

Evaluación de la Micorremediación del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*) en la eliminación de residuos farmacéuticos: paracetamol, ibuprofeno y ciprofloxacino.



Alumnado investigador

Miriam Flores Ortiz (2º Bach, IES Fidiana de Córdoba)

Daniel Lara Luque (2º Bach, IES Fidiana de Córdoba)

PROFESORA COORDINADORA:

Dra Elena León Rodríguez (IES Fidiana de Córdoba)



ÍNDICE

RESUMEN.....	3
1.- INTRODUCCIÓN.....	4
2.- OBJETIVO.....	4
3.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	4
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
4.1.- VARIABLES DE ESTUDIO.....	6
4.2.- MATERIAL EXPERIMENTAL	7
4.3.- DISEÑO DEL TRABAJO DEL LABORATORIO	8
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
5.1.- RECTAS DE CALIBRADO	11
5.2.- ENSAYO EN MAGENTAS	12
5.3.- ENSAYO EN ESTERILIDAD.....	14
5.2.- TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS	16
6.-CONCLUSIONES	16
8.- AGRADECIMIENTOS	16
9.- BIBLIOGRAFÍA	17

Evaluación de la Micorremediación del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*) en la eliminación de residuos farmacéuticos: paracetamol, ibuprofeno y ciprofloxacino.D. Lara-Luque¹, M. Flores-Ortiz¹, E. León-Rodríguez¹¹IES Fidiana

Los medicamentos como el paracetamol, el ibuprofeno o ciprofloxacino son esenciales en nuestra vida, ya que nos ayudan y defienden frente a enfermedades. Sin embargo, su uso masivo ha generado un grave problema ambiental, convirtiéndolos en contaminantes emergentes de difícil eliminación. Para evaluar posibles soluciones, utilizamos el Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*) para investigar su capacidad de degradar estos fármacos. Se elaboraron curvas de calibrado mediante espectrofotometría a partir de concentraciones estándares de los medicamentos, y el hongo se cultivó en medios con los diferentes fármacos, tomando muestras a los 0, 3 y 7 días para determinar la concentración presente en el medio. Además, se analizó la biomasa del micelio y desarrollo de basidios. Los resultados mostraron una alta capacidad degradadora: 99,7% para el paracetamol, 90% para el ibuprofeno y 97,2% para el ciprofloxacino. Paracetamol e ibuprofeno inhibieron la formación de basidios; pero favorecieron el crecimiento del micelio, mientras que el ciprofloxacino estimuló los basidios. Los ensayos de esterilización indicaron que el etanol inhibe el crecimiento del micelio, mientras que la lejía no afecta significativamente su viabilidad. Bajo condiciones estériles y en medio PDA (Patata Dextrosa Agar), el hongo logró degradar hasta un 45% del paracetamol, correlacionado con el diámetro del micelio. En conclusión, *Pleurotus ostreatus* demostró ser un agente eficaz para la micorremediación de contaminantes farmacéuticos, con gran potencial de aplicación en el tratamiento de aguas residuales y suelos contaminados.

Palabras clave: paracetamol, ibuprofeno, ciprofloxacino, *Pleurotus ostreatus*, micorremediación, farmacontaminación

ABSTRACT

Medicines such as paracetamol, ibuprofen or ciprofloxacin are essential in our lives, as they help us and defend us against diseases. However, their massive use has generated a serious environmental problem, turning them into emerging pollutants that are difficult to eliminate. To evaluate possible solutions, we used the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) to investigate its ability to degrade these drugs. Spectrophotometric calibration curves were developed from standard concentrations of the drugs, and the fungus was cultured in media containing the different drugs, taking samples at 0, 3 and 7 days to determine the concentration present in the medium. In addition, mycelial biomass and basidial development were analyzed. The results showed a high degradation capacity: 99.7% for paracetamol, 90% for ibuprofen and 97.2% for ciprofloxacin. Paracetamol and ibuprofen inhibited basidia formation but favored mycelial growth, while ciprofloxacin stimulated basidia processes. Sterilization tests indicated that ethanol inhibited mycelial growth, while bleach did not significantly affect mycelial viability. Under sterile conditions and on PDA (Potato Dextrose Agar) medium, the fungus was able to degrade up to 45% of paracetamol, correlated with mycelial diameter. In conclusion, *Pleurotus ostreatus* proved to be an effective agent for the mycoremediation of pharmaceutical pollutants, with great potential for application in the treatment of wastewater and contaminated soils.

Key words: paracetamol, ibuprofen, ciprofloxacin, *Pleurotus ostreatus*, mycoremediation, pharmaccontamination

1.- INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los medicamentos son uno de los contaminantes emergentes del medio ambiente, por lo que debe de ser una de las líneas prioritarias de investigación para los organismos de protección de la salud y del medioambiente. Los medicamentos como el paracetamol, el ibuprofeno o ciprofloxacino son esenciales en nuestra vida, ya que nos ayudan y defienden frente a enfermedades. Sin embargo, su uso masivo ha generado un grave problema ambiental, convirtiéndolos en contaminantes emergentes de difícil eliminación. Se ha detectado residuos en aguas superficiales y profundas principalmente, pero también en biota, suelo y aire. Por ello, es necesario determinar las consecuencias que la acumulación de los principios activos correspondientes podría tener para la salud humana; pero también investigar sobre procesos biológicos para reducir esta farmacontaminación. En esta investigación estudiamos la eliminación de estos residuos de manera fácil, rápida y económica mediante micorremediación con el hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*).

Basándonos en ello, la hipótesis de este proyecto de investigación es la siguiente: Al colocar una determinada concentración de estos tres medicamentos (paracetamol, ibuprofeno o ciprofloxacino) en un cultivo con el hongo *Pleurotus ostreatus*, este degradará el residuo, parcial o totalmente.

2.- OBJETIVO

El principal objetivo de este proyecto es valorar la capacidad de degradación del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*) de diversos tipos de medicamentos, como el paracetamol (analgésico y antipirético), ibuprofeno (antiinflamatorio) y ciprofloxacino (antibiótico).

3.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS

La Micorremediación es la tecnología que utiliza la capacidad biotransformadora de los hongos, basándose en su propio funcionamiento en la naturaleza, empleando material considerado residuos tóxicos para los humanos y degradándolo hasta liberar sus componentes, ya inocuos, a la naturaleza.

El hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) prospera en condiciones ambientales moderadas a templadas, con temperaturas óptimas entre 10°C y 30°C y una alta humedad relativa que favorece la actividad enzimática de su micelio. Esta humedad, junto con sustratos ricos en materia orgánica facilita la degradación de compuestos lignocelulósicos, siendo así una herramienta prometedora en la biorremediación, ya que produce enzimas como peroxidasas y celulasas que degradan contaminantes complejos (hidrocarburos, pesticidas y plásticos) en compuestos menos dañinos. Su aplicación en el tratamiento de suelos y aguas se integra en estrategias de economía circular, convirtiéndose en una alternativa sostenible para la restauración ambiental, ya que es capaz de degradar:

*Tabla 1: Residuos degradables por *Pleurotus ostreatus**

RESIDUOS	EJEMPLOS
VEGETALES	Restos de poda, café, coco, nueces...
AGRÍCOLAS	Caña de azúcar, paja de trigo, cebada...
MATERIALES MADEREROS	Aserrín, virutas de madera...
PAPEL Y CARTÓN	Residuos de libros, periódicos...
ALIMENTICIOS	Pan duro, frutas, verduras...
CONTAMINANTES INDUSTRIALES	Hidrocarburos derivados del petróleo, detergentes, pesticidas...
PLÁSTICOS	Plásticos biodegradables y algunos no biodegradables como el poliestireno.

Desde el punto de vista farmacéutico, destaca por su rica composición en compuestos bioactivos. Entre ellos se encuentran los beta-glucanos, polifenoles y antioxidantes, que han demostrado tener propiedades inmunomoduladoras; es decir, pueden potenciar la actividad de macrófagos y linfocitos, lo que podría traducirse en una respuesta inmune más eficaz frente a procesos inflamatorios y agresiones oxidativas. Además, estudios preclínicos sugieren que ciertos extractos del *Pleurotus ostreatus* pueden inhibir la proliferación de células tumorales, abriendo posibilidades para terapias complementarias en el tratamiento del cáncer. Por otro lado, su consumo se asocia a la regulación de los niveles de colesterol y glucosa en sangre, aportando un potencial en el manejo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas.

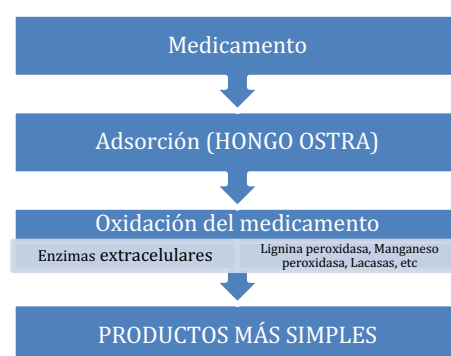
En conjunto, estas propiedades hacen del *Pleurotus ostreatus* un recurso multifuncional, integrando beneficios nutricionales, terapéuticos y medioambientales, lo que subraya su relevancia tanto en la biotecnología agrícola como en la investigación farmacológica.

Mecanismo de degradación del hongo.

Para la degradación de un medicamento, el hongo comienza con la fase de absorción, que entra a este por difusión en el medio, y por absorción pasiva a través de la pared celular del hongo. En segundo lugar, se produce una liberación masiva de enzimas específicas, que pueden transformar o romper los medicamentos. Como el caso esterasas, hidrolasas o las peroxidases.

Esquema del proceso de degradación de un medicamento por el hongo ostra.

1. *P. ostreatus* secreta enzimas no específicas (lacasas, peroxidases).
2. Estas enzimas oxidan los fármacos (ibuprofeno, paracetamol, ciprofloxacino) mediante radicales libres.
3. Se produce la ruptura de la estructura molecular de los fármacos.
4. Potencial mineralización a CO₂ y H₂O, o formación de biomasa fúngica.



Espectrofotometría.

La espectrofotometría es una técnica analítica que mide la absorción de luz por una sustancia para determinar su concentración. Se basa en la ley de Lambert-Beer, que establece que la cantidad de luz absorbida es proporcional a la concentración de la sustancia en la solución, y funciona a través de un espectrofotómetro, cuyo funcionamiento se basa en una fuente de luz que emite un haz, el cual es filtrado por un monocromador para seleccionar una longitud de onda específica. Luego, la luz atraviesa la muestra en una cubeta, donde parte es absorbida y el resto es detectado por un sensor. Finalmente, el procesador convierte la señal en un valor de absorbancia, que se usa para calcular la concentración de la sustancia mediante una curva de calibración. (García, R., 2018). Mediante esta técnica, se llevó a cabo el análisis de la concentración de cada medicamento en el medio de cultivo antes y después de tratarlo con el hongo ostra.

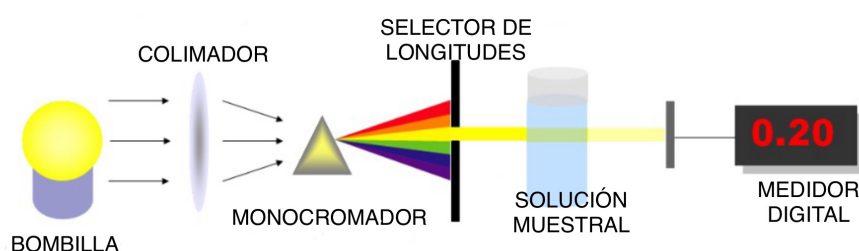


Figura1: Esquema funcionamiento del espectrofotómetro (García, R D., 2018).

Paracetamol.

Paracetamol es un medicamento analgésico y antipirético ampliamente utilizado para aliviar el dolor leve a moderado y reducir la fiebre. Su mecanismo de acción no está completamente claro, pero se cree que actúa inhibiendo la producción de prostaglandinas en el sistema nervioso central. A diferencia de los antiinflamatorios no esteroides (AINEs), el paracetamol no tiene un efecto antiinflamatorio significativo y es generalmente seguro a dosis recomendadas, aunque en exceso puede causar toxicidad hepática.



Figura 2: Envase de paracetamol cinfa 1g.

Ibuprofeno.

El ibuprofeno es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que se utiliza para aliviar el dolor, reducir la fiebre y tratar inflamaciones. Actúa inhibiendo la enzima ciclooxigenasa (COX), lo que disminuye la producción de prostaglandinas, sustancias involucradas en la inflamación y el dolor. Se usa comúnmente en afecciones como artritis, dolores musculares, migrañas y cólicos menstruales. Aunque es efectivo, su uso prolongado o en altas dosis puede causar efectos secundarios como irritación gástrica, úlceras o problemas renales.



Figura 3: Envase de ibuprofeno cinfa 600mg.

Ciprofloxacino

El ciprofloxacino es un antibiótico de la familia de las fluoroquinolonas que se emplea en el tratamiento de diversas infecciones bacterianas, como infecciones urinarias, respiratorias, gastrointestinales y de la piel. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la ADN girasa y la topoisomerasa IV, enzimas esenciales para la replicación y reparación del ADN bacteriano. Es efectivo contra un amplio espectro de bacterias, pero su uso debe ser controlado y recetado por un especialista debido a posibles efectos adversos, como alteraciones gastrointestinales, tendinitis o, en casos raros, efectos en el sistema nervioso central.



Figura 4: Envase de ciprofloxacino mormón 500mg.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- VARIABLES DE ESTUDIO

En este proyecto de investigación vamos a utilizar 3 tipos de variables.

Variables independientes:

- Tratamiento con *Pleurotus ostreatus* (hongo ostra): Presencia o ausencia del hongo en contacto con la solución farmacéutica.
- Concentración inicial de los fármacos en la solución aplicada al cultivo.
- Tiempo de exposición al hongo: Intervalo de tiempo para la toma de alícuotas, 3 y 7 días, durante el cual la solución farmacéutica permanece en contacto con el cultivo del hongo.

Variables dependientes:























- Concentración residual de fármacos (paracetamol, ibuprofeno y ciprofloxacino) en el medio: Determinada mediante espectrofotometría a partir de curvas de calibración específicas para cada medicamento. Esta variable refleja el grado de degradación logrado por el hongo.
- Crecimiento del hongo determinando biomasa del micelio y de desarrollo de cuerpos fructíferos.

Variables controladas:

- Condiciones fisicoquímicas del cultivo (temperatura, humedad, tipo de medio, etc.).
- Método de análisis espectrofotométrico, incluyendo longitudes de onda determinadas y curvas de calibración preestablecidas para una cuantificación precisa.

4.2.- MATERIAL EXPERIMENTAL

- **Micelio comercial:** Cultivo del hongo, ya colonizado en un sustrato (como paja, aserrín, etc.). Se usa como punto de partida para el cultivo de estos.
- **Medicamentos:** Paracetamol de 1g, Ibuprofeno de 600mg y Ciprofloxacino de 500mg.
- **Agua destilada:** Agua purificada por destilación, libre de impurezas y minerales. Se usa en laboratorio para preparar soluciones sin contaminantes, evitando así su interferencia con procesos biológicos o químicos.
- **FeCl₃ al 0,05M y 0,1M; H₂SO₄ al 0,1M; HCl al 0,1% y KMnO₄ al 0,001M:** Reactivos utilizados para obtener una coloración de los medicamentos.
- **Medio de cultivo PDA:** El medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar) es un agar nutritivo a base de papa (250g/l) y dextrosa(15g/l) utilizado para cultivar hongos en laboratorio.
- **Placas de petri:** Recipientes circulares y poco profundos que facilitan la manipulación y cultivo de organismos.
- **Magentas:** Contenedores de plástico usados para cultivar el hongo. Facilitan el desarrollo y manejo del sustrato donde se cultiva este.
- **Matraces Erlenmeyer:** Frascos de fondo plano y cuello estrecho. Se utilizan para cultivar hongos en medio líquido, preparar soluciones o realizar mezclas sin que se derrame el contenido.
- **Centrífuga:** Equipo que separa componentes de una mezcla utilizando fuerza centrífuga.
- **Batidora de mano:** Herramienta de aspas metálicas cuyo movimiento facilita el desgranamiento del ensayo para tomar la última alícuota con mayor eficacia y exactitud.
- **Estufa de laboratorio:** Tipo de cámara de crecimiento comúnmente usado para deshidratar reactivos de laboratorio o secar instrumentos, además de proporcionar unas condiciones ambientales óptimas para el crecimiento y desarrollo de un organismo.
- **Balanza:** Instrumento de medición diseñado para determinar con alta precisión la masa de sustancias o cuerpos.
- **Espectrofotómetro Spectronic 20D:** Instrumento que mide la absorción de luz por una sustancia para determinar su concentración (la cantidad de luz absorbida por la muestra) o su transmitancia (la cantidad de luz que pasa a través de la muestra, es decir, el recíproco matemático de la absorbancia).
- **Tubos de Vidrio Óptico para el espectrofotómetro:** Tubos de vidrio diseñados para análisis de absorbancia y transmitancia en espectrofotometría.
- **Tubos de ensayo:** Pequeño tubo cilíndrico de vidrio con un extremo abierto y el otro cerrado y redondeado, que se utiliza en los laboratorios para contener pequeñas muestras, líquidas o sólidas, aunque pueden tener otras fases, como realizar reacciones químicas en pequeña escala o mezclar sustancias.
- **Gradilla:** Una gradilla es una herramienta de metal o plástico utilizada para sostener y almacenar gran cantidad de tubos de ensayo o tubos Eppendorf.
- **Pipetas:** Sirven para medir y transferir volúmenes precisos de líquidos. Se usan en procedimientos que requieren precisión.
- **Etanol 70% y lejía 50%:** Elementos seleccionados para esterilizar el micelio cultivado en medio de cultivo (PDA) y evaluar su crecimiento en esterilidad.

Micelio comercial 	Medicamentos (Soluciones preparadas previamente) 	Agua Destilada 	FeCl₃ 
H₂SO₄ 	HCl 	KMnO₄ 	Medio de cultivo PDA 
Placas de Petri 	Magentas 	Matraces Erlenmeyer 	Centrífuga 
Batidora de mano 	Estufa de laboratorio 	Espectrofotómetro Spectronic 20D 	Tubos de vidrio óptico para el espectrofotómetro 
Balanza 	Tubos de Ensayo 	Gradillas 	Pipetas 
Etanol 70% 		Lejía 20% 	

4.3.- DISEÑO DEL TRABAJO DEL LABORATORIO

El trabajo de laboratorio puede esquematizarse en 4 fases independientes a partir de las cuales se han recogido variedad de datos que han contribuido en su conjunto a la experimentación en el laboratorio del IES Fidiana (Córdoba), así como con la ayuda del IAS-CSIC de Córdoba (Instituto de Agricultura Sostenible del Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

1.- RECTAS DE CALIBRADO

Se realizaron las diferentes rectas de calibrado con las que íbamos a comprobar la capacidad degradadora del hongo respecto a los fármacos.

En primer lugar, se prepararon reactivos que nos permitieran evaluar por ensayos colorimétricos diferentes concentraciones de los medicamentos. Posteriormente, se prepararon las distintas concentraciones Stock iniciales de paracetamol, ibuprofeno, ciprofloxacino y las disoluciones de los medicamentos (que fueron a su vez, diluidas para alcanzar unos rangos más bajos con respecto a la máxima, realizándose 5 estándares por medicamento (STD) para realizar las rectas de calibrado. La absorbancia se midió a determinadas longitudes de onda, según el medicamento, y a pesar de muchos inconvenientes técnicos con el espectrofotómetro, logramos elaborar las rectas con un excelente grado de fiabilidad (valores de R^2 de 0,96 a 0,99)

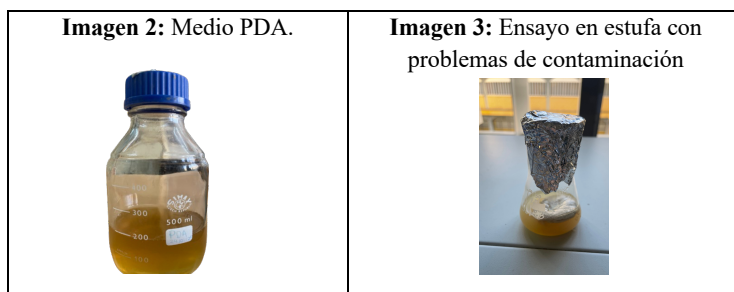
Tabla 1: Concentración medicamentos y sus respectivos reactivos para determinación colorimétrica.

MEDICAMENTO	IBUPROFENO	PARACETAMOL	CIPROFLOXACINO
CONC. STOCK	6 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL
STD 1	0,25 mg/mL	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL
STD 2	0,5 mg/mL	1 mg/mL	1,25 mg/mL
STD 3	1 mg/mL	2 mg/mL	2,5 mg/mL
STD 4	2 mg/mL	5 mg/mL	3,75 mg/mL
STD 5	3 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL
REACTIVO 1	HCl al 0,1%	FeCl ₃ al 0,05M	KMnO ₄ al 0,001M
REACTIVO 2	FeCl ₃ al 0,1M	Agua destilada	H ₂ SO ₄ al 0,1M
Longitud onda (nm)	350 nm	430 nm	450 nm
<p><u>Para medir en el espectrofotómetro:</u> se colocó 1ml de medicamento, 1 ml reactivo 1 y 1 ml de reactivo 2).</p> <p>En los ensayos del paracetamol e ibuprofeno, el incremento de color fue proporcional al incremento de concentración de los estándares determinados.</p> <p>¡ACLARACIÓN! el ciprofloxacino no reacciona de inmediato, deben pasar como mínimo 5 minutos desde que se mezcla. En este ensayo, se valoró la pérdida de color, la cual es proporcional al incremento de concentración del antibiótico.</p>			

2-PREPARACIÓN DEL CULTIVO (PDA) PARA EL ENSAYO EN ESTUFA

En segundo lugar, se preparó el medio PDA con 250g de patatas lavadas y cortadas en trozos de 3 a 5 cm, las cuales se pusieron a hervir durante 45 min en un litro de agua, para obtener un caldo de patata, pero no puré. El caldo fue filtrado y colado para eliminar los posibles residuos sólidos y, posteriormente, se añadieron 15g de azúcar panela por litro de agua. El medio PDA fue esterilizado en la olla exprés, durante 20 min.

Además, se esterilizaron los matraces Erlenmeyer donde se vertió el medio PDA (25ml por Erlenmeyer), 13 ml de las soluciones de partida de los medicamentos, 6 mg/ml, 10 mg/ml y 5 mg/ml, de Ibuprofeno, paracetamol y ciprofloxacino, respectivamente. Además, se añadió un trozo de micelio del hongo ostra en cada uno de los Erlenmeyers. Se realizaron tres réplicas por tratamiento. Sin embargo, debido a la contaminación a la hora de tomar alícuotas y la muerte de algunos (la muerte fúngica se identificaba perfectamente al ver que muchos precipitaban hacia el fondo), tuvimos que abandonar esta fase.



3-MONTAJE DEL ENSAYO EN MAGENTAS

En tercer lugar, se optó por comprar micelio comercial ya preparado con materia orgánica a partir de la cual podía crecer, y acondicionarlo en magentas. Tomando 10g de hongo iniciales y añadiéndole 6 ml de medicamento de las soluciones de partida de los medicamentos, 6 mg/ml, 10 mg/ml y 5 mg/ml, de Ibuprofeno, paracetamol y ciprofloxacino, respectivamente. Se prepararon 3 magentas (repeticiones) por medicamento y 3 controles.

De este ensayo tomamos una primera alícuota tras los 3 días y una segunda a los 7 días. En la última alícuota, se trituró el micelio en 10 ml de agua, se filtró el contenido y se separó en dos tubos para su próxima centrifugación (15 minutos con velocidad 5,5). Una vez separados los restos sólidos del líquido, se tomaron dos alícuotas de 1 ml y se procedió a la determinación colorimétrica de cada uno de los medicamentos ensayado, para saber la cantidad de compuesto presente.



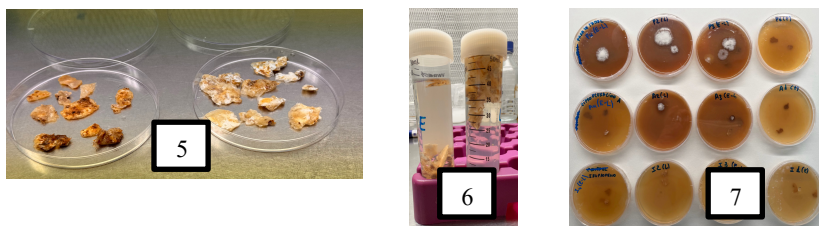
Imagen 4: Cultivo del hongo en magentas.

Además, se procedió al pesado del micelio crecido en cada magenta y al recuento del número de basidios y cuerpos frutíferos desarrollados en cada magenta. Ambas medidas fueron tomadas a los 3 y 7 días del inicio del experimento.

4-ENSAYO EN ESTERILIDAD

En cuarto y último lugar, gracias a la ayuda del departamento de mejora vegetal del IAS-CSIC, pudimos retomar el primer ensayo en unas condiciones óptimas de esterilidad, se cultivó en 10 g de micelio del hongo ostra en 25 ml de medio PDA estéril suplementados con 6ml de las soluciones stock de paracetamol, ibuprofeno y ciprofloxacino). El cultivo (PDA) y las soluciones de medicamento fueron esterilizados previamente en un autoclave. Se dispusieron en placas de Petri estéril y se realizaron 4 repeticiones por tratamiento. Además, el micelio se sometió a una esterilización previa, la mitad de los trozos de micelio se introdujeron 10 minutos en lejía al 20%, y la otra mitad 10 min en etanol 70%. Las placas de Petri se mantuvieron en oscuridad a 25 °C y se tomaron 2 alícuotas, una al día siguiente y otra al tercer día. Estas muestras se sometieron a dos centrifugaciones sucesivas, una primera, 7 min a 4000 rpm y, una segunda, 3 min a 6000 rpm. A partir de estas

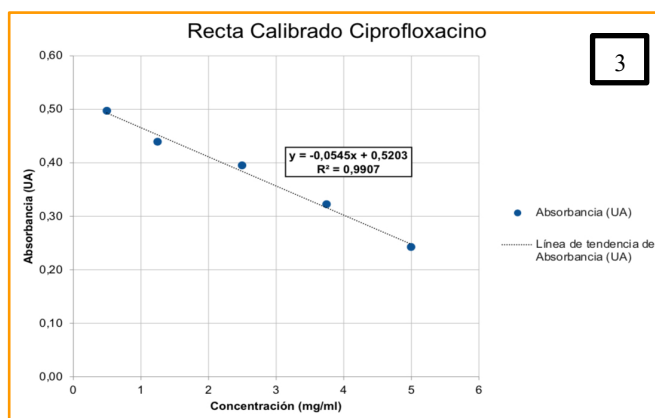
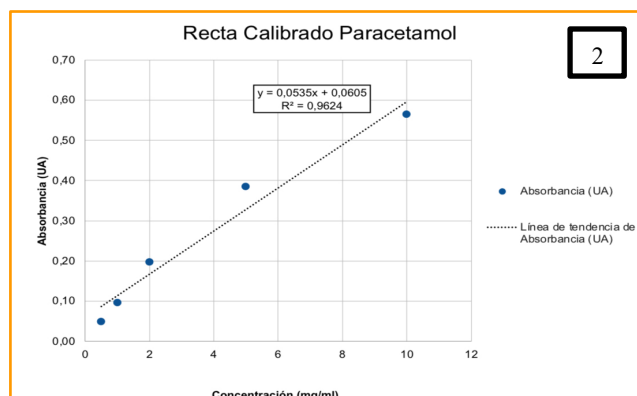
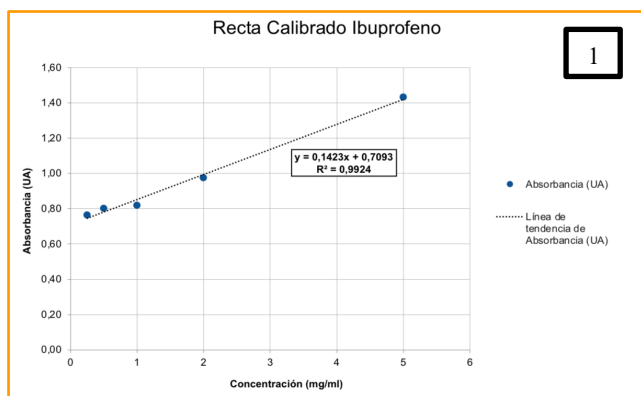
muestras se determinaron las concentraciones de los medicamentos mediante los ensayos colorimétricos y las rectas de calibrado.



Imágenes 5, 6 y 7 (de izquierda a derecha): Ensayo en esterilidad: micelio esterilizado (5), esterilización en etanol y lejía (6), diferentes tratamientos ensayados (7).

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

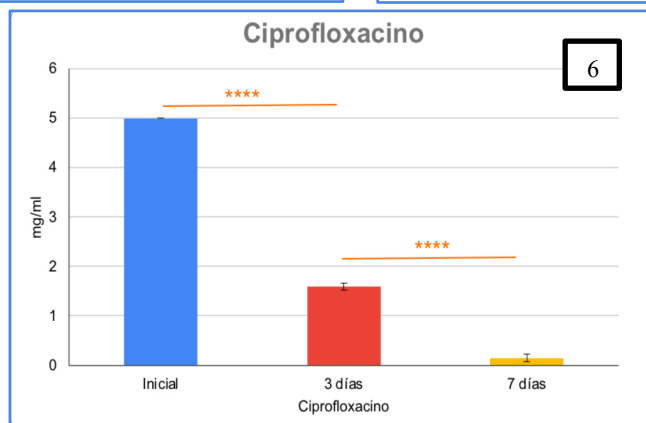
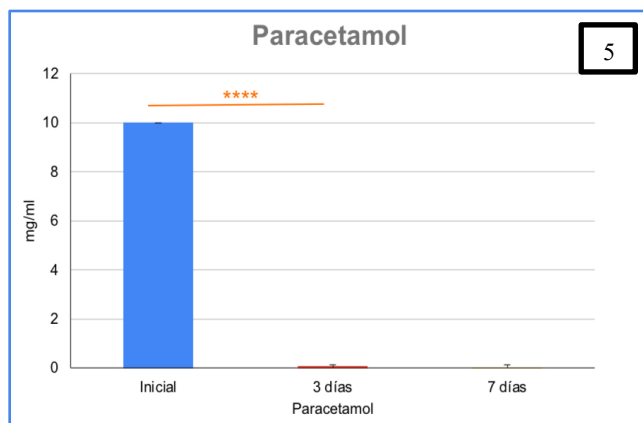
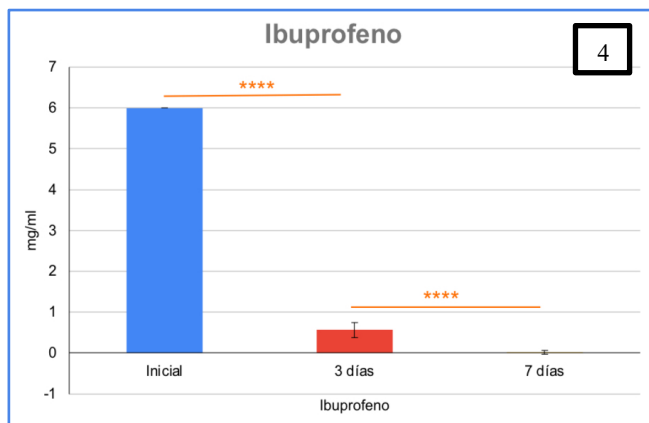
5.1.- RECTAS DE CALIBRADO



Gráficas 1, 2 y 3: Rectas de calibrado, se representa absorbancia (uA) en función de la concentración (mg/ml) del ibuprofeno, paracetamol y ciprofloxacino, respectivamente.

5.2.- ENSAYO EN MAGENTAS

A) Degradación de ibuprofeno, paracetamol y ciprofloxacino



Gráficas 4, 5 y 6: Muestran la concentración del medicamento degradado por el hongo a los 3 y 7 días.

Las Gráficas 4, 5 y 6 muestran que en todos los ensayos se observó degradación de los medicamentos.

Respecto a los resultados de ibuprofeno (Gráfica 4), partiendo de una concentración inicial de 6 mg/ml, a los 3 y 7 días, se encontraron concentraciones de 0,6 mg/ml y 0,02 mg/ml, lo supuso una degradación, respectivamente, del 90% y 99,6 % del analgésico.

En la Gráfica 5, se observa que, a los tres días la concentración inicial de paracetamol (10mg/ml), se redujo a 0,07 mg/ml, es decir un 70% de la cantidad inicial fue degradada por el hongo. A los 7 días las cantidades encontradas fueron muy pequeñas, 0,003 mg/ml, por lo que tan solo un 0,003% del medicamento permanecía en el sustrato del hongo. A los 7 días el hongo metabolizó el 99,7 % del paracetamol

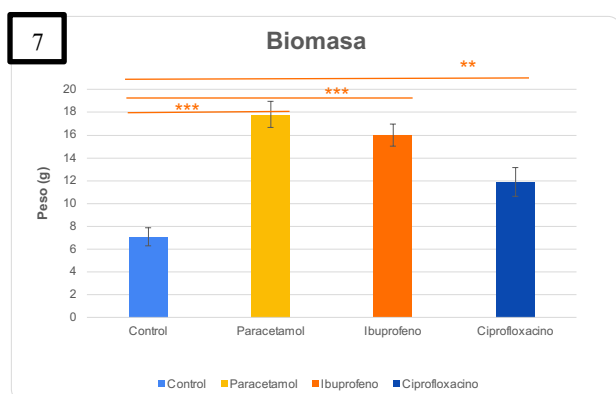
Respecto a la degradación del ciprofloxacino (Gráfica 6), partimos de una concentración de 5 mg/ml, siendo esta a los tres días de 1,6 mg/ml y de 0,14 mg/ml a los 7 días. Esto supuso una degradación del antibiótico del 68 % y del 99,9 %.

En todos los casos la degradación de los productos farmacéuticos fue prácticamente completa, presentando una disminución de la concentración inicial estadísticamente muy significativa, aunque la degradación inicial del ciprofloxacino es más lenta. Así pues, *Pleurotus ostreatus* no solo sobrevive en presencia de medicamentos, sino que es capaz de metabolizar casi por completo los posibles restos de medicamentos que puedan llegar al medio ambiente en tan solo 7 días.

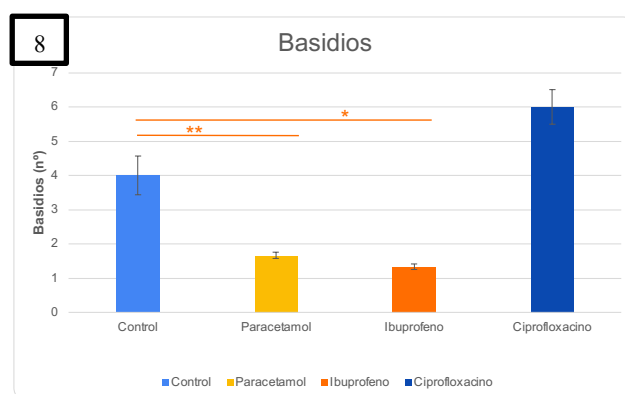
El paracetamol fue degradado en su totalidad (99,7%), el ibuprofeno también demostró alta degradación, aunque algo más lenta al principio (90%). Ciprofloxacino, aun en al tercer día, aún persistía el 32 %, a los 7 días la degradación fue del 97,2%. Este hecho sugiere que el ciprofloxacino es un antibiótico de difícil biodegradación, por lo que degradarlo en el medio ambiente, podría reducir la presión selectiva que este medicamento contribuye a la resistencia bacteriana.

Estos datos son especialmente relevantes, si tenemos en cuenta que la vida media del paracetamol en el medio ambiente es de 10 a 30 días, siendo mayormente destruido por fotólisis (Abreu-Zamora *et al*, 2016), y que la permanencia de ibuprofeno en algunos suelos cultivados con *Azthrobacter sp.* puede alcanzar unos cuatro meses y medio, según el suelo contenga biomasa o no (Bernal *et al*, 2023). Igualmente está descrito en la bibliografía la difícil degradación del ciprofloxacino y que la presencia de ciprofloxacino en el medio ambiente afecta a la microbiota del suelo y a la salud de los animales acuáticos (Meléndez *et al.*, 2020).

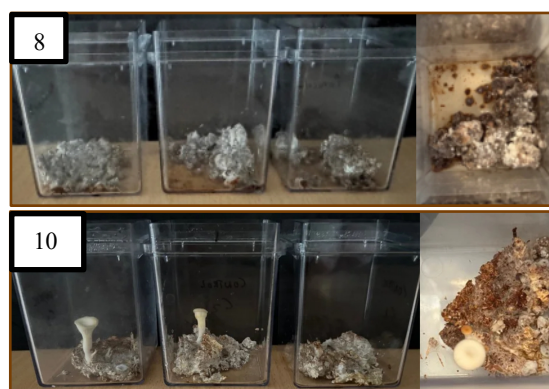
B) Desarrollo del micelio del hongo y cuerpos fructíferos (Basidios).



Gráfica 7: Cantidad de biomasa del micelio a los 7 días.



Gráfica 8: Cantidad de Basidios (cuerpo fructífero) a los 7 días



Imágenes 7, 8, 9 y 10: Ensayo de magentas tras 1 semana con ibuprofeno (7), paracetamol (8), ciprofloxacino (9) y el control (10).

En esta investigación se midió peso fresco del micelio del hongo, obteniéndose valores de 7 gramos en el control, mientras en los diferentes tratamientos de paracetamol, ibuprofeno y antibiótico, fueron respectivamente de 18g, 16 g y 12 g. Siendo la mayor biomasa alcanzada en el micelio tratado con paracetamol (Gráfica 7). De estos datos podemos deducir que tanto paracetamol como el ibuprofeno aumentan de forma muy significativa la biomasa y fomentan el crecimiento vegetativo del hongo. Ciprofloxacino también crece más respecto al control; pero menos que los antiinflamatorios y antipiréticos (Gráfica 7).

Respecto a los cuerpos fructíferos desarrollados (Gráfica 8, Imágenes 7, 8, 9 y 10), el control presentó 4 basidios a los 7 días, mientras el hongo tratado con paracetamol o ibuprofeno redujo considerablemente el número de basidios (entre 1,5 y 1,2, respectivamente). Además, estas diferencias son significativas (** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$). El antibiótico ciprofloxacino, sorprendentemente, incrementó el número de basidios hasta 6, siendo este el valor más alto de todos los tratamientos.

Estos datos nos indican que paracetamol e ibuprofeno inhiben la reproducción del hongo, impidiendo la formación de cuerpos fructíferos, pero induciendo la formación de mayor cantidad de micelio. Por el contrario, ciprofloxacino parece estimular la formación de basidios, y dado que es un antibiótico, podría deberse a la eliminación del medio de bacterias competidoras. O bien, que el principio activo del antibiótico, estrese al hongo y lo induzca a reproducirse.

5.3.- ENSAYO EN ESTERILIDAD

Tabla 2. Crecimiento o no crecimiento del micelio con respecto a los medios empleados en la esterilización del micelio, etanol o lejía

	Micelio crecido			
	Lejía/Etanol	Lejía	Lejía/Etanol	Etanol
Paracetamol	Sí	Sí	Sí	No
Ciprofloxacino	Sí	Sí	Sí	No
Ibuprofeno	No	No	No	No

Tabla 3. Diámetro del micelio desarrollado (B) con respecto a los medios empleados en la esterilización del micelio, etanol o lejía

	Diámetro de micelio crecido (cm)			
	Lejía/Etanol	Lejía	Lejía/Etanol	Etanol
Paracetamol	2,25	3,26	4,05	-
Ciprofloxacino	0,45	1,25	0,675	-
Ibuprofeno	-	-	-	-

Tabla 4. Concentración de medicamento (mg/ml) en el medio PDA a los tres días, con respecto a los medios empleados en la esterilización del micelio, etanol o lejía

	Concentración medicamento (mg/ml)				
		Lejía/Etanol	Lejía	Lejía/Etanol	Etanol
Paracetamol	Inicial	1,94	1,94	1,94	-
	1 día	1,59	1,09	1,16	-
	3 días	1,33	1,05	1,47	-
Ciprofloxacino	-	-	-	-	-
Ibuprofeno	-	-	-	-	-

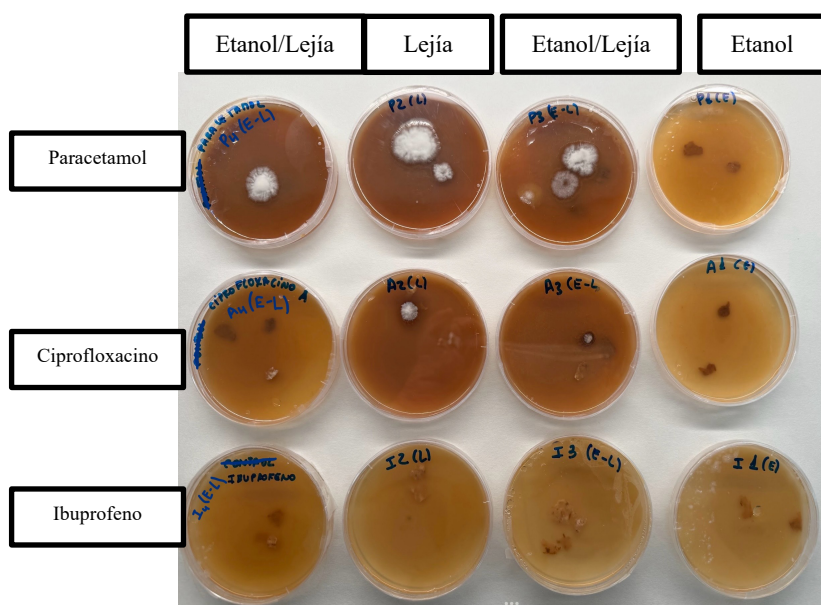


Imagen 11. Ensayo en esterilidad con 4 repeticiones por medicamento (paracetamol, ciprofloxacino e ibuprofeno de arriba hacia abajo), en primera y tercera columna se introdujo trozos de micelio esterilizados con lejía o etanol, en la segunda columna solo se creció micelio esterilizado con lejía y en la cuarta solo con etanol.

Como se observa en la Tabla 2 y 3, e Imagen 11, el tratamiento de esterilización con etanol inhibió el crecimiento del micelio: mientras que la lejía no pareció afectar a la viabilidad del micelio. Así pues, se puede concluir que el método de esterilización influye en el crecimiento del micelio, siendo la lejía la mejor opción. Posiblemente el etanol podría desnaturalizar las proteínas o alterar las membranas celulares del micelio.

Asimismo, se observó un efecto inhibitorio generalizado con el ibuprofeno, ya que no crece nada de micelio, incluso aún que la esterilización haya sido con lejía, que no daña el micelio (Tablas 2 y 3, Imagen 11)

El menor desarrollo del micelio con ciprofloxacino, diámetros más pequeños (Tabla 3, Imagen 11), sugiere que este antibiótico inhibe el crecimiento del micelio. Lo cual se corroboró el ensayo con magentas, en donde se desarrollan más los basidios, pero se redujo el micelio desarrollado (Gráficas 7 y 8).

En este ensayo, la capacidad degradadora solo se evaluó en el paracetamol (Tabla 4), ya que en el resto de condiciones, no obtuvimos micelio. No obstante, se pudo deducir que el crecimiento del micelio del hongo reduce la concentración de paracetamol. Esta reducción, en las diferentes réplicas fue del 45% al 25-32 %, mucho menor que el ensayo con magentas (Gráfica 5). Esto se explica ya que la cantidad inicial de micelio en las magentas fue de 10g, mientras en las placas Petri, apenas fue de 1 mg. No obstante, se observa una fuerte capacidad degradativa del hongo. Además, se observó que, a mayor diámetro del micelio, mayor degradación (Tabla 4). Por lo que, un mayor crecimiento micelial puede asociarse con mayor capacidad de degradación, aunque no de forma lineal.

Los medios en los que creció el hongo se tornaron de color oscuro (Imagen 11), lo sugiere una señal de la actividad metabólica intensa de degradación de compuestos. Este oscurecimiento podría deberse a que la degradación del fármaco genere compuestos coloreados, o la producción de pigmentos por parte del micelio debido al estrés químico o a la oxidación de los compuestos de la patata del medio el PDA inducida por la actividad enzimática del hongo. Se sabe que los hongos producen enzimas lignolíticas extracelulares que oxidan compuestos fenólicos, que en ocasiones generan pigmentos oscuros (Quintero et al, 2026). En los medios sin crecimiento fúngico, no cambió de color el medio. Serían necesario investigaciones posteriores y análisis de los metabolitos de degradación de paracetamol mediante técnicas de precisión como HPLC.

Los resultados obtenidos permiten analizar en profundidad la interacción entre los medicamentos evaluados y el desarrollo fúngico, tanto en términos de crecimiento vegetativo como de reproducción. Asimismo, se evidencian diferencias significativas en la capacidad del hongo para degradar cada compuesto, así como en la influencia de distintos tratamientos de esterilización sobre su viabilidad. Estos hallazgos ofrecen una base sólida para interpretar el comportamiento metabólico del hongo frente a contaminantes farmacéuticos y sus posibles aplicaciones en biorremediación.

5.2.- TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos, viniendo de 3 o 4 réplicas biológicas, se analizaron empleando Excel y se representaron como la media \pm SD (Desviación estándar). Para el análisis del efecto de los medicamentos se realizó una t de Student de dos colas. Se establecieron cuatro niveles de significancia: (*) valor de $p < 0,05$; (**) valor de $p < 0,01$; (***) valor de $p < 0,001$ y (****) p -valor $< 0,0001$.

6.-CONCLUSIONES

- Hay una disociación entre crecimiento vegetativo del hongo y reproducción, una mayor biomasa, no implica mayor número de basidios
- Paracetamol e Ibuprofeno, inhiben la reproducción (basidios) pero promueven el crecimiento vegetativo del hongo (micelio). Por el contrario, ciprofloxacino estimula tanto la formación de micelio como la de basidios, pero especialmente lo hace en la formación de estructuras reproductoras. Todos los medicamentos incrementan la masa fúngica, destacando el paracetamol.
- El hongo mostró una alta eficiencia para metabolizar los tres medicamentos. El paracetamol fue degradado en su totalidad (99,7%), el ibuprofeno también demostró alta degradación, aunque algo más lenta al principio (90%). Ciprofloxacino, al tercer día, aún persistía el 32 %, pero a los 7 días la degradación fue del 97,2%
- El tratamiento de esterilización con etanol inhibe el crecimiento del micelio: pero la lejía no parece afectar a la viabilidad del micelio.
- En condiciones de esterilidad, solo se evaluó la capacidad degradadora del paracetamol, condiciones en donde creció el micelio, observando que, a mayor diámetro del micelio, mayor degradación del compuesto (un 45% máximo).

En conclusión, el hongo *Pleurotus ostreatus* es capaz de degradar los medicamentos y utilizarlos para sobrevivir. *Pleurotus ostreatus* podría ser utilizado en tratamiento de aguas residuales farmacéuticas y descontaminación de suelos con vertidos hospitalarios, mediante inoculación del hongo, así como su utilización en filtros de plantas de tratamiento de aguas residuales (micofiltros). Es un agente fúngico degradador de paracetamol, ibuprofeno y ciprofloxacino, metabolizándolos en entornos adversos y, por tanto, un organismo fúngico con potencial para biorremediación en farmacontaminación.

8.- AGRADECIMIENTOS

Finalmente queremos agradecer a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de este proyecto.

- A la profesora del IES Fidiana que coordina el proyecto de investigación, Elena León Rodríguez, por ayudarnos a entender el funcionamiento del proyecto y su realización, así como a dirigir los documentos de investigación.
- Al IES Fidiana, por apoyar proyectos relacionados con las actividades de investigación.

- Al proyecto de Innovación Educativa y Desarrollo Curricular (PIN 144/2024) **Fidiciencia 3.0**, por darnos la oportunidad de participar en un proyecto científico.
- Al IAS CSIC, en concreto al Departamento de Mejora Vegetal por proporcionarnos un ambiente óptimo para un ensayo en completa esterilidad.
- A Rocío Martínez Ruiz por su colaboración y ayuda en la resolución de los problemas técnicos del espectrofotómetro y búsqueda del micelio del hongo.

9.- BIBLIOGRAFÍA

García R.D. (2018) Instrumentos que revolucionaron la química: la historia del espectrofotómetro. Avances en Química, 13(3), pp79-82

Abreu-Zamora M.A, González-Labrada K., Robaina-León Y., Valdés-Callado M., Saborit-Sánchez I., Jáuregui-Haz U.J. (2016). Degradación del paracetamol por radiación ultravioleta y solar en un reactor plano de canal abierto a escala de banco. Revista CENIC. Ciencias Químicas, vol. 47, pp. 93-102.

Meléndez-Marmolejo J, García-Saavedra Y, Galván-Romero V, Díaz de León-Martínez L, Vargas-Berrones K, Mejía-Saavedra J, Flores-Ramírez R. (2020). Contaminantes emergentes. Problemática ambiental asociada al uso de antibióticos. Nuevas técnicas de detección, remediación y perspectivas de legislación en América Latina. Rev. salud ambient; 20(1): pp 53-61.

Bernal-Martínez, L., Sánchez-Orozco, R., Gaduño-Pineda. L (2023). Degradation of ibuprofen in soil by means of *Arthrobacter* sp., using biomass. Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México. Volumen 7, Número 1, pp 5382.

Quintero J.C , Feijoo G.y Lema J.M. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. vitae, revista de la facultad de química farmacéutica. ISSN 0121-4004 Volumen 13 número 2, Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia. pp 61-67.

- <https://www.agromatica.es/cultivo-pleurotus-ostreatus/>
- https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/87008/CONICET_Digital_Nro.14279992-2fa1-48b5-93d6-7674ea150cf9_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- <https://efeverde.com/residuos-farmacos-hogares-espanoles-punto-sigre/>
- <http://papps.es/vii-semana-del-autocuidado-impacto-medioambiental-de-los-medicamentos/>