



FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA EN MEDIOAMBIENTE  
INGENIERÍA AMBIENTAL

---

**POTENCIAL DE USO DEL HONGO DE PUDRICIÓN BLANCA  
*Trametes versicolor*, EN LA BIODEGRADACIÓN DEL  
ANTIINFLAMATORIO NO ESTEROIDEO KETOPROFENO**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO  
AMBIENTAL**

**AUTOR: LUCAS ROLANDO GÁRATE YÁÑEZ  
PROFESOR GUÍA: OCIEL COFRÉ CARVAJAL  
PROFESOR CO-GUÍA: JOAO CERQUEIRA PINTO**

---

**VALPARAÍSO, 2021**

## AGRADECIMIENTOS

*El camino para llegar a esta instancia ha sido largo, difícil y lleno de cambios, y no quiero darle término sin antes agradecer a todas las personas que formaron parte de él y de mi crecimiento personal.*

*A mi mamá, la mujer más importante de mi vida. Desde mi crianza y hasta el día de hoy me entrega los valores que me hacen ser quien soy. Gracias por jamás reprimirme y siempre apoyarme. Una mujer resiliente y fuerte, la vida se le ha puesto cuesta arriba y siempre se ha mantenido firme. La mamá más bacán que el universo pudo entregarnos a mí y a mi hermano chico, Raúl. (Tía Jocy a usted no la olvido, mi segunda madre ahora y siempre, gracias por subrogar a la Cata desde que me vine a vivir a Viña. La amo con todo mi corazón).*

*A mi tía Vero por mostrarme la luz al final del camino en momentos difíciles, con su experiencia y apoyo incondicional. La mejor madrina que jamás pude haber tenido, gracias por ser mi mejor amiga, siempre. A mis tíos Cote, Lucho, Pablo y Nacho, por apoyar mis decisiones y ser mis panas en estos 26 años de vida, por mostrarme el Grunge desde chico y hacerme entender que no hay mejor medicina que la música. No sé qué haría sin ustedes, son un pilar fundamental en mi crecimiento personal. Gracias, infinitas gracias.*

*A mis abuelas Pachy y Marta, y mis abuelos Rolando y Domingo. Su sabiduría me ha acompañado a lo largo de toda mi vida y se plasma en quien soy en este momento. Gracias por darme las herramientas necesarias para construir este largo camino.*

*A mis amigos y hermanos de toda la vida Manuel y Lucas. No tengo palabras para expresar todo el amor y fraternidad que nos tenemos. Gracias por ser tan únicos y por ponerme el hombro cuando las cosas van cuesta abajo. Amigos para toda la vida!*

*A Cami, Diego, Botto, Ariel, Benja, Fran, Paty, Kike, Rocky, Myller. Nuestra amistad ha sido el pilar principal en todo mi proceso de aprendizaje y maduración desde que éramos mechones. Gracias por los paseos inolvidables de la carrera, los carretes y las pilsen en el Roma, los apañes en los ramos difíciles y, por sobre todo lo demás, ser los mejores amigos y amigas que pudo haberme entregado la universidad.*

*A mis amigos y hermanos Oliver y Guido, por seguir siendo tan incondicionales e importantes a pesar de la distancia y que nos veamos 3 veces al año jajajaja. Gracias por su humildad y por enseñarme tanto en todo este tiempo. A Franco, Nacho y Martín, gracias por formar parte tan importante de este año en particular, por abrirme las puertas de mundos que antes eran desconocidos para mí. La fotografía, nuevos estilos de música y líneas de pensamiento que me*

*han servido para madurar y ver la vida desde perspectivas totalmente nuevas. Panas por la eternidad.*

*A los cabros sueltos de la roca (sueeeeeeloooooooooooo!!). A Seba, Pelao Traviesa, Vicho, Nico, la Shanty, todos y todas, por los pegues duraznos, las fisuras rompemano, los wenos mates, los vueles eternos, gracias por su amistad.*

*A la tía Paty, los tíos de ICBQ, profesores, en particular a los profes Ociel, Joao y Héctor.*

*Dedicado a mi hermanito Raúl y mi hermanita Violeta. A mi primito Vini y mi primita Mati. Han sido mi motivo principal para ser una mejor persona desde que nacieron. Le entregan vida a este mundo, son la sonrisa del mañana. Todo este proceso es por y para ustedes.*

*Y especialmente a Marco. Mi papá dejó este plano físico hace ya casi 8 años y sigue siendo parte importante de mis procesos, siempre dándome la fuerza que necesito para salir adelante. Te amo viejito, gracias por ser el mejor padre que alguna vez pude tener. Esto es para ti.*

*“Each small candle lights a corner of the dark.”*

*(Roger Waters)*

## RESUMEN

Los productos farmacéuticos son sustancias biológicamente activas y persistentes que han sido reconocidas como una constante amenaza para la estabilidad del medioambiente. Fármacos de uso humano y veterinario son continuamente descargados al ambiente natural como resultado de procesos de manufactura, disposición de productos no utilizados o expirados, y excretas. Debido a sus propiedades físicas y químicas, es que muchos de estos compuestos llegan a estar bioacumulados en suelos y sedimentos, pudiendo inducir efectos adversos en organismos expuestos. Así, los procesos de tratamiento de aguas residuales convencionales son un tanto ineficientes en la remoción de gran variedad de compuestos orgánicos persistentes, donde a pesar de que muchos países han empleado técnicas avanzadas como adsorción con carbón activado granular, tecnologías de membrana, ozonización, humedales artificiales o ultrafiltración, algunos compuestos han demostrado no verse afectados por dichos procesos. En este contexto, es que la habilidad de los hongos de la pudrición blanca de la madera para biotransformar o metabolizar contaminantes emergentes ha recibido especial atención, debido a la persistencia y toxicidad en el ambiente natural por parte de dichos compuestos, siendo esta alternativa una herramienta biotecnológica que deja a la micorremediación como una solución viable que da uso a hongos filamentosos y su actividad enzimática para rehabilitar ambientes contaminados. En el presente trabajo *in silico* se busca establecer los parámetros cinéticos y condiciones de operación bajo las cuales se desempeña *Trametes versicolor*, mediante la obtención de perfiles de degradación de Ketoprofeno a partir del planteamiento de un modelo dinámico que, por un lado, describe de manera interrelacionada el crecimiento, consumo de sustrato y producción enzimática del hongo desde una fermentación en cultivo sumergido y, por otro lado, la biodegradación del fármaco como un contaminante emergente por acción de la actividad enzimática del microorganismo, con lacasa como enzima catalizadora. Así, los perfiles mencionados mostraron una biodegradación de al menos un 95% de 2.3 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de fármaco para un tiempo de 7 días y 14 horas.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Productos farmacéuticos como contaminantes emergentes en el medioambiente .....	1
1.2	Presencia de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como principales contaminantes en diferentes medios acuáticos.....	2
1.3	Toxicidad de antiinflamatorios no esteroideos en diferentes organismos expuestos .....	4
1.4	Métodos utilizados para la remoción de productos farmacéuticos desde aguas residuales.....	6
1.5	Utilización de microorganismos para la biorremediación de aguas residuales contaminadas con productos farmacológicos .....	7
1.5.1	Micorremediación. ....	7
2.	PROBLEMA .....	9
3.	OBJETIVOS .....	10
3.1	Objetivo General .....	10
3.2	Objetivos específicos.....	10
4.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
4.1.	Antiinflamatorios no esteroideos .....	11
4.2.	Antiinflamatorios esteroideos .....	11
4.3.	Hongos de pudrición blanca de la madera como una alternativa biotecnológica para la remoción de productos farmacéuticos desde aguas residuales.....	12
4.4.	Enzimas.....	14
4.4.1.	Mecanismo de acción .....	14
4.4.2.	Enzimas ligninolíticas .....	15
4.5.	Dinámica de sistemas .....	16
4.5.1.	Sistema.....	16
4.5.2.	Modelo.....	16
4.5.3.	Simulación .....	17
5.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
5.1.	Caracterización cualitativa de Ketoprofeno .....	18
5.2.	Definición de condiciones de operación y parámetros cinéticos .....	19
5.3.	Desarrollo de un sistema de ecuaciones diferenciales.....	19
5.4.	Selección de software, calibración de modelo y obtención de simulaciones .....	19
6.	RESULTADOS.....	20
6.1.	Caracterización cualitativa del antiinflamatorio no esteroideo Ketoprofeno.....	20
6.1.1.	Descripción .....	20
6.1.2.	Propiedades físicas y químicas .....	20
6.1.3.	Estereoquímica.....	21
6.1.4.	Mecanismo de acción .....	22
6.1.5.	Toxicología .....	22
6.2.	Definición de condiciones de operación y parámetros cinéticos .....	24
6.2.1.	Biorreactor N°1 .....	24
6.2.2.	Biorreactor N°2 .....	25

6.2.3.	Representación de la configuración del proceso .....	26
6.3.	Desarrollo de un sistema de ecuaciones diferenciales .....	27
6.3.1.	Crecimiento y producción enzimática de <i>Trametes versicolor</i> .....	27
6.3.2.	Biodegradación de Ketoprofeno por la actividad enzimática de <i>Trametes versicolor</i> .....	29
6.4.	Calibración de modelo y obtención de simulaciones a través del tiempo .....	31
6.4.1.	Análisis de sensibilidad .....	31
6.4.2.	Simulación del proceso de crecimiento de <i>Trametes versicolor</i> y la biodegradación de Ketoprofeno por su actividad enzimática .....	34
7.	DISCUSIÓN .....	35
8.	CONCLUSIÓN .....	38
9.	REFERENCIAS .....	39
10.	ANEXOS .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Branquias de trucha arcoíris tras exposición a diclofenaco .....	5
Figura 2. Degradación de naproxeno a través del tiempo por <i>Trametes versicolor</i> a 55 $\mu\text{gL}^{-1}$ .....	13
Figura 3. Estructura en 3D de la lacasa producida por <i>Trametes versicolor</i> .....	16
Figura 4. Metodología establecida para el cumplimiento de los objetivos .....	18
Figura 5. Estructura química de Ketoprofeno .....	21
Figura 6. Estereoquímica de Ketoprofeno .....	21
Figura 7. Velocidad de nado de <i>Daphnia magna</i> expuesta a diferentes concentraciones de Ketoprofeno .....	23
Figura 8. Esquema general del proceso.....	26
Figura 9. Diagrama de bloques que describe la variación de la biomasa a través del tiempo.....	27
Figura 10. Diagrama de bloques que describe el consumo de sustrato a través del tiempo .....	28
Figura 11. Diagrama de bloques que describe la producción de enzimas a través del tiempo.....	28
Figura 12. Diagrama de bloques general del primer biorreactor .....	29
Figura 13. Diagrama de bloques general del segundo biorreactor .....	30
Figura 14. Diagrama general del proceso.....	31
Figura 15. Variación de $S_2$ respecto de la constante de dilución aplicada.....	32
Figura 16. Variación de $S_2$ al aplicar distintos valores de $K_{cat}$ .....	32
Figura 17. Variación de $S_2$ al aplicar distintos valores de $K_M$ .....	33
Figura 18. Variación de $S_2$ al aplicar distintos valores de $K_{cat}$ y $K_M$ simultáneamente .....	33
Figura 19. Gráfico de dispersión que describe el proceso completo a través del tiempo .....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de antiinflamatorios no esteroideos medidas en diferentes medios acuáticos .....	3
Tabla 2. Parámetros cinéticos asociados al biorreactor N°1 .....	24
Tabla 3. Parámetros cinéticos asociados al biorreactor N°2.....	25
Tabla 4. Constantes añadidas a la ecuación N°4 .....	25

## 1. INTRODUCCIÓN

### **1.1 Productos farmacéuticos como contaminantes emergentes en el medioambiente**

Desde la década de los noventa y hasta el día de hoy, investigaciones han demostrado que muchos tipos de compuestos orgánicos utilizados en el día a día ingresan al medio natural de manera continua y sostenida (Durán-Alvarez *et al.*, 2009), donde se ha prestado particular atención a su presencia en aguas residuales y la eventual contaminación de cuerpos de agua colindantes, como por ejemplo las aguas subterráneas (Barnes *et al.*, 2008).

La presencia de contaminantes recientemente identificados o emergentes en fuentes naturales de agua es de preocupación constante para la salud y la seguridad de cualquier tipo de consumidor (García-Gomez *et al.*, 2011; Tijani *et al.*, 2013), y existe una creciente toma de conciencia del impacto que estos contaminantes pueden tener en aguas tanto superficiales como subterráneas, y en los organismos que en ellas habitan. Por ende, su efectiva remoción es de suma importancia dentro del área de producción de agua potable y la liberación ambientalmente responsable de aguas residuales (Grassi *et al.*, 2012). Los contaminantes emergentes más comunes incluyen a los COP (Contaminantes Orgánicos Persistentes), microconstituyentes, cianotoxinas, pesticidas y herbicidas, subproductos de desinfección del agua, químicos disruptores endocrinos (EDCs), y productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs), siendo estos dos últimos los con mayor tasa de emisión a fuentes de agua debido al pobre marco regulatorio que existe en los países fabricantes (Tijani *et al.*, 2013).

Dentro de los productos farmacéuticos y de cuidado personal, los antiinflamatorios no esteroideos pertenecen al grupo de los fármacos más consumidos a nivel mundial, por combinar propiedades farmacológicas antiinflamatorias y analgésicas, además de ser fácilmente adquiridos sin receta médica (Abatan *et al.*, 2006).

Las circunstancias más comunes en las que los cuerpos de agua y suelos se ven expuestos a productos farmacéuticos corresponden a: (a) utilizar lodo digerido de aguas residuales como fertilizante en campos agrícolas; (b) utilizar aguas residuales ya tratadas como fuente de riego para cultivos, o bien para recargar acuíferos; (c) fugas desde desagües y/o plantas de tratamiento de aguas residuales; (d) inundación de campos con aguas provenientes de plantas de tratamiento (Oppel *et al.*, 2004).

El principal problema relacionado con los productos farmacéuticos radica en que no son a menudo biodegradables y que son diseñados primeramente para tener modos de acción particulares y ser altamente resistentes a una inactivación o degradación por parte del organismo al cual han sido suministrados hasta el momento en que su función terapéutica se haya desarrollado, siendo estas mismas características las responsables de su bioacumulación y posteriores efectos tóxicos en ecosistemas, tanto terrestres como acuáticos (Fent *et al.*, 2005; Díaz-Cruz *et al.*, 2003).

Así, a pesar de que el cuerpo humano tienda a degradar las medicinas que le son suministradas, el qué tan eficientemente lleva esto a cabo puede variar. En algunos casos, el fármaco administrado puede excretarse entre un 50 a un 90% en su forma original, o bien, los que se hayan excretado y degradado parcialmente pueden volver a dicha forma a través de una variedad de reacciones químicas entre el metabolito y el medioambiente (Raloff, 1998).

Es por esto que la constante detección de fármacos en el medioambiente demuestra que los sistemas de tratamiento tradicionales no son suficientes para lograr remover estos contaminantes orgánicos y evitar su incorporación a un cuerpo de agua receptor, siendo así como el lodo producido en estas instalaciones constituye una fuente importante de contaminación. Así, como se mencionó anteriormente, la popular práctica de utilizar este lodo como abono y el agua tratada como fuente de riego resulta en una posterior diseminación de estos micro contaminantes en el medioambiente (Rodríguez, 2012). Esto se debe a que las tecnologías convencionales de lodo activado aplicadas en las plantas de tratamiento no están diseñadas para remover estos micro contaminantes, que se encuentran presentes en concentraciones relativamente bajas y, por lo tanto, pueden ingresar sin cambios o parcialmente transformados al medioambiente (Cruz-Morató, 2013; Grassi *et al.*, 2012).

### **1.2 Presencia de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como principales contaminantes en diferentes medios acuáticos**

El agua es una fuente importante de contaminantes emergentes para su ingreso a la cadena trófica, donde los residuos provenientes de compuestos farmacéuticos han afectado en gran medida al medioambiente acuático, pues no solo afectan a los procesos biológicos utilizados para el tratamiento de aguas residuales, sino que también sobrepasan los límites normativos de potabilización (Tejada *et al.*, 2014).

Variedad de artículos publicados en diversos países indican la predominancia en el medioambiente de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), seguidos de antibióticos y agentes reductores de lípidos en la sangre (Santos *et al.*, 2010). Así, se recopiló información al respecto y se elaboró la Tabla N°1 a modo de ejemplo, en donde se muestran concentraciones de antiinflamatorios no esteroideos medidas en diferentes medios acuáticos.

Tabla 1. Concentraciones de antiinflamatorios no esteroideos medidas en diferentes medios acuáticos.

Compuesto	Muestra	Concentración (ngL <sup>-1</sup> )	País	Referencia
Ácido acetilsalicílico	Efluente planta de tratamiento	100	Japón	Nakada <i>et al.</i> , 2006
Ácido Mefenámico	Efluente planta de tratamiento	2000	Chile	Manzo <i>et al.</i> , 2014
Ácido mefenámico	Agua superficial	65	Reino Unido	Hilton & Thomas, 2003
Ácido mefenámico	Agua de ríos Liuxi, Zhujiang y Shijing	22.4	China	Zhao <i>et al.</i> , 2009
Ácido salicílico	Agua de lago	286.7	Canadá	Verenitch <i>et al.</i> , 2006
Diclofenaco	Efluente planta de tratamiento	2200	España	Gómez <i>et al.</i> , 2007
Diclofenaco	Efluente planta de tratamiento	2400	Suiza	Tauxe-Wuersch <i>et al.</i> , 2005
Diclofenaco	Agua del río Paraíba do Sul	60	Brasil	Stumpf <i>et al.</i> , 1999
Diclofenaco	Aguas subterráneas	590	Alemania	Sacher <i>et al.</i> , 2001
Ibuprofeno	Agua de río Somes	115.2	Rumania	Moldovan, 2006
Ibuprofeno	Agua de río Höje	220	Suecia	Bendz <i>et al.</i> , 2005
Ibuprofeno	Agua de ríos Po y Lambro	78.5	Italia	Calamari <i>et al.</i> , 2003
Ibuprofeno	Agua subterránea	3110	Estados Unidos	Barnes <i>et al.</i> , 2008
Ibuprofeno	Efluente planta de tratamiento	3777	Taiwán	Lin <i>et al.</i> , 2009

Tabla 1. (Continuación)

Compuesto	Muestra	Concentración (ngL <sup>-1</sup> )	País	Referencia
Ketoprofeno	Efluente planta de tratamiento	2300	Chile	Manzo <i>et al.</i> , 2014
Ketoprofeno	Efluente recinto hospitalario	231	Taiwán	Lin & Tsai, 2009
Ketoprofeno	Efluente planta de tratamiento	23	Estados Unidos	Thomas & Foster, 2004
Ketoprofeno	Agua de la llave	110.9	Argelia	Kermia <i>et al.</i> , 2016
Naproxeno	Efluente planta de tratamiento	2540	Suecia	Lee <i>et al.</i> , 2005
Naproxeno	Agua de la llave	26	Eslovenia	Hernando <i>et al.</i> , 2006
Naproxeno	Efluente planta de tratamiento	1440	Chile	Manzo <i>et al.</i> , 2014

### 1.3 Toxicidad de antiinflamatorios no esteroideos en diferentes organismos expuestos

La presencia de productos farmacéuticos en el medioambiente es de gran preocupación, y existe poca información disponible acerca de su persistencia y degradación en el medioambiente, además de los posibles efectos adversos de dichas moléculas y sus derivados en organismos expuestos (Isidori *et al.*, 2005). Así, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son los productos farmacéuticos más frecuentemente detectados en ambientes acuáticos (Parolini *et al.*, 2009). A continuación, se mencionan algunos estudios llevados a cabo con el fin de evaluar la toxicidad de antiinflamatorios no esteroideos en diversos organismos.

Ensayos de toxicidad crónica llevados a cabo en *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) indicaron cambios citológicos tras 28 días de exposición a 1 µgL<sup>-1</sup> de diclofenaco en hígado, riñones y branquias. A una concentración de 5 µgL<sup>-1</sup> existieron fallas renales, además de bioacumulación del fármaco en hígado, riñones, branquias e intestinos (Schwaiger *et al.*, 2004; Tribskorn *et al.*, 2004). La Figura N°1 muestra el daño citológico mencionado a las branquias del individuo.

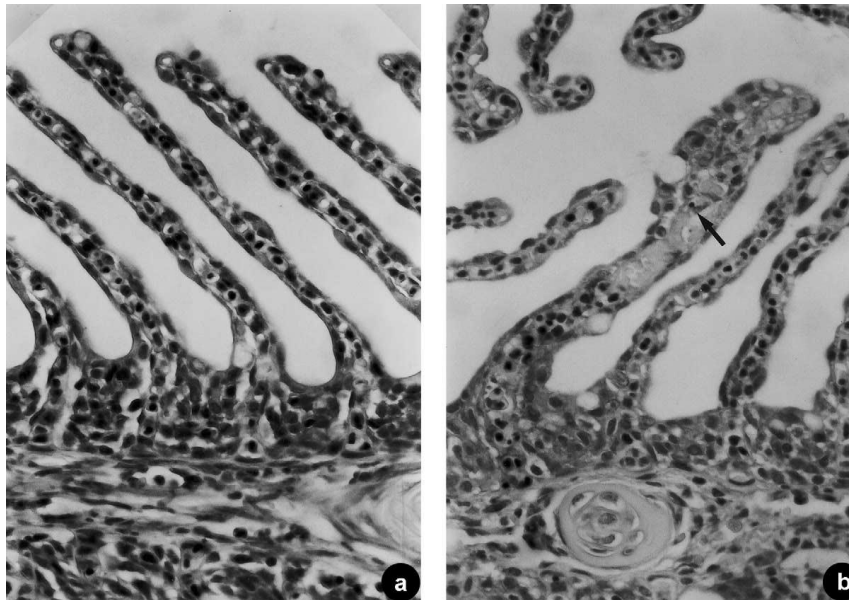


Figura 1. Branquias de trucha arcoíris. (a) Control, (b) tras exposición a  $1 \mu\text{gL}^{-1}$  de diclofenaco: degeneración y necrosis de células pilar (flecha), y dilatación de paredes capilares. Magnificación 400x. Tinción H-E. Fuente: Schwaiger *et al.*, 2004.

En el año 2004, Oaks *et al.* reportó una inusual disminución mayor a un 95% en la población de tres especies de buitre a lo largo del subcontinente indio entre 1990 y la década del 2000, atribuida principalmente a residuos de diclofenaco. Al ser aves carroñeras, estos ejemplares habrían ingerido como fuente primaria de alimento cadáveres de ganado a los que les fue suministrado dicho fármaco, lo que más tarde las llevaría a padecer fallas renales y posteriormente gota, causa principal de la muerte.

Un estudio de la Universidad de Tecnología de Aachen en Alemania (Cleuvers, 2004) evaluó la ecotoxicidad de los AINEs diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico mediante pruebas de inhibición del crecimiento en *Desmodesmus subspicatus* y de inmovilización aguda en el crustáceo planctónico *Daphnia magna*, obteniendo valores de  $EC_{50}$  en el rango entre  $72$  a  $626 \text{ mgL}^{-1}$  y entre  $68$  a  $166 \text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente. DeLorenzo & Fleming (2008) reportaron efectos significativos en una población del fitoplancton marino *Dunaliella tertiolecta* tras ser sometido a un bioensayo de toxicidad con el fármaco carbamazepina, viéndose reducida su densidad celular en un 42% para una concentración de  $80 \text{ mgL}^{-1}$ .

Así, los sistemas de tratamiento de aguas residuales son el proceso de control esencial de la presencia de contaminantes emergentes en medios acuáticos, pues según las propiedades físico-químicas de los productos farmacéuticos, sus metabolitos, productos de degradación y características de los suelos, es que estos compuestos pueden llegar a estar presentes en aguas subterráneas y contaminar acuíferos, o bien, mantenerse retenidos en suelos y bioacumularse,

afectando a los ecosistemas y al ser humano por ser el agua la vía principal de incorporación de contaminantes emergentes a la cadena trófica (Tejada *et al.*, 2014).

#### **1.4 Métodos utilizados para la remoción de productos farmacéuticos desde aguas residuales**

Con el paso de los años y desde que se comenzó a tomar conciencia, en la década de los noventa, del gran impacto que pueden llegar a tener este tipo de contaminantes emergentes en la salud de cualquier organismo expuesto a aguas o suelos contaminados por ellos, es que se ha hecho de vital importancia el desarrollo de procesos lo suficientemente aptos para la remoción de productos farmacéuticos.

Coagulación/flotación, ozonización, adsorción con carbón activado y suavización con cal son algunos de los tipos de tratamiento que formaron parte del estudio llevado a cabo por Westerhoff *et al.* (2005), en donde se analizó la remoción de gran variedad de productos farmacéuticos. Los procesos relacionados con carbón activado y oxidación por ozonización y cloración obtuvieron eficiencias de remoción mayores a un 90%, a diferencia de la coagulación/flotación con eficiencias menores a un 20%.

En República Checa, Březinova *et al.* (2018) desarrolló un sistema de humedal artificial con flujo subsuperficial horizontal para la remoción de ibuprofeno (IBU) y sus principales metabolitos, hidroxibuprofeno (OH-IBU) y carboxibuprofeno (CA-IBU) desde aguas residuales municipales. Los porcentajes de remoción para IBU, OH-IBU y CA-IBU fueron de 44.7%, 29.3% y 47.5% respectivamente, resultados que según el autor se condicen con el hecho de que el ibuprofeno y sus metabolitos no son removidos con una alta eficiencia en condiciones anóxicas o anaeróbicas.

Un sistema de tratamiento terciario constituido por ultrafiltración es el que se llevó a cabo en Cantabria, España por Urtiaga *et al.* (2013) en una planta de tratamiento de aguas residuales habilitada para la remoción de partículas de un tamaño mayor a 130  $\mu\text{m}$ , en donde el efluente se recirculaba a las unidades de ultrafiltración. Los porcentajes de remoción de gemfibrozilo, bezafibrato, furosemida y naproxeno fueron de 71, 21, 17 y 12%, para concentraciones de 3567  $\text{ngL}^{-1}$ , 207  $\text{ngL}^{-1}$ , 981  $\text{ngL}^{-1}$  y 2949  $\text{ngL}^{-1}$ , respectivamente.

### **1.5 Utilización de microorganismos para la biorremediación de aguas residuales contaminadas con productos farmacológicos**

A pesar de que gran parte de los métodos de tratamiento mencionados anteriormente pueden llegar a ser bastante efectivos al reducir los niveles de un gran rango de contaminantes, suelen tener variedad de inconvenientes, principalmente su complejidad a nivel tecnológico, ser muy costosos en aplicaciones de baja escala y ser difíciles de implementar cuando son requeridos para tratar grandes volúmenes de suelo y aguas residuales.

La biorremediación se entiende como el proceso por el cual desechos orgánicos son degradados biológicamente bajo condiciones controladas hasta un estado inocuo, o bien a niveles por debajo de los límites máximos de concentración permitidos por las autoridades (Mueller *et al.*, 1996), siendo una opción que ofrece la posibilidad de remover o bien volver inofensivos una variedad de contaminantes mediante el uso de la actividad biológica natural de una serie de microorganismos. Los compuestos contaminantes involucrados son biotransformados por dichos microorganismos a través de reacciones que tienen lugar como parte de su actividad metabólica, donde toman parte variedad de ataques enzimáticos (Vidali, 2001). El proceso suele verse influenciado por una serie de factores medioambientales, físicos y químicos, a saber, la estereoquímica, toxicidad y concentración del contaminante, la eficiencia de la cepa microbiana, las condiciones de operación durante la degradación, tiempos de retención, la presencia de otros compuestos, y su concentración (Misal *et al.*, 2011).

#### **1.5.1 Micorremediación.**

Los organismos de importancia en la biorremediación de aguas residuales corresponden a bacterias, algas y hongos, donde por lo general al utilizarse estos últimos, es que se suele hacer referencia a la micorremediación. Los hongos son organismos eucariotas, que crecen típicamente como filamentos llamados hifas, por lo que exhiben un crecimiento de tipo apical. Dichas hifas se ramifican repetidamente detrás de la punta, dando origen a una red llamada micelio. Sin embargo, algunos hongos crecen como levaduras unicelulares mediante gemación, pudiendo de igual manera producir hifas para una eventual invasión de tejidos (Deacon, 2006).

La micorremediación es el uso de hongos y su actividad enzimática para degradar una amplia gama de contaminantes ambientalmente persistentes, como hidrocarburos aromáticos policíclicos, tinturas, fenoles peligrosos, metales pesados, productos farmacéuticos, herbicidas, insecticidas, cianotoxinas, entre otros (Rudakiya *et al.*, 2019), sin la formación de metabolitos potencialmente peligrosos para el medioambiente y la salud humana (Prasad, 2017). Este proceso se caracteriza por ser una estrategia económica, eco-amigable y eficiente para combatir el constante incremento en la contaminación de suelos y aguas. La fisiología y estrategia de colonización de los hongos miceliales les atribuye factores como un crecimiento robusto, una vasta red de hifas, la producción de una variedad de enzimas ligninolíticas extracelulares, una alta relación superficie/volumen, ser resistentes a metales pesados y su adaptabilidad a fluctuaciones bruscas de pH y temperatura (Akhtar & Mannan, 2020; Silva *et al.*, 2019).

## 2. PROBLEMA

Los productos farmacéuticos y de cuidado personal son un grupo inmensamente diverso de químicos utilizados en distintas áreas, como medicina veterinaria, cosmética, prácticas agrícolas y cuidado de la salud humana. Dentro de ellos, los antiinflamatorios no esteroideos son los fármacos más consumidos a nivel mundial, ya que tienen la facultad de combinar propiedades farmacológicas antiinflamatorias y analgésicas. Dichos compuestos son contaminantes emergentes ubicuos liberados en ambientes acuáticos a través de aguas residuales domésticas, efluentes hospitalarios, disposición inadecuada por parte de los fabricantes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales. Una alternativa biotecnológica para la remoción de los compuestos anteriormente mencionados es la utilización de hongos y su actividad enzimática para su biodegradación, y así lograr disminuir en gran medida sus concentraciones en ambientes naturales. El hongo de pudrición blanca de la madera *Trametes versicolor* ha sido ampliamente estudiado en lo que a micorremediación de aguas residuales respecta, por ser un organismo cosmopolita y poseer además la capacidad de remover un amplio rango de productos farmacéuticos.

Si bien existen variedad de artículos de investigación en los que se reportan tanto la capacidad de biodegradación del hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor* como los altos grados de remoción del fármaco ketoprofeno, no es posible encontrar información respecto de los perfiles de degradación de dicho compuesto en aguas residuales por parte del hongo mencionado. Dichos perfiles son de suma importancia a la hora de pensar en implementar un sistema de micorremediación a gran escala, pues la información que entrega un perfil de degradación influye directamente en las ecuaciones de diseño de los distintos equipos a implementarse.

En el marco de depuración de aguas residuales y la protección y conservación del estado natural de ambientes acuáticos susceptibles de contaminación por contaminantes emergentes, es que mediante modelos cinéticos y matemáticos que describan el crecimiento, mecanismos de degradación y metabolismo de estos individuos, se plantea la obtención de perfiles de degradación del fármaco ketoprofeno como una molécula orgánica, para así establecer las condiciones de operación bajo las cuales se desempeñe *Trametes versicolor* en la micorremediación de dicho compuesto desde aguas residuales.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivo General*

Establecer la potencialidad del uso de *Trametes versicolor* en la biodegradación del fármaco ketoprofeno para su aplicación en la depuración de aguas residuales.

#### 3.2 *Objetivos específicos*

- Caracterizar cualitativamente el antiinflamatorio no esteroideo Ketoprofeno.
- Definir las condiciones de operación y parámetros cinéticos para la biodegradación de ketoprofeno, mediante el hongo *Trametes versicolor*.
- Obtener, a partir de un modelo matemático, perfiles de degradación de ketoprofeno en medio acuoso mediante el hongo *Trametes versicolor*.

## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. Antiinflamatorios no esteroideos

Los antiinflamatorios no esteroideos son productos farmacéuticos de gran popularidad debido a sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas (Mendoza *et al.*, 2008), siendo un conjunto heterogéneo de compuestos químicos que por lo general no tienen relación entre sí, pero que comparten acciones terapéuticas para el control en diversos grados del dolor, la inflamación y la fiebre (Prieto, 2007). El primer antiinflamatorio no esteroideo fue aislado en 1829, cuando científicos alemanes fueron capaces de recuperar salicilato desde una corteza de sauce. Más tarde, en la década de los '60, la indometacina sería desarrollada (Green, 2001).

La actividad antiinflamatoria de los AINEs se ve mediada a través de sus efectos inhibitorios en la actividad de la ciclooxigenasa (COX), una enzima clave en la síntesis de prostaglandina, la cual posee a su vez una fuerte capacidad de inducir inflamación (Mizushima, 2010; Díaz-González & Sánchez-Madrid, 2015). La enzima ciclooxigenasa, también conocida como prostaglandina-endoperóxido sintasa (PGHS por sus siglas en inglés), existe en 2 isoformas: PGHS-1 o COX-1 (constitutiva) y PGHS-2 o COX-2 (inducible) (Osafó *et al.*, 2017), donde la primera es responsable principalmente de la síntesis de prostaglandinas que ejercen un efecto citoprotector en el tracto gastrointestinal y el control de funciones renales, mientras que la segunda es activada de manera selectiva por estímulos proinflamatorios, facilitando la liberación de prostaglandinas involucradas en el proceso de inflamación (El Sayed *et al.*, 2018).

Estos compuestos se encuentran entre los productos farmacéuticos más frecuentemente detectados en ambientes acuáticos, esto debido a su hidrofiliidad y estabilidad, pudiendo permanecer en fase acuosa y ser detectados en aguas superficiales e incluso subterráneas (Manzo *et al.*, 2014).

### 4.2. Antiinflamatorios esteroideos

También llamados corticosteroides o glucocorticoides (como el cortisol, por ejemplo), los antiinflamatorios esteroideos son corticoides naturales (hormonas que produce la corteza adrenal) o semisintéticos, de características a nivel estructural parecidas a los primeros, aunque suelen ser más potentes. En general su uso se ha visto ampliamente limitado debido a sus importantes efectos secundarios y efectos sobre las actividades metabólicas del organismo (Divins, 2014; Belanoff *et al.*, 2001).

Son ampliamente utilizados para el tratamiento del asma y otros trastornos alérgicos, inflamatorios e inmunológicos, donde los corticosteroides administrados por inhalación se han establecido como un tratamiento de primera línea en adultos y niños con asma persistente (Barnes, 2006).

Los corticosteroides se ven involucrados en una variedad de procesos fisiológicos, incluyendo la respuesta al estrés, respuesta inmune y regulación de la inflamación, metabolismo de carbohidratos, catabolismo de proteínas y niveles y comportamiento de electrolitos en la sangre (Stern *et al.*, 2017). En los humanos el cortisol es la hormona corticosteroide principal secretada ante episodios de estrés (en roedores, por ejemplo, lo es la corticosterona). Dos receptores de corticosteroides median una gran mayoría de los efectos del cortisol y la corticosterona: los receptores mineralocorticoides de alta afinidad (MRs) y los receptores glucocorticoides de baja afinidad (GRs) (Meijer *et al.*, 2019).

#### **4.3. Hongos de pudrición blanca de la madera como una alternativa biotecnológica para la remoción de productos farmacéuticos desde aguas residuales**

Los hongos de pudrición blanca de la madera poseen la habilidad de degradar un rango extremadamente diverso de contaminantes ambientales persistentes y tóxicos, esto debido a que estos organismos únicos en su clase están capacitados para degradar paredes celulares lignificadas, donde la estructura irregular de la lignina la hace ser muy resistente a ataques enzimáticos, pues se encuentra intercalada con hemicelulosas, formando una matriz que rodea las microfibrillas de celulosa, proveyendo así de una barrera física y química contra sistemas biodegradativos (Blanchette, 1991), siendo imposible su degradación por enzimas intracelulares. Es en este contexto que los hongos mencionados han desarrollado mecanismos muy inespecíficos para poder degradar lignina de la madera, basados en la producción de enzimas extracelulares como la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa, en respuesta a bajos niveles de fuentes clave de nutrientes, condiciones conocidas como ligninolíticas (Barr & Aust, 1994).

Las enzimas mencionadas catalizan reacciones de los altamente reactivos e inespecíficos radicales libres, generando una despolimerización y degradación de la lignina. Así, el comprender cómo esto se lleva a cabo es fundamental para tener una noción de la gran cantidad de contaminantes ambientales que pueden llegar a ser degradados por estos hongos (Aust & Benson, 1993).

La utilización de hongos de la pudrición blanca de la madera como una herramienta biotecnológica efectiva y de bajo costo para la depuración de contaminantes emergentes recalcitrantes ha estado bajo evaluación en las últimas décadas, dejando a la micorremediación como una solución viable que utiliza hongos (o bien sus enzimas) para la rehabilitación de ambientes contaminados a su condición original (Tortella *et al.*, 2013).

Respecto a la remoción de antiinflamatorios no esteroideos, Marco-Urrea *et al.* (2010a) ha reportado rápidas velocidades de degradación de naproxeno por el hongo de pudrición blanca de la madera *Trametes versicolor*, que tras ser agregado en concentraciones típicamente encontradas en el medioambiente ( $55 \mu\text{g L}^{-1}$ ), fue degradado en un 95% tras 5 horas de exposición, llegando a niveles no detectables pasadas las 6 horas. La Figura N°2 muestra la degradación mencionada de naproxeno a través del tiempo.

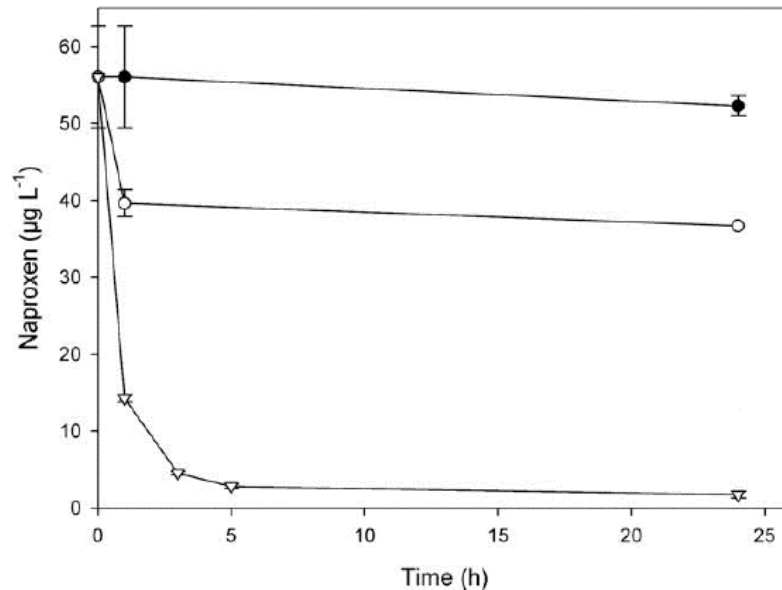


Figura 2. Degradación de naproxeno a través del tiempo por *Trametes versicolor* a  $55 \mu\text{g L}^{-1}$ . Símbolos: Controles sin inocular (●), controles inactivados por calor (○), cultivos experimentales (▽). Valores presentados como medias  $\pm$  SD. Los gránulos miceliales añadidos fueron de  $248.3 \pm 2 \text{ mg}$ . Fuente: Marco-Urrea *et al.*, 2010a.

Cruz-Morató *et al.* (2013) utilizó un biorreactor de lecho fluidizado por lotes para estudiar la degradación de productos farmacéuticos presentes en aguas residuales urbanas en sus concentraciones preexistentes y bajo condiciones estériles, por el hongo *Trametes versicolor*. Así, para compuestos como ibuprofeno, naproxeno y acetaminofeno (paracetamol), presentes en concentraciones de  $12.61 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $35.58 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $3.87 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente, el autor reporta porcentajes de remoción de un 100% tras 24 horas de exposición para ibuprofeno y naproxeno, y tras 8 horas de exposición para acetaminofeno.

Debido a su baja tasa de degradabilidad en plantas de tratamiento, es que el ketoprofeno ha sido reportado por varios autores con una gran variabilidad en eficiencias de remoción en plantas de tratamiento de aguas residuales, que van desde un 38% hasta casi un 100% en algunos casos (Lindqvist *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2007). En este contexto es que Marco-Urrea *et al.* (2010b) evaluó el uso de *Trametes versicolor* para degradar efectivamente ketoprofeno en un medio líquido definido. Se determinó que el hongo removió ketoprofeno a niveles no detectables en 24 horas tras ser agregados  $10 \text{ mgL}^{-1}$  del mismo, mientras que a una baja concentración ( $40 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$ ) y tras 6 horas fue removido en un 95%, con gránulos miceliales agregados en peso seco de  $124 \pm 5.2 \text{ mg}$  y  $233.2 \pm 8.4 \text{ mg}$ , respectivamente.

Si bien el grupo de hongos de pudrición blanca de la madera es extenso, con ejemplares como *Ganoderma lucidum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes maxima*, *Pleurotus ostreatus* y *Dichomitus squalens*, pocas son las especies que logran siquiera acercarse a los grados de remoción de contaminantes que posee *Trametes versicolor*.

*Trametes versicolor* tiene la particularidad de poseer un amplio espectro de degradación de contaminantes emergentes (Rodríguez, 2012), ser altamente tolerante a concentraciones considerablemente altas de los mismos y bajos valores de pH (Quintero, 2011), además de poder crecer en sustratos lignocelulósicos provenientes de residuos de muy bajo costo, como viruta de madera, paja de trigo o mazorcas de maíz (Barr & Aust, 1994).

#### **4.4. Enzimas**

Todas las reacciones bioquímicas son catalizadas por enzimas, proteínas que cumplen la función de catalizadores biológicos, siendo sustancias que aumentan la rapidez o velocidad de una reacción química sin verse alterada ella misma en el proceso global, disminuyendo la energía de activación que se requiere para una reacción química (Mathews *et al.*, 2002). Las enzimas se desnaturalizan debido a elevadas temperaturas y niveles de pH extremos. Así, su estado fisicoquímico y su influencia en reacciones químicas dependen de factores como el pH, fuerza iónica, temperatura, y la presencia o ausencia de inhibidores o activadores (Tabatabai, 1994)

##### **4.4.1. Mecanismo de acción**

La función de una enzima es la de unir una molécula de sustrato (o bien variedad de sustratos) en una región de la enzima denominada sitio activo, que por lo general consta de una pequeña hendidura o grieta en una molécula proteínica grande, donde su estructura sirve para orientar de

manera óptima al sustrato. Como resultado de esto, el complejo enzima-sustrato se transforma en producto y energía libre (McKee & McKee, 1996).

#### **4.4.2. Enzimas ligninolíticas**

Los hongos de pudrición blanca de la madera son los principales organismos involucrados en la mineralización de la lignina, proceso que es llevado a cabo mediante un sistema enzimático inespecífico extracelular que involucra la producción de enzimas denominadas ligninolíticas, que incluyen a la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), lacasa y otro grupo de oxidasas (Dávila & Vázquez-Duhalt, 2006).

Las peroxidases son enzimas hemo-contenedoras con ciclos catalíticos que involucran una activación por peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y la reducción de sustrato de los intermediarios 1 y 2. Así, las enzimas LiP y MnP oxidan al sustrato mediante dos pasos consecutivos de oxidación de un electrón, con la formación de radicales catiónicos intermedios. LiP cataliza la despolimerización oxidativa dependiente de  $H_2O_2$  de la lignina (Tien & Kirk, 1983), es relativamente inespecífica para sus sustratos y se ha conocido que oxida sustratos aromáticos fenólicos y una variedad de unidades de lignina no fenólicas (hasta un 90% del polímero). Por su parte, MnP genera  $Mn^{3+}$ , que actúa como un oxidante difusible en unidades tanto fenólicas como no fenólicas a través de reacciones de peroxidación lipídica (Sánchez, 2009; Wong, 2008).

Las denominadas lacasas (Figura N°3) representan una de las enzimas más antiguas alguna vez descritas a partir del hongo *T. versicolor* y el árbol de laca japonés *R. vernicifera* (Yoshida, 1883), siendo uno de los grupos de enzimas más prometedores en lo que respecta a la descontaminación de sistemas contaminados con fenoles y en aplicaciones biotecnológicas como la remoción de compuestos tóxicos desde ecosistemas terrestres y acuáticos (Bollag, 1992). Plantas superiores y hongos (mayoritariamente de la pudrición de la madera) son los principales productores de lacasas, que perteneciendo a la clase de las fenoloxidasas, catalizan la polimerización de gran variedad de sustancias fenólicas a productos poliméricos. Además, han transformado lignina y compuestos relacionados con la lignina, mostrando una especificidad muy amplia de sustrato (Gianfreda *et al.*, 1999).

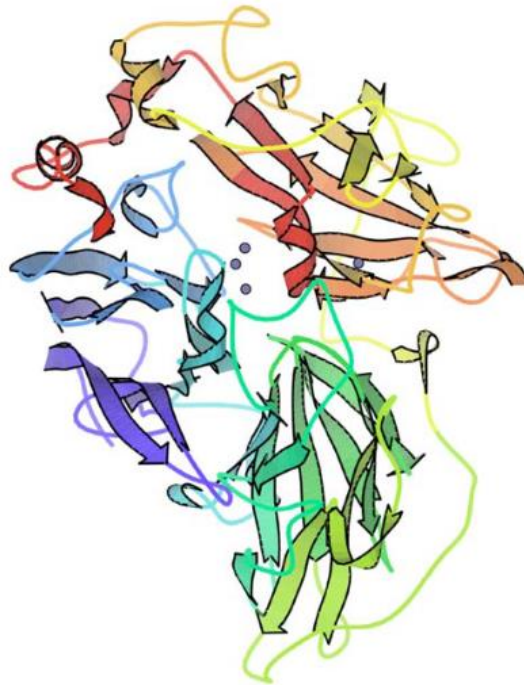


Figura 3. Estructura en 3D de la lacasa producida por *Trametes versicolor*. Fuente: Wong, 2008.

#### **4.5. Dinámica de sistemas**

La filosofía de lo que es la dinámica de sistemas se basa principalmente en el concepto de retroalimentación entre variables que son de carácter observable, que pueden a su vez describir alguna característica de componentes básicos o magnitudes globales del sistema, donde la relación de causalidad entre dichas variables es el foco principal de la dinámica de sistemas, pues facilita el dar respuesta a comportamientos globales (Izquierdo *et al.*, 2008).

##### **4.5.1. Sistema**

Un sistema corresponde a una especie de objeto compuesto por un conjunto de partes entre las que existe una cierta relación que las articula en la unidad, que viene siendo precisamente el sistema. Así, éste se manifiesta como un elemento de la realidad que se encuentra dotado de cierto grado de complejidad, justamente por encontrarse formado por distintas partes que interactúan entre sí. Dicha interacción genera que las partes se coordinen y sean así una entidad de carácter propio, percibiéndose entonces el concepto de sistema como algo que se distingue de su entorno, pero que mantiene una constante relación con él (Aracil & Gordillo, 1997).

##### **4.5.2. Modelo**

Un modelo es una representación de cierto aspecto de la realidad con cierto grado de abstracción que (1) facilita o simplifica la construcción del mismo (pues el intentar incluir todos los aspectos

que reúne la realidad en un modelo sería imposible, debido a la enormidad de matices que presenta) y (2) generaliza a dicho modelo, pues permite tener la posibilidad de reconocer patrones estructurales del sistema que a simple vista serían indetectables, pudiéndose así extrapolar a otros modelos (Rueda & Rico, 2017).

Según Donado *et al.* (2005) las principales propiedades de un modelo se pueden resumir en:

- 1) Debe reflejar de manera adecuada las características del sistema que son de interés.
- 2) Debe ser lo suficientemente sencillo como para resultar manejable en su totalidad.

#### **4.5.3. Simulación**

La simulación entonces se puede entender como el proceso de asignar datos a las distintas variables que forman parte de las ecuaciones de un modelo que representa cierto sistema que se quiera estudiar como una aparente réplica o procesos del mundo real (Aracil & Gordillo, 1997), procesar dichos datos mediante los procedimientos propios del software que se esté utilizando, y en base a las respuestas obtenidas, analizar el comportamiento de dicho sistema bajo las condiciones establecidas inicialmente (Rueda & Rico, 2017).

Por otro lado, Nance & Sargent (2002) señalan la definición de simulación como: *“X simula a Y es verdad si, y sólo si, (a) X e Y son sistemas formales, (b) Y se toma como el sistema real, (c) X se toma como una aproximación al sistema real y (d) las reglas de validez en X se encuentran libres de error”*.

La simulación del modelo en una computadora permite ejecutarlo y poner a prueba las hipótesis dinámicas, su comportamiento y su grado de sensibilidad ante perturbaciones externas. La existencia de discrepancias frente al sistema real obligaría entonces a un refinamiento o ajuste en las ecuaciones que componen dicho modelo, o bien la redefinición del mismo, verificando de tal manera su consistencia estructural (Serra, 2016).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura N°4 se muestra el diagrama de bloques correspondiente a la metodología establecida para el cumplimiento de los objetivos planteados, la cual es explicada en detalle más adelante.

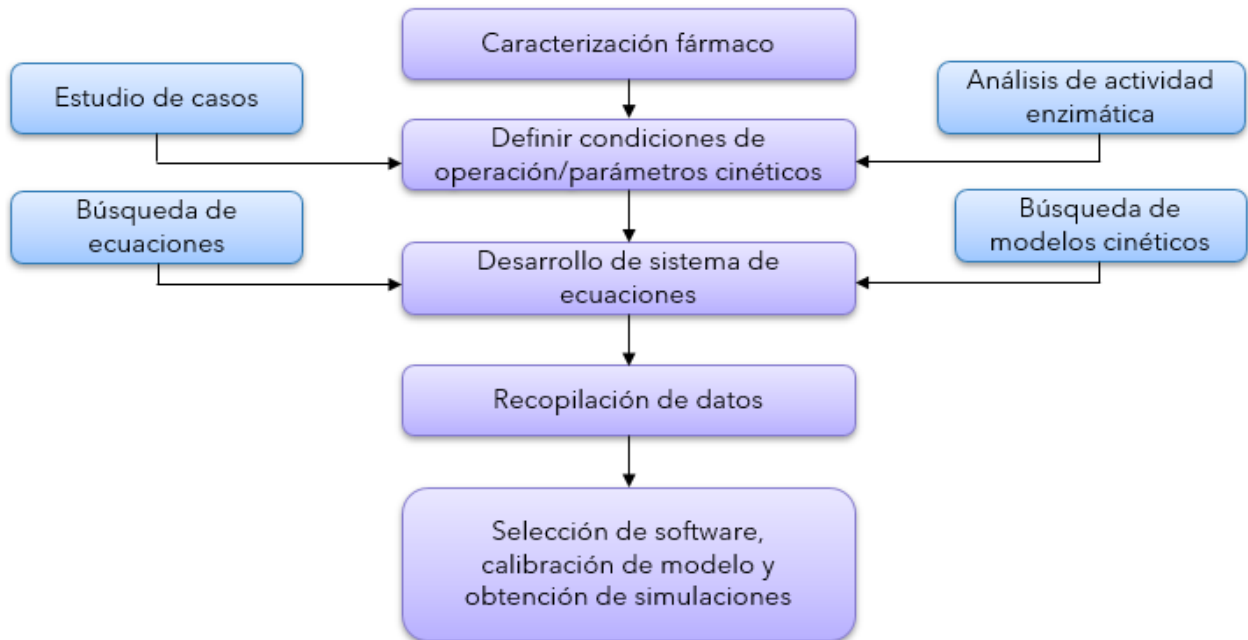


Figura 4. Metodología establecida para el cumplimiento de los objetivos.

### 5.1. Caracterización cualitativa de Ketoprofeno

Se caracterizó cualitativamente al antiinflamatorio no esteroideo mediante revisión bibliográfica en libros, artículos de investigación y fuentes confiables (es decir, propiedades físicas, químicas, farmacológicas, clínicas, farmacocinéticas y toxicológicas, mecanismos de acción, niveles de eficacia clínica, etc.), para así poner en contexto a la molécula orgánica con la cual se llevaron a cabo las simulaciones.

## **5.2. Definición de condiciones de operación y parámetros cinéticos**

Mediante la revisión de estudios de casos en donde se haya hecho uso de *Trametes versicolor* para la degradación de Ketoprofeno (o bien moléculas análogas), se buscó obtener concentraciones pre y post tratamiento del mismo, tipo y condiciones del medio de cultivo y condiciones ambientales, además del análisis de las distintas actividades enzimáticas extracelulares que lleva a cabo el hongo en cuestión como parte de su metabolismo.

Lo anterior se debe a que la actividad metabólica y el crecimiento celular del organismo dependen de dichas condiciones además de mecanismos específicos de regulación enzimática, los que son altamente importantes para los procesos de producción de enzimas y, por ende, en la degradación de moléculas orgánicas.

## **5.3. Desarrollo de un sistema de ecuaciones diferenciales**

Se desarrolló un sistema de ecuaciones diferenciales mediante la búsqueda de ecuaciones que describieran (1) modelos cinéticos de comportamiento para poblaciones de microorganismos y (2) el consumo o degradación de moléculas orgánicas por medio de ellos, planteando así los balances de materia en estado no estacionario correspondientes.

Así, el sistema propuesto considera:

1. Un biorreactor *batch* destinado a el crecimiento del hongo y su producción enzimática.
2. Un biorreactor *batch* enfocado en la degradación del antiinflamatorio estudiado.

## **5.4. Selección de software, calibración de modelo y obtención de simulaciones**

Se buscó resolver el sistema de ecuaciones diferenciales planteado, en donde a través de balances de materia y en base a las debidas suposiciones, se calibró el modelo matemático propuesto mediante la asignación a dichas ecuaciones de valores correspondientes a las condiciones de operación y parámetros cinéticos obtenidos. Dicho modelo fue construido por medio de diagramas de bloques que describen cada etapa del proceso en el software Matlab® R2020b y su aplicación integrada Simulink, una herramienta diseñada para la simulación de modelos o sistemas. Lo anterior se llevó a cabo con el fin de contrastar los resultados obtenidos con los valores presentes en bibliografía y eventualmente llevar a cabo ajustes a las ecuaciones diferenciales planteadas, si así lo requirieran. Esto permitió establecer las variables más influyentes a controlar tanto en el crecimiento de *Trametes versicolor* como en su actividad enzimática, para así analizar el comportamiento de las variables de respuesta en las ecuaciones diferenciales propuestas para la predicción de la degradación de Ketoprofeno, y luego poder obtener las simulaciones correspondientes, es decir, los perfiles de degradación del fármaco.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Caracterización cualitativa del antiinflamatorio no esteroideo Ketoprofeno

#### 6.1.1. Descripción

El Ketoprofeno (ácido 2-(3-benzofenil) propiónico) es un antiinflamatorio no esteroideo perteneciente al grupo de los derivados del ácido propiónico, con propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Con formulaciones orales, dérmicas, rectales e intravenosas, es utilizado en el tratamiento de una variedad de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, además de artritis reumatoide, osteoartritis, espondiloartritis anquilosante y calambres abdominales asociados a la menstruación. Con una vida media de 2 a 4 horas en el organismo, es metabolizado en el hígado y excretado mediante la orina, y en menor medida en las heces (Kantor, 1986; Cailleateau, 1988).

Ha existido cierto interés agregado en este fármaco debido a sus posibles beneficios terapéuticos en la prevención de los cánceres colorrectal y pulmonar, así como en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson (Hirohata *et al.*, 2008). Por otro lado, se han reportado efectos adversos comunes producto de la administración de Ketoprofeno, como lo son sangrado en el tracto gastrointestinal, vómitos, náuseas, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, desórdenes en el sistema nervioso central y alteración del sueño (Veys, 1991).

#### 6.1.2. Propiedades físicas y químicas

Es un polvo cristalino inodoro parcialmente blanco y con un sabor amargo fuerte. Su peso molecular es de 254.3 ( $\text{g mol}^{-1}$ ), posee un pKa de 5.94 en metanol:agua (3:1) y un coeficiente de reparto n-octanol:agua ( $K_{OW}$ ) de 0.97 (Rençber *et al.*, 2009; Hosny *et al.*, 2013). Su estructura química ( $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_3$ ) se muestra en la Figura N°5.

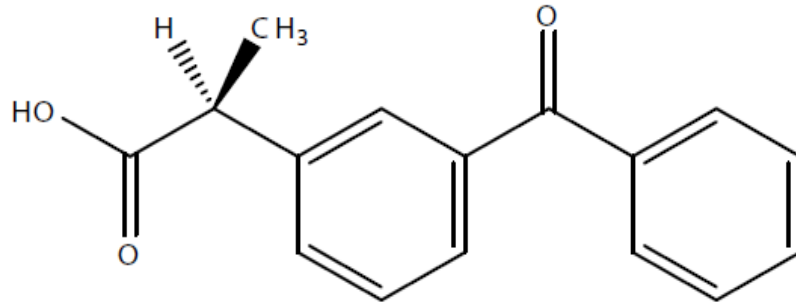


Figura 5. Estructura química del Ketoprofeno. Fuente: Rençber *et al.*, 2009.

Esta molécula es prácticamente insoluble tanto en agua como en condiciones de acidez, pero libremente soluble en acetona, etanol, cloruro de metileno, cloroformo, éter y benceno. Se sabe que el ajustar el pH a un valor mayor produce la solubilización del fármaco, ya que la solubilidad incrementa a valores de pH por sobre el *pKa* del mismo. Su punto de fusión suele fluctuar dentro del rango de 91°C a 97°C (Okai, 2005).

### 6.1.3. Estereoquímica

Es una molécula quiral debido a que posee un carbono asimétrico (o bien, centro quiral) y al ser racémico su estereoquímica viene dada por sus dos enantiómeros *R*(-) y *S*(+), donde el enantiómero *S* es el responsable activamente (eutómero) de efectos farmacológicos relacionados con la reducción de inflamación y el alivio del dolor, mientras que el enantiómero *R* es el más inactivo (distómero) en términos terapéuticos (Jamali & Brocks, 1990; Blanco *et al.*, 2003). La Figura N°6 muestra la estereoquímica del fármaco.

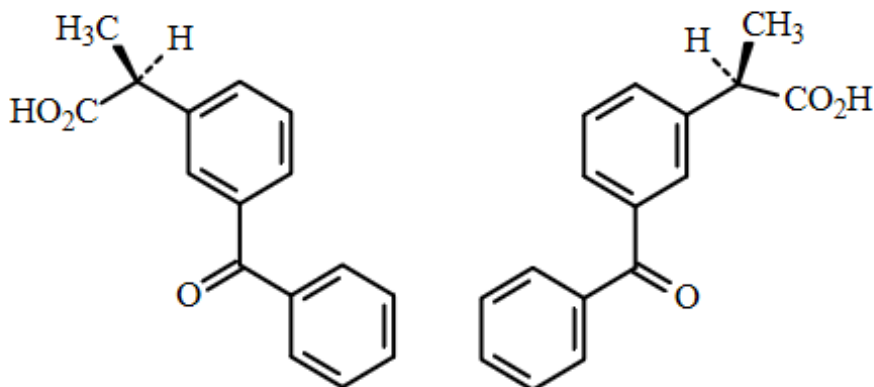


Figura 6. Estereoquímica de Ketoprofeno. Enantiómeros *S*(+) y *R*(-) a la izquierda y derecha, respectivamente. Fuente: Rençber *et al.*, 2009.

#### **6.1.4. Mecanismo de acción**

La acción analgésica y antiinflamatoria de los antiinflamatorios no esteroideos y de Ketoprofeno en particular se debe a la inhibición no selectiva de isoformas de la ciclooxigenasa (COX), una enzima involucrada en la producción de prostaglandinas, potentes mediadores de inflamaciones, que resultan en edemas, dolor y vasodilatación (Simon, 1999; Green, 2001). Existen 2 tipos de COX; la COX-1 se produce constantemente en las células del cuerpo bajo condiciones fisiológicas, mientras que la COX-2 es inducida por citoquinas, mitógenos y endotoxinas bajo condiciones patológicas, como lo es la inflamación (Mennillo *et al.*, 2017). Estas isoenzimas poseen diversos roles fisiológicos y patofisiológicos, donde exhiben diferencias farmacológicamente importantes en términos de estructura y perfiles de inhibición. Así, los efectos secundarios no deseados de estos fármacos se atribuyen a su acción inhibitoria de la COX-1, mientras que los efectos terapéuticos de los mismos se relacionan con la inhibición de la COX-2 (Villegas *et al.*, 2004). Ketoprofeno ha demostrado una inhibición importante de COX-1 y por lo tanto incrementa el riesgo de padecer efectos secundarios en el tracto gastrointestinal si su administración oral es sostenida en el tiempo (Adachi *et al.*, 2011).

Ketoprofeno produce una inhibición reversible de la COX al competir con el sustrato (ácido araquidónico) por el sitio activo de la enzima (Vane & Botting, 1996). El efecto terapéutico de Ketoprofeno reside casi únicamente en el enantiómero S(+), ya que el enantiómero R(-) carece de interacciones con el sitio de unión de la ciclooxigenasa. Además, el enantiómero S(+) es absorbido rápidamente en el tracto gastrointestinal (unas 2 horas aproximadamente), caracterizándose así por un rápido inicio de la acción biológica (Evans, 1992; Barden *et al.*, 2009).

#### **6.1.5. Toxicología**

Recientemente, Bownik *et al.* (2020) determinó la influencia del Ketoprofeno en concentraciones desde  $0.005 \text{ mgL}^{-1}$  hasta  $50 \text{ mgL}^{-1}$  en criterios de valoración de comportamiento (velocidad de nado, frecuencia de salto) y fisiológicos (ritmo cardíaco, actividad de la extremidad torácica, movimientos de mandíbula) de *Daphnia magna*, evidenciando una significativa disminución en dichos criterios tras 24 y 48 horas de exposición, respectivamente. Así, ambos resultados indicaron que las dafnias responden de manera negativa al fármaco en concentraciones normales en el medioambiente. A modo de ejemplo, la Figura N°7 muestra el efecto de Ketoprofeno en la velocidad de nado de *Daphnia magna*.

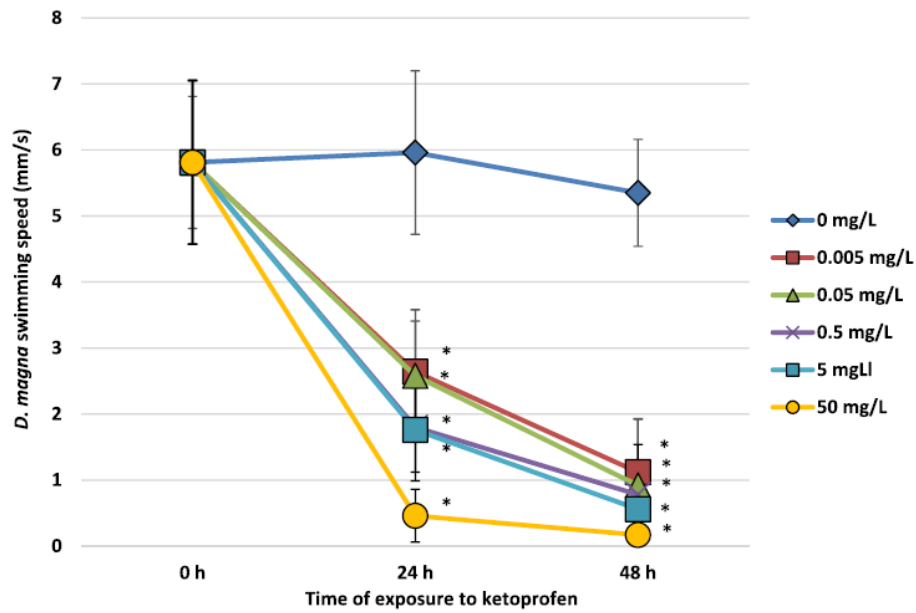


Figura 7. Velocidad de nado de *Daphnia magna* expuesta a diferentes concentraciones de Ketoprofeno. Resultados son presentados como valores medios  $\pm$  SD. Asteriscos indican significancia estadística a  $p < 0.05$  al ser comparada con el control.

Fuente: Bownik *et al.*, 2020.

Illés *et al.* (2014) comparó la degradación de Ketoprofeno mediante ozonización ( $O_3$ ) y su combinación con radiación ultravioleta ( $O_3/UV$ );  $O_3/UV$  resultó ser más efectiva, llamando además la atención de que los productos de transformación resultaron ser de una toxicidad mucho mayor que la del Ketoprofeno como tal hacia especies de ecosistemas acuáticos como *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* y *Vibrio fischeri*.

Variedad de estudios de toxicidad aguda y oral crónica de Ketoprofeno han demostrado lesiones y sangramiento gastrointestinal, erosiones, úlceras intestinales, peritonitis y muerte en ratas, perros y monos (Nieto *et al.*, 2002; Shientag *et al.*, 2012; Okai, 2005), efectos negativos en tasas de crecimiento y marcados retrasos en su desarrollo en etapas tempranas en embriones y larvas de la Carpa común (*Cyprinus carpio*) (Prášková *et al.*, 2013) y signos de depresión, pérdida de apetito y coma aparente en ejemplares de buitres leonados (*Gyps coprotheres*) con resultado de muerte tras 48 h de administrada una dosis de 5 mg/kg (Naidoo *et al.*, 2010).

## 6.2. Definición de condiciones de operación y parámetros cinéticos

Se consideraron 2 biorreactores tipo batch dentro del sistema, uno para el proceso de crecimiento y producción enzimática, y uno para el proceso de biodegradación del fármaco. A continuación se definen las condiciones de operación y los parámetros cinéticos considerados dentro del modelo matemático para cada biorreactor.

### 6.2.1. Biorreactor N°1

Para el primer biorreactor se consideró una fermentación en cultivo sumergido con medio *Trametes* definido (TDM) modificado (Anexo A1), según lo descrito por Roy & Archibald (1993), en condiciones de limitación de carbono y con adición de inductores para mejorar la producción de lacasa, como lo son el cobre, la 2,5-xilidina y una mezcla fenólica, componentes considerados como micronutrientes (Bollag & Leonowicz, 1984; Palmieri *et al.*, 2000).

Los parámetros cinéticos relacionados directamente con las condiciones de operación señaladas son detallados en la tabla N°2.

Tabla 2. Parámetros cinéticos asociados al biorreactor N°1.

Nombre	Nomenclatura	Valor	Proceso asociado	Ecuación asociada
Tasa de crecimiento específica máxima	$\mu_{\text{máx}}$	0.82 (día <sup>-1</sup> )	Crecimiento	1
Constante de afinidad	$K_s$	1.3 (g dm <sup>-3</sup> )	Crecimiento	1
Rendimiento de la biomasa	$Y_{X/S}$	-0.38 (g g <sup>-1</sup> )	Consumo de sustrato	2
Constante asociada al crecimiento	$\alpha$	0.147 (U g <sup>-1</sup> )	Producción enzimática	3
Constante no asociada al crecimiento	$\beta$	499 (U g <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	Producción enzimática	3

A lo anterior se le suman ciertas suposiciones, como lo son un previo cultivo del microorganismo en medio *Tien y Kirk* en placas de Petri a 28°C por 7 días previo a su utilización (Tien & Kirk, 1988) y ajustes de pH a 5.0 al medio de cultivo antes de una esterilización a condiciones estándar de 121 °C por 21 min (Tavares *et al.*, 2005).

### 6.2.2. Biorreactor N°2

Para el caso del segundo biorreactor se consideró una cinética de Michaelis-Menten, en donde se utilizaron los parámetros cinéticos determinados por Arca-Ramos *et al.* (2016) de lacasa libre con ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (en adelante ABTS) como sustrato enzimático.

Los parámetros cinéticos relacionados con las condiciones mencionadas son detallados en la tabla N°3, así como las constantes de conversión, en la tabla N°4.

Tabla 3. Parámetros cinéticos asociados al biorreactor N°2.

Nombre	Nomenclatura	Valor	Proceso asociado	Ecuación asociada
Constante catalítica	$K_{cat}$	-153.7 (día <sup>-1</sup> )	Biodegradación	4
Constante de Michaelis-Menten	$K_M$	38.5 (μM)	Biodegradación	4

Tabla 4. Constantes añadidas a la ecuación N°4.

Nombre	Nomenclatura	Valor	Proceso asociado	Ecuación asociada
Constante de conversión	$\theta$	0.01 (μg U <sup>-1</sup> )	Biodegradación	4
Constante de conversión	$\lambda$	86400 (s <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	Biodegradación	4

Se supusieron condiciones estándar para la determinación de los parámetros cinéticos mencionados (0.1 M de tampón acetato, pH 4.0 y 25 °C) (Arca-Ramos *et al.*, 2016).

### 6.2.3. Representación de la configuración del proceso

La Figura N°8 muestra un esquema que representa la configuración del proceso. Se plantea la utilización de un sistema de separación teórico (A) a la salida del primer biorreactor. Dicho separador consta de dos membranas internas (Anexo A2), en donde la primera permite el paso de moléculas de un tamaño menor o igual a 72 kilodalton (kDa) (es decir, enzimas producidas y sustrato) y la segunda permite el paso de moléculas con un tamaño menor o igual a 32 (kDa) (es decir, glucosa, que posee un tamaño aproximado de 0.18 (kDa), siendo recirculada al primer biorreactor en conjunto con la biomasa), lo cual resulta en el paso exclusivo de enzimas al segundo biorreactor. El rango de tamaños descrito anteriormente se centra en el peso molecular de la enzima producida (lacasa), el cual es de 52 (kDa), considerando así un rango de  $\pm 20$  (kDa).

A lo anterior se le suma un sistema de nanofiltración (B) a la salida del segundo biorreactor, para filtrar el agua del resto de la mezcla, recirculando esta al segundo biorreactor, y el agua al primero, en conjunto con la biomasa y el sustrato provenientes del separador (A).

Esta configuración busca fundamentalmente mantener condiciones de volumen constante y un equilibrio en el sistema, lo cual formó parte de las suposiciones al elaborar las ecuaciones diferenciales descritas en el apartado 6.3.

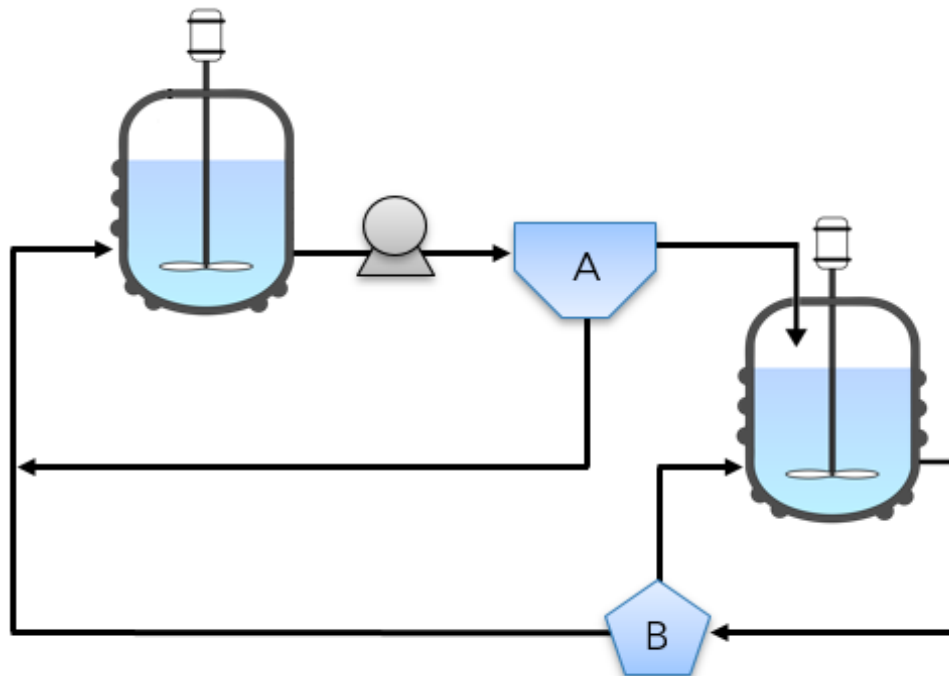


Figura 8. Esquema que representa el proceso general.

### 6.3. Desarrollo de un sistema de ecuaciones diferenciales

#### 6.3.1. Crecimiento y producción enzimática de *Trametes versicolor*

Para el caso del primer biorreactor, se planteó un modelo del tipo Monod (Tavares *et al.*, 2005) que logra describir la variación de la biomasa a través del tiempo, descrito por la ecuación N°1, además de un diagrama de bloques en el software MATLAB y su herramienta integrada *Simulink*, que describe a la misma (Figura N°9):

$$\frac{dX}{dt} = \left( \frac{\mu_{m\acute{a}x} S}{(K_s + S)} \right) X \quad (1)$$

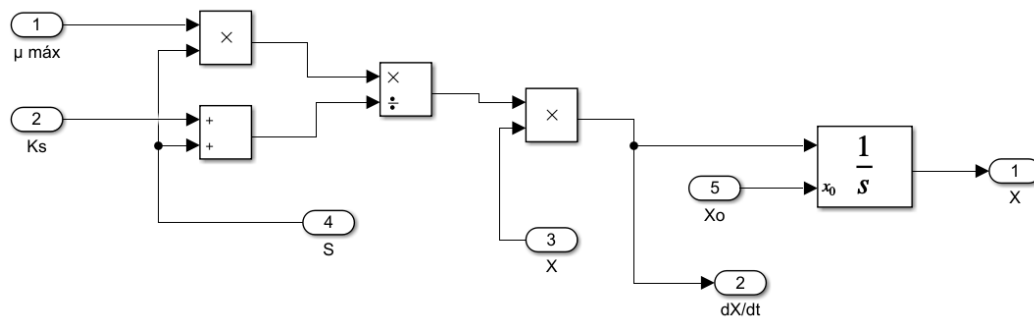


Figura 9. Diagrama de bloques que describe la variación de la biomasa a través del tiempo.

El consumo de sustrato se ve representado por la ecuación N°2, obtenida a partir de un ajuste llevado a cabo sobre la expresión original de Tavares *et al.* (2005). De igual manera, la Figura N°10 presenta el diagrama de bloques correspondiente al consumo de sustrato:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\frac{dX}{dt}}{Y_{X/S}} \quad (2)$$

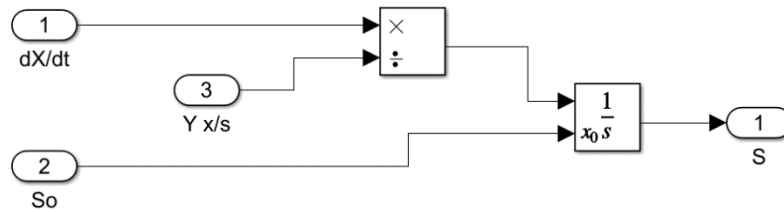


Figura 10. Diagrama de bloques que describe el consumo de sustrato a través del tiempo.

La producción enzimática del microorganismo fue representada por la ecuación N°3, y el diagrama de bloques que le corresponde se presenta en la Figura N°11.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (3)$$

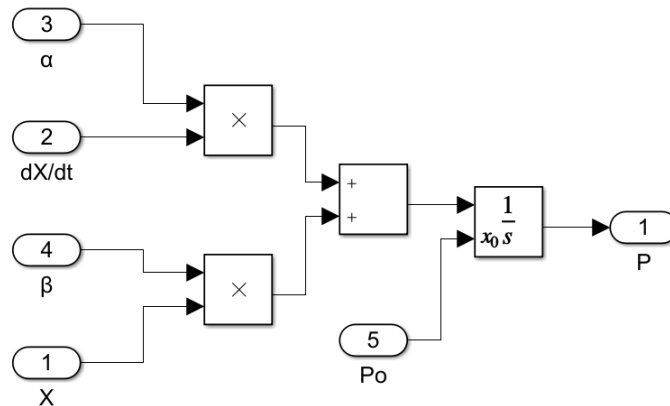


Figura 11. Diagrama de bloques que describe la producción de enzimas a través del tiempo.

De esta manera, el diagrama general para el primer biorreactor queda demostrado en la Figura N°12, en donde se puede apreciar que los procesos de crecimiento, consumo de sustrato y la producción enzimática se encuentran interrelacionados.

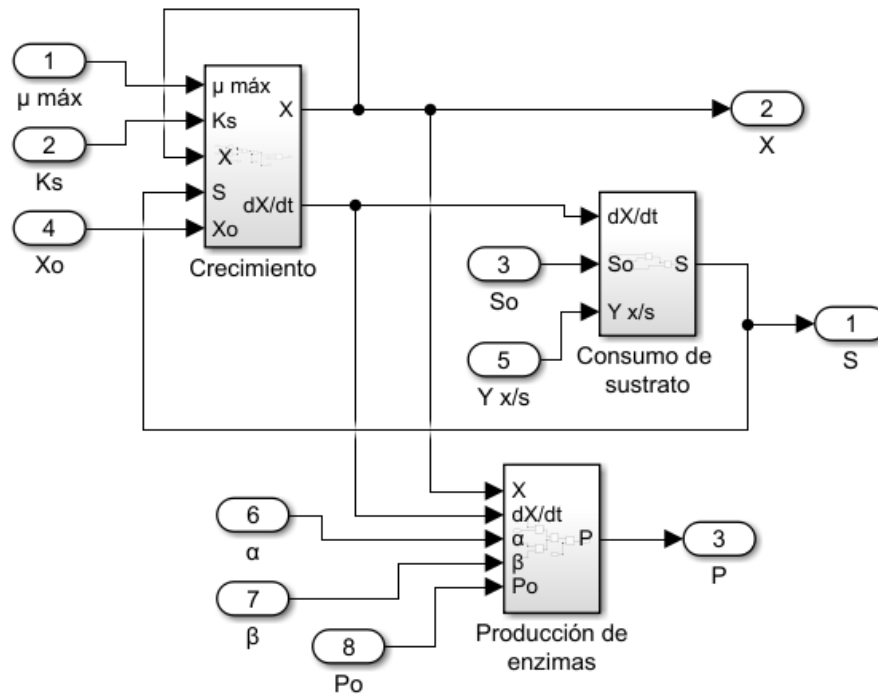


Figura 12. Diagrama de bloques general del primer biorreactor.

Donde  $X$  ( $\text{g L}^{-1}$ ) es la concentración de biomasa,  $S$  ( $\text{g L}^{-1}$ ) es la concentración de sustrato (glucosa) como fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo,  $P$  ( $\text{U L}^{-1}$ ) es la concentración de enzimas producidas,  $t$  es el tiempo (día),  $\mu_{m\acute{a}x}$  ( $\text{d\acute{a}a}^{-1}$ ) es la tasa de crecimiento específica máxima del microorganismo,  $Y_{X/S}$  ( $\text{g g}^{-1}$ ) es el rendimiento de la biomasa,  $K_S$  ( $\text{g dm}^{-3}$ ) es la constante de afinidad del microorganismo por el sustrato,  $\alpha$  ( $\text{U g}^{-1}$ ) es la constante asociada al crecimiento, y  $\beta$  ( $\text{U g}^{-1} \text{d\acute{a}a}^{-1}$ ) es la constante no asociada al crecimiento.

### 6.3.2. Biodegradación de Ketoprofeno por la actividad enzimática de *Trametes versicolor*

El segundo biorreactor considerado en el sistema involucra la biodegradación del fármaco en cuestión por efecto de la lacasa producida por *Trametes versicolor* en el primer biorreactor. Para describir este proceso a lo largo del tiempo se planteó la ecuación N°4, la cual sigue una cinética del tipo Michaelis-Menten:

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{-K_{cat} \theta \lambda \frac{P S_2}{PM_{lac} PM_{Ket}}}{K_M + S_2} \quad (4)$$

Donde  $S_2$  ( $\mu\text{M}$ ) es la nueva concentración de sustrato para la enzima (fármaco),  $t$  (día) es el tiempo,  $K_{cat}$  ( $\text{día}^{-1}$ ) es la constante catalítica (número de moléculas de sustrato que cada sitio activo de la enzima convierte en producto por unidad de tiempo),  $\theta$  ( $\mu\text{g U}^{-1}$ ) y  $\lambda$  ( $\text{s día}^{-1}$ ) son constantes de conversión de unidades,  $P$  ( $\text{U L}^{-1}$ ) es el valor de la concentración de enzima alimentada desde el primer biorreactor,  $PM_{lac}$  ( $\mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1}$ ) es el peso molecular de la enzima catalizadora (que en este caso es lacasa),  $PM_{Ket}$  ( $\mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1}$ ) es el peso molecular del Ketoprofeno, y  $K_M$  ( $\mu\text{M}$ ) es la constante de Michaelis-Menten, valor utilizado como una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato (Ingole & Rathod, 2020). La ecuación descrita se ve además reflejada en el diagrama presente en la Figura N°13.

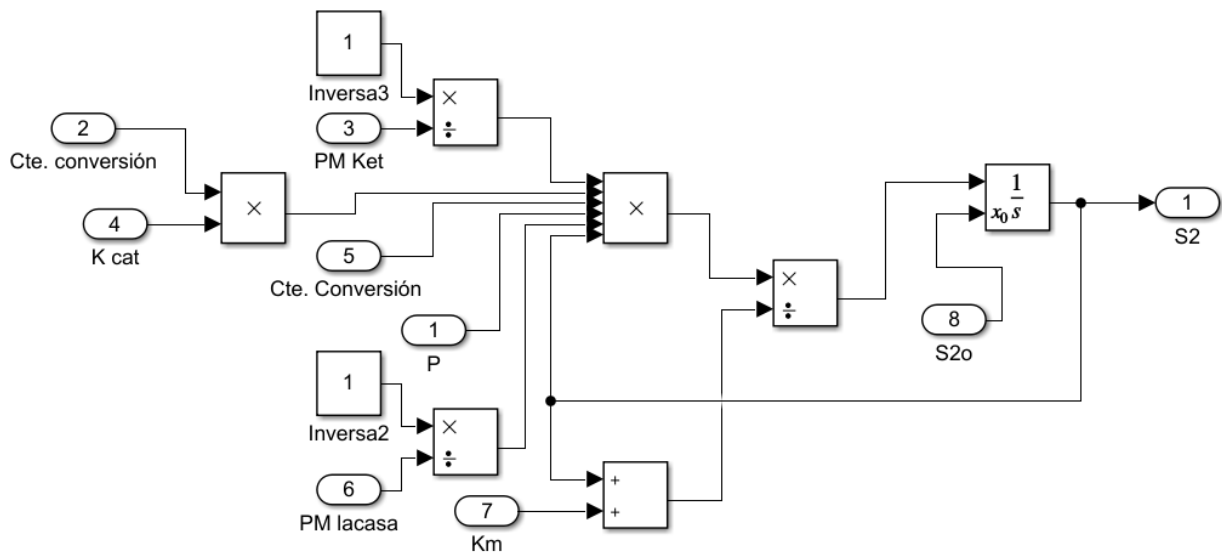


Figura 13. Diagrama de bloques general del segundo biorreactor, que describe la biodegradación del fármaco a través del tiempo.

Finalmente, el diagrama general que involucra tanto al primer como al segundo biorreactor, y que describe todos los procesos antes mencionados, se muestra en la Figura N°14.

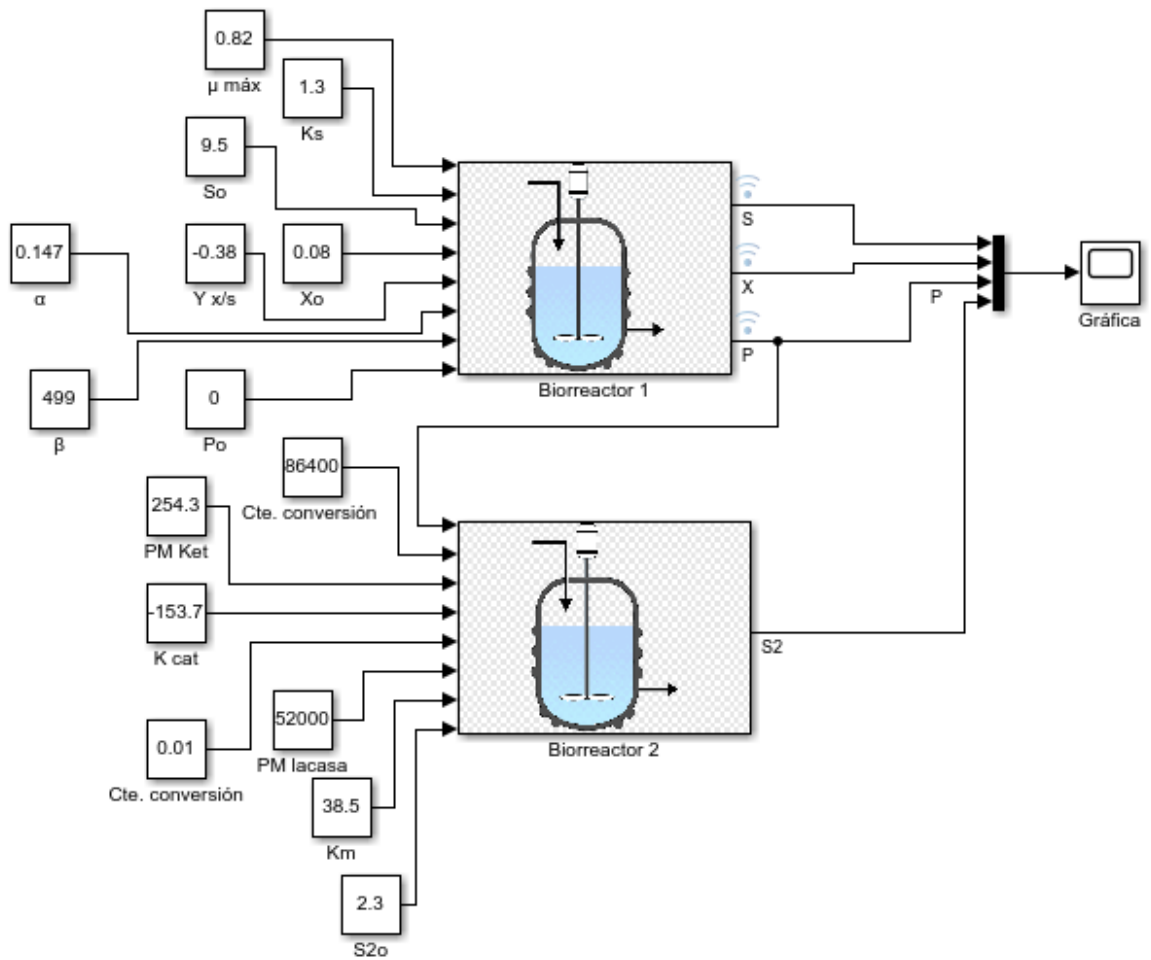


Figura 14. Diagrama general del proceso.

## 6.4. Calibración de modelo y obtención de simulaciones a través del tiempo

### 6.4.1. Análisis de sensibilidad

Se llevó a cabo un análisis de sensibilidad paramétrica sobre la Ecuación N°4 (correspondiente a la biodegradación del fármaco estudiado) para determinar la magnitud de los cambios en la respuesta del modelo, al variar ciertos valores de componentes del mismo, así como la adición de otros (Plata *et al.*, 2011). Para esto se agregó una constante de dilución ( $\rho$ ) (ver Ecuación N°5) con el fin de evaluar la respuesta del modelo frente a cambios en la concentración de la enzima. Por otro lado, se realizaron cambios en los valores de las constantes  $K_{cat}$  y  $K_M$ .

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{-K_{cat} \theta \lambda \rho \frac{P S_2}{PM_{lac} PM_{Ket}}}{K_M + S_2} \quad (5)$$

La Figura N°15 muestra la variación en la respuesta del modelo para distintos valores de la constante de dilución ( $\rho$ ).

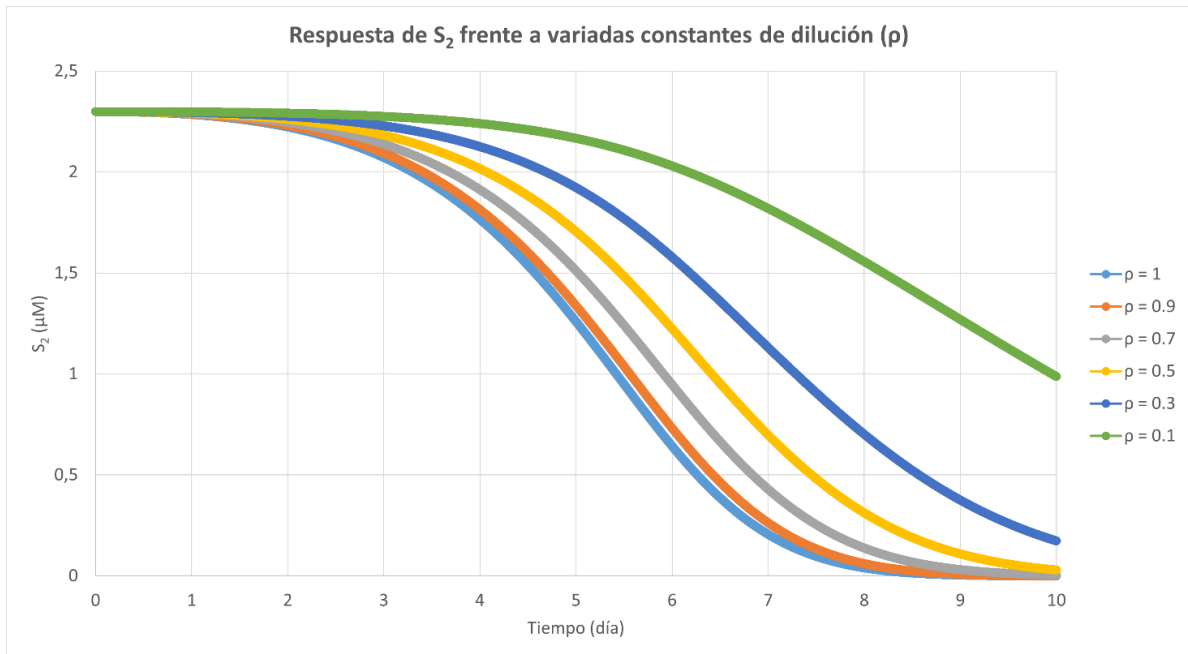


Figura 15. Variación de  $S_2$  respecto de la constante de dilución aplicada. Valores de  $K_{cat}$  y  $K_M$  se mantuvieron constantes en  $-153.7$  ( $\text{día}^{-1}$ ) y  $38.5$  ( $\mu\text{M}$ ), respectivamente.

De igual manera, las Figuras N°16, 17 y 18 muestran la variación en la respuesta del modelo para distintos valores de  $K_{cat}$ , distintos valores de  $K_M$ , y distintos valores de  $K_{cat}$  y  $K_M$  simultáneamente, respectivamente.

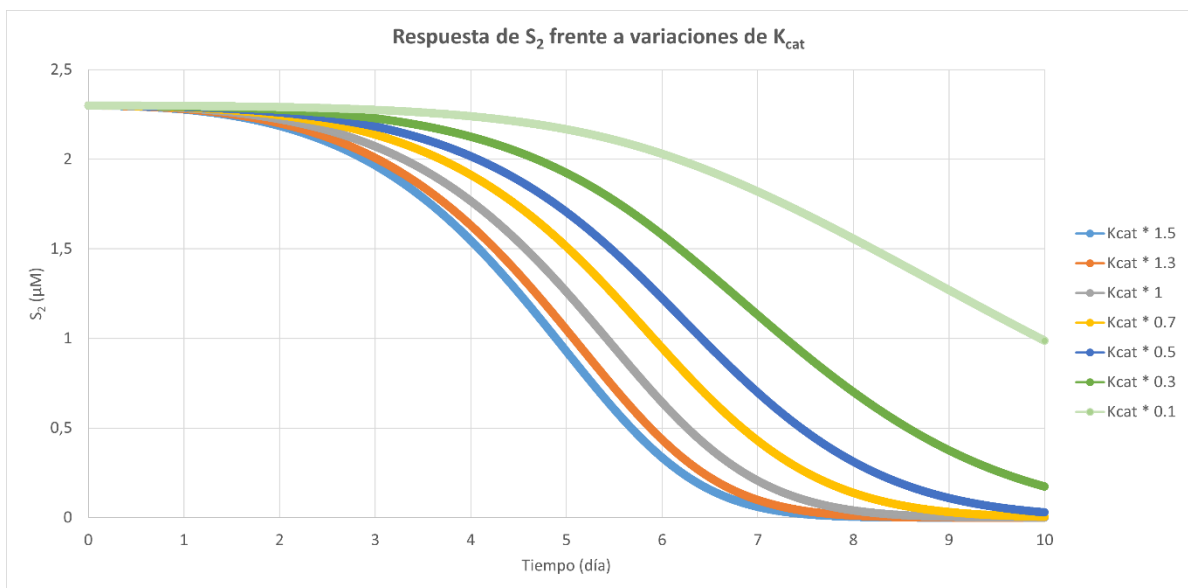


Figura 16. Variación de  $S_2$  al aplicar distintos valores de  $K_{cat}$ . Valores de  $K_M$  y  $\rho$  se mantuvieron constantes en  $38.5$  ( $\mu\text{M}$ ) y  $1$ , respectivamente.

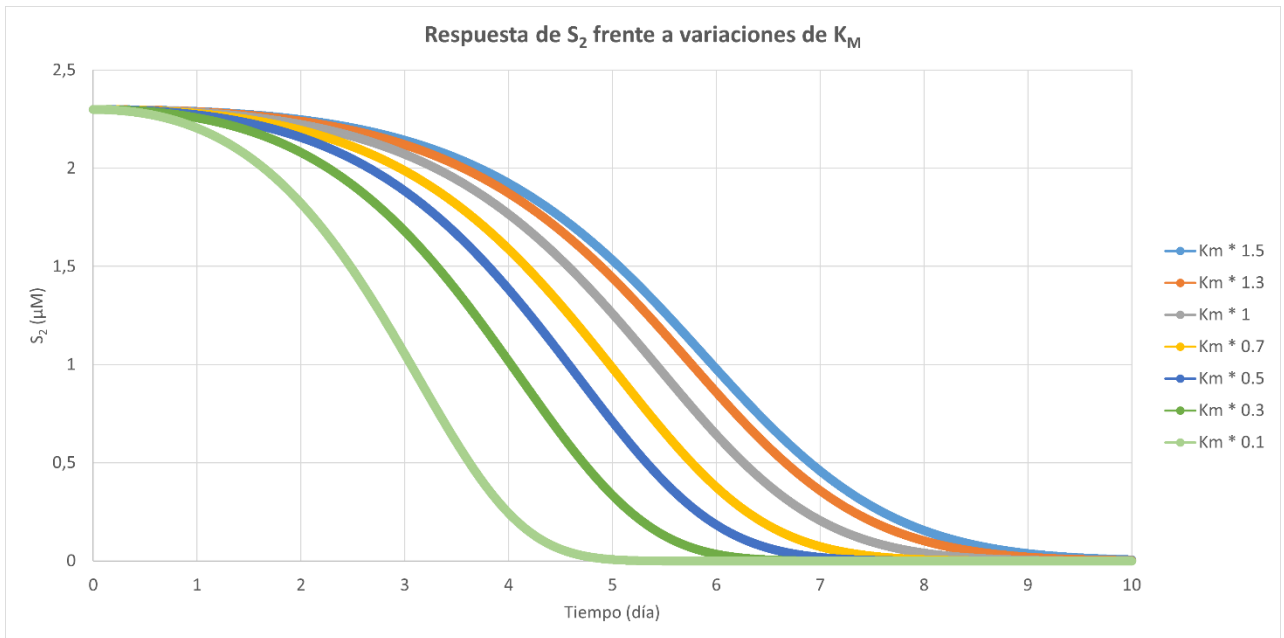


Figura 17. Variación de  $S_2$  al aplicar distintos valores de  $K_M$ . Valores de  $K_{cat}$  y  $\rho$  se mantuvieron constantes en  $-153.7$  ( $\text{día}^{-1}$ ) y  $1$ , respectivamente.

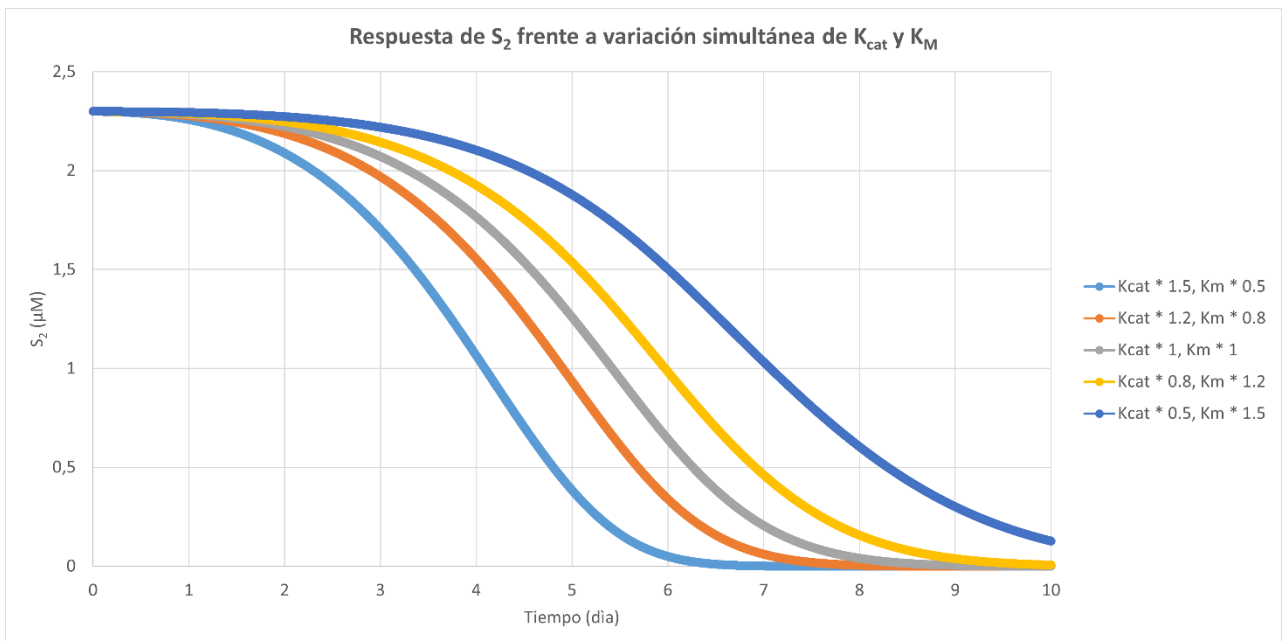


Figura 18. Variación de  $S_2$  al aplicar distintos valores de  $K_{cat}$  y  $K_M$  simultáneamente. La constante de dilución se mantuvo constante, con  $\rho=1$ .

### 6.4.2. Simulación del proceso de crecimiento de *Trametes versicolor* y la biodegradación de Ketoprofeno por su actividad enzimática

Una vez planteado el diagrama de bloques que describe el proceso en el software *Simulink*, se procedió a ejecutar el modelo, obteniendo así la gráfica presentada en la Figura N°19.

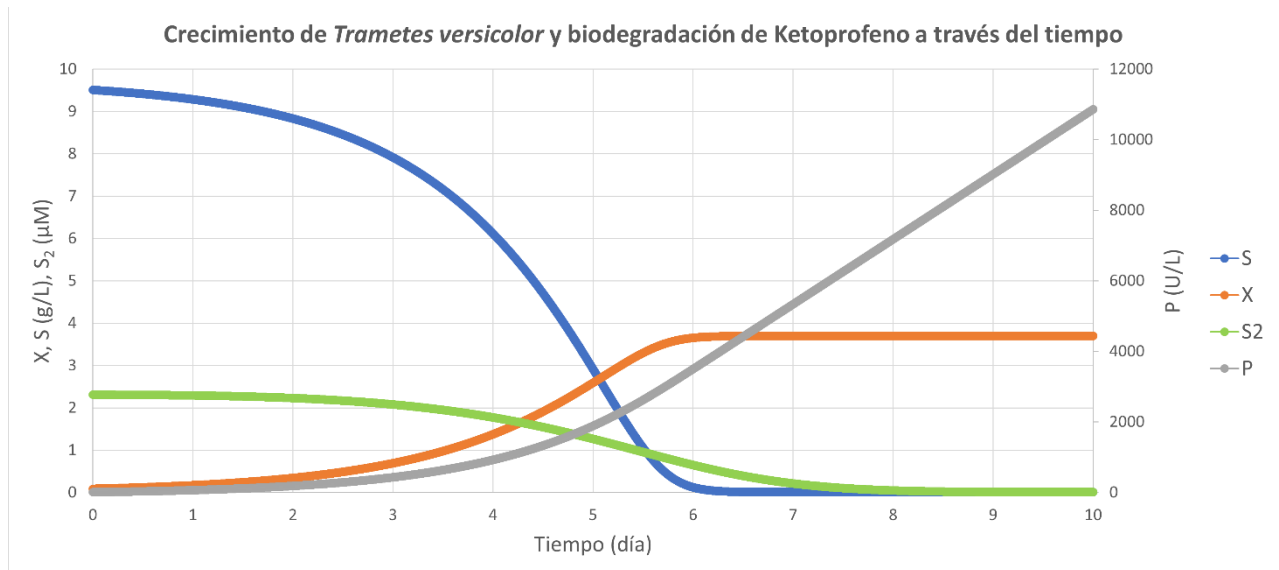


Figura 19. Gráfico de dispersión que describe el proceso completo a través del tiempo. X, Biomasa; S, Sustrato; S<sub>2</sub>, Nuevo sustrato (Ketoprofeno); P, Enzimas producidas. En este caso,  $K_{cat}$  y  $K_M$  se mantuvieron constantes en  $-153.7$  ( $\text{día}^{-1}$ ) y  $38.5$  ( $\mu\text{M}$ ), respectivamente.

## 7. DISCUSIÓN

Dentro de toda la gama de AINEs, se planteó la utilización de Ketoprofeno como contaminante emergente a biodegradar, debido a que según bibliografía nacional estudiada, este fármaco sería el que en mayor concentración se encuentra en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales del país (Manzo *et al.*, 2014). Además, el Instituto de Salud Pública de Chile (2020) lo sitúa como uno de los fármacos más consumidos a nivel nacional.

Para dicho efecto se consideró la utilización de biorreactores por lotes o tipo *batch*, debido a que este tipo de reactor permite un mejor control de las condiciones de operación (Choi *et al.*, 2008), posee un menor riesgo de contaminación que un proceso continuo y se puede asumir una maximización en la producción de biomasa.

Respecto a las ecuaciones que conforman el modelo planteado, si bien una expresión del tipo Monod no se adecúa específicamente para la descripción de la producción de biomasa de un hongo filamentoso (es decir, que crece mediante la extensión de los ápices de sus hifas, y no mediante fisión binaria como las bacterias), se determinó la utilización de la ecuación N°1 para dicho fin debido a que no fue posible hallar en bibliografía un modelo que se adecuara a lo mencionado y se enfocara en la producción de lacasa en fermentación en cultivo sumergido. Se encontraron modelos que describían este proceso para fermentaciones en estado sólido mediante el uso de, por ejemplo, la ecuación logística (Mitchell *et al.*, 2004; Smits *et al.*, 1998; Hasan *et al.*, 1998), pero corresponde a algo que se escapa del alcance de este estudio.

Para la descripción del consumo de sustrato (ecuación N°2) se llevó a cabo un ajuste sobre la ecuación original obtenida de Tavares *et al.* (2005), debido a que se encontraba con uno de sus componentes (tasa de crecimiento) ubicado de manera errónea, específicamente en el denominador, el cual fue ubicado en el numerador. Esto producía que la concentración de sustrato en el primer biorreactor tomara valores negativos antes del primer día, un comportamiento claramente imposible.

La producción de lacasa en la ecuación N°3 se consideró como una asociación entre la tasa de crecimiento y la concentración de biomasa, utilizando la relación más simple posible, según lo descrito por Luedeking & Piret (1959).

Según Tavares *et al.* (2005), las condiciones de operación mencionadas para el primer biorreactor (tanto la limitación de carbono como la adición de inductores) favorecerían en un 138% más la producción de lacasa que al no considerarlas. Esto se condice con estudios que hacen uso de inductores como los mencionados, buscando una optimización en la producción de lacasa en hongos de pudrición blanca como *Ganoderma lucidum* (Kuhar & Papinutti, 2014) o *Trametes pubescens* (Galhaup & Haltrich, 2001), donde predominan actividades extracelulares de lacasa inducidas por cobre y 2,5-xilidina.

En este contexto, existen ciertos parámetros cinéticos presentes en la ecuación N°4 ( $K_{cat}$  y  $K_M$ ) específicos para Ketoprofeno como sustrato que no fueron encontrados en bibliografía y que, por lo tanto, requieren de su determinación mediante experimentación en laboratorio. De esta manera es que el segundo biorreactor considera ABTS como sustrato con lacasa libre en solución como enzima catalizadora, siendo los parámetros cinéticos recién mencionados específicos para estas condiciones.

Para el caso del análisis de sensibilidad llevado a cabo sobre la misma ecuación, específicamente respecto de la constante de dilución aplicada, se pudo evidenciar que a una mayor dilución (menor valor de la constante), se aprecia un desplazamiento de la curva hacia la derecha, lo que indica un aumento en el tiempo de remoción del fármaco donde, por ejemplo, para una dilución de un 10% (valor de  $\rho$  igual a 0.9) se alcanza una remoción de un 95% del contaminante a los 7 días y 14 horas aproximadamente, frente a los 9 días necesarios para alcanzar el mismo grado de remoción a una dilución de un 50% (valor de  $\rho$  igual a 0.5). Los valores de tiempo mencionados fueron obtenidos mediante la herramienta interna de análisis e inspección de datos de MATLAB.

La Figura N°16 muestra que, al igual que con la constante de dilución, los tiempos de remoción del fármaco aumentan a medida que disminuye el valor de  $K_{cat}$ . Esto demuestra la importancia de mantener valores altos de la constante y así mantener una alta eficiencia enzimática, pues aquello significa que por cada segundo que pasa, un mayor número de moléculas de sustrato son convertidas en producto por cada sitio activo de la enzima.

Como se puede apreciar en la Figura N°17, al disminuir los valores de la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) las curvas se desplazan hacia la izquierda, lo que indica que los tiempos de remoción del fármaco disminuyen. Lo anterior tiene explicación en que la enzima posee una mayor afinidad por el sustrato a menores valores de la constante, requiriendo así una menor concentración de sustrato para lograr la tasa máxima de reacción ( $V_{m\acute{a}x}$ ) (López & García, 2015).

Así, la gráfica presentada en la Figura N°18 permite verificar los comportamientos mencionados anteriormente en ambos parámetros, donde se puede establecer que ambos son altamente sensibles a disminuciones en sus valores, no así a los aumentos, donde una disminución en los valores de  $K_M$  y  $K_{cat}$  representa una mayor sensibilidad en la disminución y en el aumento del tiempo de remoción del contaminante, respectivamente. Es por esto que al aumentar el valor de  $K_{cat}$  y disminuir el valor de  $K_M$ , se esperaba un desplazamiento de la curva hacia la izquierda. De igual manera, al disminuir el valor de  $K_{cat}$  y aumentar el valor de  $K_M$  se esperaba lo contrario, un desplazamiento de la curva a la derecha y un aumento en el tiempo de remoción del fármaco.

En la simulación general del proceso mostrada en la Figura N°19, se puede evidenciar una correcta correlación entre ambos procesos de fermentación, con una remoción de un 95% del fármaco pasados los 7 días, lo que difiere de lo reportado por autores como Cruz-Morató *et al.* (2013), en donde se alcanza una completa remoción de 0.08 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) del fármaco a los 2 días aproximadamente, así como de los 21 días reportados por Dalecka *et al.* (2020) para una remoción de un 80% de una concentración inicial de 5 ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de contaminante, o las 5 horas para un 95% de remoción reportadas por Marco-Urrea *et al.* (2010b), para una concentración inicial de Ketoprofeno de 40 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Esta discrepancia entre distintos tiempos de remoción del fármaco puede deberse a que muchas veces se hace uso de cepas específicas del microorganismo para estos estudios, donde la cepa juega un rol importante en la calidad de la enzima a utilizar y, por ende, en los tiempos y grados de remoción de los contaminantes. A lo anterior se le suma que este estudio es en base a una simulación, donde no se toman en cuenta los cambios naturales en las condiciones del sistema por factores ambientales, así como otros microorganismos que compitan por el consumo del sustrato, lo que claramente influye en el resultado final.

## 8. CONCLUSIÓN

Se ha planteado un modelo dinámico que logra, por un lado, describir de manera interrelacionada el crecimiento, consumo de sustrato y producción enzimática del hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor* a partir de una fermentación en cultivo sumergido y, por otro lado, la biodegradación de Ketoprofeno como un contaminante emergente por acción de la actividad enzimática del microorganismo, a partir de lacasa como enzima catalizadora.

Las condiciones de operación y los parámetros cinéticos planteados en este trabajo pueden servir de apoyo para futuros diseños de biorreactores y control de procesos, así como el modelo planteado cumple con ser una base para futuros estudios de simulación de sistemas relacionados con la remoción de otros fármacos desde aguas residuales, con base en la micorremediación. Así, un panorama futuro puede significar el aplicar este estudio a muestras *in vivo* de aguas residuales, para así proponer su uso a una escala de nivel industrial.

El análisis de sensibilidad llevado a cabo permitió establecer que es importante la realización de futuros estudios que establezcan las condiciones para obtener valores óptimos e idealmente bajos de la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) y altos de la constante catalítica ( $K_{cat}$ ) para Ketoprofeno específicamente, debido a que esto favorece una disminución significativa en los tiempos de remoción del fármaco, lo que llevado a gran escala puede significar un importante ahorro de material y disminución en costos de operación.

Con base en los resultados obtenidos, se concluye entonces que *Trametes versicolor* y su lacasa poseen un potencial importante en lo que a biodegradación de contaminantes emergentes respecta, siendo una alternativa vanguardista frente a los métodos convencionales de biorremediación. No está demás mencionar que el modelo planteado, así como las simulaciones llevadas a cabo, corresponden a situaciones teóricas que deben ser corroboradas experimentalmente en laboratorio, para establecer de manera veraz los grados y tiempos más eficientes de remoción del fármaco, mediante la determinación de parámetros cinéticos específicos para Ketoprofeno. Esto debido a que es sumamente difícil adecuar un modelo matemático a cambios inesperados en tanto factores ambientales como condiciones de trabajo, por lo que la veracidad de las predicciones y el control en la eficacia de las mismas es limitado.

## 9. REFERENCIAS

- Abatan, M. O., Lateef, I., Taiwo, V. O. (2006). *Toxic effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Agents in Rats*. African Journal of Biomedical Research, 9, 219-223.
- Adachi, H., Ioppolo, F., Paoloni, M., Santilli, V. (2011). *Physical characteristics, pharmacological properties and clinical efficacy of the ketoprofen patch: a new patch formulation*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 15, 823-830.
- Akhtar, N., Mannan, M. A.-u. (2020). *Mycoremediation: Expunging environmental pollutants*. Biotechnology Reports, 26, 1-10.
- Aracil, J., Gordillo, F. (1997). *Dinámica de sistemas* (p. 20). Madrid, Alianza Editorial.
- Arca-Ramos, A., Kumar, V., Eibes, G., Moreira, M., Cabana, H. (2016). *Recyclable cross-linked laccase aggregates coupled to magnetic silica microbeads for elimination of pharmaceuticals from municipal wastewater*. Environmental Science and Pollution Research, 23, 8929-8939.
- Aust, S. D., Benson, J. T. (1993). *The Fungus among Us: Use of White Rot Fungi to Biodegrade Environmental Pollutants*. Environmental Health Perspectives, 101 (3), 232-233.
- Barden, J., Derry, S., McQuay, H. J., Moore, R. A. (2009). *Single dose oral ketoprofen and dexketoprofen for acute postoperative pain in adults (Review)*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 11.
- 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.
- Barnes, P. J. (2006). *Corticosteroids: The drugs to beat*. European Journal of Pharmacology, 533(1-3), 2-14.
- Barr, D. P., Aust, S. D. (1994). *Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants*. Environmental Science and Technology, 28 (2), A78-87.
- Belanoff, J. K., Gross, K., Yager, A., Schatzberg, A. F. (2001). *Corticosteroids and cognition*. Journal of Psychiatric Research, 35(3), 127-145.
- Bendz, D., Paxéus, N. A., Ginn, T. R., Loge, F. J. (2005). *Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden*. Journal of Hazardous Materials, 122 (3), 195-204.
- Blanchette, R. A. (1991). *Delignification by Wood-Decay Fungi*. Annual Review of Phytopathology, 29, 381-398.

- Blanco, M., González, J., Torras, E., Valverde, I. (2003). *Enantiomeric purity determination of ketoprofen by capillary electrophoresis: development and validation of the method*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 375(1), 157-163.
- Bollag, J. M. (1992). *Decontaminating soil with enzymes*. Environmental Science & Technology, 26(10), 1876-1881.
- Bollag, J-M., Leonowicz, A. (1984). *Comparative studies of extracellular fungal laccases*. Applied and Environmental Microbiology, 48, 849-854.
- Bownik, A., Jasieczek, M., Kosztowny, E. (2020). *Ketoprofen affects swimming behavior and impairs physiological endpoints of Daphnia magna*. Science of the Total Environment, 725, 138312.
- Březinová, T. D., Vymazal, J., Koželuh, M., Kule, L. (2018). *Occurrence and removal of ibuprofen and its metabolites in full-scale constructed wetlands treating municipal wastewater*. Ecological Engineering, 120, 1-5.
- Cailleteau, J. G. (1988). *Ketoprofen in dentistry: A pharmacologic review*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 66(5), 620-624.
- Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R. (2003). *Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in northern Italy*. Environmental Science & Technology, 37 (7), 1241-1248.
- Choi, S., Morris, J., Lee, I.-B. (2008). *Dynamic model-based batch process monitoring*. Engineering Science, 63(3), 622-636.
- Cleuvers, M. (2004). *Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 59 (3), 309-315.
- Cruz-Morató, C., Ferrando-Climent, L., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Vicent, T., Sarrà, M. (2013). *Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by Trametes versicolor in a fluidized bed bioreactor*. Water Research, 47, 5200-5210.
- Dalecka, B., Juhna, T., Rajarao, G. (2020). *Constructive use of filamentous fungi to remove pharmaceutical substances from wastewater*. Journal of Water Process Engineering, 33, 100992.
- Dávila, G., Vásquez-Duhalt, R. (2006). *Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales*. Mensaje Bioquímico, 30, 29-55.
- Deacon, J. (2006). *Fungal Biology* (4ª edición). Reino Unido, Blackwell Publishing, 5p.
- DeLorenzo, M. E., Fleming, J. (2007). *Individual and Mixture Effects of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products on the Marine Phytoplankton Species Dunaliella tertiolecta*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 54 (2), 203-210.

- Díaz-Cruz, M.S., López de Alda, M.J., Barceló, D. (2003). *Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge*. Trends in Analytical Chemistry, 22 (6), 340-351.
- Díaz-González, F., Sánchez-Madrid, F. (2015). *NSAIDs: Learning new tricks from old drugs*. European Journal of Immunology, 45, 679-686.
- Divins, M-J. (2014). *Antiinflamatorios*. Farmacia Profesional, 28(5), 19-22.
- Donado, J. de M., Dormido, S., Morilla, F. (2005). *Fundamentos de la dinámica de sistemas y Modelos de dinámica de sistemas en epidemiología*. Madrid.
- Durán-Alvarez, J. C., Becerril-Bravo, E., Castro, V. S., Jiménez, B., Gibson, R. (2009). *The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography-mass spectrometry*. Talanta, 78 (3), 1159-1166.
- El Sayed, M. T., El-Sharief, M. A. M. S., Zarie, E. S., Morsy, N. M., Elsheakh, A. R., Voronkov, A., Berishvili, V., Hassan, G. S. (2018). *Design, synthesis, anti-inflammatory activity and molecular docking of potential novel antipyrine and pyralozone analogs as cyclooxygenase enzyme (COX) inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 28(5), 952-957.
- Evans, A. M. (1992). *Enantioselective pharmacodynamics and pharmacokinetics of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs*. European Journal of Clinical Pharmacology, 42(3), 237-256.
- Fent, K., Weston, A., Caminada, D. (2005). *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*. Aquatic toxicology, 76 (2), 122-159.
- Galhaup, C., Haltrich, D. (2001). *Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus Trametes pubescens in the presence of copper*. Applied Microbiology and Biotechnology, 56, 225-232.
- García-Gomez, C., Gortáres-Moroyoqui, P., Drogui, P. (2011). *Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción*. QuímicaViva, 10 (2), 96-105.
- Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J-M. (1999). *Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes*. Bioremediation Journal, 3(1), 1-26.
- Gómez, M. J., Martínez Bueno, M. J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A. R., Agüera, A. (2007). *Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast*. Chemosphere, 66 (6), 993-1002.
- Grassi, M., Kaykioglu, G., Belgiorno, V., Lofrano, G. (2012). *Removal of Emerging Contaminants from Water and Wastewater by Adsorption Process*. En *Emerging Compounds Removal from Wastewater*. SpringerBriefs, 15-37.
- Green, G. A. (2001). *Understanding NSAIDs: From aspirin to COX-2*. Clinical Cornerstone, 3(5), 50-59.

- Hasan, S., Costa, J., Sanzo, A. (1998). *Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor*. Biotechnology Techniques, 12(10), 787-791.
- Hernando, M. D., Heath, E., Petrovic, M., Barceló, D. (2006). *Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 385 (6), 985-991.
- Hilton, M. J., Thomas, K. V. (2003). *Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1015 (1-2), 129-141.
- Hirohata, M., Ono, K., Morinaga, A., Yamada, M. (2008). *Non-steroidal anti-inflammatory drugs have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for  $\alpha$ -synuclein fibrils in vitro*. Neuropharmacology, 54(3), 620-627.
- Hosny, K. M., Rambo, S. M., Al-Zahrani, M. M., Al-Subhi, S. M., Fahmy, U. A. (2013). *Ketoprofen Emulgel: Preparation, Characterization, and Pharmacodynamic Evaluation*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 20(2), 306-310.
- Illés, E., Szabó, E., Takács, E., Wojnárovits, L., Dombi, A., Gajda-Schranz, K. (2014). *Ketoprofen removal by O3 and O3/UV processes: Kinetics, transformation products and ecotoxicity*. Science of the Total Environment, 472, 178-184.
- Ingole, P., Rathod, V. (2020). *Naproxen Removal from Wastewater by Enzymatic Degradation Using Laccase*. Catalysis in Green Chemistry and Engineering, 3(1), 45-56.
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2020, 15 de septiembre). *ISP informa sobre los medicamentos más demandados en el país durante la pandemia por COVID-19*. <https://cutt.ly/HRZtCkA>
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtera, L., Rubino, M. (2005). *Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products*. Science of the Total Environment, 348 (1-3), 93-101.
- Izquierdo, L. R., Galán, J. M., Santos, J. I., Del Olmo, R. (2008). *Modelado de sistemas complejos mediante simulación basada en agentes y mediante dinámica de sistemas*. EMPIRIA. Revista de Metodología de las Ciencias Sociales, 16, 85-112.
- Jamali, F., Brocks, D. R. (1990). *Clinical Pharmacokinetics of Ketoprofen and Its Enantiomers*. Clinical Pharmacokinetics, 19(3), 197-217.
- Kantor, T. G. (1986). *Ketoprofen: A Review of its Pharmacologic and Clinical Properties*. Pharmacotherapy, 6(3), 93-102.
- Kermia, A. E. B., Fouial-Djebbar, D., Trari, M. (2016). *Occurrence, fate and removal efficiencies of pharmaceuticals in wastewater treatment plants (WWTPs) discharging in the coastal environment of Algiers*. Comptes Rendus Chimie, 19 (8), 963-970.

- Kuhar, F., Papinutti, L. (2014). *Optimization of laccase production by two strains of Ganoderma lucidum using phenolic and metallic inducers*. Revista Argentina de Microbiología, 46(2), 144-149.
- Lee, H.-B., Peart, T. E., Svoboda, M. L. (2005). *Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1094 (1-2), 122-129.
- Lin, A. Y.-C., Tsai, Y.-T. (2009). *Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities*. Science of the Total Environment, 407 (12), 3793-3802.
- Lin, A. Y.-C., Yu, T.-H., Lateef, S. K. (2009). *Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan*. Journal of Hazardous Materials, 167 (1-3), 1163-1169.
- Lindqvist, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2005). *Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters*. Water Research, 39 (11), 2219-2228.
- López, J., García, F. (2015). *Los cuatro mosqueteros de la cinética enzimática*. Revista Eubacteria, 34, 39-43.
- Luedeking, R., Piret, E. L. (1959). *A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH*. Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering, 1(4), 393-412.
- Manzo, V., Honda, L., Navarro, O., Ascar, L., Richter, P. (2014). *Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction*. Talanta, 128, 486-492.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Blánquez, P., Vicent, T., Caminal, G. (2010a). *Biodegradation of the analgesic naproxen by Trametes versicolor and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR*. Bioresource Technology, 101 (7), 2159-2166.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Caminal, G., Vicent, T. (2010b). *White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR*. Chemosphere, 78 (4), 474-481.
- Mathews, C., Van Holde, K., Ahern, K. 2002. *Bioquímica* (3ª ed., 403p). Pearson. Madrid.
- McKee, T., McKee, J. R. (1996). *Enzimas*. En *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida* (4ª ed., pp 183-201).
- Meijer, O. C., Buurstede, J. C., Schaaf, M. J. M. (2019). *Corticosteroid Receptors in the Brain: Transcriptional Mechanisms for Specificity and Context-Dependent Effects*. Cellular and Molecular Neurobiology, 39, 539-549.
- Mendoza, L., Salvatierra, G., Frisancho, O. (2008). *Perfil del consumidor de antiinflamatorios no esteroideos en Chiclayo y Cajamarca, Perú*. Acta Médica Peruana, 25(4), 216-219.

- Mennillo, E., Arukwe, A., Monni, G., Meucci, V., Intorre, L., Pretti, C. (2017). *Ecotoxicological properties of ketoprofen and the S(+)-enantiomer (dexketoprofen): Bioassays in freshwater model species and biomarkers in fish PLHC-1 cell line*. Environmental Toxicology and Chemistry, 37(1), 201-212.
- Misal, S. A., Lingojar, D. P., Shinde, R. M., Gawai, K. R. (2011). *Purification and characterization of azoreductase from alkaliphilic strain Bacillus badius*. Process Biochemistry, 46(6), 1264-1269.
- Mitchell, D., von Meien, O., Krieger, N., Dalsenter, F. (2004). *A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation*. Biochemical Engineering Journal, 17, 15-26.
- Mizushima, T. (2010). *Molecular Mechanism for Various Pharmacological Activities of NSAIDS*. Pharmaceuticals, 3, 1614-1636.
- Moldovan, Z. (2006). *Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania*. Chemosphere, 64 (11), 1808-1817.
- Mueller, G., Cerniglia, C. E., Pritchard, P. H. (1996). *Bioremediation of Environments Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Bioremediation, 125-194.
- Naidoo, V., Venter, L., Wolter, K., Taggart, M., Cuthbert, R. (2010). *The toxicokinetics of ketoprofen in Gyps coprotheres: toxicity due to zero-order metabolism*. Archives of Toxicology, 84, 761-766.
- Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K., Takada, H. (2006). *Pharmaceutical chemicals and endocrine disruptors in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment*. Water research, 40 (17), 3297-3303.
- Nance, R. E., Sargent, R. G. (2002). *Perspectives on the Evolution of Simulation*. Operations Research, 50(1), 161-172.
- Nieto, A. I., Cabré, F., Moreno, F. J., Alarcón, C. (2002). *Mechanisms Involved in the Attenuation of Intestinal Toxicity Induced by (S)-(+)-Ketoprofen in Re-Fed Rats*. Digestive Diseases and Sciences, 47(4), 905-913.
- Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Chaudhry, M.J.I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., Khan, A.A. (2004). *Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan*. Nature, 427 (6975), 630-633.
- Okai, R. N. (2005). *In Vitro Release of Ketoprofen from Proprietary and Extemporaneously Manufactured Gels* (Tesis de Master). Rhodes University. Grahamstown.
- Oppel, J., Broll, G., Löffler, D., Meller, M., Römbke, J., Ternes, T. (2004). *Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing-systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection*. Science of the Total Environment, 328 (1-3), 265-273.

- Osafo, N., Agyare, C., Darko, D., Opoku, A. (2017). *Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*. En *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs* (1ª ed.), pp. 5–11.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., Sannia, G. (2000). *Copper induction of laccase isoenzyme in the lignolytic fungus Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 920-924.
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Riva, C., Provini, A. (2009). *An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)*. *Toxicology in Vitro*, 23 (5), 935-942.
- Plata, F., Mendoza, G., Viccon, J., Bárcena, R., Sánchez, F., Villarreal, O. (2011). *Adecuación y análisis de sensibilidad de un modelo para la estimación de la capacidad de carga del hábitat de venado cola blanca*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43, 267-275.
- Prasad, R. (2017). *Mycoremediation and Environmental Sustainability*. Vol. 1. Suiza, Fungal Biology, 59p.
- Prášková, E., Štěpánová, S., Chromcová, L., Plhalová, L., Voslářová, E., Pištěková, V., Prokeš, M., Svobodová, Z. (2013). *The effects of subchronic exposure to ketoprofen on early developmental stages of common carp*. *Acta Veterinaria BRNO*, 82, 343-347.
- Prieto, J. M. (2007). *Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs). ¿Dónde estamos y hacia dónde nos dirigimos? (Primera Parte)*. *Cient. Dent.*, 4(3), 203-212.
- Quintero, J. C. (2011). *Revisión: Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la Pudrición Blanca de la Madera*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín*, 64 (1), 5867-5882.
- Raloff, J. (1998). *Drugged Waters: Does it matter that pharmaceuticals are turning up in water supplies?*. *Science News*. 153, 187-189.
- Rençber, S., Karavana, S. Y., Özyazici, M. (2009). *Bioavailability File: KETOPROFEN*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34, 203-216.
- Rodríguez, C. (2012). *Degradation of pharmaceuticals in sewage sludge by Trametes versicolor* (tesis doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
- Roy, B., Archibald, F. (1993). *Effects on Kraft Pulp and Lignin on Trametes versicolor Carbon Metabolism*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6), 1855-1863.
- Rudakiya, D. M., Tripathi, A., Gupte, S., Gupte, A. (2019). *Fungal Bioremediation: A Step Towards Cleaner Environment*. *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology*, 9, 229-249.
- Rueda, L. J., Rico, D. W. (2007). *Modelamiento inicial de ciudades de países en vía de desarrollo, utilizando dinámica de sistemas*. *Scientia et Technica*, 34, 421-426.

- Sacher, F., Lange, F. T., Brauch, H.-J., Blankenhorn, I. (2001). *Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany*. Journal of Chromatography A, 938 (1-2), 199-210.
- Sánchez, C. (2009). *Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi*. Biotechnology Advances, 27(2), 185-194.
- Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E. (2007). *Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain)*. Environment International, 33 (4), 596-601.
- Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). *Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*. Journal of Hazardous Materials, 175 (1-3), 45-95.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R. D. (2004). *Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout*. Aquatic Toxicology, 68 (2), 141-150.
- Serra, F. (2016). *El enfoque sistémico y la dinámica de sistemas como metodología de la NTE para el estudio de fenómenos complejos*. Civilizar, 3(3), 119-134.
- Shientag, L. J., Wheeler, S. M., Garlick, D. M., Maranda, L. S. (2012). *A Therapeutic Dose of Ketoprofen Causes Acute Gastrointestinal Bleeding, Erosions, and Ulcers in Rats*. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 51(6), 832-841.
- Silva, A., Delerue-Matos, C., Figueiredo, S. A., Freitas, O. M. (2019). *The Use of Algae and Fungi for Removal of Pharmaceuticals by Bioremediation and Biosorption Processes: A Review*. Water, 11, 1-36.
- Simon, L. S. (1999). *Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation*. The American Journal of Medicine, 106(5), 37S-42S.
- Smits, J. P., Rinzema, A., Tramper, J., van Sonsbeek, H. M., Hage, J. C., Kaynak, A., Knol, W. (1998). *The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation*. Enzyme and Microbial Technology, 22(1), 50-57.
- Stern, A., Skalsky, K., Avni, T., Carrara, E., Leibovici, L., Paul, M. (2017). *Corticosteroids for pneumonia (Review)*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 12.
- Stumpf, M., Ternes, T. A., Wilken, R.-D., Vianna, S., Baumann, W. (1999). *Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil*. Science of the Total Environment, 225 (1-2), 135-141.
- Tabatabai, M. A. (1994). *Soil Enzymes*. En *Soil Enzymes. Methods of Soil Analysis: Part 2-Microbiological and Biochemical Properties* (pp 775-833). Iowa State University, Iowa.

- Tauxe-Wuersch, A., De Alencastro, L. F., Grandjean, D., Tarradellas, J. (2005). *Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment*. Water Research, 39 (9), 1761-1772.
- Tavares, A., Coelho, M., Coutinho, J., Xavier, A. (2005). *Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modelling*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 80(6), 669-676.
- Tejada, C., Quiñonez, E., Peña, M. (2014). *Contaminantes Emergentes en Aguas: Metabolitos de Fármacos. Una Revisión*. Facultad de Ciencias Básicas – Universidad Militar Nueva Granada, 10, 80-101.
- Thomas P. M., Foster, G. D. (2004). *Determination of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Caffeine, and Triclosan in Wastewater by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Journal of Environmental Science and Health A, 39 (8), 1969-1978.
- Tien, M., Kirk, T. K. (1983). *Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete Phanerochaete chrysosporium Burds*. Science, 221(4611), 661-663.
- Tien, M., Kirk, T. K. (1988). *Lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium*. Methods in Enzymology, 161, 238-247.
- Tijani, J. O., Fatoba, O. O., Petrik, L. F. (2013). *A Review of Pharmaceuticals and Endocrine-Disrupting Compounds: Sources, Effects, Removal, and Detections*. Water, Air & Soil Pollution, 224 (11).
- Tortella, G., Durán, N., Rubilar, O., Parada, M., Diez, M. C. (2013). *Are white-rot fungi a real biotechnological option for the improvement of environmental health?*. Critical Reviews in Biotechnology, 35 (2), 165-172.
- Triebkorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H.-R., Schwaiger, J. (2004). *Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Aquatic Toxicology, 68 (2), 151-166.
- Urtiaga, A. M., Pérez, G., Ibáñez, R., Ortiz, I. (2013). *Removal of pharmaceuticals from a WWTP secondary effluent by ultrafiltration/reverse osmosis followed by electrochemical oxidation of the RO concentrate*. Desalination, 331, 26-34.
- Vane, J. R., Botting, R. M. (1996). *Mechanism of Action of Anti-Inflammatory Drugs*. Scandinavian Journal of Rheumatology, 25(sup102), 9-21.
- Verenitch, S. S., Lowe, C. J., Mazumder, A. (2006). *Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1116 (1-2), 193-203.
- Veys, E. M. (1991). *20 Years' Experience with Ketoprofen*. Scandinavian Journal of Rheumatology, 19(90), 3-44.

- Vidali, M. (2001). *Bioremediation. An overview*. Pure and Applied Chemistry, 73 (7), 1163-1172.
- Villegas, I., La Casa, C., de la Lastra, C. A., Motilva, V., Herrerías, J. M., Martín, M. J. (2004). *Mucosal damage induced by preferential COX-1 and COX-2 inhibitors: Role of prostaglandins and inflammatory response*. Life Sciences, 74(7), 873-884.
- Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S., Wert, E. (2005). *Fate of Endocrine-Disruptor, Pharmaceutical, and Personal Care Product Chemicals during Simulated Drinking Water Treatment Processes*. Environmental Science & Technology, 39 (17), 6649-6663.
- Wong, D. W. S. (2008). *Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 157(2), 174-209.
- Yoshida, H. (1883). *LXIII.-Chemistry of lacquer (Urushi). Part I*. Journal of the Chemical Society, Transactions, 43, 472-486.
- Zhao, J.-L., Ying, G.-G., Wang, L., Yang, Y.-F., Yang, X.-B., Yang, L.-H., Li, X. (2009). *Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry*. Science of the Total Environment, 407 (2), 962-974.

## 10. ANEXOS

Tabla A1. Composición del Medio *Trametes* Definido (TDM). Fuente: Roy & Archibald, 1993.

Compuesto	Valor
Glucosa	83 (mM)
Glutamina	5 (mM)
NaCl	5 (mM)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 (mM)
MgSO <sub>4</sub>	1 (mM)
CaCl <sub>2</sub>	0.1 (mM)
2,2-dimetilsuccinato	10 (mM)
Tiamina	2.4 (μM)
Solución de metales traza	1 (ml L <sup>-1</sup> )

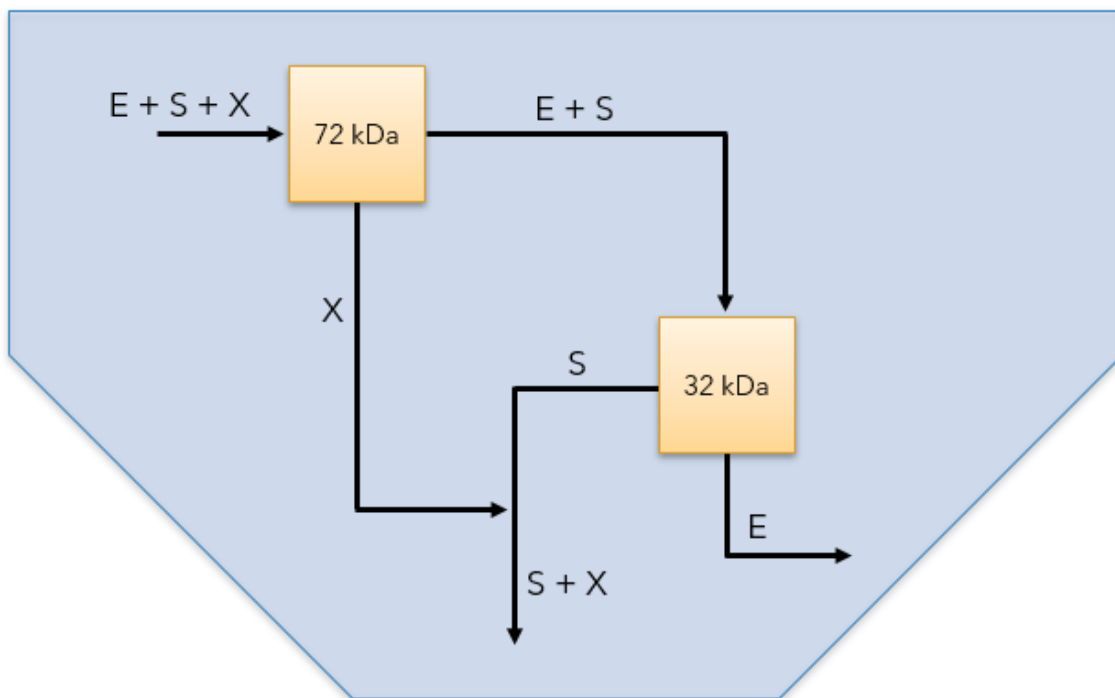


Figura A2. Esquema que representa el funcionamiento interno del separador teórico dentro del proceso. E = Enzima, S = Sustrato, X = Biomasa.