



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEGRADACIÓN DEL CONTAMINANTE EMERGENTE
CIPROFLOXACINO MEDIANTE LA ENZIMA
CLOROPEROXIDASA DEL HONGO *Leptoxyphium
fumago***

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

BLANCA ERÉNDIRA RAMÍREZ ANGUIANO

DIRECTOR:

DR. EDUARDO TORRES RAMÍREZ

CODIRECTOR:

M.C. JOSÉ LUIS GARCÍA ZAMORA

FEBRERO 2025



Agradecimientos

Nada en esta vida me ha hecho crecer tanto como persona como lo hizo este trabajo de investigación, y por eso, quiero expresar mi eterna gratitud a todas las personas que hicieron esto posible.

A mamá, por su amor, porque sin él yo no sería quien soy ahora.

A mis hermanos, por ser los mejores amigos que alguien podría desear.

A Kalel y Sunny, por recordarme lo sencilla que es la vida.

A mis angelitos, por crecer conmigo.

A mi familia, porque la vida puede ser dura, pero siempre hay alguien que te quiere.

A mis mentores, el Dr. Eduardo Torres Ramírez y el Dr. José Luis García Zamora, por convertirme en biotecnóloga, por enseñarme el camino de la ciencia y tomar mi mano durante estos primeros pasos.

A mis amigos, por ser las personas tan extraordinarias que son.

A Galita, porque las almas gemelas también pueden ser amigas.

A mi amor, por recordarme que tengo la capacidad de creer.

A Dios, por todo.

Dedicatoria

"Todo es posible para el que cree."

Marcos 9:23

A mamá, porque ella hace los sueños realidad.

Índice general

Resumen	7		
Introducción	8		
Capítulo 1. Antecedentes y estado del arte	10		
1.1. Contaminantes emergentes	10		
1.2. Antibióticos	11		
1.2.1. Panorama ambiental	12		
1.2.1.1. Resistencia antimicrobiana	13		
1.2.2. Los antibióticos en México	14		
1.3. Quinolonas	15		
1.3.1. Ciprofloxacino	16		
1.4. Alternativas de remoción de ciprofloxacino	20		
1.4.1. Biocatálisis	21		
1.4.1.1. Biocatálisis enzimática	22		
1.4.1.2. Cloroperoxidasa	23		
Hipótesis	26		
Objetivo general	26		
Objetivos particulares	26		
Capítulo 2. Metodología	27		
2.1. Diagrama de trabajo	27		
2.2. Reactivos	27		
2.3. Instrumentos	28		
2.4. Preparación de soluciones de trabajo	28		
2.5. Obtención de espectros UV-vis y de emisión de fluorescencia	29		
2.5.1. Curva de calibración	29		
2.5.2. Degradación enzimática de CPX por CPO	29		
2.5.2.1. Determinación del efecto del pH y la temperatura sobre la reacción de degradación enzimática	30		
2.5.2.2. Determinación de parámetros cinéticos para el sistema biocatalítico	30		
2.6. Extracción de productos de reacción enzimática por SPE	30		
2.7. Pruebas de toxicidad	31		
2.8. Biodegradabilidad	31		
2.9. Evaluación de la actividad antimicrobiana	32		
Capítulo 3. Resultados y discusión	34		
3.1. Comparación de los espectros de absorción electrónica y de fluorescencia	34		
3.2. Curva de calibración para CPX	35		
3.3. Evaluación del efecto del pH y la temperatura sobre la degradación de CPX por CPO	36		
3.4. Degradación enzimática de CPX por CPO	39		
3.5. Determinación de parámetros cinéticos para la degradación de CPX por CPO	43		
3.6. Extracción de productos de reacción enzimática por SPE	45		
3.7. Pruebas de toxicidad para el CPX y el CPX transformado por biocatálisis	47		
3.8. Determinación de la biodegradabilidad para CPX y CPX transformado por biocatálisis	49		
3.9. Evaluación de la sensibilidad microbiana del CPX y CPX transformado por biocatálisis	50		
Conclusiones	52		
Bibliografía	53		

Índice de tablas

Tabla 1.1. <i>Propiedades químicas del ciprofloxacino. (Azanu et al., 2018; García, 2023; O'Neill et al., 2006)</i>	17	Tabla 2.1. <i>Lista de reactivos</i>	28
Tabla 1.2. <i>Presencia de ciprofloxacino en aguas residuales.</i>	17	Tabla 2.2. <i>Condiciones de detección de CPX por espectrofotometría de fluorescencia.</i>	29
Tabla 1.3. <i>Presencia de ciprofloxacino en influentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales.</i>	18	Tabla 3.1. <i>Parámetros de la linealización de la curva de calibración.</i>	36
Tabla 1.4. <i>Presencia de ciprofloxacino en matrices ambientales acuáticas.</i>	19	Tabla 3.2. <i>Degradación de CPX por distintas metodologías.</i>	41
Tabla 1.5. <i>Metodologías propuestas para la remoción de ciprofloxacino.</i>	20	Tabla 3.3. <i>Parámetros cinéticos de la degradación de CPX por CPO.</i>	45
		Tabla 3.4. <i>Resultados de biodegradabilidad para CPX y CPX transformado por biocatálisis.</i>	50

Índice de figuras

- Figura 1.1.** Estructura de la 4-quinolona. Modificado de Alós (2009). 16
- Figura 1.2.** Mecanismo de acción de la catálisis. E_a' y E_a representan las energías de activación de la reacción catalizada (azul) y no catalizada (rosa) respectivamente. 21
- Figura 1.3.** Enzima cloroperoxidasa del hongo *Leptoxyphium fumago*. (Sundaramoorthy et al., 1995). 24
- Figura 2.1.** Diagrama de trabajo. 27
- Figura 3.1.** Espectro de absorción UV-Vis experimental obtenido para CPX a partir de un fármaco comercial. 34
- Figura 3.2.** Espectro de emisión de fluorescencia para CPX obtenido con excitación a 277 nm. 35
- Figura 3.3.** Curva de calibración para CPX obtenida mediante espectrofotometría de emisión de fluorescencia a 450 nm. 36
- Figura 3.4.** Efecto del pH en la degradación de CPX mediante CPO a temperatura ambiente. 37
- Figura 3.5.** Diagrama de especiación para ciprofloxacino. Modificado de García, (2023) 38
- Figura 3.6.** Efecto de la temperatura en la degradación de CPX mediante CPO obtenida a pH 4.5. 39
- Figura 3.7.** Espectro de emisión de fluorescencia para CPX (azul) y CPX transformado por biocatálisis (rosa). 40
- Figura 3.8.** Cinética de degradación de CPX mediante CPO a pH 4 (azul) y pH 3 (verde). 40
- Figura 3.9.** Curva de Michaelis-Menten para CPO en degradación de CPX utilizando H_2O_2 como sustrato. 44
- Figura 3.10.** Reacción antes (a) y después (b) de añadir la enzima CPO en una concentración de 11.5 nM. 46
- Figura 3.11.** Extracción de productos de reacción: a) sistema SPE durante la filtración, b) productos de reacción retenidos en cartuchos Strata X, c) productos de reacción recuperados de la elución, d) productos de reacción parcialmente secados. 47
- Figura 3.12.** Artemia salina en diferentes etapas de su ciclo de vida: organismos en etapa Instar I (verde) y en proceso de eclosión (rojo). 48
- Figura 3.13.** Curvas dosis-respuesta para CPX (azul) y CPX transformado por biocatálisis (rosa): a) 24 horas, b) 48 horas. 49
- Figura 3.14.** Perfil de actividad antimicrobiana del CPX (azul) y CPX transformado por biocatálisis (rosa). 51

Abreviaturas

ATCC – American Type Culture Collection

CMI – Concentración Mínima Inhibitoria

CPO – Cloroperoxidasa

CPX – Ciprofloxacino

DDD – Dosis Diarias Definidas

DBO – Demanda Bioquímica de Oxígeno

DQO – Demanda Química de Oxígeno

OMS – Organización Mundial de la Salud

PTAR – Planta de Tratamiento de Aguas Residuales

SPE – Separación en Fase Sólida

UE – Unión Europea

Resumen

El ciprofloxacino (CPX) es un contaminante emergente de creciente preocupación debido su persistencia en el medio ambiente y sus potenciales efectos adversos sobre la salud humana y el medio ambiente. Su presencia en diversas matrices ambientales ha sido documentada en investigaciones recientes, lo que resalta la necesidad de encontrar métodos eficaces para su eliminación.

En este trabajo, se propone la degradación de CPX utilizando la enzima cloroperoxidasa (CPO) del hongo *Leptoxyphium fumago*. Para ello, se realizó una evaluación de la capacidad catalítica de la enzima para degradar el fármaco, así como la determinación de los parámetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ y K_M , que describen el comportamiento biocatalítico de la enzima. Además, se analizaron los cambios en toxicidad, biodegradabilidad y actividad microbiana del CPX antes y después del tratamiento enzimático, con el fin de determinar la efectividad del tratamiento propuesto.

Los resultados mostraron que la enzima CPO es capaz de degradar hasta el 99% del CPX, lo que demuestra una alta eficiencia bajo condiciones controladas. Asimismo, los productos de la degradación enzimática presentaron una menor toxicidad, mayor biodegradabilidad y la ausencia de actividad antimicrobiana en concentraciones equivalentes a la concentración mínima inhibitoria del CPX no tratado.

Estos hallazgos sugieren que la degradación del CPX mediante el uso de la enzima CPO es una estrategia de tratamiento prometedora, capaz de reducir eficazmente la concentración del fármaco reduciendo al mismo tiempo los riesgos ambientales asociados a su presencia.

Introducción

Desde su descubrimiento, los antibióticos han tenido un gran impacto en la salud humana salvando miles de vidas. Sin embargo, el uso indiscriminado e incorrecto de estos fármacos tanto con fines terapéuticos como no terapéuticos ha hecho de los antibióticos una emergente contingencia ambiental reconocida por organismos internacionales como la Comisión Europea.

Actualmente, la presencia de estas moléculas se ha reportado en una gran variedad de matrices ambientales alrededor del mundo en concentraciones tan pequeñas que aún no existen métodos concretos para su detección lo que provoca que la información acerca de su destino y potencial impacto tanto en el medio ambiente como en la salud humana permanezca escasa; por lo que aún no se encuentran reguladas por normativas y legislaciones nacionales e internacionales considerándose así contaminantes emergentes.

Si bien existen algunos reportes acerca de su ecotoxicidad, la principal preocupación acerca de su presencia en el ambiente se debe a su contribución en el desarrollo de la resistencia antimicrobiana ya que, al encontrarse en concentraciones tan bajas, permite que los organismos entren en un estado de presión selectiva que promueve la generación de genes de resistencia.

El ciprofloxacino (CPX), una fluoroquinolona de tercera generación, es un antibiótico de amplio espectro reportado como no biodegradable, cuya presencia en aguas residuales tanto urbanas como hospitalarias e industriales permite que este compuesto llegue a formar parte del medio ambiente, representando un riesgo tanto para el equilibrio ecosistémico como para la salud humana.

En la actualidad, el CPX se encuentra declarado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un antibiótico a vigilar. No obstante, a pesar de los esfuerzos por limitar el uso de este y otros antimicrobianos de amplio espectro, continúa siendo uno de los antibióticos más utilizados en el mundo y en México por lo que, a pesar de encontrarse en concentraciones muy bajas en el ambiente, su constante ingreso, aunado a su naturaleza resistente a la biodegradación lo posicionan como un contaminante persistente y de alta preocupación.

Por esta razón, y debido a que las plantas de tratamiento de aguas residuales no cuentan con la tecnología para la eliminación de este tipo de contaminantes, se han desarrollado diversas técnicas que, si bien han demostrado ser eficaces en la degradación del fármaco, presentan desventajas en cuanto a su alto costo y complejidad operativa.

Además, la mayoría de las metodologías aún carecen de la información acerca de la naturaleza de los productos de degradación lo cual es fundamental para asegurar que

éstos sean menos tóxicos, más biodegradables y con menor actividad antimicrobiana por lo que es necesario continuar desarrollando metodologías para la degradación del CPX que puedan superar estas limitaciones.

En este trabajo se evalúa la capacidad catalítica de la enzima CPO del hongo *Leptoxyphium fumago* para degradar al CPX. El propósito es proponer una metodología de fácil operación y bajo costo que pueda reducir eficazmente la concentración del fármaco, transformándolo en productos menos tóxicos, más biodegradables y con menor actividad antimicrobiana, reduciendo así los riesgos ambientales asociados a su presencia.

Capítulo 1. Antecedentes y estado del arte

1.1. Contaminantes emergentes

Recientes investigaciones han revelado la presencia de compuestos orgánicos en diferentes matrices ambientales que no habían sido detectados con anterioridad al no estar incluidos en normativas de regulación de contaminación. Estos compuestos, llamados contaminantes emergentes, comprenden una gran variedad de sustancias que se caracterizan principalmente por la falta de información que existe acerca de su destino en el medio ambiente y sus efectos toxicológicos, así como la falta de legislación tanto nacional como internacional para su regulación (Carvalho & Santos, 2016).

Si bien estos compuestos generalmente se encuentran en el rango de concentraciones de partes por billón (ppb) o partes por trillón (ppt) (Focazio et al., 2008), su persistencia en el ambiente, así como su continuo ingreso ha despertado el interés de la comunidad científica por investigar su destino y posible impacto ambiental y en la salud humana, el desarrollo de técnicas para su detección y, aún más importante, el desarrollo de técnicas para su remoción.

De acuerdo con (Richardson & Ternes, 2011), la lista de contaminantes emergentes comprende sustancias como endulzantes artificiales, compuestos persulfonados, pesticidas, retardantes de flama, nanomateriales, fármacos e ingredientes de productos de cuidado personal como protectores solares. Sin embargo, aún no existe un consenso general sobre las sustancias que deben considerarse en este grupo, lo que dificulta su monitoreo (Rodríguez-Narvaez et al., 2017).

Es importante destacar que estas sustancias suelen ser ingredientes de productos de uso cotidiano lo que facilita su entrada continua al ambiente y las convierte en un riesgo incluso en concentraciones muy bajas. Además, se espera también que su presencia aumente proporcionalmente al crecimiento poblacional.

Las fuentes de su ingreso al ambiente son muy diversas y pueden incluir aguas residuales de hospitales, industrias, domésticas y de actividades ganaderas. Sin embargo, una de las principales fuentes son los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) ya que están diseñadas para una depuración parcial del agua y no disponen con la tecnología adecuada para el tratamiento de estas sustancias a concentraciones tan bajas (Deblonde et al., 2011).

Uno de los grupos más relevantes de contaminantes emergentes es el de los fármacos, cuya presencia ha sido reportada en una gran variedad de matrices ambientales (Liu et al., 2015). Esto los convierte en un riesgo tanto para la salud humana como para otros organismos. Debido a la frecuente presencia de estos compuestos en diferentes matrices ambientales, la Comisión Europea ha reconocido la contaminación por fármacos como

un problema ambiental emergente y de preocupación para la salud pública (Polianciuc et al., 2020).

Aunque la lista de fármacos reportados como contaminantes emergentes comprende una cantidad alrededor de tres mil sustancias, los de mayor preocupación son los antibióticos y pesticidas (Zhang et al., 2015), ya que están diseñados específicamente para eliminar especies, lo que puede alterar significativamente el equilibrio ecológico.

Sumado a lo anterior, los antibióticos contribuyen al desarrollo de resistencia antimicrobiana ya que, al encontrarse en tan bajas concentraciones, las bacterias no mueren, sino que, entran en un estado de presión selectiva que induce la activación de genes de protección a antibióticos y estos genes pueden ser transferidos entre bacterias (Camargo et al., 2014).

Esta problemática tiene implicaciones alarmantes, ya que, de acuerdo con datos del Banco Mundial, se estima que para el año 2050, 10 millones de personas morirán debido a la resistencia antimicrobiana, y 28 millones de personas serán desplazadas hacia la pobreza como consecuencia de este fenómeno (Bloom et al., 2017).

1.2. Antibióticos

El descubrimiento de los antibióticos es considerado el mayor descubrimiento del Siglo XX que comenzó con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en el año 1929 y su posterior comercialización en 1946 (Carvalho & Santos, 2016). Desde entonces, una gran variedad de antibióticos ha sido descubierta y comercializada en todo el mundo salvando la vida de miles de personas.

De acuerdo con Burstein et al., (2019) y Dicker et al., (2018), el descubrimiento de los antibióticos ha tenido grandes impactos en la salud humana, reduciendo la tasa de mortalidad mundial de 216 muertes por cada 1000 personas en 1950 a tan sólo 39 en 2017. Además, este avance ha contribuido al aumento de la esperanza de vida, que pasó de 48 ± 1 a 70 ± 5 años en hombres y de 52 ± 9 a 75 ± 6 años en mujeres (Dicker et al., 2018).

El uso de antibióticos alrededor del mundo tiene una gran variedad de propósitos. En humanos, los antibióticos son utilizados como moléculas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades infecciosas y para fines profilácticos en procedimientos médicos como trasplantes, quimioterapias y cirugías; mientras que, su uso veterinario tiene propósitos mayormente no terapéuticos como promotores de crecimiento y son administrados en dosis menores (Carvalho & Santos, 2016).

Un estudio publicado en 2021 estima que el consumo global de antibióticos en 2018 alcanzó las 40 billones de dosis diarias definidas (DDD), que representa un aumento del 46% desde el año 2000 (Browne et al., 2021). Según el mismo estudio, el sur de Asia concentra aproximadamente el 25% del consumo total, mientras que Centroamérica

representa sólo el 2%. En cuanto al uso de antibióticos en la industria ganadera, los datos de consumo muestran una tendencia que podría verse reflejada en un aumento del 67% para el año 2030, mientras que el consumo en humanos podría incrementarse en un 200% para el mismo año (Klein et al., 2018; Polianciuc et al., 2020).

Aunque estos fármacos han representado un gran beneficio para la humanidad, se ha descubierto que su uso excesivo está directamente relacionado con la contaminación de diversas matrices ambientales, lo que representa un grave peligro para el medio ambiente y a la salud humana.

1.2.1. Panorama ambiental

La presencia de fármacos e ingredientes de productos de cuidado personal en aguas superficiales de Estado Unidos y Europa fue reportada por primera vez en la década de 1960 (Yoosefian et al., 2017). Actualmente se ha reportado la presencia de antibióticos en una gran variedad de matrices ambientales entre las que se incluyen aguas residuales, aguas subterráneas y superficiales, suelo, lodos e incluso fuentes de agua potable y vegetales; esto último sugiere que los antibióticos podrían estarse incluyendo en la dieta diaria de manera inconsciente, representando así un riesgo mayor para la salud humana (Hanna et al., 2018). Esta situación ha generado una creciente preocupación a nivel mundial, motivando los esfuerzos para regular el uso de estos compuestos en un intento por mitigar sus efectos ambientales y sanitarios.

En el año 2015, la Unión Europea (UE) incluyó por primera vez algunos antibióticos como la amoxicilina y el ciprofloxacino, en la lista de contaminantes emergentes a supervisar. Además, desde 2006, la UE ha prohibido el uso de estos fármacos como promotores de crecimiento en la industria ganadera. A nivel global, existe un consenso respaldado por la OMS para limitar el uso de antibióticos de amplio espectro debido a los riesgos asociados con su abuso (Polianciuc et al., 2020).

Por otra parte, aproximadamente entre el 40 y 90% de los antibióticos administrados a humanos y animales se excreta a través de heces y orina en su forma aún activa y, si bien su presencia en matrices ambientales no supera los $\mu\text{g/L}$, su baja biodegradabilidad sumado a la alta tasa de ingreso al ambiente los convierte en contaminantes persistentes (Coman, 2017; Polianciuc et al., 2020).

Aunque la mayoría de los antibióticos son excretados aún en su forma inalterada, poco se sabe acerca de las interacciones que puedan tener con factores bióticos y abióticos en el ambiente, lo que hace que su destino y efectos adversos continúen siendo inciertos. De acuerdo con Carvalho & Santos (2016) algunos antibióticos llegan al ambiente en forma de subproductos y productos de transformación que difieren del compuesto original en sus características físicoquímicas y propiedades farmacológicas, lo que puede hacer que, en ciertos casos, estos subproductos sean más tóxicos que los compuestos

originales. Además, algunos de estos subproductos pueden regresar a su forma original, representando un reservorio de contaminantes (Evgenidou et al., 2015).

Las fuentes de ingreso de los antibióticos al ambiente son principalmente las aguas residuales municipales, hospitalarias, industriales y de agricultura y los efluentes de las PTAR, debido a que éstas no cuentan con la tecnología adecuada para disminuir la presencia de estos contaminantes (Polianciuc et al., 2020). Por otro lado, las aguas residuales de la industria farmacéutica representan un gran peligro debido a que los fármacos ingresan directamente al ambiente por medio de los desechos sin haber sido previamente metabolizados por el cuerpo humano (Larsson, 2014).

Si bien los efectos toxicológicos de la mayoría de estos contaminantes son aún desconocidos, existen algunos estudios que revelan su potencial riesgo al ecosistema. Un estudio publicado por Carvalho & Santos en el 2016 revela que existe una gran cantidad de bacterias que pueden ser sensibles a los antibióticos lo cual implica una directa interferencia en los procesos vitales del ecosistema ya que estos organismos son considerados productores o descomponedores primarios.

Incluso en las concentraciones tan bajas (ppb o ppt) que los antibióticos han sido encontrados en el ecosistema, se ha reportado que pueden reducir la biomasa en tierras cultivadas, lo que afecta directamente la economía y pueden ingresar a los alimentos de las personas al ser absorbidos por las plantas que están destinadas a consumo humano. Una vez en el organismo humano, estos antibióticos pueden alterar la microbiota intestinal y provocar afectaciones relacionadas con el sistema digestivo, reacciones alérgicas y efectos tóxicos crónicos (Ben et al., 2019; Minden et al., 2017).

Sin embargo, es importante resaltar que la mayoría de estos estudios consideran la toxicidad de los antibióticos como compuestos individuales y, ya que estos suceden rara vez en el ambiente en su forma individual e inalterada, hace falta información acerca de la ecotoxicidad de los subproductos, productos de transformación y las interacciones que estos puedan tener con otros contaminantes (Carvalho & Santos, 2016). Aunque por ahora, la mayor preocupación acerca de la presencia de antibióticos en el ambiente es su contribución al desarrollo de la resistencia antimicrobiana.

1.2.1.1. Resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana, un fenómeno predicho por el mismo Alexander Fleming, es el resultado evolutivo del uso indiscriminado de antibióticos en el que las comunidades bacterianas han adquirido la capacidad de sobrevivir y crecer ante la exposición a antibióticos en concentraciones que años atrás inhibían su crecimiento (Carvalho & Santos, 2016).

De acuerdo con la OMS, actualmente mueren más de 700 mil personas a causa de la resistencia antimicrobiana y, como se mencionaba anteriormente, se estima que para

2050 esta cifra aumentará a 10 millones, con pérdidas económicas que superarán los 10 billones de dólares, por lo que no sólo es un problema de salud pública sino también económico principalmente en países en desarrollo. Actualmente los 7 casos de resistencia antimicrobiana declarados por la OMS como una prioridad son: *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación, *E. coli* resistente a fluoroquinolonas, *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación, *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, *S. aureus* resistente a penicilina y *Salmonella* resistente a fluoroquinolonas (Hou et al., 2023).

Ahora bien, si la causa principal de la resistencia es la exposición prolongada de las bacterias a estos fármacos provocada por una alta prescripción y un uso inapropiado; actualmente, esta exposición se extiende aún más debido a que los antibióticos se encuentran en una gran variedad de matrices ambientales, por lo que los microorganismos ambientales están expuestos a una presión selectiva continua que promueve la adquisición o activación de genes de resistencia (Bairán et al., 2020).

1.2.2. Los antibióticos en México

En México, el uso de antibióticos fue restringido hasta el año 2010 (SSA, 2010). Antes de esa fecha, los antibióticos eran fármacos de venta libre y administrados de manera tan indiscriminada lo que llevó a que, entre 1997 y 2004, México se convirtiera en el país con mayor consumo de antibióticos con fines clínicos, con una DDD de 14 - 16 por 1000 habitantes por día. Incluso, para el año 2007, México se encontraba entre los 5 países con mayor uso clínico de antibióticos (Wirtz et al., 2010).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por reducir el uso de antibióticos a partir de 2010, un estudio reveló que el consumo de antibióticos se había mantenido casi sin cambios hasta finales del mismo año y sólo se observó una disminución en el consumo de penicilinas, tetraciclinas y sulfonamidas, mientras que el consumo de macrólidos, quinolonas y otro tipo de antibióticos, no disminuyó (Santa-Ana-Tellez et al., 2013).

Actualmente, es difícil establecer un panorama concreto acerca del uso clínico de antibióticos en México debido a la poca información que existe acerca de dosis prescritas, ya que la información existente está centrada principalmente en las ventas (Santa-Ana-Tellez et al., 2013; Van Boeckel et al., 2014). Sin embargo, un estudio realizado por Sánchez-Huesca et al. en el 2020 reportó que, entre los antibióticos más prescritos en la Ciudad de México, las quinolonas son las más comunes, representando el 28% de los antibióticos prescritos y siendo el ciprofloxacino el de mayor prevalencia (45%). En cuanto al uso veterinario, un reporte del año 2015 realizado por Van Boeckel et al. muestra que para el año 2030, México se encontrará entre los 5 países con mayor consumo de antibióticos para este uso representando el 2% del consumo global.

Respecto al panorama ambiental, Calderón et al. (2019) reportó la presencia de una gran variedad de fármacos en aguas residuales de un hospital de la Ciudad de México, incluyendo analgésicos como naproxeno, diclofenaco, ibuprofeno y paracetamol, así como antibióticos como ofloxacino, ciprofloxacino, y sulfametoxazol, en concentraciones desde los 9 a los 27 $\mu\text{g/L}$.

Calderón et al. (2019) también reportó la presencia de algunos de estos fármacos en efluentes de PTAR lo que demuestra que las instalaciones no cuentan con la tecnología necesaria para eliminar completamente estos compuestos. Por otro lado, Lesser et al. (2018), llevaron a cabo un estudio de la presencia de contaminantes en aguas subterráneas del Valle del Mezquital, que son utilizadas comúnmente para irrigación en el sector agrícola, reportando la presencia de 65 fármacos incluidos antibióticos de los grupos de quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas.

1.3. Quinolonas

Como se resaltó en el apartado anterior, las quinolonas son el grupo de antibióticos más prescritos en México y tienen una presencia importante en diferentes matrices ambientales.

De acuerdo con Alós (2009), en su estructura básica, las quinolonas se encuentran conformadas por dos anillos aromáticos (Figura 1.1.), con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3. Las quinolonas que poseen esta estructura son las del grupo de la primera generación y son activas principalmente frente a enterobacterias. Algunas quinolonas también poseen un átomo de flúor en la posición 6, son llamadas fluoroquinolonas y comprenden a las quinolonas de segunda, tercera y cuarta generación. Las quinolonas de segunda generación tienen actividad principalmente frente a organismos gramnegativos, mientras que las de tercera generación poseen un grupo piperacínico o metil-piperacínico en la posición 7 y son activas frente a organismos gramnegativos y grampositivos, mientras que las quinolonas de cuarta generación poseen un doble anillo derivado del anillo pirrolidónico, y son activas frente a organismos gramnegativos, grampositivos y tienen una mejora en cuanto a su actividad frente a organismo anaerobios. Sus características de biodisponibilidad, actividad, farmacocinética y farmacodinámica varían dependiendo de la quinolona.

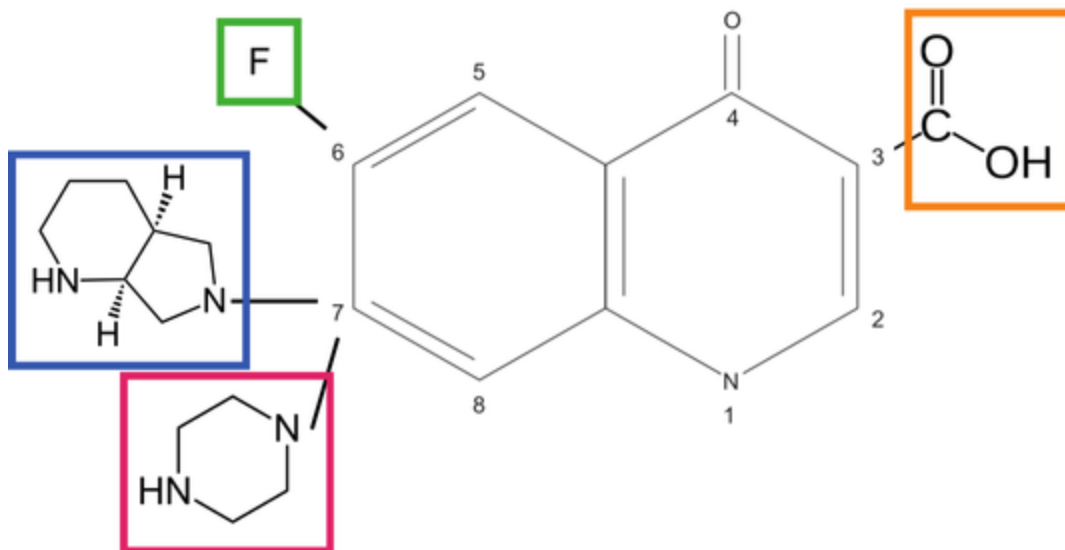


Figura 1.1. Estructura química general de la 4-quinolona. En naranja el grupo carboxilo unido al carbono 3, en verde el átomo de flúor unido al carbono 6, en magenta el grupo piperacínico que se puede unir al carbono 7 y en azul un ejemplo del doble anillo derivado del anillo pirrolidónico que puede unirse también al carbono 7. Modificado de Alós (2009).

En el panorama ambiental, su presencia se ha reportado en una gran variedad de matrices ambientales acuáticas alrededor del mundo (Barnes et al., 2008; Focazio et al., 2008; Jiang et al., 2011; Lesser et al., 2018; Tamtam et al., 2008; Tong et al., 2014; Zuccato et al., 2010).

1.3.1. Ciprofloxacino

El ciprofloxacino (CPX) es una fluoroquinolona perteneciente al grupo de quinolonas de tercera generación patentado en 1980 y comercializado en 1987 (Enyoh & Wang, 2023). Es un antibiótico de amplio espectro con actividad frente a organismos gramnegativos y grampositivos, cuyo mecanismo de acción corresponde a impedir la replicación celular inhibiendo las enzimas ADN girasa y ADN topoisomerasa IV (Conley et al., 2018).

Además, puede tener efectos sinérgicos con otros antibióticos haciéndolo altamente atractivo para el tratamiento de infecciones, lo que lo convierte en el antibiótico más usado en quimioterapia a nivel mundial y, aunque actualmente se encuentra en la lista de antibióticos a vigilar de la OMS, fue uno de los medicamentos más usados en la pandemia del COVID 19 (Aggelopoulos et al., 2020; Enyoh & Wang, 2023; Granata et al., 2022). Algunas de sus propiedades fisicoquímicas se encuentran enlistadas en la tabla 1.1 y en la figura 1.2 puede observarse el diagrama de especiación del CPX.

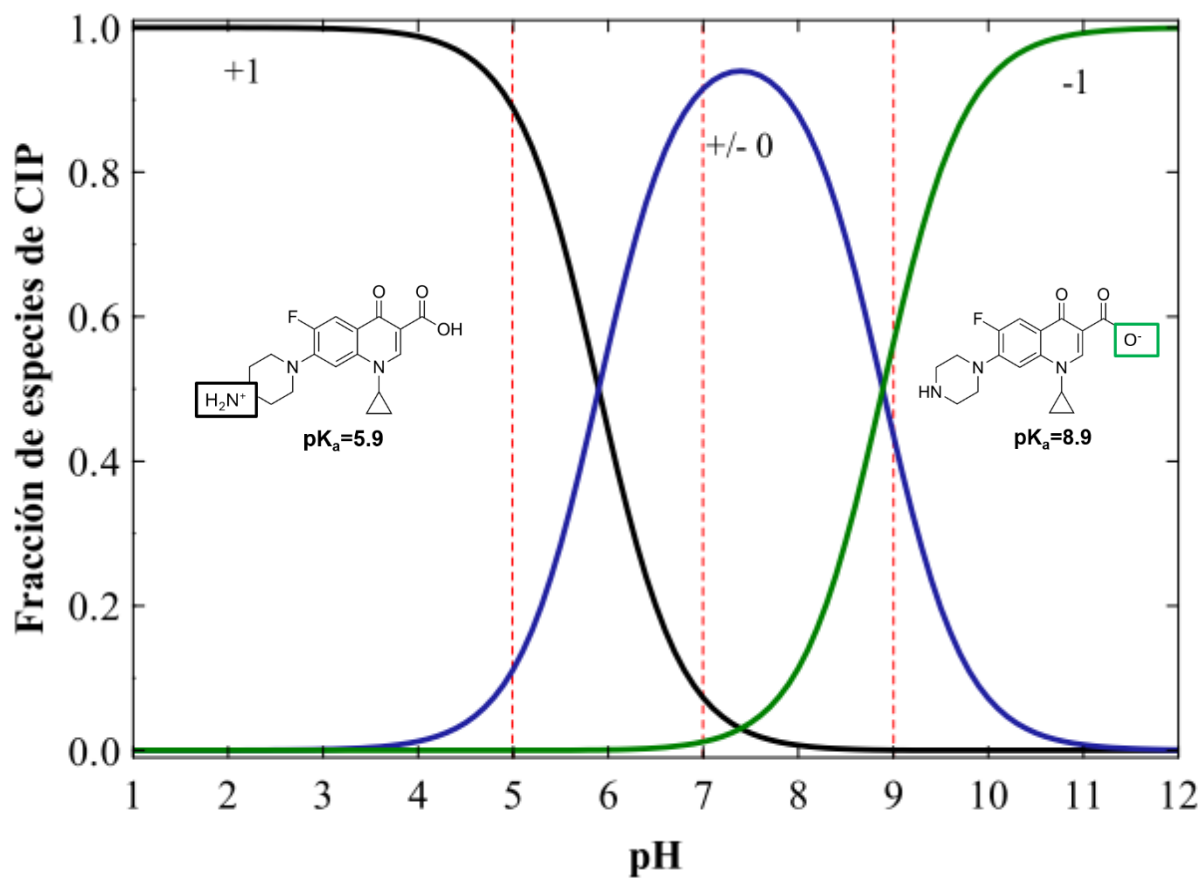


Figura 1.2. Diagrama de especiación para ciprofloxacino. Modificado de García, (2023).

Tabla 1.1. Propiedades químicas del ciprofloxacino. (Azanu et al., 2018; García, 2023; O'Neill et al., 2006)

Ciprofloxacino	
Estructura	
Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃
Peso molecular	331.3 g/mol
Log Kow	0.28
pKa	5.9 8.9
Solubilidad en agua a 20 °C	30 g/L
Estado de agregación	Sólido

Punto de fusión	255-257 °C
------------------------	------------

Como contaminante, el CPX ha sido reportado como no biodegradable (Girardi et al., 2011). Su alta solubilidad en el agua lo ayuda a transferirse fácilmente de una matriz ambiental a otra, siendo las aguas residuales hospitalarias, urbanas y de la industria farmacéutica su principal fuente de ingreso al ambiente. En la tabla 1.2. se enlistan algunos reportes de la presencia de CPX en aguas residuales hospitalarias y urbanas mientras que en la tabla 1.3. se enlistan reportes de la presencia de CPX en influentes y efluentes de PTAR.

Tabla 1.2. Presencia de ciprofloxacino en aguas residuales.

País	Tipo de efluente	Concentración (µg/L)	Referencia
México	Aguas residuales hospitalarias	0.95	Calderón et al. (2019)
Ghana		15	Azanu et al. (2018)
Australia		14.5	Watkinson et al. (2009)
Portugal		10.9	Seifrtová et al. (2008)
México	Aguas residuales urbanas	2.69	Calderón et al. (2019)
Australia		1.1	Watkinson et al. (2009)
España		2.29	Gracia-Lor et al. (2011)
China		0.00813	Hanna et al. (2018)

Larsson et al. (2007) reportaron una concentración de hasta 31 mg/L de CPX en efluentes de una PTAR que recibe aguas residuales de diferentes industrias farmacéuticas en la India. Por su parte, Hanna et al. (2018) reporta una concentración de 2.003 µg/kg en efluentes sedimentarios de una planta de tratamiento de aguas residuales en China. Además, se ha reportado que el CPX puede afectar el desempeño de estas plantas debido a que es capaz de inhibir el metabolismo de nitrógeno y la Demanda Química de Oxígeno (DQO) a concentraciones de mg/L (Chen et al., 2021). De este modo, al no ser completamente eliminado, el CPX puede llegar a una gran variedad de matrices ambientales una vez liberado a través de estos efluentes.

Tabla 1.3. Presencia de ciprofloxacino en influentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales.

País	Concentración (µg/L)		Referencia
	Influente	Efluente	
Irán	0.796	0.248	Mirzaei et al. (2018)
Italia	1.67	0.626	Castiglioni et al. (2008)
India	No reportado	31000	Larsson et al. (2007)

Su presencia en aguas subterráneas es preocupante debido a que, por este medio, el CPX podría llegar a estar presente en fuentes de agua potable o bien formar parte del agua utilizada para el riesgo de cultivos e ingresar directamente a nuestra dieta diaria. Focazio et al. (2008) reportó la presencia de CPX en agua bebible de Estados Unidos en concentraciones de 0.03 µg/L mientras que, Lesser et al. (2018) reportó la presencia de hasta 1.18 µg/L de CPX en canales de riego con agua proveniente del acuífero del Valle del Mezquital. En la tabla 1.4. se muestran algunos reportes de su presencia en aguas subterráneas y superficiales.

Por su parte, Hanna et al. (2018) reportó la presencia de CPX en concentraciones de 0.0062 µg/L en agua bebible, 1.519 µg/kg en estiércol de cerdo y hasta 44.584 µg/kg en vegetales de ingesta común como tomate, papa, zanahoria y ajo.

De acuerdo con Ahmadzadeh et al. (2017) la presencia del CPX en agua bebible aún en concentraciones pequeñas puede provocar problemas de salud como nerviosismo, vómito, diarrea y temblores y, en concentraciones más altas, puede provocar trombocitopenia, falla renal aguda, leucopenia, eosinofilia y niveles elevados de enzimas hepáticas.

Tabla 1.4. Presencia de ciprofloxacino en matrices ambientales acuáticas.

País	Matriz ambiental	Concentración (µg/L)	Referencia
Ghana	Agua superficial	1.2	Azanu et al. (2018)
Kenia		0.12	Ngumba et al. (2016)
Brasil		0.119	Locatelli et al. (2011)
Italia		0.588	Castiglioni et al. (2008)
Francia		2.95	Feitosa-Felizzola & Chiron (2009)

China		0.00086	Hanna et al. (2018)
España		0.74	Gracia-Lor et al. (2011)
México		1.36	Calderón et al. (2019)
México	Agua subterránea	1.18	Lesser et al. (2018)

Por otro lado, su presencia en matrices ambientales puede significar un peligro para otros organismos y afectar el equilibrio ecológico. De acuerdo con Johansson et al. (2014), el CPX puede reducir significativamente la capacidad de las comunidades microbianas marinas presentes en biofilms de perifiton para utilizar el carbono. En experimentos de laboratorio, se encontró que una concentración de 340.11 nM de CPX reduce a la mitad la actividad microbiana después de 48 horas; por otro lado, Magdaleno et al. (2015) reportaron una EC_{50} de 11.3 mg/L para la inhibición del crecimiento de *Pseudokirchneriella subcapitata* por el CPX tras 72 horas de exposición.

En cuanto a su efecto sobre las plantas, Opris et al. (2013) evaluaron la toxicidad de CPX frente a *Triticum aestivum*, demostrando que el fármaco puede disminuir el contenido de clorofila y aumentar la secreción de compuestos volátiles de la vía de la lipoxigenasa en respuesta a estrés, y que puede tener efectos significativos en la eficiencia fotosintética de la planta.

Es por lo anterior que, es importante el desarrollo de alternativas para la remoción del CPX de efluentes para evitar que éste llegue a formar parte de las matrices ambientales y poder hacer frente así a los efectos adversos relacionados con la exposición continua al fármaco.

1.4. Alternativas de remoción de ciprofloxacino

Actualmente existe una gran variedad de estudios en torno a desarrollar alternativas de remoción de CPX que comprenden tanto su adsorción como su degradación.

En la tabla 1.5., se enlistan algunas de las tecnologías reportadas para la remoción del CPX que, si bien han demostrado ser eficientes para esta remoción, algunas de ellas como la oxidación y fotocátalisis presentan desventajas como complejidad de operación o una alta demanda de energía, y aunque algunas otras basadas en la adsorción han sido estudiadas con el propósito de disminuir costos (Igwegbe et al., 2021), no cumplen con el objetivo de degradar la molécula del fármaco. Es por esto que metodologías basadas en la biocatálisis han captado recientemente el foco de las investigaciones debido a que cumplen, en su mayoría, con el objetivo de resolver las problemáticas que presentan las otras metodologías, siendo en principio más sustentables debido a que

operan generalmente bajo condiciones ambientales de temperatura, presión y pH, lo que reduce costos en energía y, además, utilizan materias primas renovables y no tóxicas para el ambiente (Bommarius, 2015; Sheldon & Woodley, 2018).

Tabla 1.5. Metodologías propuestas para la remoción de ciprofloxacino.

Tipo de metodología	Metodología	Referencia
Oxidación	Ozonización	De Witte et al. (2010)
	Oxidación mediante fenton homogéneo	Salari et al. (2018)
	Oxidación mediante sonoquímica utilizando nanopartículas de ZnO y persulfato.	Igwegbe et al. (2020)
	Oxidación mediante persulfato activado	Xing et al. (2020)
Fotocatálisis	Fotocatálisis empleando nanopartículas de ZnO.	El-Kemary et al. (2010)
	Fotocatálisis en presencia de sustancias húmicas.	Porras et al. (2016)
	Fotocatálisis con luz solar impulsada por una película TiO ₂ /Ti asistida con polivinil alcohol y peroximonosulfato.	Sayed et al. (2018)
Biodegradación	Biodegradación en biorreactor anaeróbico de cama estructurada y empacada.	Carneiro et al. (2019)
	Biodegradación mediante <i>Trametes versicolor</i> y la enzima lacasa de <i>Trametes versicolor</i> .	Prieto et al. (2011)
Adsorción	Adsorción por microplásticos de tereftalato de polietileno	Enyoh & Wang (2023)
	Adsorción en adsorbentes a base de lignina.	Gao et al. (2021)

1.4.1. Biocatálisis

La catálisis podría definirse como el uso de moléculas con el fin de reducir la barrera de energía requerida para transformar químicamente una sustancia en otra (Illanes, 2019), lo

que provoca un aumento considerable en la velocidad de reacción (Figura 1.2). Las moléculas utilizadas para la catálisis son llamados catalizadores y, cuando estos catalizadores son biomoléculas el proceso se llama biocatálisis.

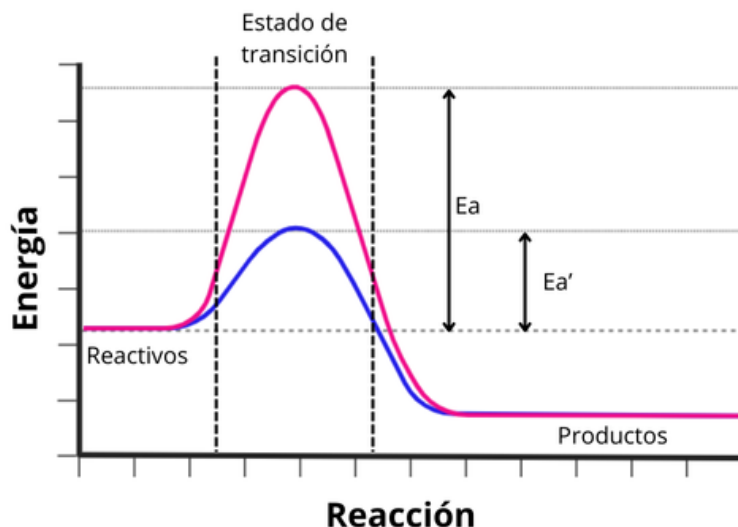


Figura 1.3. Mecanismo de acción de la catálisis. Ea' y Ea representan las energías de activación de la reacción catalizada (azul) y no catalizada (rosa) respectivamente.

De acuerdo con Sheldon & Woodley (2018) la biocatálisis puede clasificarse en 3 grupos; en el primero la biocatálisis es llevada a cabo por células completas en reposo, en el segundo es llevada a cabo por enzimas aisladas y en el tercero las enzimas aisladas son inmovilizadas en soportes sólidos con el propósito de posibilitar la recuperación y reutilización de la enzima. Aunque las metodologías basadas en el uso de células completas han demostrado resultados eficientes que pueden incluso alcanzar la mineralización a bajo costo, autores como Prieto et al. (2011) recomiendan la identificación, aislamiento y utilización de las enzimas implicadas en la degradación para la optimización del proceso. Este trabajo se centra en la biocatálisis del segundo grupo: la biocatálisis enzimática.

1.4.1.1. Biocatálisis enzimática

Las enzimas son proteínas compuestas por residuos de aminoácidos unidos covalentemente a través de un enlace peptídico formado entre el átomo de carbono del grupo carboxilo de un aminoácido y el átomo de nitrógeno del grupo α -amino de otro aminoácido (Illanes, 2019). La utilización de enzimas aisladas como biocatalizadores ayuda a superar la limitación que presenta el uso de células completas en cuanto a la difusión de sustratos al interior de la célula y de productos al exterior de esta (Sheldon & Woodley, 2018).

La cinética de la biocatálisis enzimática puede, generalmente, ser explicada por el modelo de Michaelis-Menten como se muestra en la ecuación 1.

Ecuación 1:



Donde:

- E representa la enzima.
- S representa al sustrato.
- P representa al producto de reacción.
- ES representa el complejo enzima-sustrato.

Este modelo propone que, para la conversión de un sustrato, la reacción sucede a través de la formación de un complejo reversible enzima-sustrato que da lugar a la transformación irreversible de ese sustrato en un producto y la posterior liberación de la enzima que no es consumida ni modificada en el proceso (Bommarius, 2015).

Así, el modelo propuesto por Leonor Michaelis y Maud Menten en 1913 (Srinivasan, 2022) establece una serie de parámetros que ayudan a definir el comportamiento de una enzima en una determinada reacción, y que se rigen bajo el criterio de la siguiente ecuación:

Ecuación 2:

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]} = \frac{k_{cat}[E]_{total}[S]}{K_M + [S]}$$

Donde:

- V_0 es la velocidad inicial de la reacción enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$).
- $[S]$ es la concentración de sustrato (μM).
- $V_{m\acute{a}x}$ es la velocidad máxima de la reacción enzimática ($\mu\text{M}/\text{min}$).
- K_M es la constante de Michaelis-Menten para la reacción enzimática (μM).
- k_{cat} es la constante catalítica para la reacción enzimática (min^{-1}).
- $[E]_{total}$ es la concentración total de la enzima en el sistema (μM).

Estos parámetros cinéticos sirven para obtener información cuantitativa del comportamiento de la reacción catalizada por la enzima y establecer así valores que definan conceptos como el punto de saturación de una enzima ($V_{m\acute{a}x}$), la afinidad de la enzima por el sustrato (K_M) o bien, la tasa de conversión de sustrato a producto (k_{cat}) (León Aguirre, 2015; Segel, 1976).

Las enzimas, en su aplicación para la biorremediación, han sido ampliamente estudiadas debido a su capacidad para transformar un contaminante en productos con mayor biodegradabilidad y menor toxicidad (Unuofin et al., 2019). En este sentido, las lacasas y las peroxidasas son dos tipos de enzimas oxidativas atractivas por su aplicación para

la degradación de contaminantes y su uso se ha reportado para la degradación de una gran variedad de fármacos (León Aguirre, 2015; Prieto et al., 2011; Romero Balboa Osorio, 2024)

1.4.1.2. Cloroperoxidasa

Las enzimas oxidativas catalizan reacciones en las que el oxígeno o peróxido de hidrógeno son los aceptores de electrones, es decir, reacciones redox, con la capacidad de reconocer como sustratos reductores una gran cantidad de compuestos aromáticos (García-Zamora et al., 2018; Torres & Ayala, 2010).

De acuerdo con Torres & Ayala (2010) este tipo de enzimas pueden ser divididas en dos grupos dependiendo de su mecanismo de acción: el primer grupo lo componen las oxidasas y peroxidasas en las que la oxidación ocurre por medio de una transferencia de electrones y el segundo grupo lo componen las monoxigenasas y dioxigenasas en las que la oxidación se lleva a cabo mediante la incorporación del oxígeno a la molécula de sustrato. De acuerdo con el potencial redox, aquellas con una mayor capacidad oxidativa son las peroxidasas para las cuales se ha reportado un potencial redox (E°) mayor en comparación con el potencial redox reportado para las lacasas (Torres & Ayala, 2010).

Dentro del grupo de las peroxidasas se encuentran las hemoperoxidasas, o hemoenzimas, que son enzimas con la característica de que contienen un grupo hemo en su estructura y utilizan peróxido de hidrógeno u otros peróxidos orgánicos para catalizar la oxidación de una gran variedad de sustratos (Romero-Balboa, 2024; Unuofin et al., 2019).

Esta capacidad de las peroxidasas de utilizar una gran variedad de sustratos, aunado al gran potencial redox, es lo que las vuelve atractivas en el sector industrial para la producción de una gran variedad de metabolitos y, sobre todo, en la degradación de una gran cantidad de contaminantes aromáticos (García-Zamora et al., 2018).

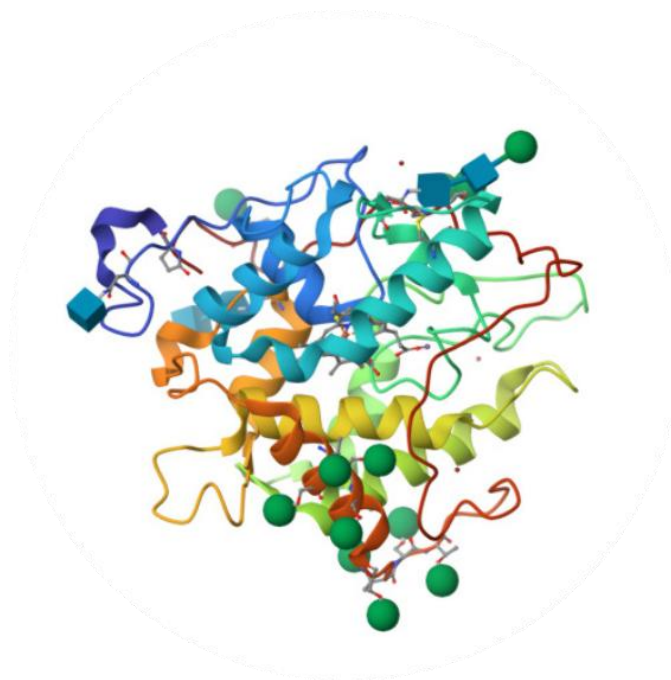


Figura 1.4. Enzima cloroperoxidasa del hongo *Leptoxyphium fumago* (Sundaramoorthy et al., 1995).

La enzima cloroperoxidasa (CPO) del hongo *Leptoxyphium fumago* (Figura 1.3) es una hemo peroxidasa con alto potencial redox que utiliza peróxido de hidrógeno para catalizar la oxidación de diversos sustratos y su uso para la degradación de fármacos ha sido ampliamente reportado (Torres et al., 2003; Torres & Ayala, 2010).

León Aguirre (2015) reportó la utilización de la enzima cloroperoxidasa del hongo *L. fumago* para la degradación de 11 fármacos (ambroxol, diclofenaco, estradiol, ketoconazol, ketorolaco, metotrexato, oxitetraciclina, sulfametoxazol, tenoxicam, tetraciclina y trazodona), lo que demostró que la enzima tiene la capacidad catalítica para oxidar fármacos con características aromáticas bajo condiciones controladas y en agua residual real.

Por su parte, Romero-Balboa (2024) reporta la degradación bajo condiciones controladas de laboratorio de los antiparasitarios albendazol, cloroquina e hidroxiclороquina mediante la enzima cloroperoxidasa de *L. fumago* obteniendo porcentajes de degradación de 100, 36.44 y 34.45, respectivamente; García-Zamora et al. (2018) reportaron el uso de esta misma enzima en aguas residuales simuladas para la degradación de diclofenaco, sulfametoxazol, naproxeno, ketorolaco, tetraciclina, estradiol, ketoconazol y trazodona obteniendo una degradación mayor al 90% para los 5 primeros fármacos mencionados, cerca del 60% para los siguientes dos, y 12% para el último demostrando además, que la inmovilización de la enzima en microesferas de quitosano permite la reutilización de la misma hasta 3 veces.

Por lo anteriormente mencionado, la CPO es una enzima con un gran potencial para descontaminar ambientes acuáticos contaminados con fármacos de naturaleza aromática como antibióticos, y en particular, se presenta como una enzima con alto potencial para oxidar y eliminar al CPX. Al catalizar reacciones por radicales libres, la CPO de alto potencial redox, podría descomponer la estructura molecular del antibiótico, transformándolo, en principio, en sustancias menos tóxicas o inofensivas. Esta enzima ofrece ventajas como su alta eficiencia, condiciones de reacción suaves y la generación de productos más biodegradables.

Hipótesis

El tratamiento del contaminante emergente ciprofloxacino (CPX) mediante la enzima cloroperoxidasa (CPO) del hongo *Leptoxyphium fumago* transforma al fármaco en productos más biodegradables, menos tóxicos y con menor actividad antimicrobiana.

Objetivo general

Evaluar la degradación del ciprofloxacino mediante la enzima cloroperoxidasa de *Leptoxyphium fumago*.

Objetivos particulares

- Demostrar la capacidad de la enzima cloroperoxidasa para oxidar al fármaco ciprofloxacino.
- Analizar los efectos del pH y la temperatura en la reacción de degradación.
- Determinar los parámetros cinéticos que definen el comportamiento de la reacción.
- Determinar la toxicidad, biodegradabilidad y actividad antimicrobiana de la mezcla de productos de degradación en comparación con el ciprofloxacino.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Diagrama de trabajo

En la figura 2.1 se muestra el diagrama de trabajo de los ensayos realizados para esta investigación. Todos los ensayos se realizaron por triplicado a excepción de las pruebas de toxicidad, las cuales se realizaron con 4 réplicas, y las pruebas de biodegradabilidad que se realizaron por duplicado.

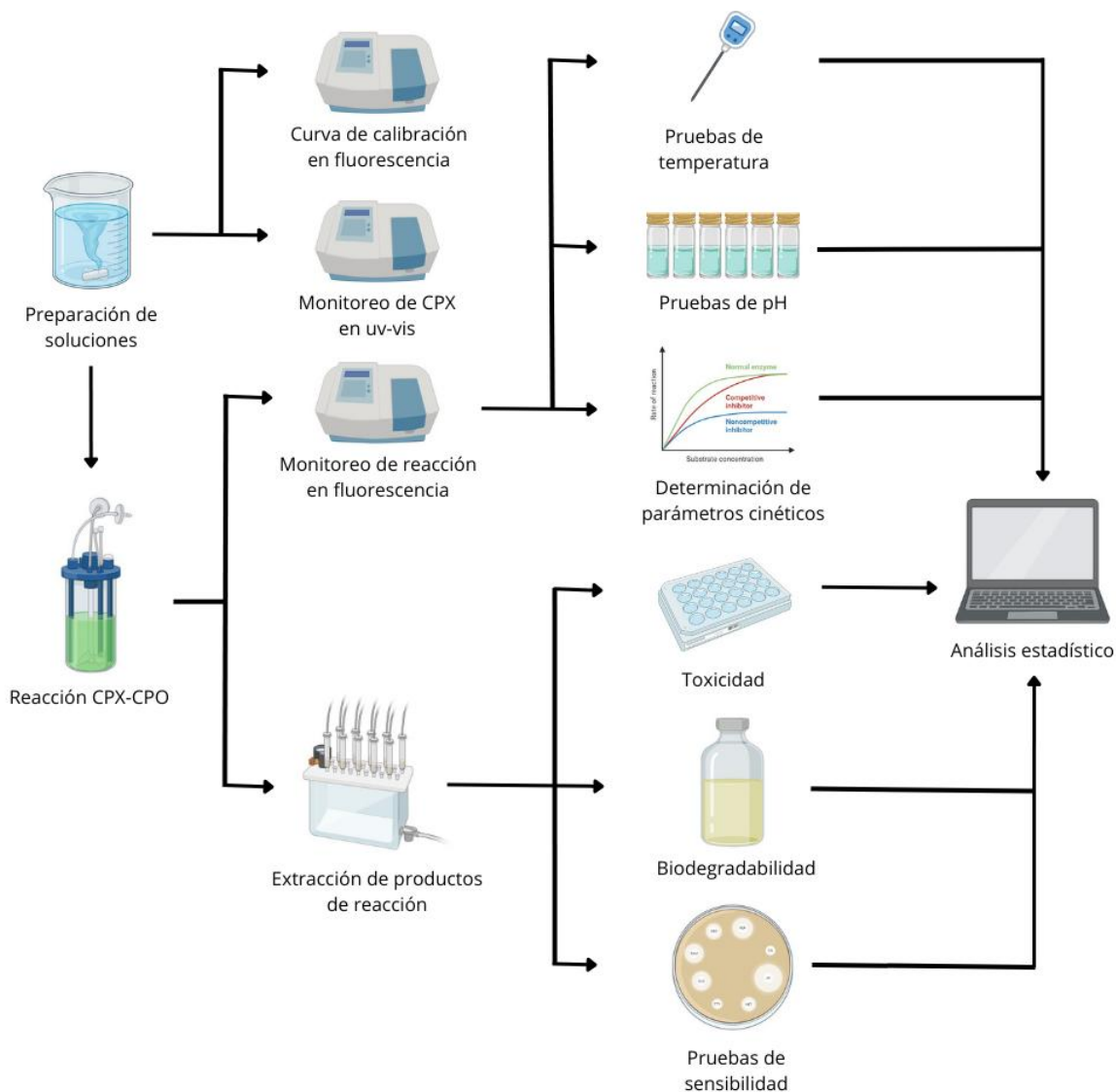


Figura 2.1. Diagrama de trabajo.

2.2. Reactivos

Los reactivos empleados en la preparación de soluciones utilizadas en los ensayos se muestran en la tabla 2.1.

La enzima CPO utilizada para la degradación fue adquirida de Alltazyme, extraída del hongo marino *Leptoxyphium fumago* con R_z de 1.42 y actividad específica de 22,000 min^{-1} usando monoclorodimedona como sustrato.

Tabla 2.2. Lista de reactivos

Reactivo	Marca	Pureza
Cloruro de potasio	Técnica Química	99.5%
Ciprofloxacino (Ciprobac)	PiSA	65.7%
Fosfato de sodio dibásico heptahidratado	Fermont	100.0%
Fosfato de sodio monobásico (monohidratado)	Karal	98.0%-102.0%
Ácido fosfórico	Karal	98.0%
Ácido acético glacial	Fermont	99.8%
Peróxido de hidrógeno	Química Mercurio	30.0%
Acetonitrilo	Fermont	99.9%
Acetato de sodio anhidro	Técnica Química	99.0%
Ácido trifluoroacético	Karal	99.9%
Metanol	J. T.Baker	99.9%
Hidróxido de potasio	Fermont	88.0%

2.3. Instrumentos

- Espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse equipado con dos monocromadores Czerny-Turner y una lámpara de pulsos de xenón de 15 W (ancho de pulso 2-3 μs , potencia: 60-75 kW).
- Espectrofotómetro de haz simple UV-Vis Varian Cary 50 Bio con un monocromador Czerny-Turner, una lámpara de Xenón de espectro completo y detector de diodos de silicio duales.
- Fotómetro multiparámetro HI 83099 HANNA Instruments.
- Termo-reactor HI 839800 HANNA Instruments.

2.4. Preparación de soluciones de trabajo

La preparación de la solución madre de CPX se realizó a partir del fármaco comercial Ciprobac (500 mg). Las tabletas del fármaco fueron trituradas con ayuda de un mortero para posteriormente disolver 86 mg del pulverizado en 10 mL de agua bidestilada con agitación constante durante 15 minutos; posteriormente se realizaron dos centrifugados de la solución a 10,000 rpm por 10 minutos para separar el CPX del excipiente sólido de la tableta.

Una vez obtenida la solución madre, con una concentración de 26 mM, se hicieron diluciones hasta llegar a la concentración con la que se trabajó en el medio de reacción y en el resto de los ensayos.

2.5. Obtención de espectros UV-vis y de emisión de fluorescencia

Para determinar la longitud de onda de la banda de máxima absorción del CPX, se obtuvo su espectro de absorción UV-vis en un intervalo de 200 - 600 nm.

Este valor se estableció en 277 nm y, con base en lo anterior, se estableció la configuración para la obtención del espectro de emisión de fluorescencia del CPX como se muestra en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Condiciones de detección de CPX por espectrofotometría de fluorescencia.

Long. de onda excitación (nm)	Long. de onda emisión (nm)	Slit excitación	Slit emisión	Smoothing
277	450	5	5	15

2.5.1. Curva de calibración

La curva de calibración de CPX se obtuvo por medio de los valores de intensidad de fluorescencia a 450 nm en un rango de concentraciones de 0.8 a 8.6 μM . Los datos experimentales se ajustaron a un modelo lineal y se obtuvo la pendiente de la ecuación de la recta. La pendiente se interpretó como el factor de conversión entre la señal de intensidad experimental y la concentración de CPX para esta técnica.

2.5.2. Degradación enzimática de CPX por CPO

Los ensayos de degradación enzimática fueron monitoreados por espectrofotometría de emisión de fluorescencia durante 10 minutos utilizando las condiciones de detección que se muestran en la tabla 2. 2. El medio de reacción estaba compuesto por 20 mM de KCl, 6.7 μM de CPX, 200 μM de H_2O_2 y 11.5 nM de CPO en amortiguador de fosfatos 60 mM pH 3.

Se monitoreó el cambio en la intensidad de la fluorescencia a 450 nm y el porcentaje de degradación se calculó con la ecuación 3.

Ecuación 3:

$$\% \text{ de degradación} = \left(1 - \frac{C_2}{C_1}\right) * 100$$

Donde:

- C_2 es la concentración de CPX después de 10 minutos de reacción.

- C_1 es la concentración de CPX antes de agregar la enzima.

2.5.2.1. Determinación del efecto del pH y la temperatura sobre la reacción de degradación enzimática

Para los ensayos a diferentes valores de pH se prepararon soluciones amortiguadoras en un rango de pH de 2.5 a 8, sobre las cuales se preparó el medio de reacción, mientras que para el ensayo de temperatura se controló la temperatura de la reacción en un intervalo de 20 a 70 °C a un pH de 4.5. La degradación enzimática se monitoreó a partir del cambio en la intensidad de la emisión de fluorescencia después de 10 minutos empleando la ecuación 3.

En todos los ensayos se realizaron experimentos control sin agregar la enzima para asegurar que los cambios observados fueran atribuidos a la acción de la CPO.

2.5.2.2. Determinación de parámetros cinéticos para el sistema biocatalítico

La determinación de los parámetros cinéticos K_M , $V_{m\acute{a}x}$ y k_{cat} se realizó mediante la construcción de una curva ajustada al modelo no lineal de Michaelis-Menten de acuerdo con las ecuaciones 4 y 5.

Ecuación 4:

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} * [S]}{K_M + [S]}$$

Ecuación 5:

$$k_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E]}$$

Donde:

- V_0 es la velocidad inicial de la reacción enzimática.
- $[S]$ es la concentración de sustrato (H_2O_2).
- $V_{m\acute{a}x}$ es la velocidad máxima de la reacción enzimática.
- K_M es la constante de Michaelis-Menten para la reacción enzimática.
- k_{cat} es la constante catalítica para la reacción enzimática.
- $[E]$ es la concentración total de enzima en el sistema.

Para este ensayo, se fijó la concentración de CPX en el medio de reacción ($6.7 \mu M$) y se varió la concentración del sustrato H_2O_2 en un rango de 0.2 a $400 \mu M$. La reacción fue monitoreada por fluorescencia a 450 nm durante 10 minutos y el cambio en la pendiente fue interpretado como la velocidad inicial para cada concentración de H_2O_2 . Los resultados se ajustaron al modelo no lineal de Michaelis-Menten utilizando el programa Origin Pro Versión 2024.

2.6. Extracción de productos de reacción enzimática por SPE

La extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) del CPX transformado por biocatálisis se llevó a cabo con el uso de cartuchos Strata-X 33u (60 mg/3 mL, 1000/pk) de fase reversa polimérica de la marca Phenomenex con un flujo de 1.6 mL/min.

Para la etapa de acondicionamiento de los cartuchos, se utilizaron 3 mL de metanol seguidos de 5 mL de agua bidestilada siguiendo la metodología propuesta por Zhou & Jiang (2012); luego se hizo pasar el medio de reacción CPX-CPO (1 L) y finalmente se aplicó vacío por 5 minutos para eliminar restos de humedad.

Posteriormente se realizó la elusión de los compuestos retenidos en el cartucho SPE con 5 mL de una solución de metanol y acetonitrilo (1:1 v/v %) y 2.17 mM de ácido trifluoroacético, seguidos de 5 mL de una solución de metanol a la cual se le añadió un volumen de una solución de KOH para llegar a una concentración de 75 mM.

Una vez eluidos, los solventes fueron evaporados empleando corriente suave de nitrógeno hasta completa sequedad. Con los compuestos finales obtenidos se preparó una solución de 10000 ppm en agua bidestilada.

2.7. Pruebas de toxicidad

Las pruebas de toxicidad se realizaron usando quistes de *Artemia salina* como organismo modelo. Los quistes de *A. salina* fueron adquiridos de White Mountain (extraídos del Gran Lago Salado de Utah) los cuales se eclosionaron de acuerdo con la metodología propuesta por el fabricante. Brevemente, se colocaron quistes en un recipiente de forma cilíndrica-cónica con aireación e iluminación fuertes y una salinidad de 29.9 g/L durante 24 horas. Después de este tiempo, los nauplios en etapa Instar I fueron separados de los quistes no eclosionados por fototropismo positivo.

Posteriormente el ensayo se llevó a cabo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos en la que se colocaron 10 nauplios en promedio en cada pocillo. Tanto para el CPX como para el CPX transformado por biocatálisis se utilizaron soluciones de prueba en concentraciones de 100 a 1000 ppm. De igual manera se utilizó un control positivo de $K_2Cr_2O_7$ en un rango de concentraciones de 1.25 a 120 ppm y un control negativo de agua salina 15 g/L. Todas las soluciones tenían una salinidad de 15 g/L. Se realizaron 4 réplicas para cada concentración de las soluciones de prueba, control positivo y control negativo. Todo el ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente.

La toxicidad de las soluciones de prueba se determinó en función del porcentaje de mortalidad de los nauplios después de 24 y 48 horas. La LC_{50} se calculó con el análisis estadístico de unidades Probit.

2.8. Biodegradabilidad

El índice de biodegradabilidad se determinó empleando la metodología propuesta por la norma OCDE 301 D. Para ello, la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) se determinó de manera indirecta al medir el consumo de oxígeno disuelto con el método Winkler modificado de azida en botellas de 300 mL durante 28 días. Por su parte, la Demanda Química de Oxígeno (DQO) se determinó empleando el Kit para celdas DQO de la marca Hanna Instruments.

Para estos ensayos las soluciones de prueba se construyeron siguiendo la metodología OCDE 301 D con concentraciones de 2 ppm tanto para el CPX como para el CPX modificado por biocatálisis. Finalmente, la DBO y el Índice de Biodegradabilidad se determinó mediante las ecuaciones 6 y 7.

Ecuación 6:

$$DBO = \frac{\text{consumo } \frac{mgO_2}{L} \text{ de la sustancia de prueba} - \text{consumo } \frac{mgO_2}{L} \text{ del blanco}}{mg \text{ de la sustancia de prueba en la botella}}$$

$$= \frac{mgO_2}{mg} \text{ de la sustancia de prueba}$$

Ecuación 7:

$$\text{índice de biodegradabilidad} = \frac{DBO \left(\frac{mgO_2}{L} \text{ de la sustancia de prueba} \right)}{DQO \left(\frac{mgO_2}{L} \text{ de la sustancia de prueba} \right)}$$

Donde:

- DBO es la demanda bioquímica de oxígeno experimental.
- DQO es la demanda química de oxígeno experimental.

2.9. Evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana del CPX antes y después de la transformación enzimática por CPO se determinó empleando una cepa tipo ATCC1 (American Type Culture Collection) de *Escherichia coli* como organismo modelo dado que diversos autores (De Bel et al., 2009; De Witte et al., 2010; Porras et al., 2016; Prieto et al., 2011) reportan su uso en experimentos de susceptibilidad con CPX.

El ensayo se llevó a cabo con un cultivo previamente ajustado a 0.5 en el estándar de turbidez de McFarland para lo cual se tomaron de 1 a 2 colonias de un cultivo aislado y purificado y se disolvieron en un tubo de ensayo hasta llegar a la turbidez

correspondiente. Posteriormente se realizó un sembrado masivo con isopo en placas de agar Müller-Hinton y se colocaron 3 sensidiscos humedecidos con las soluciones de prueba más un sensidisco humedecido con agua bidestilada estéril como control negativo. Las concentraciones utilizadas para estos ensayos fueron de 0.1 a 6 ppm.

Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas y posteriormente se midió el diámetro de los halos de inhibición para ambas sustancias de prueba y los datos experimentales fueron tratados para obtener el promedio y la desviación estándar.

Capítulo 3. Resultados y discusión

Dado que en este proyecto se partió del análisis de un compuesto farmacéutico comercial de CPX (Ciprobac 500 mg), y no de un estándar puro, fue necesario realizar su comparación con los espectros característicos UV-Vis y de emisión de fluorescencia para CPX reportados en la literatura.

3.1. Comparación de los espectros de absorción electrónica y de fluorescencia

En la figura 3.1 se muestra el espectro de absorción UV-Vis del CPX. Se puede observar que éste presenta tres bandas de absorción características con máximos alrededor de los 277 nm, 316 nm y 331 nm, los cuales coinciden con los reportados por diversos autores (Rajja et al., 2015; Naveed & Waheed, 2014; Zhou & Jiang, 2012; El-Kemary et al., 2010; Tozar et al., 2021), al no observarse ninguna otra banda adicional, podemos concluir que el compuesto comercial no contiene ningún otro compuesto que pudiera interferir con los ensayos posteriores.

El espectro de absorción electrónica permitió seleccionar la longitud de onda de excitación para el monitoreo del CPX por espectroscopía de emisión de fluorescencia.

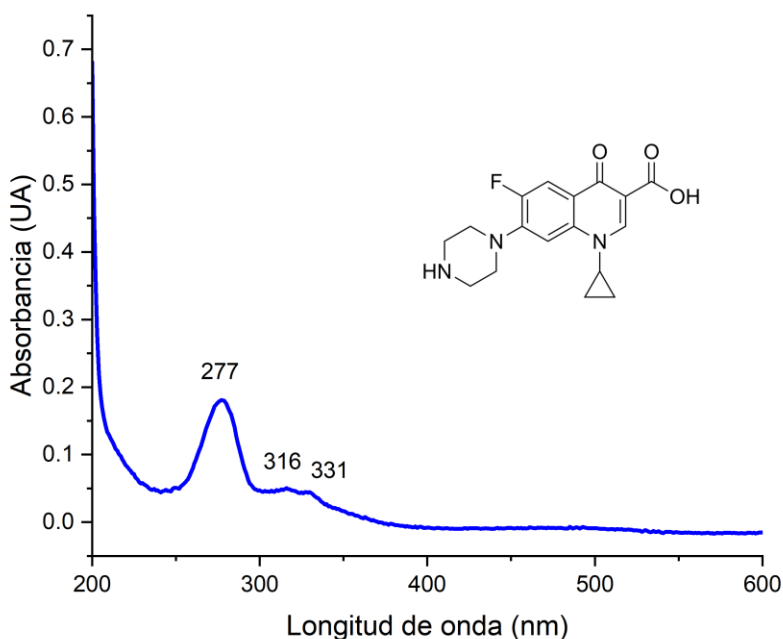


Figura 3.1. Espectro de absorción UV-Vis experimental obtenido para CPX a partir de un fármaco comercial.

En la figura 3.2. se muestra el espectro de emisión de fluorescencia del CPX obtenido excitando al antibiótico a 277 nm; puede observarse que la banda de emisión de

fluorescencia presenta un máximo alrededor de los 450 nm, valor que coincide con lo reportado por San Martín et al. (2001) y El-Kemary et al. (2010). Posteriormente, se obtuvo la curva de calibración y los ensayos de degradación de CPX por la enzima CPO monitoreando la intensidad de la fluorescencia a esta longitud de onda.

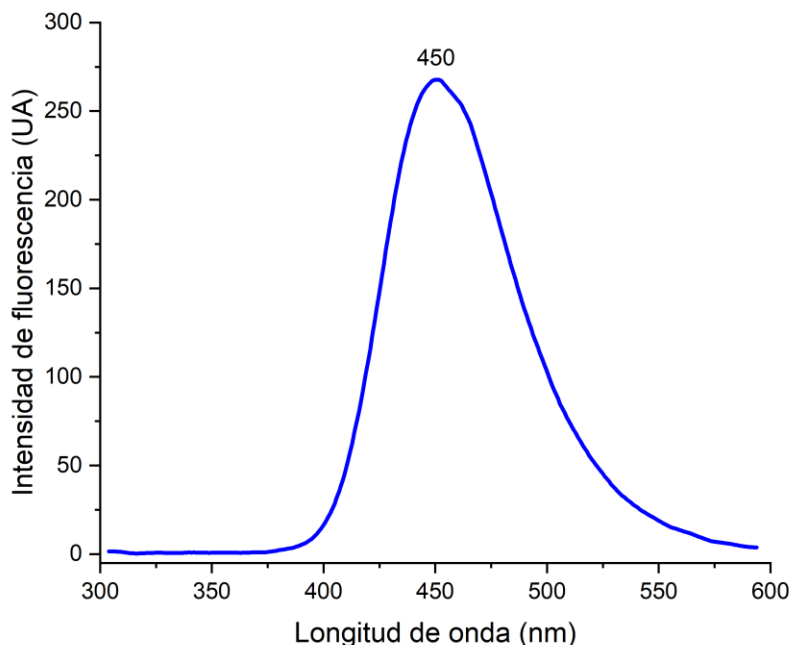


Figura 3.2. Espectro de emisión de fluorescencia para CPX obtenido con excitación a 277 nm.

3.2. Curva de calibración para CPX

Antes de llevar a cabo los ensayos de reacción, se construyó una curva de calibración para establecer el rango de concentración del antibiótico en el cual se tenga una relación lineal con la intensidad de la señal de fluorescencia. Para con ello poder transformar los datos de intensidad de luz en concentración.

En la figura 3.3 se presenta la curva de calibración obtenida por espectrofotometría de emisión de fluorescencia a 450 nm para CPX. Se puede observar que el ajuste fue de buena calidad al presentar un coeficiente de correlación de 0.9889, con un rango lineal de 0.8 a 8.6 μM .

Los parámetros obtenidos de la regresión lineal de los datos experimentales se muestran en la tabla 3.1.

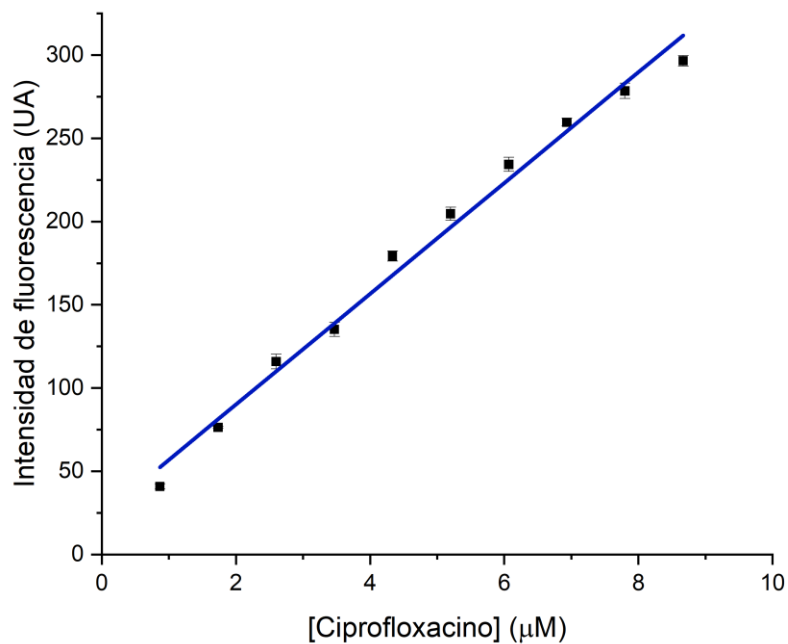


Figura 3.3. Curva de calibración para CPX obtenida mediante espectrofotometría de emisión de fluorescencia a 450 nm.

Tabla 3.1. Parámetros de la linealización de la curva de calibración.

$\lambda_{\text{máx}}$ (emisión)	450 nm
Ecuación de regresión lineal	$y = 33.26538x + 23.56062$
Coefficiente de correlación (R^2)	0.9889

3.3. Evaluación del efecto del pH y la temperatura sobre la degradación de CPX por CPO

Se realizaron pruebas preliminares para evaluar el efecto del pH y la temperatura en la degradación enzimática de CPX de acuerdo con las condiciones reportadas en el apartado 2.5.2.1.

En las figuras 3.4 y 3.5 se presentan los resultados para estos ensayos después de 10 minutos de reacción enzimática.

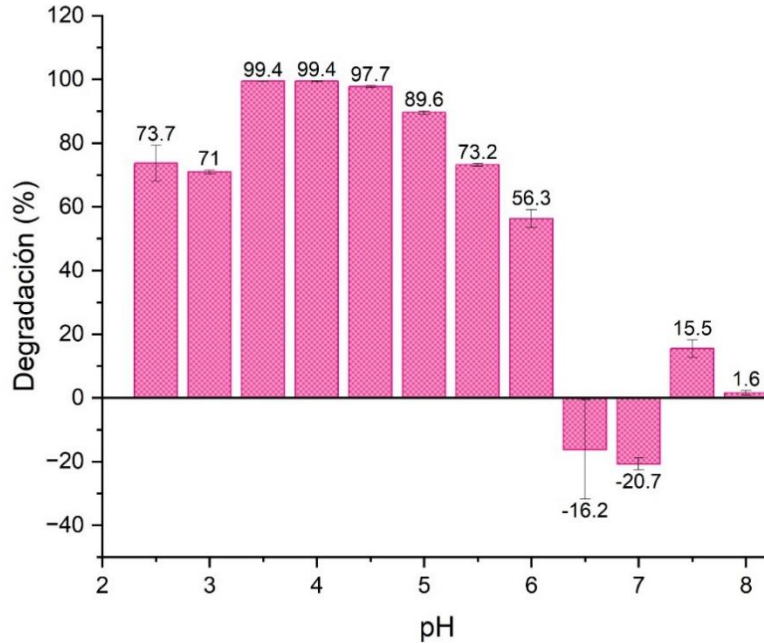


Figura 3.4. Efecto del pH en la degradación de CPX por CPO a temperatura ambiente.

En la figura 3.4 se muestra el efecto del pH en la degradación de CPX por CPO, alcanzado el mayor porcentaje de degradación a pH 3.5 y 4.0 con 99.4% para ambos casos. Este resultado coincide con los obtenidos por otros autores que han estudiado la degradación del CPX por técnicas como ozonización y fotocatalisis y concluyen que su degradación es dependiente del pH (De Witte et al., 2010; El-Kemary et al., 2010) . Lo anterior podría deberse a que autores como Haslam et al., (2011) y Landersdorfer et al. (2010) han mencionado que el CPX existe bajo su forma neutra o switteriónica a valores de pH cercanos a 7 mientras que a valores de pH menores a 6 tiene un cambio en su estructura hacia su forma catiónica como se observa en la figura 1.2 del apartado 1.3.1.

El-Kemary et al. (2010) menciona que la molécula de CPX es más estable a valores de pH ácidos (pH 4) donde el grupo carboxilo no se encuentra ionizado y el nitrógeno está completamente protonado, es decir, valores de pH en los cuales la molécula del ciprofloxacino tiene una menor probabilidad de sufrir cambios en su estructura como se observa en la figura 3.5.; sin embargo, como puede observarse, la conversión es máxima, lo que indica que estas condiciones de pH son más favorables para que la enzima alcance su mejor desempeño sin importar el estado de ionización del CPX. Trabajos previos han encontrado que el pH óptimo de la CPO es 3 para oxidar otros compuesto farmacéuticos; el hecho de que la enzima pueda catalizar la reacción a pH de 6 y mayores proporciona una ventaja técnica ya que la mayoría de los efluentes contaminados tienen un pH neutro.

De manera análoga, en la figura 3.6. puede observarse el efecto de la temperatura en el porcentaje de degradación de CPX. El mayor porcentaje de degradación se presentó en un intervalo de entre 20 a 30 °C. Este resultado indica que la reacción de degradación enzimática del CPX con CPO puede llevarse a cabo en un intervalo frecuentemente encontrado en los efluentes contaminados con este tipo de microcontaminantes. Algunos autores han reportado que el CPX es inestable a temperaturas superiores a los 60° C y que incluso puede degradarse sólo por efecto del calor (Liao et al., 2016; Rajia et al., 2015); sin embargo, el gasto energético que implica degradar CPX sólo con calor hace que no sea una opción viable debido a que se requiere una gran cantidad de energía por un tiempo prolongado.

Por otro lado, puede observarse que para valores de pH de 6.5 y 7 y a temperaturas superiores a los 45 °C se obtienen porcentajes de degradación negativos después de 10 minutos de reacción. Esto puede deberse a la posible formación de productos de degradación que emitirían fluorescencia a la misma longitud de onda que el CPX, lo que contribuiría a la señal observada por emisión de fluorescencia, lo anterior no implica que la reacción no sea viable bajo estas condiciones, sino que el monitoreo de la reacción de degradación de CPX por CPO utilizando espectrofotometría de emisión de fluorescencia podría no ser la mejor opción.

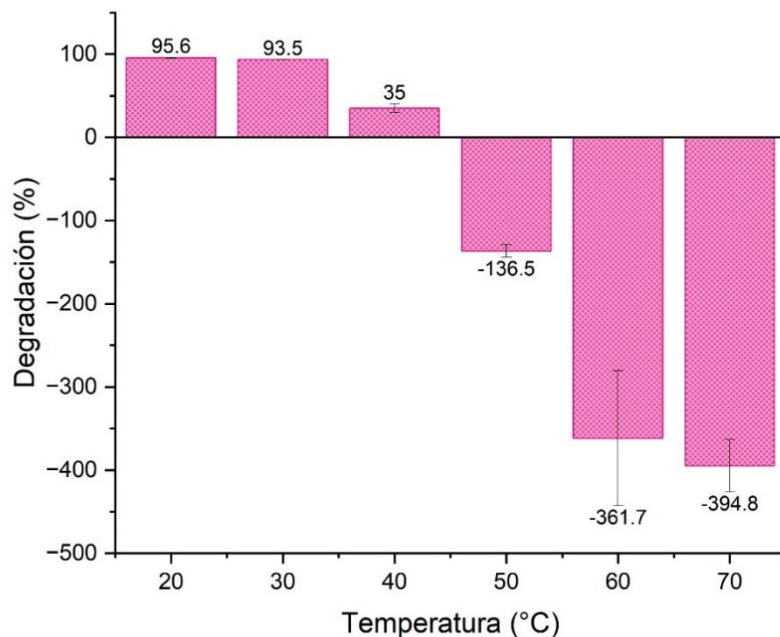


Figura 3.6. Efecto de la temperatura en la degradación de CPX por CPO obtenida a pH 4.5.

3.4. Degradación enzimática de CPX por CPO

Los ensayos de evaluación del efecto del pH en la reacción de degradación de CPX por CPO demostraron que la enzima tiene capacidad catalítica para oxidar al fármaco reduciendo su concentración en un mínimo de 56.3% a pH 6 y un máximo de 99.4% a valores de pH de 3.5 y 4.

En la figura 3.7. puede observarse la disminución en la intensidad de la emisión de fluorescencia del CPX después del tratamiento con CPO a pH 4 mientras que, en la figura 3.8. se muestran las cinéticas de la degradación a valores de pH de 4 y 3, en donde se observa que a pH 3 la reacción tiene una cinética de pseudo primer orden y llega a su máximo de degradación en un periodo de tiempo de 10 minutos mientras que a pH 4 la concentración de CPX se reduce casi en su totalidad en el primer minuto de la reacción. A partir de estos valores es posible calcular la velocidad inicial de la reacción, es decir, durante el primer minuto de reacción, a pH 4 y 3 para la que se obtuvieron valores preliminares de $7.425 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ y $0.857 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ respectivamente.

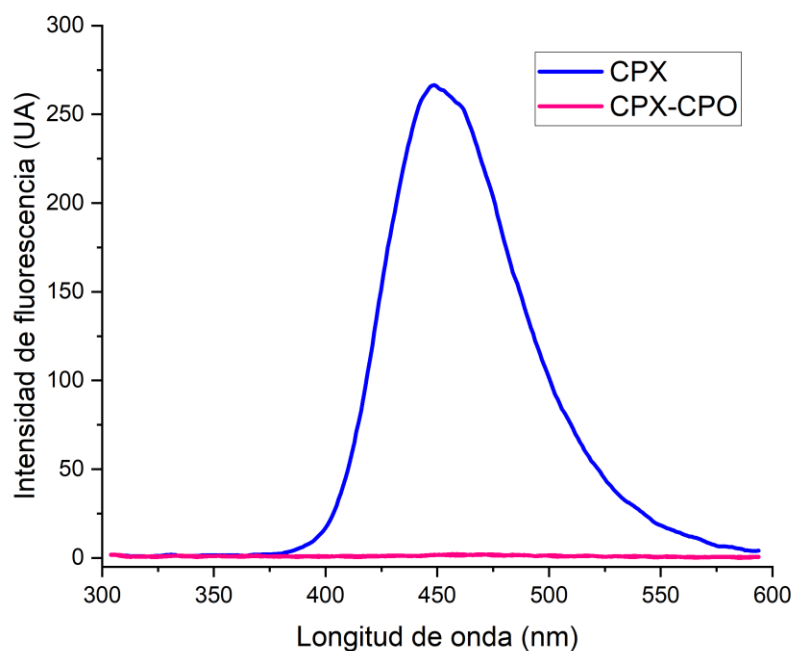


Figura 3.7. Espectro de emisión de fluorescencia para CPX (azul) y CPX transformado por biocatálisis (rosa).

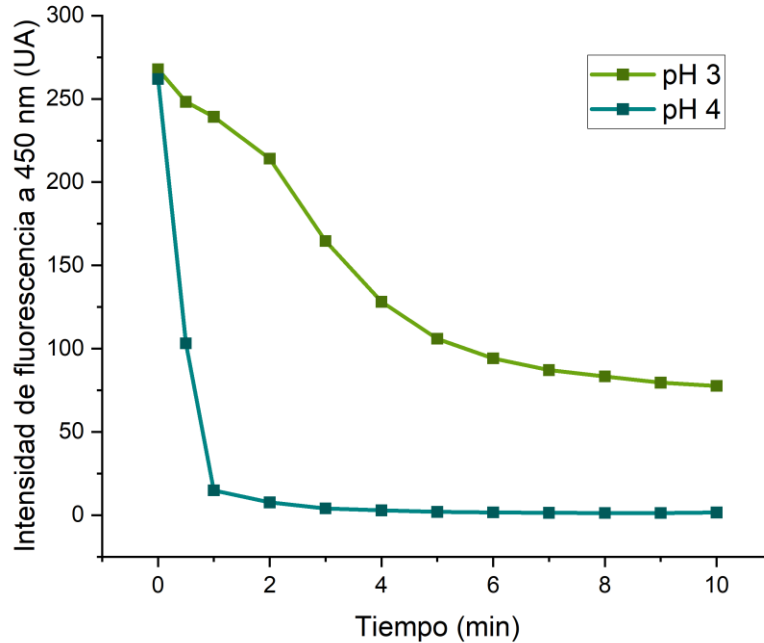


Figura 3.8. Cinética de degradación de CPX mediante CPO a pH 4 (azul) y pH 3 (verde).

Diversos autores han reportado la degradación del CPX por técnicas tanto fisicoquímicas como biológicas. En la tabla 3.2 se encuentran enlistadas algunas metodologías empleadas, condiciones de operación, porcentajes y tiempos de degradación.

Es importante recalcar que, si bien muchos autores logran una casi completa degradación de la molécula, los tiempos de reacción superan casi siempre los 30 minutos, lo cual (dependiendo de la metodología y los recursos que ésta precise) podría resultar inconveniente debido a que un aumento en el tiempo de reacción podría fácilmente verse reflejado en un aumento en el costo del proceso. De igual manera, la eficiencia de reacción de algunas de estas metodologías es dependiente también de la concentración inicial del CPX, por lo que la cantidad de CPX que pueda ser degradada a lo largo del tiempo se ve reducida entre más largo sea el tiempo de reacción.

Tabla 3.2. Degradación de CPX por distintas metodologías.

Degradación	Tiempo de reacción	Metodología basada en:	Condiciones generales de operación	Referencia
18%	60 minutos	Fotocatálisis empleando nanopartículas de Zn	pH 7, 20 mg/L partículas de ZnO, 5 mg/L de CPX y radiación ultravioleta a 365	El-Kemary et al. (2010)

			nm en intervalos de tiempo	
90%	25 minutos	Oxidación mediante fenton homogéneo	pH 5, relación molar de H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ de 4 y 56 mM de CPX	Salari et al. (2018)
81±16%	3 días	Biodegradación en biorreactor anaeróbico de cama estructurada	Temperatura 30° C, recirculación constante de efluente,	Carneiro et al. (2019)
81±15%	3 días	Biodegradación en biorreactor anaeróbico de cama empacada	alimentación continua, flujo ascendente, tiempo de retención hidráulica de 12 horas y condiciones mesofílicas	Carneiro et al. (2019)
98.3%	60 minutos	Fotocatálisis con luz solar impulsada por una película TiO ₂ /Ti asistida con polivinil alcohol y peroximonosulfato	Luz solar simulada con una lámpara de Xenón de 300 W filtrada con un filtro global de masa de aire 1.5 y un filtro FSQ-KG5	Sayed et al. (2018)
>90%	7 días	Biodegradación mediante <i>Trametes versicolor</i>	Temperatura 30° C, agitación orbital a 150 rpm, 2 mg/L de CPX, medio de extracto de malta al 2% y 5 g de pellets humedecidos de <i>T. versicolor</i>	Prieto et al. (2011)
97.7%	30 horas	Biodegradación mediante la enzima lacasa de <i>Trametes versicolor</i> en adición del mediador de lacasa 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sul-ácido fóónico	Solución lacasa con actividad enzimática 1000 nkat/mL, pH 4.5, temperatura 30° C, 10 mg/L de CPX y agitación orbital a 150 rpm	Prieto et al. (2011)

95%	42 minutos	Ozonización	Ozonización en columna de burbujeo, pH 7, temperatura 27° C, 15 mg/L de CPX, concentración de ozono 2500 ppm en aire seco y flujo de 120 mL/min	De Witte et al. (2010)
99%	10 minutos	Oxidación mediante sonoquímica utilizando nanopartículas de ZnO y persulfato	pH 7, frecuencia a 60 KHz, 25 mg/L de CPX y 476.06 de persulfato	Igwegbe et al., (2020)
75%	10 horas	Fotocatálisis en presencia de sustancias húmicas	Irradiaciones policromáticas en longitudes de onda de 300 a 450 nm en un reactor con 20 mL de una solución de CPX con aire saturado y temperatura de 25° C	Porras et al. (2016)

Otros autores han reportado valores de degradación superiores al 90% (De Witte et al., 2010; Igwegbe et al., 2020; Porras et al., 2016), no obstante, las condiciones bajo las que llevan a cabo la reacción incluyen valores de pH superiores a 6 por lo que no puede llevarse a cabo una comparación directa debido a que, en este trabajo, las conclusiones acerca de la degradación de CPX mediante CPO a valores de pH superiores a 6 permanecen inciertas.

Por otra parte, en cuanto a lo que corresponde a métodos biológicos para la degradación del CPX, estos reportan tiempos de degradación que pueden variar entre 1 día y 4 semanas (Carneiro et al., 2019; Prieto et al., 2011), lo cual se traduce en una alta demanda de recursos para el mantenimiento de los sistemas que impliquen utilizar células completas.

En un intento por reducir el tiempo de tratamiento biológico, Prieto et al. (2011) reportó la identificación de la enzima lacasa de *T. versicolor* implicada en la degradación del CPX y reducir así el tiempo de degradación de 7 días a 30 horas bajo condiciones controladas de laboratorio que se muestran en la tabla 3.2, sin embargo, continúa siendo un tiempo de degradación muy prolongado.

Además, es importante recalcar que en las metodologías antes mencionadas se evalúa la degradación del CPX en función de la disminución de la concentración de este y, si bien la mayoría de ellos (De Witte et al., 2010; El-Kemary et al., 2010; Porras et al., 2016; Prieto et al., 2011; Salari et al., 2018; Sayed et al., 2018) hacen un esfuerzo por predecir los productos de degradación, la eficiencia de la degradación del CPX debe considerar también la toxicidad, biodegradabilidad y, sobre todo, actividad antimicrobiana de los mismos.

3.5. Determinación de parámetros cinéticos para la degradación de CPX por CPO

El comportamiento de la reacción enzimática es también una manera de analizar la eficacia de la degradación del CPX por CPO y se define por una serie de parámetros cinéticos. Estos parámetros cinéticos pueden determinarse por medio del modelo de Michaelis-Menten que explica el comportamiento de una enzima (Srinivasan, 2022).

En la figura 3.9 se muestra la gráfica obtenida de los datos experimentales de velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato (H_2O_2), los cuales fueron ajustados al modelo de Michaelis-Menten con ayuda del programa Origin 2024. En esta podemos observar que a muy bajas concentraciones de sustrato, la velocidad es proporcional a la concentración del mismo, mostrando en este punto un comportamiento de primer orden, mientras que, a concentraciones muy altas de sustrato, la gráfica muestra un comportamiento de orden cero, en el que el cambio en la velocidad de reacción respecto a la concentración de sustrato es prácticamente insignificante; además, entre ambas zonas se presenta una zona de pseudo primer orden. Esto indica que el comportamiento de la enzima obedece una cinética de Michaelis-Menten (Srinivasan, 2022).

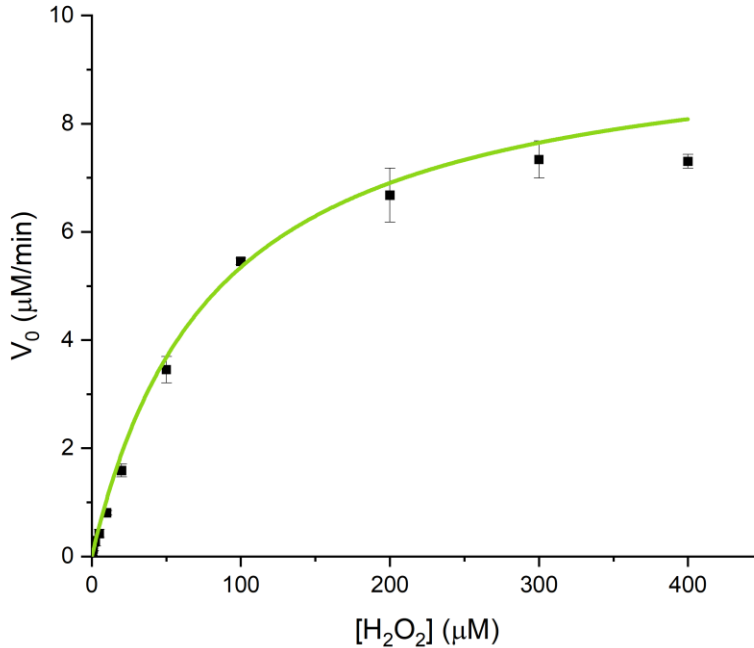


Figura 3.9. Curva de Michaelis-Menten para CPO en degradación de CPX utilizando H₂O₂ como sustrato.

Ahora bien, en cuanto a los parámetros cinéticos que definen el comportamiento de la CPO en la reacción de degradación de CPX, estos se encuentran en la tabla 3.3.

La velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$), se determinó en 9.7498 min^{-1} e indica el punto de saturación de la enzima cuando todos los sitios activos están ocupados por moléculas de sustrato (León Aguirre, 2015) que en este caso es H₂O₂.

En esta misma línea, se determinaron también las constantes cinéticas que ayudan a analizar la eficiencia catalítica como la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la constante catalítica (k_{cat}).

La constante de Michaelis-Menten, que representa la relación entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato a la cuál esta velocidad es igual a la mitad de la velocidad máxima y que, por lo general, se calcula sobre la zona de pseudo primer orden, es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato (Segel, 1976). La K_M para este sistema dio como resultado $82.4260 \mu\text{M}$; por otro lado, la k_{cat} , que representa la tasa de conversión de sustrato a producto, se determinó en $847.8104 \text{ min}^{-1}$ y el cociente de estas dos constantes dio como resultado un valor de $10.28571 \text{ min}^{-1}$ el cual es conocido como constante de especificidad.

León Aguirre (2015) reporta valores de $V_{m\acute{a}x}$ que van desde los 242.5 min^{-1} hasta los $10717.21 \text{ min}^{-1}$ para la degradación de diversos fármacos utilizando la misma enzima. Esto

podría indicar que, el sistema de catálisis de CPX por CPO se desempeña por debajo del rango reportado para otros fármacos, lo que sugiere que el compuesto es de mayor recalcitrancia que otros con los que se alcanzan valores mayores.

Comparando los resultados con los obtenidos por otros autores en la degradación de compuestos utilizando la enzima cloroperoxidasa de *L. fumago*, Romero-Balboa (2024) reporta valores de K_M de 1.1498, 0.0377 y 0.0789 μM en la biocatálisis de albendazol, cloroquina e hidroxiclороquina respectivamente mientras que, León Aguirre (2015) reporta valores de K_M que van desde 0.0645 mM hasta 1.39522 mM en la degradación de fármacos como diclofenaco y ketorolaco y antibióticos como ambroxol, sulfametoxazol, tetraciclina y oxitetraciclina. Por otra parte, Hernandez et al. (1998) reporta un valor de k_{cat} de 1 080 min^{-1} para la degradación de paratión mientras que Romero-Balboa (2024) reporta valores para la misma constante de 25×10^3 , 9×10^3 y 200 min^{-1} en la degradación de albendazol, cloroquina e hidroxiclороquina respectivamente. Con respecto a la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) Romero-Balboa (2024) reporta valores bastante más altos de hasta 259×10^3 ($\mu\text{M} \cdot \text{min}$) $^{-1}$ debido a que los valores de K_M obtenidos en su trabajo son mucho menores lo que indica que se tiene una mayor especificidad de la enzima cloroperoxidasa por el sustrato H_2O_2 para el sistema catalítico en la degradación de CPX.

Así, si bien los valores de las constantes cinéticas reportados en este trabajo son menores a los reportados por otros autores para la misma enzima en degradación de diferentes compuestos esto puede deberse a la complejidad de la molécula de CPX que le confieren sus anillos aromáticos.

Tabla 3.3 Parámetros cinéticos de la degradación de CPX por CPO.

$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M} \cdot \text{min}$) $^{-1}$
9.7498	82.4260	847.8104	10.2857

3.6. Extracción de productos de reacción enzimática por SPE

Para la evaluación de la toxicidad, biodegradabilidad y actividad antimicrobiana residual se obtuvieron los productos de la reacción de biocatálisis del CPX por CPO mediante SPE. Para tener suficiente material, se preparó 1 L del medio de reacción que se describe

en el apartado 2.5.2 y, como puede apreciarse en la figura 3.10, la reacción se tornó ligeramente amarillenta casi inmediatamente después de agregar la enzima (figura 3.10).

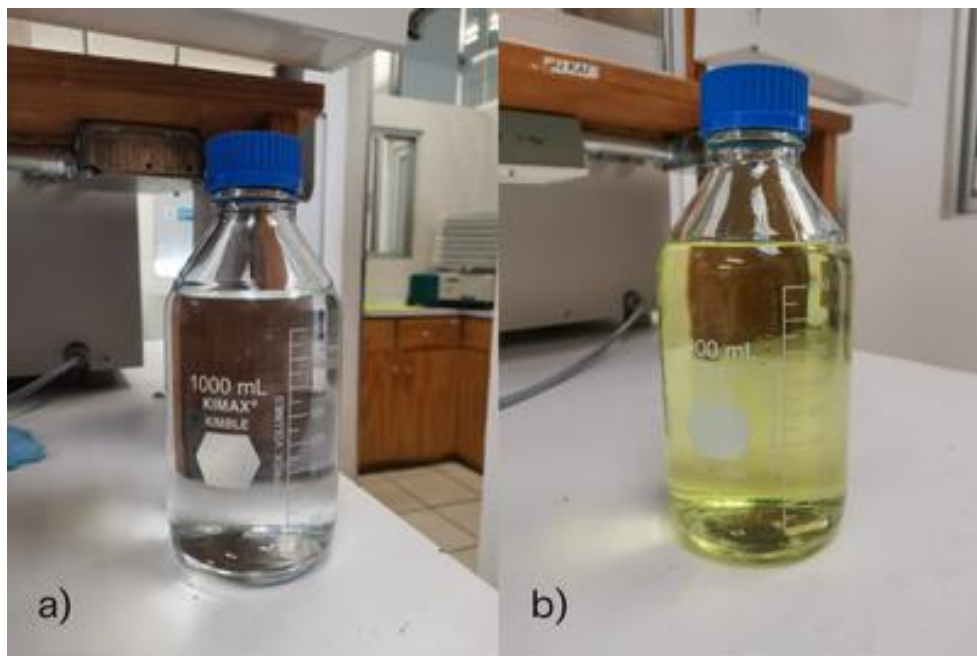


Figura 3.10. Reacción antes (a) y después (b) de añadir la enzima CPO en una concentración de 11.5 nM.

En la figura 3.11 se muestra el proceso de extracción de los productos de degradación y en el inciso d) de la misma figura se observa la retención de estos en el cartucho antes de la elución. Después de la elución y el secado, pudieron obtenerse 76 mg de la mezcla de posibles productos los cuales se disolvieron en agua bidestilada para construir una solución de 10000 ppm a partir de la cual se realizaron diluciones para la obtención de soluciones a diferentes concentraciones necesarias para llevar a cabo las pruebas de biodegradabilidad, toxicidad y sensibilidad microbiana.

Aun cuando no puede definirse por completo la cantidad y naturaleza de las moléculas retenidas, puede observarse que, por la cantidad de anillos formados en el cartucho, muy probablemente existen al menos dos productos de degradación; sin embargo, esta afirmación deberá de confirmarse empleando técnicas de análisis específicas para ello como la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

Comparando estos resultados con los reportados en la literatura por otros autores que proponen diferentes técnicas para la degradación de CPX, Liao et al. (2016) y Prieto et al. (2011) reportan hasta 4 posibles intermediarios y productos de la biodegradación de CPX identificados por medio de espectrometría de masas, sin embargo, poco se habla de la naturaleza de dichos productos. Por su parte, Sayed et al. (2018) reporta hasta 12 posibles productos de la degradación de CPX por fotocatalisis, los cuales fueron

identificados también por espectrometría de masas de los cuales 5 mostraron cierta toxicidad y 3 de ellos eran incluso más tóxicos que el CPX mismo.

Un mayor número de productos de reacción puede verse fácilmente reflejado en un aumento de la probabilidad de que alguno de ellos resulte ser más tóxico que el precursor y un aumento en el costo y la complejidad del estudio de cada uno de ellos, por lo que conocer el número de los productos de una degradación es tan importante como conocer la naturaleza de ellos.

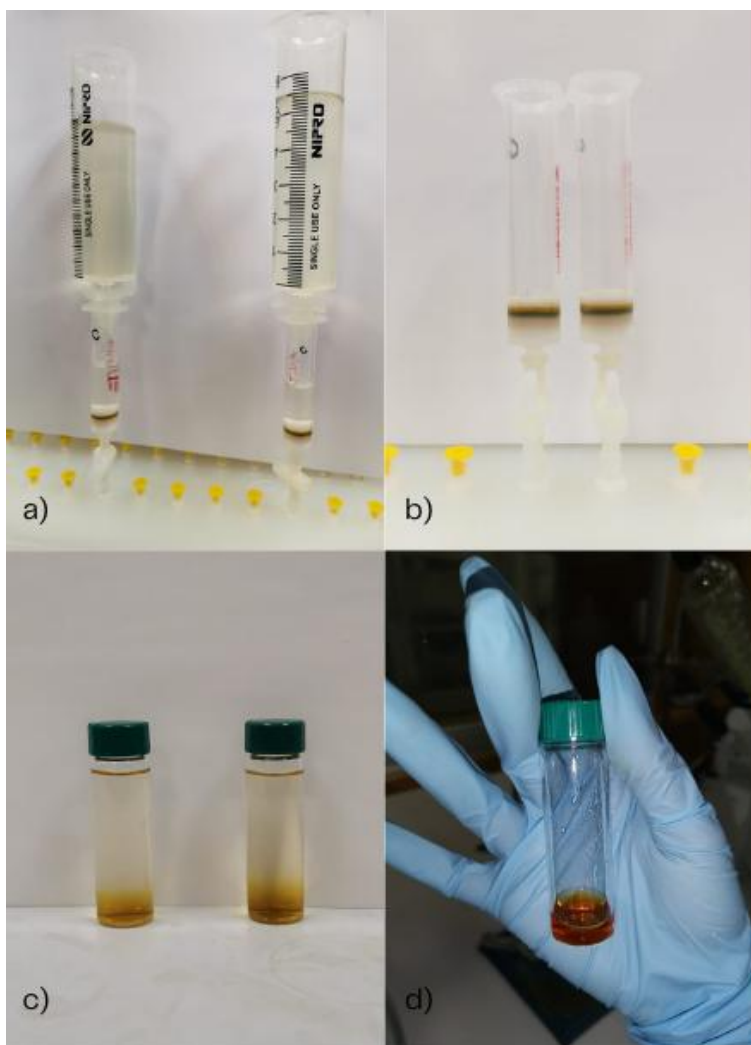


Figura 3.11. Extracción de productos de reacción: a) sistema SPE durante la filtración, b) productos de reacción retenidos en cartuchos Strata X, c) productos de reacción recuperados de la elución, d) productos de reacción parcialmente secados.

3.7. Pruebas de toxicidad para el CPX y el CPX transformado por biocatálisis

La toxicidad tanto del CPX antes y después de la degradación enzimática se determinó utilizando nauplios en etapa Instar 1 de *A. salina* como se menciona en el apartado 2.5.3.1. En la figura 3.12 se muestra un ejemplo de la diferenciación entre individuos de

A. salina en etapa Instar 1 (verde) e individuos de *A. salina* que aún se encuentran en el proceso de eclosión o bien no han aún eclosionado (rojo).

El control negativo mostró una mortalidad menor al 5% lo que indica que los efectos observados durante los ensayos de toxicidad agua se deben únicamente a la presencia de las sustancias de prueba (CPX antes y después de la transformación enzimática), de manera que no hay interferencias por parte de otras variables como podrían ser la temperatura, el pH y la salinidad. Por otro lado, el control positivo de $K_2Cr_2O_7$ permitió calcular una LC_{50} de 9.77 ppm a 24 horas de exposición, lo que demuestra sensibilidad y respuesta por parte del organismo de prueba de acuerdo con lo sugerido por Tapia-Salazar et al., (2022).

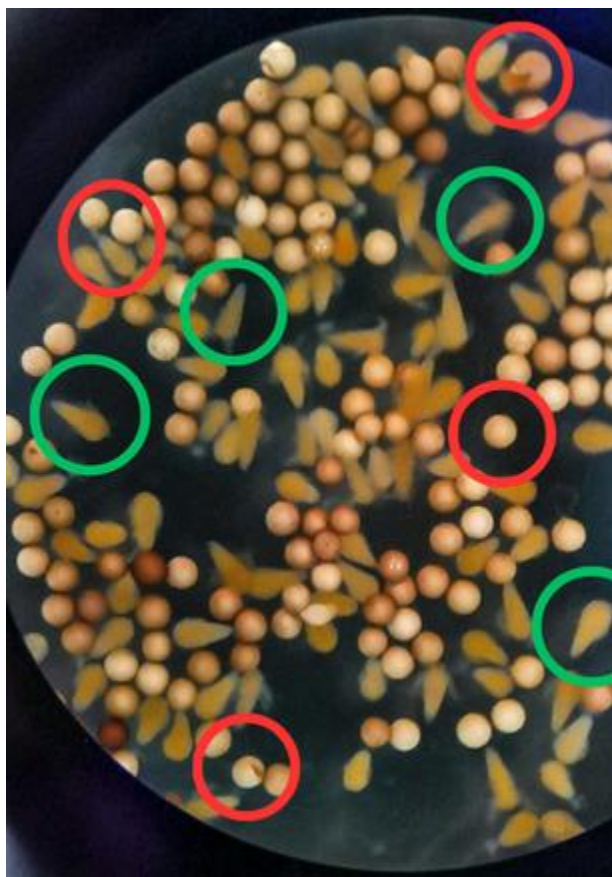


Figura 3.12. *Artemia salina* en diferentes etapas de su ciclo de vida: organismos en etapa Instar I (verde) y en proceso de eclosión (rojo).

La LC_{50} para el CPX fue establecida en 619.23 ppm y 557.1 ppm para 24 y 48 horas de exposición respectivamente, mientras que para la mezcla de productos de reacción no se observó toxicidad en la ventana de concentración ensayada. Aun cuando sería ideal probar la toxicidad del CPX transformado por biocatálisis a concentraciones mayores, por ahora, a concentraciones a las que el CPX muestra mortalidad del 100%, ésta se redujo en su totalidad tras el tratamiento enzimático con CPO.

El valor de LC_{50} hallado para CPX en este ensayo es mayor que lo reportado por Iannacone & Alvareño (2009) quienes reportan una LC_{50} de 230.6 ppm empleando *D. magna* como organismo modelo, tras 96 horas de exposición; esto podría indicar que *D. magna* es más sensible que *A. salina* a la exposición de CPX, aunque no puede hacerse una comparación directa debido a la diferencia en el tiempo de exposición de ambas pruebas. Por su parte, Tapia-Salazar et al. (2022) utilizó *A. salina* para probar la toxicidad de diversos contaminantes emergentes como benzofenona (TBBPA), con valores de LC_{50} en el rango de 17 hasta 164.9 ppm, lo que indica que la sensibilidad de *A. salina* es mayor para la exposición a estos contaminantes que para la exposición a CPX, o que la toxicidad de esos fármacos es mayor que la de CPX.

En la figura 3.13. se muestran las curvas sigmoidales de dosis-respuesta para el CPX y el CPX transformado por biocatálisis.

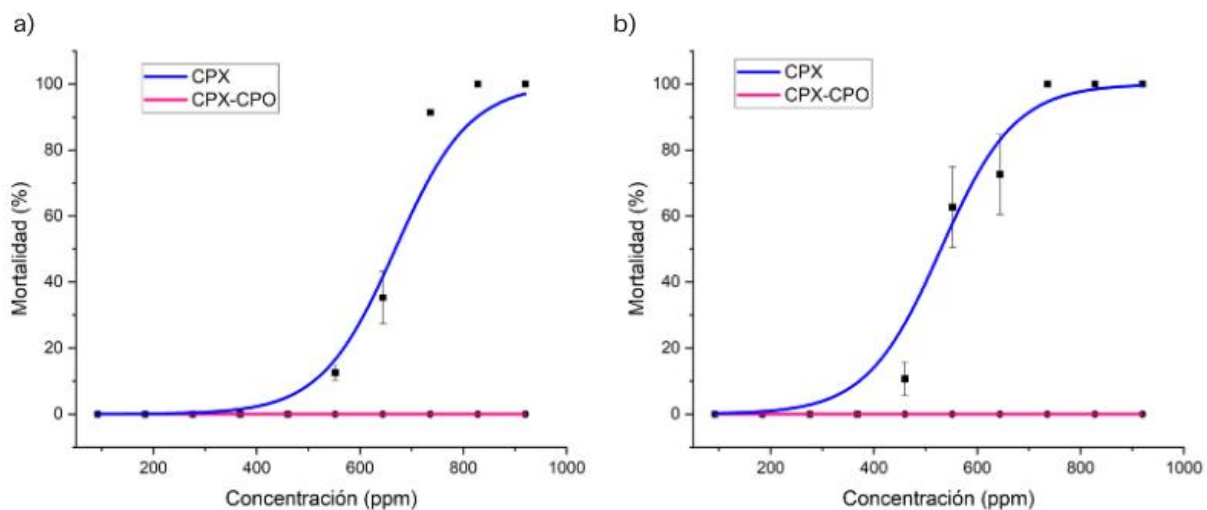


Figura 3.13. Curvas dosis-respuesta para CPX (azul) y CPX transformado por biocatálisis (rosa): a) 24 horas, b) 48 horas.

3.8. Determinación de la biodegradabilidad para CPX y CPX transformado por biocatálisis

Debido a que los tratamientos enzimáticos por sí solos no logran la mineralización completa de los compuestos, se realizaron pruebas de biodegradabilidad para comprobar que el CPX transformado por biocatálisis fuera más biodegradable que el CPX sin transformar. Para esto, se determinó el índice de biodegradabilidad para ambos compuestos en función de la DBO y la DQO.

Tabla 3.4. Resultados de biodegradabilidad para CPX y CPX transformado por biocatálisis.

Sustancia de prueba	DBO (mgO ₂ /L)	DQO (mgO ₂ /L)	Índice de biodegradabilidad
CPX	1.33	19	0.07
CPX transformado por biocatálisis	11.33	18	0.62

En la tabla 3.4. se muestran los resultados obtenidos tras 28 días de prueba en la que puede observarse que el índice de biodegradabilidad determinado para el CPX fue de 0.07, valor que, al ser muy cercano a 0, indica que el CPX es muy poco biodegradable de acuerdo con lo establecido por la OCDE (1992) y coincide con lo estipulado por Girardi et al. (2011) acerca de la persistencia del fármaco en el ambiente. A su vez, este valor coincide con el reportado por De Bel et al. (2009) quien determinó un índice de biodegradabilidad para el CPX de 0.07 mediante la misma técnica. Por otra parte, el índice de biodegradabilidad para el CPX transformado por biocatálisis se determinó en 0.62, lo que indica que, al ser un valor más cercano a 1, la mezcla de productos de reacción es más biodegradable de acuerdo con la OCDE (1992) y Chamarro et al. (2001).

De Bel et al. (2009) reporta índices de biodegradabilidad de 0.6, 0.17 y 0.18 para los productos de la degradación de CPX tras un tratamiento con sonólisis a pH de 3, 7 y 10 respectivamente, donde el único valor que presenta un índice de biodegradabilidad mayor a 0.4 es el obtenido a pH 3.

3.9. Evaluación de la sensibilidad microbiana del CPX y CPX transformado por biocatálisis

El CPX es un compuesto antimicrobiano de amplio espectro contra bacterias tanto grampositivas como gramnegativas por lo que la evaluación de la actividad antimicrobiana del CPX tras el tratamiento con CPO es de los parámetros más importantes para determinar la eficiencia de la degradación. *Escherichia coli*, bacteria de tipo gramnegativo, es el organismo utilizado por diversos autores (De Bel et al., 2009; De Witte et al., 2010; Porrás et al., 2016; Prieto et al., 2011) como organismo modelo para la determinación de la eficiencia de diferentes tratamientos para la degradación de CPX debido a que la mayor actividad antimicrobiana de las fluoroquinolonas es contra bacterias gramnegativas (De Witte et al., 2010).

En la figura 3.14. se muestra la actividad antimicrobiana del CPX antes (azul) y después del tratamiento con CPO (rosa) en la que se puede observar que, el tratamiento con la enzima reduce la actividad microbiana del CPX siendo incluso nula a concentraciones

menores a 1 ppm, es decir, a valores de concentración correspondientes a la concentración mínima inhibitoria (CMI) reportada para el ciprofloxacino (Idexx Laboratories, Inc., 2023)

Porras et al. (2016) y De Bel et al. (2009) reportan una reducción del 43% y 100% en la actividad microbiana del CPX respectivamente. Por su parte, De Witte et al. (2010) reporta una reducción en el diámetro de los halos de inhibición de ± 1 a <0.2 cm para *E. coli* (gramnegativa) y *B. coagulans* (grampositivo) y de <3 a <1.5 cm para *P. fluorescens* (gramnegativo). Sin embargo, es importante hacer notar que la mezcla de productos aun exhibe actividad antimicrobiana, la cual es necesaria eliminar completamente para contribuir en aminorar el problema de resistencia bacteriana que se puede promover en ambientes contaminados con este fármaco.

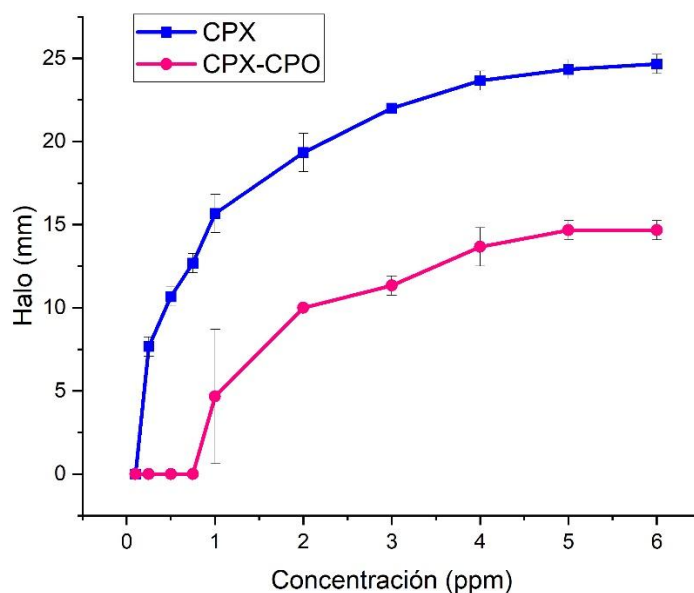


Figura 3.14. Perfil de actividad antimicrobiana del CPX (azul) y CPX transformado por biocatálisis (rosa).

Puesto que la actividad antimicrobiana del CPX está principalmente definida por los grupos carboxilo y ceto en la zona de la quinolona de la molécula (Chu & Fernandest, 1989), los resultados de las pruebas de sensibilidad pueden darnos una idea de en qué lugar de la molécula de CPX está ocurriendo la mayor parte de la reacción de degradación, lo cual deberá ser corroborado en estudios posteriores por espectrometría de masas.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados presentados con anterioridad se puede concluir que:

- La enzima cloroperoxidasa del hongo *L. fumago* es capaz de degradar al contaminante emergente ciprofloxacino reduciendo su concentración hasta en un 99% demostrando una alta eficiencia bajo condiciones controladas de laboratorio a valores de pH mayormente ácidos y temperatura ambiente aunque se sugiere el monitoreo de la reacción por técnicas diferentes a las presentadas en este trabajo a valores de pH básicos y temperaturas superiores a los 40 °C.
- La mezcla de productos de degradación enzimática de CPX mostró tener una mayor biodegradabilidad comparada con el fármaco sin tratamiento y una toxicidad nula ante el organismo *A. salina* a concentraciones en las que el ciprofloxacino demostró ser altamente tóxico; no obstante, se recomienda realizar pruebas de toxicidad a concentraciones mayores y con diferentes organismos para esclarecer por completo la ecotoxicidad de la mezcla de productos de degradación.
- El tratamiento con cloroperoxidasa logró reducir la actividad antimicrobiana del ciprofloxacino eliminándola por completo en concentraciones correspondientes a la concentración mínima inhibitoria reportada para el fármaco.

Así, la degradación del ciprofloxacino mediante el uso de la enzima cloroperoxidasa es una estrategia de tratamiento prometedora capaz de reducir la concentración del fármaco aminorando al mismo tiempo el impacto ambiental y los riesgos asociados a su presencia.

Bibliografía

- Aggelopoulos, C. A., Hatzisymeon, M., Tataraki, D., & Rassias, G. (2020). Remediation of ciprofloxacin-contaminated soil by nanosecond pulsed dielectric barrier discharge plasma: Influencing factors and degradation mechanisms. *Chemical Engineering Journal*, 393. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124768>
- Ahmadzadeh, S., Asadipour, A., Pournamdari, M., Behnam, B., Rahimi, H. R., & Dolatabadi, M. (2017). Removal of ciprofloxacin from hospital wastewater using electrocoagulation technique by aluminum electrode: Optimization and modelling through response surface methodology. *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.04.026>
- Alós, J. I. (2009). Quinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(5), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.03.001>
- Azanu, D., Styryshave, B., Darko, G., Weisser, J. J., & Abaidoo, R. C. (2018). Occurrence and risk assessment of antibiotics in water and lettuce in Ghana. *Science of the Total Environment*, 622–623, 293–305. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.287>
- Bairán, G., Rebollar-Pérez, G., Chávez-Bravo, E., & Torres, E. (2020). Treatment processes for microbial resistance mitigation: The technological contribution to tackle the problem of antibiotic resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(23), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijerph17238866>
- Barnes, K. K., Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., Meyer, M. T., & Barber, L. B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - I) Groundwater. *Science of the Total Environment*, 402(2–3), 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.04.028>
- Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M. H., & Zheng, C. (2019). Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environmental Research*, 169, 483–493. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>
- Bloom, G., Merrett, G. B., Wilkinson, A., Lin, V., & Paulin, S. (2017). Antimicrobial resistance and universal health coverage. *BMJ Global Health*, 2(4). <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2017-000518>
- Bommarius, A. S. (2015). Biocatalysis: A Status Report. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 6, 319–345. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061114-123415>
- Browne, A. J., Chipeta, M. G., Haines-Woodhouse, G., Kumaran, E. P. A., Hamadani, B. H. K., Zarea, S., Henry, N. J., Deshpande, A., Reiner, R. C., Day, N. P. J., Lopez, A.

- D., Dunachie, S., Moore, C. E., Stergachis, A., Hay, S. I., & Dolecek, C. (2021). Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. *The Lancet Planetary Health*, 5(12), e893–e904. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00280-1](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00280-1)
- Burstein, R., Henry, N. J., Collison, M. L., Marczak, L. B., Sligar, A., Watson, S., Marquez, N., Abbasalizad-Farhangi, M., Abbasi, M., Abd-Allah, F., Abdoli, A., Abdollahi, M., Abdollahpour, I., Abdulkader, R. S., Abrigo, M. R. M., Acharya, D., Adebayo, O. M., Adekanmbi, V., Adham, D., ... Hay, S. I. (2019). Mapping 123 million neonatal, infant and child deaths between 2000 and 2017. *Nature*, 574(7778), 353–358. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1545-0>
- Calderón, A., Meraz, M., & Tomasini, A. (2019). Pharmaceuticals Present in Urban and Hospital Wastewaters in Mexico City. *Journal of Water Chemistry and Technology*, 41(2), 105–112. <https://doi.org/10.3103/s1063455x19020073>
- Camargo, M. C., García, A., Riquelme, A., Otero, W., Camargo, C. A., Hernandez-García, T., Candia, R., Bruce, M. G., & Rabkin, C. S. (2014). The problem of helicobacter pylori resistance to antibiotics: A systematic review in latin America. *American Journal of Gastroenterology*, 109(4), 485–495. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.24>
- Carneiro, R. B., Sabatini, C. A., Santos-Neto, Á. J., & Zaiat, M. (2019). Feasibility of anaerobic packed and structured-bed reactors for sulfamethoxazole and ciprofloxacin removal from domestic sewage. *Science of the Total Environment*, 678, 419–429. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.437>
- Carvalho, I. T., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International* 94, 736–757. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>
- Castiglioni, S., Pomati, F., Miller, K., Burns, B. P., Zuccato, E., Calamari, D., & Neilan, B. A. (2008). Novel homologs of the multiple resistance regulator marA in antibiotic-contaminated environments. *Water Research*, 42(16), 4271–4280. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.07.004>
- Chamarro, E., Marco, A., & Esplugas, S. (2001). Use of fenton reagent to improve organic chemical biodegradability. *Water Research*, 35(4), 1047–1051. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00342-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00342-0)
- Chen, Y., Wang, Z., Liu, L., Zhao, H., & Wu, P. (2021). Stress-responses of microbial population and activity in activated sludge under long-term ciprofloxacin exposure. *Journal of Environmental Management*, 281. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111896>

- Chu, D. T. W., & Fernandest, P. B. (1989). MINIREVIEW Structure-Activity Relationships of the Fluoroquinolones. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 33(2), 131–135.
- Coman, C. (2017). Antibiotic resistance: not only the clinician's problem. *Danube News*, 18(34). www.who.int
- Conley, Z. C., Bodine, T. J., Chou, A., & Zechiedrich, L. (2018). Wicked: The untold story of ciprofloxacin. *PLoS Pathogens*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006805>
- De Bel, E., Dewulf, J., Witte, B. De, Van Langenhove, H., & Janssen, C. (2009). Influence of pH on the sonolysis of ciprofloxacin: Biodegradability, ecotoxicity and antibiotic activity of its degradation products. *Chemosphere*, 77(2), 291–295. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.033>
- De Witte, B., Van Langenhove, H., Demeestere, K., Saerens, K., De Wispelaere, P., & Dewulf, J. (2010). Ciprofloxacin ozonation in hospital wastewater treatment plant effluent: Effect of pH and H₂O₂. *Chemosphere*, 78(9), 1142–1147. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.026>
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., & Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>
- Dicker, D., Nguyen, G., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abdel-Rahman, O., Abdi, A., Abdollahpour, I., Abdulkader, R. S., Abdurahman, A. A., Abebe, H. T., Abebe, M., Abebe, Z., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality and life expectancy, 1950–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1684–1735. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31891-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31891-9)
- El-Kemary, M., El-Shamy, H., & El-Mehasseb, I. (2010). Photocatalytic degradation of ciprofloxacin drug in water using ZnO nanoparticles. *Journal of Luminescence*, 130(12), 2327–2331. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2010.07.013>
- Enyoh, C. E., & Wang, Q. (2023). Adsorption and toxicity characteristics of ciprofloxacin on differently prepared polyethylene terephthalate microplastics from both experimental and theoretical perspectives. *Journal of Water Process Engineering*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103909>
- Evgenidou, E. N., Konstantinou, I. K., & Lambropoulou, D. A. (2015). Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A

- review. *Science of the Total Environment*, 505, 905–926. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.021>
- Feitosa-Felizzola, J., & Chiron, S. (2009). Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France). *Journal of Hydrology*, 364(1–2), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.10.006>
- Focazio, M. J., Kolpin, D. W., Barnes, K. K., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Thurman, M. E. (2008). A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources. *Science of the Total Environment*, 402(2–3), 201–216. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.021>
- Gao, B., Chang, Q., & Yang, H. (2021). Selective adsorption of ofloxacin and ciprofloxacin from a binary system using lignin-based adsorbents: Quantitative analysis, adsorption mechanisms, and structure-activity relationship. *Science of the Total Environment*, 765. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144427>
- García, C. (2023). *Remediación de efluentes acuosos contaminados con fármacos mediante procesos de adsorción y fotoquímicos* (Tesis de Doctorado, Universidad de Granada).
- García-Zamora, J. L., León-Aguirre, K., Quiroz-Morales, R., Parra-Saldívar, R., Gómez-Patiño, M. B., Arrieta-Baez, D., Rebollar-Pérez, G., & Torres, E. (2018). Chloroperoxidase-mediated halogenation of selected pharmaceutical micropollutants. *Catalysts*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/catal8010032>
- Girardi, C., Greve, J., Lamshöft, M., Fetzer, I., Miltner, A., Schäffer, A., & Kästner, M. (2011). Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. *Journal of Hazardous Materials*, 198, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.10.004>
- Gracia-Lor, E., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2011). Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(16), 2264–2275. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.026>
- Granata, G., Schiavone, F., Pipitone, G., Taglietti, F., & Petrosillo, N. (2022). Antibiotics Use in COVID-19 Patients: A Systematic Literature Review. *Journal of Clinical Medicine*, 11(23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcm11237207>
- Hanna, N., Sun, P., Sun, Q., Li, X., Yang, X., Ji, X., Zou, H., Ottoson, J., Nilsson, L. E., Berglund, B., Dyar, O. J., Tamhankar, A. J., & Stålsby Lundborg, C. (2018). Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province

- in eastern China: Its potential for resistance development and ecological and human risk. *Environment International*, 114, 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.003>
- Haslam, I. S., Wright, J. A., O'Reilly, D. A., Sherlock, D. J., Coleman, T., & Simmons, N. L. (2011). Intestinal ciprofloxacin efflux: The role of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Drug Metabolism and Disposition*, 39(12), 2321–2328. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.038323>
- Hernandez, J., Robledo, N. R., Velasco, L., Quintero, R., Pickard, M. A., & Vazquez-Duhalt, R. (1998). Chloroperoxidase-Mediated Oxidation of Organophosphorus Pesticides. *PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY*, 61, 87–94.
- Hou, J., Long, X., Wang, X., Li, L., Mao, D., Luo, Y., & Ren, H. (2023). Global trend of antimicrobial resistance in common bacterial pathogens in response to antibiotic consumption. *Journal of Hazardous Materials*, 442. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130042>
- Iannacone, J., Alvariño, L. (2009) Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia Magna*. *Ecología Aplicada*, 8(2), 71-80.
- Igwegbe, C. A., Ahmadi, S., Rahdar, S., Ramazani, A., & Mollazehi, A. R. (2020). Efficiency comparison of advanced oxidation processes for ciprofloxacin removal from aqueous solutions: Sonochemical, sono-nano-chemical and sono-nano-chemical/persulfate processes. *Environmental Engineering Research*, 25(2), 178–185. <https://doi.org/10.4491/eer.2018.058>
- Igwegbe, C. A., Oba, S. N., Aniagor, C. O., Adeniyi, A. G., & Ighalo, J. O. (2021). Adsorption of ciprofloxacin from water: A comprehensive review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 93, 57–77. Korean Society of Industrial Engineering Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.09.023>
- Illanes, A. (2019). *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer.
- Jiang, L., Hu, X., Yin, D., Zhang, H., & Yu, Z. (2011). Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere*, 82(6), 822–828. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.028>
- Johansson, C. H., Janmar, L., & Backhaus, T. (2014). Toxicity of ciprofloxacin and sulfamethoxazole to marine periphytic algae and bacteria. *Aquatic Toxicology*, 156, 248–258. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.015>
- Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., Goossens, H., & Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 115(15), E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>

- Landersdorfer, C. B., Kirkpatrick, C. M. J., Kinzig, M., Bulitta, J. B., Holzgrabe, U., Jaehde, U., Reiter, A., Naber, K. G., Rodamer, M., & Sörgel, F. (2010). Competitive inhibition of renal tubular secretion of ciprofloxacin and metabolite by probenecid. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 69(2), 167–178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03564.x>
- Larsson, D. G. J. (2014). Pollution from drug manufacturing: Review and perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 369, Número 1656). Royal Society of London. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0571>
- Larsson, D. G. J., de Pedro, C., & Paxeus, N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 148(3), 751–755. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.008>
- León Aguirre, K. G. (2015). *Uso de cloroperoxidasa para la oxidación de fármacos como contaminantes emergentes* (Tesis de Maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).
- Lesser, L. E., Mora, A., Moreau, C., Mahlkecht, J., Hernández-Antonio, A., Ramírez, A. I., & Barrios-Piña, H. (2018). Survey of 218 organic contaminants in groundwater derived from the world's largest untreated wastewater irrigation system: Mezquital Valley, Mexico. *Chemosphere*, 198, 510–521. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.154>
- Liao, X., Li, B., Zou, R., Dai, Y., Xie, S., & Yuan, B. (2016). Biodegradation of antibiotic ciprofloxacin: pathways, influential factors, and bacterial community structure. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(8), 7911–7918. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6054-1>
- Liu, A., Goonetilleke, A., & Egodawatta, P. (2015). *Role of Rainfall and Catchment Characteristics on Urban Stormwater Quality*. Springer. <http://www.springer.com/series/11214>
- Locatelli, M. A. F., Sodr e, F. F., & Jardim, W. F. (2011). Determination of antibiotics in brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(3), 385–393. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9550-1>
- Magdaleno, A., Saenz, M. E., Juárez, A. B., & Moreton, J. (2015). Effects of six antibiotics and their binary mixtures on growth of *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.021>

- Minden, V., Deloy, A., Volkert, A. M., Leonhardt, S. D., & Pufal, G. (2017). Antibiotics impact plant traits, even at small concentrations. *AoB PLANTS*, 9(2). <https://doi.org/10.1093/aobpla/plx010>
- Mirzaei, R., Yunesian, M., Nasser, S., Gholami, M., Jalilzadeh, E., Shoeibi, S., & Mesdaghinia, A. (2018). Occurrence and fate of most prescribed antibiotics in different water environments of Tehran, Iran. *Science of the Total Environment*, 619–620, 446–459. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.272>
- Naveed, S., & Waheed, N. (2014). Simple UV spectrophotometric assay of ciprofloxacin. *Mintage Journal of Pharmaceutical & Medical Sciences*, 3, 10–13. www.mintagejournals.com
- Ngumba, E., Gachanja, A., & Tuhkanen, T. (2016). Occurrence of selected antibiotics and antiretroviral drugs in Nairobi River Basin, Kenya. *Science of the Total Environment*, 539, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.139>
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). (1992). *OECD Guideline for the testing of chemicals*. París, Francia.
- O'Neill, M., Heckelman, P., & Koch, C. (2006). The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. *Journal of Medicinal Chemistry* (Whitehouse Station), 50(3). <https://doi.org/10.1021/jm068049o>
- Opris, O., Copaciu, F., Loredana Soran, M., Ristoiu, D., Niinemets, Ü., & Copolovici, L. (2013). Influence of nine antibiotics on key secondary metabolites and physiological characteristics in *Triticum aestivum*: Leaf volatiles as a promising new tool to assess toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 87, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.09.019>
- Polianciuc, S. I., Gurzău, A. E., Kiss, B., Georgia Ștefan, M., & Loghin, F. (2020). Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Medicine and Pharmacy Reports*, 93(3), 231–240. <https://doi.org/10.15386/mpr-1742>
- Porras, J., Bedoya, C., Silva-Agredo, J., Santamaría, A., Fernández, J. J., & Torres-Palma, R. A. (2016). Role of humic substances in the degradation pathways and residual antibacterial activity during the photodecomposition of the antibiotic ciprofloxacin in water. *Water Research*, 94, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.024>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.055>

- Rajia, S., Hasan, I., Amin, R., Anwar, M., & Islam, U. (2015). EFFICIENCY OF A COST-EFFECTIVE UV SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR ESTIMATION OF CIPROFLOXACIN HCL IN MARKETED TABLET FORMULATION. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(10), 4277. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(10\).4277-83](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4277-83)
- Richardson, S. D., & Ternes, T. A. (2011). Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*, 83(12), 4614–4648. <https://doi.org/10.1021/ac200915r>
- Rodriguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., & Bandala, E. R. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 323, 361–380. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.106>
- Romero-Balboa, A. (2024). *Degradación catalítica de antiparasitarios como contaminantes emergentes* (Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).
- Salari, M., Rakhshandehroo, G. R., & Nikoo, M. R. (2018). Degradation of ciprofloxacin antibiotic by Homogeneous Fenton oxidation: Hybrid AHP-PROMETHEE method, optimization, biodegradability improvement and identification of oxidized by-products. *Chemosphere*, 206, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.086>
- San Martín, A., DMV, M. V., Cañon, H., & Iraguen, M. V. (2001). Ensayo rápido para la determinación simultánea de enrofloxacin y ciprofloxacin en leche mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 33(1). http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301
- Sánchez-Huesca, R., Lerma, A., Guzmán-Saldaña, R. M. E., & Lerma, C. (2020). Prevalence of antibiotics prescription and assessment of prescribed daily dose in outpatients from mexico city. *Antibiotics*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9010038>
- Santa-Ana-Tellez, Y., Mantel-Teeuwisse, A. K., Dreser, A., Leufkens, H. G. M., & Wirtz, V. J. (2013). Impact of Over-the-Counter Restrictions on Antibiotic Consumption in Brazil and Mexico. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075550>
- Sayed, M., Khan, J. A., Shah, L. A., Shah, N. S., Shah, F., Khan, H. M., Zhang, P., & Arandiyan, H. (2018). Solar Light Responsive Poly(vinyl alcohol)-Assisted Hydrothermal Synthesis of Immobilized TiO₂/Ti Film with the Addition of Peroxymonosulfate for Photocatalytic Degradation of Ciprofloxacin in Aqueous Media: A Mechanistic Approach. *Journal of Physical Chemistry C*, 122(1), 406–421. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b09169>

- Secretaria de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, (2010). Acuerdo por el que se Determinan los Lineamientos a los que Estará Sujeta la Venta y Dispensación de Antibióticos; *Diario Oficial de la Federación*: México City, México.
- Segel, I. (1976). *Biochemical Calculations. How to Solve Mathematical Problems in General Biochemistry*. (2da ed.). John Wiley & Sons.
- Seifrtová, M., Pena, A., Lino, C. M., & Solich, P. (2008). Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(3), 799–805. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2020-1>
- Sheldon, R. A., & Woodley, J. M. (2018). Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chemical Reviews* 118(2), 801–838. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>
- Srinivasan, B. (2022). A guide to the Michaelis–Menten equation: steady state and beyond. *FEBS Journal*, 289(20), 6086–6098. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/febs.16124>
- Sundaramoorthy, M., Turner, J., & Poulos, T. L. (1995). The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase–cytochrome P450 functional hybrid. *Structure*, 3(12), 1367–1378. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00274-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00274-X)
- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Tuc Dinh, Q., Clément, M., & Chevreuil, M. (2008). Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of the Total Environment*, 393(1), 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.12.009>
- Tapia-Salazar, M., Diaz-Sosa, V. R., & Cárdenas-Chávez, D. L. (2022). Toxicological effect and enzymatic disorder of non-studied emerging contaminants in *Artemia salina* model. *Toxicology Reports*, 9, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.01.007>
- Tong, L., Huang, S., Wang, Y., Liu, H., & Li, M. (2014). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment of Jiangnan Plain, central China. *Science of the Total Environment*, 497–498, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.068>
- Torres, E., & Ayala, M. (2010). *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Springer.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I., & Le Borgne, S. (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*, 46(1), 1–15. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(03\)00228-5](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(03)00228-5)

- Tozar, T., Boni, M., Staicu, A., & Pascu, M. L. (2021). Optical characterization of ciprofloxacin photolytic degradation by uv-pulsed laser radiation. *Molecules*, 26(8). <https://doi.org/10.3390/molecules26082324>
- Unuofin, J. O., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2019). Aptitude of oxidative enzymes for treatment of wastewater pollutants: A laccase perspective. *Molecules*, 24(11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24112064>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., & Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 742–750. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7)
- Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., & Costanzo, S. D. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of the Total Environment*, 407(8), 2711–2723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.059>
- Wirtz, V. J., Dreser, A., & Gonzales, R. (2010). Trends in antibiotic utilization in eight Latin American countries, 1997-2007. *Revista Panameña de Salud Publica*, 27(3), 219–225.
- Xing, S., Li, W., Liu, B., Wu, Y., & Gao, Y. (2020). Removal of ciprofloxacin by persulfate activation with CuO: A pH-dependent mechanism. *Chemical Engineering Journal*, 382. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122837>
- Yoosefian, M., Ahmadzadeh, S., Aghasi, M., & Dolatabadi, M. (2017). Optimization of electrocoagulation process for efficient removal of ciprofloxacin antibiotic using iron electrode; kinetic and isotherm studies of adsorption. *Journal of Molecular Liquids*, 225, 544–553. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.11.093>
- Zhang, Q. Q., Ying, G. G., Pan, C. G., Liu, Y. S., & Zhao, J. L. (2015). Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. *Environmental Science and Technology*, 49(11), 6772–6782. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00729>
- Zhou, Z., & Jiang, J. Q. (2012). DETECTION OF IBUPROFEN AND CIPROFLOXACIN BY SOLID-PHASE EXTRACTION AND UV/Vis SPECTROSCOPY. *Journal of Applied Spectroscopy*, 79(3), 477–481.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Melis, M., & Fanelli, R. (2010). Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1–3), 1042–1048.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.110>