetics. *Samara Journal of Science*, 10(1), 86–91. <https://doi.org/10.17816/snv2021101112>
- Jimenez, M. (2018). *Remoción de carbamazepina mediante filtros empacados con sustratos organicos y Pleurotus ostreatus (HE MIM-50)* [Universidad Politécnica del Estado de Morelos]. <https://www.upemor.edu.mx/posgrados/documentos/tesis/T.3043-Jim%C3%A9nez-Luna-Mar%C3%ADa-Isabel.pdf>
- Jiménez, M. (2018). *Remoción de carbamazepina mediante filtros empacados con sustratos orgánicos y Pleurotus ostreatus (Hemim-50)*. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
- Kandhasamy, S., Balraj, S., Kanagaraj, S., & Sundaravadivelu, S. (2022). *Microbial degradation of pharmaceuticals*. <https://doi.org/10.20944/PREPRINTS202206.0014.V1>
- Kasonga, T. K., Coetzee, M. A. A., Kamika, I., & Momba, M. N. B. (2021). Assessing the Fungal Simultaneous Removal Efficiency of Carbamazepine, Diclofenac and Ibuprofen in Aquatic Environment. *Frontiers in Microbiology*, 12, 755972. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.755972/BIBTEX>
- Kasonga, T. K., Coetzee, M. A. A., Kamika, I., & Momba, M. N. B. (2022). Assessing a co-culture fungal granule ability to remove pharmaceuticals in a sequencing batch reactor. *Environmental Technology*, 43(11), 1684–1699. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1847204>
- Khan, M. F., & Murphy, C. D. (2021). Bacterial degradation of the anti-depressant drug fluoxetine produces trifluoroacetic acid and fluoride ion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(24). <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11675-3>
- Kumar, K. (2020). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Bacteria. *Applied Microbiology: Open Access*, 6(3), 1–3. <https://www.longdom.org/abstract/degradation-of-polycyclic-aromatic-hydrocarbons-by-bacteria-58890.html>
- Levakov, I., Shahar, Y., & Rytwo, G. (2022). Carbamazepine Removal by Clay-Based Materials Using Adsorption and Photodegradation. *Water (Switzerland)*, 14(13), 2047. <https://doi.org/10.3390/W14132047/S1>
- Linhartová, L., Michalíková, K., Šrédlová, K., & Cajthaml, T. (2020). Biodegradability of Dental Care Antimicrobial Agents Chlorhexidine and Octenidine by Lignolytic Fungi. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 400, 25(2), 400. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25020400>
- Lobos, C. (2020). *Biotransformación y/o degradación de diclofenaco por hongos con actividad lignolítica*. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/6602>
- Lozano, G. (2004). *Generación de desechos contaminantes en la familia y su diferenciación por estrato socioeconómico* [Universidad autónoma de Baja California]. <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/server/api/core/bitstreams/2a47f28b-bcb6-4935-9df0-e668e6a10116/content>
- Maldonado, L. (2017). *Evaluación de la biodegradación de un insecticida organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa mediante Trichoderma harzianum y Pleurotus ostreatus*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Montoya, S., Restrepo, G., & Calvo, C. (2022). Actividades ligninolíticas y producción de basidiomas de *Ganoderma lucidum* en cultivo sólido suplementado con manganeso. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 24(2), 46–58. <https://doi.org/10.15446/REV.COLOMB.BIOTE.V24N2.95288>

- Morales, J. P., & Loor, K. (2023). Diseño de biofiltro para eliminación de contaminantes de aguas residuales de la comunidad Ballagán, Ecuador. *REVISTA CIENTÍFICA ECOCIENCIA*, 10(2), 92–106. <https://doi.org/10.21855/ecociencia.102.801>
- Muratov, E. N., Bajorath, J., Sheridan, R. P., Tetko, I. V., Filimonov, D., Poroikov, V., Oprea, T. I., Baskin, I. I., Varnek, A., Roitberg, A., Isayev, O., Curtalolo, S., Fourches, D., Cohen, Y., Aspuru-Guzik, A., Winkler, D. A., Agrafiotis, D., Cherkasov, A., & Tropsha, A. (2020). QSAR without borders. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 49, Issue 11, pp. 3525–3564). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0cs00098a>
- Nasir, N. M., Talib, S. A., Hashim, S. N., Tay, C. C., & Fundam Appl Sci, al J. (2017). Biodegradation of carbamazepine using fungi and bacteria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 9(6S), 124–146. <https://doi.org/10.4314/JFAS.V9I6S.12>
- Neagu, M., Rusu, V. C., Cadlet, I., & Chirita, A. M. (2023). HPLC method for simultaneous identification and quantification of Enrofloxacin, Bromhexine*HCl and their related substances / degradation products, in veterinary pharmaceutical product, Bromflovot. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-2542918/V1>
- Pacheco, A. (2021). *Determinación de contaminantes emergentes carbamazepina y diclofenaco en el Río San Pedro y análisis de tratamiento con nanotecnología*. <https://repositorio.espe.edu.ec/jspui/bitstream/21000/24123/1/T-ESPE-044397.pdf>
- Parco, G., & Rodriguez, J. (2018). *Determinación de falsos positivos identificación de benzodiazepinas en muestras biológicas mediante cromatografía en capa fina*. Universidad Peruana Los Andes.
- Patricia, L., & Escobar, B. (2017). *Influencia de tres métodos de conservación sobre la estabilidad y producción del hongo Pleurotus ostreatus*.
- Perez, B. (2006). *Descripción de las características macroscópicas, de cultivo in vitro de cepas de Pleurotus aisladas en Guatemala*. Universidad de San Carlos Guatemala.
- Prado, D. (2021). *Determinación de contaminantes emergentes en aguas superficiales de la provincia de Esmeraldas*.
- Quevedo, K., & Quinde, J. (2023). *Comparación de las propiedades mecánicas de probetas elaboradas a partir de micelio de los hongos Ganoderma Lucidum y Pleurotus ostreatus en un sustrato de rastrojo de maíz*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Ramón, X. (2020). Comportamiento de bacterias y hongos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados. *Repositorio Institucional – UCS*. <https://repositorio.cientifica.edu.pe/handle/20.500.12805/1501>
- Rodríguez, J., Pliego, J., Reyes, L., Sánchez, D., Íñiguez, L., & Córtez, C. (2021). Evaluación de pruebas bioquímicas para determinar actividad lacasa en hongos utilizados en biorremediación de suelos. *E-Gnosis*, 4.
- Rouibah, I., Hassen, W., Sallem, O. F., Khellaf, N., Hassen, A., & Mansour, H. Ben. (2021). Photocatalytic and biodegradation treatments of paracetamol: investigation of the in vivo toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(12), 14530–14545. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-11615-0/METRICS>
- Rugolo, M., Kuhar, F., Pildain, M. B., Lechner, B. E., & Rajchenberg, M. (2019). Molecular identification of Pleurotus ostreatus strains from Patagonia and their ability to retain laccase activity at low temperature. *Scientia Fungorum*, 49, e1202. <https://doi.org/10.33885/sf.2019.49.1202>
- Sanchez, J. (2022, November 3). *Capacidad de hongos para remover fármacos presentes en aguas para riego en la sabana occidental de Bogotá (Colombia)*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/82659?show=full>

- Schapira, M., Manor, O., Golan, N., Kalo, D., Mordehay, V., Kirshenbaum, N., Goldsmith, R., Chefetz, B., & Paltiel, O. (2020). Involuntary human exposure to carbamazepine: A cross-sectional study of correlates across the lifespan and dietary spectrum. *Environment International*, *143*, 105951. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.105951>
- Silva, A., Tomé, A., Pinto, D., Domingues, F., Rocha, G., Cavaleiro, J., Neves, M. da G., Faustino, M. do A., & Simoes, M. (2017). Catalytic epoxidation of carbamazepine. In C. AM, R. Nuño, D. Pereira, A. Trindade, J. Coelho, & R. Franzén (Eds.), *Comprehensive Organic Chemistry Experiments for the Laboratory Classroom* (pp. 762–765).
- Sociedad Española de Microbiología. (2012, March 29). *Prueba de la catalasa*. <https://www.semimicrobiologia.org/imagen-banco/prueba-de-la-catalasa>
- Solis, Y. (2013). *Remoción del compuesto emergente carbamazepina mediante Fotocatálisis Heterogénea con TiO2* [UNAM]. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/100526>
- Tam, J., Lorsbach, T., Schmidt, S., & Wicker, J. (2021). Holistic evaluation of biodegradation pathway prediction: assessing multi-step reactions and intermediate products. *Journal of Cheminformatics*, *13*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13321-021-00543-X/TABLES/7>
- Tandjaoui, N., Abouseoud, M., Couvert, A., Amrane, A., & Tassist, A. (2019). A combination of absorption and enzymatic biodegradation: phenol elimination from aqueous and organic phase. *Environmental Technology*, *40*(5), 625–632. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1400110>
- Valerie, E., Wong, R. R., Yuka, H., Adura, M. A., Hock, O. G., & Wong, K. K. (2022). Fungal and bacterial species in degrading carbamazepine: a metabolite perspective: Mini-review. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, *10*(5), 922–931. [https://doi.org/10.18006/2022.10\(5\).922.931](https://doi.org/10.18006/2022.10(5).922.931)
- Voloshenko-Rossin, A., Gasser, G., Cohen, K., Gun, J., Cumbal-Flores, L., Parra-Morales, W., Sarabia, F., Ojeda, F., & Lev, O. (2015). Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro–Guayllabamba–Esmeraldas rivers. *Environmental Science: Processes & Impacts*, *17*(1), 41–53. <https://doi.org/10.1039/C4EM00394B>
- Zind, H., Mondamert, L., Blancart, Q. B., Cleon, A., Karpel vel Leitner, N., & Labanowski, J. (2021). Occurrence of carbamazepine, diclofenac, and their related metabolites and transformation products in a French aquatic environment and preliminary risk assessment. *Water Research*, *196*, 117052. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2021.117052>
- Zvinowanda, C., Ncube, P., & Ntuli, F. (2023). Photocatalytic degradation of Emtricitabine, Lamivudine, and Tenofovir in water using the UV/TiO₂/H₂O₂ hybrid system. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-2787116/V1>