

**Lacasas: un enfoque “*In Silico*” para la inactivación de antibióticos comúnmente
utilizados en humanos y animales**

María Paula Catalina Mora Gamboa, **Microb. Ind.**

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Maestría en Ciencias Biológicas

Bogotá D.C.

2023

Lacasas: un enfoque “*In Silico*” para la inactivación de antibióticos comúnmente utilizados en humanos y animales

Trabajo de Grado como requisito parcial para optar al título de Magister en Ciencias Biológicas

Raúl A. Poutou-Piñales, Bq., M.Sc., Ph.D.

Tutor

Leidy D. Ardila-Leal, Biol., M.Sc., Ph.D.

Co-tutora

Balkys E. Quevedo-Hidalgo, Ing. Q., M.Sc., Ph.D.

Co-tutora

Laboratorio de Biotecnología Molecular
Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI)

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Maestría en Ciencias Biológicas

Bogotá D.C.

2023

Lacasas: un enfoque “*In Silico*” para la inactivación de antibióticos comúnmente utilizados en humanos y animales

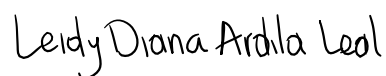
María Paula Catalina Mora Gamboa, **Microb. Ind.**

APROBADO POR



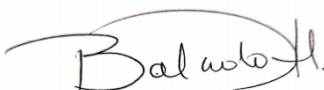
Raúl A. Poutou-Piñales, Ph.D.

Tutor



Leidy D. Ardila-Leal, Ph.D.

Co-tutora



Balkys E. Quevedo-Hidalgo, Ph.D.

Co-tutora

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Maestría en Ciencias Biológicas

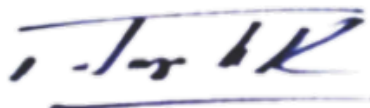
Bogotá D.C.

2023

Lacasas: un enfoque “*In Silico*” para la inactivación de antibióticos comúnmente utilizados en humanos y animales

María Paula Catalina Mora Gamboa, **Microb. Ind.**

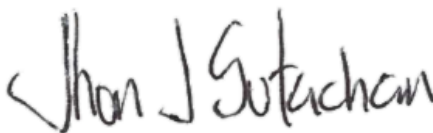
APROBADO POR



Alba A. Trespalacios-Rangel, Ph.D

Decana

Facultad de ciencias



Jhon J. Sutachan Rubio, Ph.D

Director de posgrados

Facultad de ciencias

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Maestría en Ciencias Biológicas

Bogotá D.C.

2023

Lacasas: un enfoque “*In Silico*” para la inactivación de antibióticos comúnmente utilizados en humanos y animales

María Paula Catalina Mora Gamboa, **Microb. Ind.**

APROBADO POR



Janneth Gonzalez Santos, Ph.D.
Jurado evaluador



Mayra Alexandra Tellez Corral, Ph.D.
Jurado evaluador



Fabián Harvey Lopez Vallejo, Ph.D.
Jurado evaluador

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Maestría en Ciencias Biológicas

Bogotá D.C.

2023

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme vivir esta experiencia llena de aprendizaje. Agradezco a Fernando Gabriel Mora Acevedo y María Antonieta Gamboa Sánchez por su amor y apoyo incondicional.

Agradezco a mis tutores, el profesor Raúl Alberto Poutou Piñales, la profesora Leidy Diana Ardila Leal y la profesora Balkys Quevedo Hidalgo por sus enseñanzas, paciencia y compromiso. Agradezco al profesor Johan Fabián Galindo y a Lina María Rojas por asesorar este proyecto.

Agradecimientos especiales a Carlos Andrés Daza, Juan Fernando Mora Gamboa, Melissa Andrea Mora Gamboa, María Elvia Sánchez y a todos aquellos quienes hicieron parte de este proceso.

Resumen

Las lacasas (Lac, E.C 1.10.3.2) pertenecen a la superfamilia de las cupredoxinas, familia de las oxidasas multicobre azul. Actualmente son de gran importancia ambiental e industrial, ya que catalizan la oxidación de una gran cantidad de compuestos recalcitrantes que contaminan el ambiente. Los antibióticos son contaminantes emergentes, considerados los segundos fármacos en incidencia en medios acuáticos a nivel mundial. La persistencia de los antibióticos en el medio ambiente en concentraciones subletales genera un grave problema, ya que favorece la adaptación y la proliferación de bacterias multirresistentes. El objetivo de este trabajo fue simular computacionalmente el uso de las lacasas GILCC 1 de *Ganoderma lucidum* y POXA 1B de *Pleurotus ostreatus* en la degradación de antibióticos de uso humano y animal. Para esto, se generó un modelo basado en el molde de la lacasa producida por el hongo *Lentinus tigrinus* y se determinó la calidad del modelo mediante el cálculo del QMEAN (0.78). Igualmente, el modelo fue validado con el fin de evaluar la calidad de la estructura; superando los umbrales de calidad esperados para cada análisis. El siguiente paso fue la parametrización de los cobres del centro activo y el análisis de las variaciones estructurales (en ausencia de ligandos) a lo largo de la etapa de producción de la dinámica molecular; las estructuras de GILCC 1 y POXA 1B fueron estables durante toda la trayectoria (200 ns), (RMSD y RMSF <2 Å).

Para el estudio se seleccionaron 16 antibióticos (ligandos), de importancia crítica según la OMS, con uso aprobado por diferentes entidades regulatorias (FDA, INVIMA, ICA), de amplio espectro y con un peso molecular entre 100 y 500 Da. Se evaluó la interacción molecular con los modelos 3D de las enzimas GILCC 1 y POXA 1B y los ligandos a pH 3.0 y 7.0.

Ambos modelos 3D presentaron mayor afinidad por los ligandos a pH 3.0, lo que coincidió con los análisis experimentales que ha realizado el grupo de investigación, cuando determinaron el pH óptimo para la actividad de las lacasas rGILCC 1 y rPOXA 1B, utilizando ABTS como sustrato.

Los valores de energía libres de unión indicaron una mayor afinidad entre el modelo 3D de GILCC 1 y los ligandos y una afinidad menor entre el modelo 3D de POXA 1B y los ligandos. Los resultados más bajos de energía libre de Gibbs (ΔG) indicaron mayor afinidad a pH 3.0 entre GILCC 1 con levofloxacina (LVX; $-8.2 \text{ Kcal mol}^{-1}$), sulfisoxazol (FIS; $-7.8 \text{ Kcal mol}^{-1}$), cefuroxima (CXM ; $-7.5 \text{ Kcal mol}^{-1}$), cefradina (BAN; $-7.5 \text{ Kcal mol}^{-1}$), ABTS ($-7.6 \text{ Kcal mol}^{-1}$) y tetraciclina (TE; $-7.5 \text{ Kcal mol}^{-1}$). Los resultados de GILCC 1 pueden explicarse por la topología del bolsillo

y el gran número de interacciones (puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals) que se forman entre la enzima y los antibióticos. Es posible que la transferencia de electrones en GILCC 1 ocurra por medio de una cadena de residuos de aminoácidos que incluye la His³⁹⁵ y la Phe²³⁹.

A pesar de que a pH 7.0 la afinidad entre los antibióticos y GILCC 1 fue menor que a pH 3.0, no se descarta la posibilidad de que la lacasa pueda degradar los antibióticos a pH 7.0; por lo que se recomienda evaluar experimentalmente la degradación de los antibióticos con GILCC 1 a pH 7.0 en presencia de un mediador como el ABTS, para tratar de incrementar la afinidad entre las moléculas.

Para POXA 1B a pH 3.0 los resultados más bajos de ΔG indicaron mayor afinidad por cefazolina (CZ; $-6.8 \text{ Kcal mol}^{-1}$), levofloxacin (LVX; $-6.3 \text{ Kcal mol}^{-1}$), linezolid (LZD; $-6.3 \text{ Kcal mol}^{-1}$), ABTS ($-6.7 \text{ Kcal mol}^{-1}$) y tetraciclina (TE; $-6.4 \text{ Kcal mol}^{-1}$). La interacción entre los grupos ionizables de los antibióticos y ciertos aminoácidos claves de POXA 1B como la His⁴⁵⁸, la Phe²³⁸ y el Asp²⁰⁶, facilitaron la transferencia de electrones hasta el centro activo para dar inicio a la degradación. A pH 7.0, no fue posible parametrizar la enzima ya que se formó un enlace entre la Cis⁴⁵¹ y la His³⁹⁵ del centro activo, esta conformación no es la correcta, ni es coherente con la estructura reportada para las lacasas, por lo que no se presentan los resultados de acoplamiento ni de dinámica con POXA 1B a pH 7.0. Sin embargo, la parametrización de este modelo a pH 7.0 sigue en estudio por el grupo de investigación.

Los complejos enzima-ligando más estables fueron evaluados por dinámica molecular; estos fueron inmersos en una caja de aguas TIP3P y se evaluó el comportamiento del sistema a 300 K. Se realizó la simulación de equilibrio y producción utilizando un ensamblaje isotérmico-isobárico (NPT).

Los resultados de la dinámica molecular mostraron una alta estabilidad de los complejos GILCC 1-ligando a pH 3.0. GILCC 1 mostró que la Tetraciclina (TE), la cefuroxima (CXM), la levofloxacin (LVX) y la cefradina (BAN) tenían una interacción estable con el centro activo y sólo el antibiótico sulfisoxazol (FIS) se salía del bolsillo a los 4.0 ns. El análisis del MMGBSA confirmó la estabilidad de los complejos. Estos resultados promisorios, sugieren que GILCC 1 puede degradar los antibióticos tetraciclina (TE), levofloxacin (LVX), cefuroxima (CXM) y cefradina (BAN) a pH 3.0.

En el modelo 3D de POXA 1B, sólo la cefazolina (CZ) permaneció en el bolsillo del modelo, mientras que la tetraciclina (TE), la levofloxacin (LVX) y el linezolid (LZD) se salieron a los 7.4, 40.2 y 19.6 ns, respectivamente. La estructura del modelo 3D de POXA 1B presentó regiones de alta fluctuación cercanas al bolsillo de unión, lo que explicaría la salida de la mayoría de los ligandos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que POXA 1B pueda degradar estos antibióticos, pues la presencia de un mediador podría contribuir a la estabilidad del sistema.

Este estudio computacional predijo de forma acertada el comportamiento de un sistema lacasa-antibiótico. Es una representación a nivel atómico de las interacciones moleculares que pueden darse bajo condiciones reales entre las lacasas y los antibióticos y significa un complemento para los estudios a nivel práctico. Se sugiere validar experimentalmente estos resultados y evaluar la degradación en presencia de diferentes compuestos químicos que pueden encontrarse en aguas residuales. Además, se sugiere realizar estudios de mutagénesis para evaluar si los aminoácidos de POXA 1B, que presentaron altas fluctuaciones (Val¹⁶² y Ser²⁶⁴) afectan la degradación de los antibióticos.

Palabras clave: lacasas, antibióticos, acoplamiento molecular, afinidad, dinámica molecular, estabilidad, degradación.

Abstract

Laccases (Lac, E.C 1.10.3.2) belong to the cupredoxin superfamily, a family of multi-copper blue oxidases. They are currently of high environmental and industrial importance, as they catalyse the oxidation of several recalcitrant compounds that pollute the environment. Antibiotics are emerging pollutants, considered the second most prevalent drugs in aquatic environments worldwide. The environmental persistence of antibiotics at sub-lethal concentrations is a problem, as it favours the adaptation and proliferation of multi-resistant bacteria. This work aimed to computationally simulate the use of the laccases GILCC 1 from *Ganoderma lucidum* and POXA 1B from *Pleurotus ostreatus* in the degradation of antibiotics for human and animal use. Then, we obtained a 3D model based on the laccase template produced by *Lentinus tigrinus*, and its quality expressed as the QMEAN was 0.78. Likewise, the model validation allowed us to evaluate the structure quality, exceeding the expected thresholds for each analysis. The next step was the parameterisation of the active centre coppers and structural variations (in the absence of ligands) along the molecular dynamics production step; the structures of GILCC 1 and POXA 1B were stable during the whole trajectory (200 ns) (RMSD and RMSF <2 Å).

For the study, 16 antibiotics (ligands) were selected, of critical importance according to the WHO, with approved use by different regulatory bodies (FDA, INVIMA, ICA), of broad spectrum and with a molecular weight between 100 and 500 Da. The molecular interaction between 3D structures models of GILCC 1 and POXA 1B and ligands was at pH 3.0 and 7.0.

Both 3D models showed higher affinity for the ligands at pH 3.0, which agreed with the experimental analyses performed by the research group when they determined the optimum pH for the activity of the rGILCC 1 and rPOXA 1B laccases, using ABTS as substrate.

The binding free energy values indicated a higher affinity between the 3D model of GILCC 1 and the ligands and a low affinity for the 3D model of POXA 1B and the ligands. Lower Gibbs free energy (ΔG) results indicated high pH 3.0 affinity between GILCC 1 with Levofloxacin (LVX; -8.2 Kcal mol⁻¹), sulfisoxazole (FIS; -7.8 Kcal mol⁻¹), Cefuroxime (CXM; -7.5 Kcal mol⁻¹), Cephadrine (BAN; -7.5 Kcal mol⁻¹), ABTS (-7.6 Kcal mol⁻¹) and Tetracycline (TE; -7.5 Kcal mol⁻¹). The GILCC 1 results could occur by the topology of the pocket and a large number of interactions (hydrogen bridges and van der Waals interactions) that form between the enzyme and

the antibiotics. Electron transfer in GILCC 1 may occur via a chain of amino acid residues, including His³⁹⁵ and Phe²³⁹.

Although at pH 7.0, the affinity between the antibiotics and GILCC 1 was lower than at pH 3.0. Then, the degradation of antibiotics at pH 7.0 by laccases should not be excluded. Therefore, should be interesting to experimentally evaluate the degradation of the antibiotics with GILCC 1 at pH 7.0 in the presence of a mediator such as ABTS to try to increase the affinity between the molecules.

For POXA 1B at pH 3.0, the lowest ΔG results indicated a higher affinity for Cefazolin (CZ; -6.8 Kcal mol⁻¹), Levofloxacin (LVX; -6.3 Kcal mol⁻¹), linezolid (LZD; -6.3 Kcal mol⁻¹), ABTS (-6.7 Kcal mol⁻¹) and Tetracycline (TE; -6.4 Kcal mol⁻¹). The interaction between the ionisable groups of the antibiotics and certain amino acids of POXA 1B, such as His⁴⁵⁸, Phe²³⁸ and Asp²⁰⁶, facilitated electron transfer to the active centre to initiate degradation. At pH 7.0, it was not possible to parameterise the enzyme due to a bond formed between Cis⁴⁵¹ and His³⁹⁵ of the catalytic centre. This structure does not comply with the previously reported laccases structures, so neither acoplamiento nor dynamics results are presented with POXA 1B at pH 7.0. However, the parameterisation of this model at pH 7.0 is still under study by the research group.

For the most stable enzyme-ligand complexes molecular dynamics evaluation, they were immersed in a TIP3P water box to determine the system behaviour at 300 K. Equilibrium and production simulation was performed using an isothermal-isobaric assembly (NPT).

Molecular dynamics results showed high stability of the GILCC 1-ligand complexes at pH 3.0. GILCC 1 showed that tetracycline (TE), cefuroxime (CXM), levofloxacin (LVX) and cephadrine (BAN) had a stable interaction with the active centre, and only the antibiotic sulfisoxazole (FIS) dropped out of the pocket at 4.0 ns. MMGBSA analysis confirmed the stability of the complexes. These promising results suggest that GILCC 1 can degrade the antibiotics tetracycline (TE), levofloxacin (LVX), cefuroxime (CXM) and cephadrine (BAN) at pH 3.0.

In the POXA 1B 3D model, only cefazolin (CZ) remained in the model pocket, while tetracycline (TE), levofloxacin (LVX) and linezolid (LZD) dropped out at 7.4, 40.2 and 19.6 ns, respectively. The 3D model structure of POXA 1B showed regions of high fluctuation close to the binding

pocket, which would explain the active centre exit of most ligands. However, the possibility that POXA 1B could degrade these antibiotics should not be discarded, as the presence of a mediator could contribute to the system's stability.

This computational study accurately predicted the behaviour of a laccase-antibiotic system. It is a representation at the atomic level of the molecular interactions that can occur, between laccases and antibiotics, and it supports studies at the practical level. We suggest experimentally validating these results and evaluating the degradation in the presence of different chemical compounds found in wastewater. In addition, targeted mutagenesis studies will allow us to know if the amino acids of POXA 1B, which have high fluctuations (Val¹⁶² and Ser²⁶⁴), affect the degradation of antibiotics.

Keywords: Laccases, antibiotics, molecular acoplamiento, affinity, molecular dynamics, stability, degradation.

Tabla de contenido

Resumen	8
Abstract.....	11
Listado de tablas	16
Listado de Figuras	16
1. Introducción	20
2. Marco teórico	23
2.1. Generalidades	24
2.1.1. Lacasas de hongos, características y funciones	24
2.1.2. Hongos de podredumbre blanca	24
2.1.3. Estructura de las lacasas	26
2.1.4. Potencial redox de las lacasas	27
2.1.5. Aplicaciones de las lacasas	27
2.2. Antibióticos	30
2.2.1. Uso de los antibióticos en ganadería	46
2.2.2. Uso de los antibióticos en humanos.....	52
2.2.3. Presencia de antibióticos en aguas residuales.....	54
2.2.4. Problemática global de la resistencia a antibióticos	56
2.2.5. Entidades regulatorias del uso de antibióticos	58
2.2.6. Degradación de antibióticos	60
2.3. Lacasas recombinantes	81
2.4. Estudios computacionales de lacasas	84
2.5. Antecedentes del trabajo en el grupo de investigación.....	86
2.5.1. Estudios computacionales de GILCC 1 y POXA 1B realizados por el grupo GBAI	88
2.6. Otros estudios de lacasas producidas en <i>Pichia pasatoris</i>	90
3. Objetivo General	93
3.1. Objetivos específicos	93
4. Materiales y Métodos.....	94
4.1. Modelado y parametrización del centro activo de las enzimas GILCC 1 y POXA 1B.....	94
4.2. Dinámica molecular con las enzimas GILCC 1 y POXA 1B.....	94
4.3. Selección de los ligandos (antibióticos).....	95
4.4. Preparación de los ligandos (antibióticos).....	95
4.5. Preparación de los modelos 3D de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B	95
4.6. Acoplamiento molecular de los modelos 3D de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B con los ligandos	95
4.6.1. Identificación de los residuos que hacen parte del bolsillo de unión al sustrato de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B.....	95
4.6.2. Parámetros del acoplamiento molecular entre los modelos 3D de las enzimas GILCC 1 y POXA 1B con los ligandos	96
4.6.3. Comparación de la conformación del ABTS acoplado con los receptores vs. la conformación del ABTS en el complejo cristalizado 3ZDW	96
4.6.4. Análisis de las interacciones de los complejos enzima-ligando	96
4.7.1 Análisis de dinámica molecular - área de superficie con solvatación generalizada (MMGBSA).....	97

5.	Resultados	98
5.1.	Modelado de la estructura 3D de la enzima GILCC 1	98
5.2.	Parametrización del centro activo del modelo 3D de GILCC 1 a pH 3.0 y 7.0.....	100
5.3.	Parametrización del centro activo de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B a pH 7.0.....	101
5.3.	Dinámica molecular con los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B en ausencia de ligandos. .	103
5.4.	Selección de ligandos (antibióticos)	105
5.5.	Preparación de ligandos	107
5.6.	Acoplamiento molecular de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B con los ligandos	111
5.6.1.	Identificación de los residuos que hacen parte del bolsillo de unión al sustrato.....	111
5.6.2.	Resultados del acoplamiento molecular con los modelos 3D de GILCC 1 a pH 3.0 y 7.0, y POXA 1B a pH 3.0.....	112
5.6.3	Comparación del ABTS una vez acoplado con los receptores vs. el complejo cristalizado del ABTS con la lacasa de <i>Bacillus subtilis</i> (3ZDW)	113
5.7.	Interacciones de los complejos enzima-ligando.....	114
5.7.1.	Acoplamiento molecular de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B con el ABTS..	114
5.7.2.	Acoplamiento molecular de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B con la tetraciclina (TE).....	116
5.7.3.	Acoplamiento molecular de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B con los aminoglicósidos seleccionados.	118
5.7.4.	Acoplamiento molecular de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B con las oxazolidinonas seleccionadas.....	123
5.7.5.	Acoplamiento molecular de los modelos 3D de lacasas GILCC 1 y POXA 1B con las cefalosporinas seleccionadas	126
5.7.6.	Acoplamiento molecular de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B con fosfomicina (FOS).....	134
5.7.7.	Acoplamiento molecular de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B con las lincosamidas seleccionadas	136
5.7.8.	Acoplamiento molecular de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B las fluoroquinolonas seleccionadas	140
5.7.9.	Acoplamiento molecular de los modelos 3D de GILCC1 y POXA 1B con las sulfonamidas seleccionadas.	144
6.	Discusión.....	155
6.1	Modelado, validación y parametrización del centro activo del modelo 3D de la enzima GILCC 1	155
6.2.	Dinámica molecular de las enzimas sin ligando.....	157
6.2.1	Dinámica molecular del modelo 3D de GILCC 1	157
6.3	Comparación del ABTS una vez acoplado con los receptores vs. el complejo cristalizado del ABTS con la lacasa de <i>Bacillus subtilis</i> (3ZDW).....	157
6.4	Análisis de las interacciones de los complejos enzima-ligando	157
6.5	Análisis de dinámica molecular de los modelos 3D GILCC 1 y POXA 1B con los antibióticos seleccionados	162
7.	Conclusiones.....	164
8.	Recomendaciones	165
9.	Referencias	166
10.	Anexos.....	188
11.	Artículo.....	191

Listado de tablas

Tabla 1. Antibióticos de importancia crítica y e importancia alta según la WHO.....	31
Tabla 2. Tipos de tratamientos y técnicas para la degradación de antibióticos, resumen del porcentaje de degradación o eliminación.	74
Tabla 3. Comparación de los resultados de la validación de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B.	100
Tabla 4. Ángulos y enlaces del centro activo parametrizado a pH 3.0 de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B.	100
Tabla 5. Ángulos y enlaces del centro activo parametrizado a pH 7.0 del modelo 3D de GILCC 1	102
Tabla 6. Ejemplo de la entrada de netilmicina (NET) a la biblioteca de 226 antibióticos preseleccionados para el estudio.	106
Tabla 7. Antibióticos de amplio espectro seleccionados para el estudio.	107
Tabla 8. Carga de los ligandos seleccionados a pH 3.0 y 7.0.....	108
Tabla 9. Energía de afinidad (ΔG , Kcal mol ⁻¹) de los modelos 3D de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B con los antibióticos.	112
Tabla 10. Resultados del análisis de MMGBSA de los complejos GILCC 1-ligando y el tiempo de permanencia de los ligandos en el bolsillo.....	154
Tabla 11 Resultados del análisis de MMGBSA de los complejos POXA 1B-ligando y el tiempo de permanencia de los ligandos en el bolsillo.....	154

Listado de Figuras

Figura 1. Algunos intermediarios generados y pasos de degradación de la cefazolina (CZ) a partir de diferentes técnicas.....	72
Figura 2. Algunos pasos intermediarios y de degradación de la levofloxacin (LVX) empleando diferentes técnicas de degradación	73
Figura 3. Intermediarios resultantes de la degradación de la levofloxacin (LVX)	79
Figura 4. Convenciones utilizadas para representar las interacciones formadas entre las enzimas y los ligandos.....	96
Figura 5. Calidad del modelo 3D de GILCC 1.....	98
Figura 6. Validación del modelo 3D de GILCC 1	99
Figura 7. Centro activo parametrizado de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B a pH 3.0.	101
Figura 7.1. Parametrización de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B a pH 7.0.	103
Figura 8. Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de los modelos GILCC 1 y POXA 1B en ausencia de ligandos.	104
Figura 8.1. Fluctuación cuadrática media (RMSF) de los modeos 3D de GILCC 1 y POXA 1B en ausencia de ligandos.....	105
Figura 8.2. Zonas de fluctuación de los modelos GILCC 1 y POXA 1B en ausencia de ligandos	105
Figura 9. Bolsillo del centro activo del modelo 3D de GILCC 1.....	111
Figura 9.1. Bolsillo del centro activo del modelo 3D de POXA 1B.....	112
Figura 10. Conformación del ABTS cristalizado vs., la conformación del ABTS acoplado a los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B.....	113

Figura 10.1. Conformación del ABTS cristalizado vs., la conformación del ABTS acoplado al modelo 3D de GILCC 1 a pH 7.0.....	114
Figura 11. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y el ABTS a pH 3.0.....	115
Figura 11.1. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y el ABTS a pH 7.0.....	115
Figura 11.2. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y el ABTS a pH 3.0. a.....	116
Figura 12. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y tetraciclina (TE) a pH 3.0.....	117
Figura 12.1. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la tetraciclina (TE) a pH 7.0.....	117
Figura 12.2. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y la tetraciclina (TE) a pH 3.0.....	118
Figura 13. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la netilmicina (NET) a pH 3.0.....	119
Figura 13.1. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la netilmicina (NET) a pH 7.0.....	120
Figura 13.2. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la tobramicina (TM) a pH 3.0.....	121
Figura 13.3. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la tobramicina (TM) a pH 7.0.....	122
Figura 14. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y netilmicina (NET) a pH 3.0 a.....	123
Figura 14.1. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y tobramicina (TM) a pH 3.0 a.....	123
Figura 15. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y el linezolid (LZD) a pH 3.0.....	124
Figura 15.1. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y linezolid (LZD) a pH 7.0.....	125
Figura 16. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y linezolid (LZD) a pH 3.0.....	125
Figura 17. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y cefazolina (CZ) a pH 3.0.....	126
Figura 17.1. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la cefazolina (CZ) a pH 7.0.....	127
Figura 17.2. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la cefradina (RAD) a pH 3.0 a.....	127
Figura 17.3. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la cefradina (RAD) a pH 7.0.....	128
Figura 17.4. acoplamiento molecular entre el modelo la enzima GILCC 1 y la cefuroxima (CXM) a pH 3.0.....	129
Figura 17.5. acoplamiento molecular entre el modelo la enzima GILCC 1 y la cefuroxima (CXM) a pH 7.0.....	129

Figura 18. acoplamiento molecular entre el modelo la enzima POXA 1B y cefazolina (CZ) a pH 3.0	130
Figura 18.1. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y cefradina (RAD) a pH 3.0.	131
Figura 18.2. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y cefuroxima (CXM) a pH 3.0	132
Figura 19. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC1 y el tiamfenicol (TP) a pH 3.0	133
Figura 19.1. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y el tiamfenicol (TP) a pH 7.0	133
Figura 20. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y tiamfenicol (TP) a pH 3.0	134
Figura 21. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la fosfomicina (FOS) a pH 3.0	135
Figura 21.1. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la fosfomicina (FOS) a pH 7.0	135
Figura 22. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y fosfomicina (FOS) a pH 3.0	136
Figura 23. acoplamiento molecular entre el modelo la enzima GILCC 1 y la clindamicina (CM) a pH 3.0	136
Figura 23.1. acoplamiento molecular entre el modelo la enzima GILCC 1 y la clindamicina (CM) a a pH 7.0	137
Figura 23.2. acoplamiento molecular entre el modelo la enzima GILCC 1 y la lincomicina (LIN) a pH 3.0	138
Figura 23.3. acoplamiento molecular entre el modelo la enzima GILCC 1 y lincomicina (LIN) a pH 7.0	138
Figura 24. acoplamiento molecular entre la enzima POXA 1B y clindamicina (CM) a pH 3.0...	139
Figura 24.1. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y lincomicina (LIN) a pH 3.0.	140
Figura 25. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la moxifloxacina (MXF) a pH 3.0	140
Figura 25.1. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la moxifloxacina (MXF) a pH 7.0	141
Figura 25.2. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la levofloxacina (LVX) a pH 3.0 a.	141
Figura 25.3. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la levofloxacina (LVX) a pH 7.0	142
Figura 26. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y la moxifloxacina (MXF) a pH 3.0	143
Figura 26.1. acoplamiento molecular entre el modelo la enzima POXA 1B y levofloxacina (LVX) a pH 3.0	143
Figura 27. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y el trimetoprim (SXT) a pH 3.0	144

Figura 27.1. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y el trimetoprim (SXT) a pH 7.0	145
Figura 27.2. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y el sulfisoxazol (FIS) a pH 3.0	145
Figura 27.3. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y el sulfisoxazol (FIS) a pH 7.0	146
Figura 27.4. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y Sulfinalamida (SA) a pH 3.0	147
Figura 27.5. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y Sulfinalamida (SA) a pH 7.0	148
Figura 28. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y trimetoprim (SXT) a pH 3.0	148
Figura 28.1. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y sulfisoxazol (FIS) a pH 3.0	149
Figura 28.2. acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y Sulfinalamida (SA) a pH 3.0	149
Figura 29. Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de los complejos GILCC 1-ligandos	150
Figura 30. Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de los complejos POXA 1B-ligandos.	151
Figura 31. Fluctuación cuadrática media (RMSF) de los complejos GILCC 1-ligando.....	152
Figura 32. Fluctuación cuadrática media (RMSF) de los complejos POXA 1B-ligando	153

1. Introducción

Las lacasas (Lac, E.C 1.10.3.2) son enzimas pertenecientes a la superfamilia de las cupredoxinas, específicamente a la familia de las oxidasas multicobre azul [1]. Son enzimas ubicuas, se encuentran en hongos, bacterias, plantas, e insectos; organismos en los que desempeñan diferentes funciones. En los hongos, participan en la despolimerización de compuestos complejos como la lignina [2] y en la morfogénesis, la producción de pigmentos y la defensa contra el estrés [3]. Se han reportado diferentes géneros productores de lacasas como los hongos de podredumbre blanca [4]. Estos se caracterizan por ser los organismos más eficientes en la degradación de lignina hasta su mineralización a CO₂ y agua. La lignina es el segundo biopolímero en abundancia después de la celulosa y también uno de los compuestos naturales más recalcitrantes [5]. La degradación de la lignina, al igual que la de otros compuestos xenobióticos, ocurre debido a la producción de enzimas ligninolíticas oxidorreductasas extracelulares de baja especificidad, las cuales se clasifican en fenoloxidasas (E.C. 1.10.3.) y hemooxidasas (E.C 1.14.14.18) [6]. Las enzimas fenoloxidasas utilizan el oxígeno (O₂) como aceptor final de electrones, mientras que las hemooxidasas utilizan el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Entre las enzimas fenoloxidasas se encuentran las lacasas, mientras que, entre las hemooxidasas se incluyen enzimas como lignina peroxidasa (LiP, E.C 1.11.1.14) manganeso peroxidasa (MnP, E.C 1.11.1.13), versátil peroxidasa (VP, E.C 1.11.1.16) y peroxidasa tipo dyP (E.C 1.11.1.19) [2, 7, 8]. También, existen enzimas accesorias involucradas en la degradación de la lignina, las cuales producen el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) requerido por las peroxidasa, como aril-alcohol oxidasa (E.C 1.1.3.7), glioxal oxidasa (E.C 1.2.3.5) y glucosa 1-oxidasa (E.C 1.1.3.4) [6]. La capacidad de estas enzimas para degradar los compuestos, varía según la especie y las propiedades catalíticas [8]. Las lacasas son las enzimas que participan principalmente en la degradación de la lignina, actualmente las lacasas son de gran importancia a nivel industrial ya que tienen la capacidad catalizar la oxidación de una gran cantidad de compuestos, igualmente son de gran importancia en el tratamiento de pesticidas, explosivos, agua residual y colorantes sintéticos [3], desechos generados por diferentes industrias, principalmente, por industrias papeleras, petroquímicas y textiles [9]. Estos compuestos de desecho tienen un impacto negativo en el ambiente, por ejemplo, los colorantes sintéticos poseen estructuras químicas complejas de difícil degradación que impactan negativamente en el ambiente y en la salud, por ser tóxicos, cancerígenos y altamente recalcitrantes [10-12].

Debido a la importancia de las lacasas, se han implementado diferentes estrategias para aumentar la producción enzimática reduciendo costos y tiempo, ya que la producción de lacasas en hongos es muy baja para el uso industrial y los altos costos en el proceso de purificación hacen que sea inviable el uso de lacasas nativas [13, 14]. El uso de lacasas recombinantes es una alternativa para facilitar el proceso de purificación y aumentar la producción [15]. *Pichia pastoris* (actualmente reclasificada como *Komagataella phaffii*) [16-20] ha sido utilizada como modelo de expresión de genes heterólogos para la producción de lacasas recombinantes ya que presenta ventajas sobre otros sistemas de expresión heteróloga en eucariotas, como una alta tasa de crecimiento, altos niveles de productividad, fácil manipulación genética, se cuenta con varios vectores de expresión muy caracterizados, no es patógena para humanos (GRAS, “general recognize as safe”) ya que no produce endotoxinas, además, de realizar modificaciones postraduccionales [21]. En este sentido algunos autores han utilizado *Pichia pastoris* para la producción de una gran variedad de proteínas y enzimas; entre ellas las lacasas [14, 22-28]. El grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI) de la Facultad de Ciencias en la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia, expresó las lacasas recombinantes rPOXA 1B de *Pleurotus ostreatus* y la rGILCC 1 de *Ganoderma lucidum* en *P. pastoris* X33, bajo el control del promotor de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (E.C.1.2.1.12), (*pGAP*), [22]. Con las cepas recombinantes productoras de enzimas se han realizado optimizaciones estadísticas secuenciales para incrementar la producción de biomasa y la actividad enzimática [29-32]. Por otra parte el aumento en la escala la producción de la enzima rPOXA 1B ha sido objetivo de este grupo, Ardila-Leal et al., (2019) optimizaron un medio de cultivo [32], disminuyeron los costos del mismo [31], escalaron producción de rPOXA 1B en biorreactor de 10 L [32], implementaron una estrategia de adición de metanol para incrementar la producción de la enzima, pese a que el gen codificante de rPOXA 1B se encuentra bajo el control del promotor *pGAP* [30], obteniendo resultados muy promisorios; por otra parte estudiaron la estabilidad del concentrado enzimático (enzima impura) en ausencia de preservantes [33]. Todos estos estudios realizados han estado dirigidos al uso de las lacasas recombinantes o nativas para la remoción de diversos tipos de contaminantes [29, 34-39] y a la posibilidad de que la producción de lacasas recombinantes sea una opción industrial.

Otros autores han empleado las lacasas para la remoción de compuestos provenientes de la industria farmacéutica; entre estos compuestos se encuentran los antibióticos, las hormonas, los compuestos citostáticos, los antiepilépticos, los reguladores de lípidos, los β -bloqueadores y los antiinflamatorios. El incremento en la frecuencia de algunas enfermedades, la auto-medicación, el

manejo inadecuado y a la disposición incorrecta de los residuos, ha incrementado la presencia de medicamentos en el medio ambiente. Estos compuestos son introducidos en el ambiente principalmente mediante la descarga de aguas residuales de hospitales, hogares e industrias farmacéuticas [40, 41].

Los antibióticos son de los fármacos con mayor presencia en aguas residuales a nivel mundial [42], ya que son ampliamente utilizados en la industria ganadera para la prevención (profiláctico) y tratamiento de enfermedades causadas por patógenos, permitiendo así un crecimiento saludable con menor mortalidad y morbilidad del ganado. Estos antibióticos se utilizan en la cría de animales destinados a la producción de carne como, cerdos, bovinos, aves de corral y en acuicultura [43]. Sólo en Colombia, en el año 2020 habían 28.245.262 cabezas de ganado bovino, 221.011 de ganado porcino y 463.113 cabezas aviares (<https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2018.aspx>). De acuerdo con un reporte de la Food and Drug Administration (FDA) entre el 2009 y el 2018 la cantidad anual de antibióticos utilizados en animales alcanzó valores de 8000000 Kg, siendo las tetraciclinas (TE) las más utilizadas [44]. Debido a la naturaleza de estos compuestos, no son absorbidos por el intestino de los animales, lo que resulta en la excreta entre el 30 y el 90 % de los antibióticos en las heces fecales [45].

Al realizar la disposición de los residuos ganaderos, los antibióticos presentes en las heces suelen descomponerse debido a reacciones de oxido-reducción, hidrólisis, biodegradación y fotodegradación; lo que hace que se reduzca la concentración del antibiótico y por ende, su función bactericida o bacteriostática [46]; lo anterior genera un grave problema, ya que la exposición a concentraciones subletales de los antimicrobianos favorece la adaptación y la proliferación de bacterias con fenotipos multirresistentes. Además, los antibióticos generan un grave problema de contaminación en el ambiente, causando un impacto negativo en los ecosistemas, debido a su toxicidad sobre organismos acuáticos, bacterias algas y peces [47].

Por otra parte, la resistencia bacteriana a los antibióticos implica el fracaso en los tratamientos; la latencia de los procesos infecciosos, la progresión de la enfermedad de aguda a crónica, la transmisión de la infección a otros animales, la aparición de brotes, las pérdidas económicas e incluso la aparición de reacciones adversas a los antibióticos [48]. En muchas ocasiones los cultivos de consumo humano son fertilizados con heces de animales y regados con fuentes hídricas

contaminadas con antibióticos, ocasionando la diseminación a humanos y animales de cepas resistentes. Esta diseminación implica un problema de salud pública, ya que las opciones de tratamientos contra bacterias patógenas son cada vez más limitadas [49].

Existen diferentes métodos para la eliminación de compuestos farmacéuticos en aguas, sin embargo, debido a la hidrofilia, la naturaleza persistente y la baja concentración en aguas residuales, la eliminación de estos productos químicos en las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales es mucho más difícil que la eliminación de otros compuestos orgánicos. En algunos procesos se obtienen residuos con alta concentración de microcontaminantes, los cuales deben ser sometidos a tratamientos especiales como la incineración o fusión por plasma lo que incrementa considerablemente los costos del tratamiento. Además, en los procesos de oxidación se pueden producir intermediarios de la degradación de los antibióticos que resulten tóxicos y cancerígenos [50, 51]. Por esto, se han implementado alternativas ecológicas y eficientes para la degradación de estos compuestos y así reducir la problemática de contaminación y resistencia bacteriana. Por lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron, *i*) generar y validar los modelos computacionales de las lacasas POXA 1B de *Pleurotus ostreatus* y GILCC 1 de *Ganoderma lucidum*, *ii*) simular computacionalmente el uso de dos lacasas (POXA 1B y GILCC 1) en la degradación de antibióticos de uso humano y animal y *iii*) caracterizar molecularmente de la interacción de las enzimas POXA 1B y GILCC 1 con antibióticos (ligandos) de uso común en humanos y/o animales y simular computacionalmente las interacciones enzima-ligando.

2. Marco teórico

La biología computacional ha permitido la simulación de sistemas biológicos y su comprensión a nivel molecular mediante el uso de algoritmos y modelos matemáticos. Estas simulaciones se alimentan de grandes bases de datos obtenidos experimentalmente. Entender la interacción lacasa-antibiótico bajo ciertas condiciones permitirá conocer el tipo de enlaces formados, la afinidad de la enzima por el ligando, la ruptura de enlaces o valores de energía del sistema a lo largo del tiempo; datos que experimentalmente no son fáciles de obtener [52]. Esta información, permitiría la predicción acertada del comportamiento del sistema en condiciones reales, facilitando la metodología experimental. De esta manera también, se ampliará la lista de aplicaciones que tienen las lacasas a nivel industrial y ambiental debido a sus propiedades catalíticas, que ya han sido reportadas.

2.1. Generalidades

2.1.1. Lacasas de hongos, características y funciones

Las lacasas (Lac, E.C 1.10.3.2) son enzimas pertenecientes a la superfamilia de las cupredoxinas, específicamente a la familia de las oxidasas multicobre azul [1]. Son enzimas ubicuas, se encuentran en hongos, bacterias, plantas, e insectos, desempeñando diferentes funciones. En diferentes especies de hongos se ha reportado la producción de lacasas; estas participan en la despolimerización de compuestos complejos como la lignina [2]. También participan en otros procesos como morfogénesis, producción de pigmentos que protegen los hongos de condiciones ambientales adversas, esporulación y defensa contra el estrés [3]. Además, las lacasas tiene gran importancia en la interacción planta-hongo; son producidas por hongos fitopatógenos con el fin de degradar los compuestos tóxicos generados por las plantas como sistema de defensa [53]. Las lacasas en hongos pueden ser intra o extracelulares, mientras que en bacterias las lacasas son predominantemente intracelulares [5]. Se ha reportado que, en bacterias estas enzimas están involucradas en el proceso de morfogénesis, biosíntesis de pigmentos, protección de las esporas contra la luz UV y contra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [3]. En las plantas estas enzimas son de gran importancia en la síntesis de lignina para la formación de la pared celular mientras que, en insectos, las lacasas participan en la esclerotización de la cutícula y otros procesos fisiológicos [54].

2.1.2. Hongos de podredumbre blanca

Se han reportado diferentes géneros productores de lacasas pertenecientes a Ascomicetos, Deuteromicetos y Basidiomicetos [55, 56]. En estos últimos, se encuentran los hongos de podredumbre blanca [4], los cuales se caracterizan por ser los organismos degradadores de lignina más eficientes, llevándola hasta su mineralización (formación de CO_2 y agua). La lignina es un biopolímero aromático complejo, compuesto por unidades de fenilpropanoides unidas entre si a través de enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno [5], la lignina es la segunda molécula en abundancia después de la celulosa y hace parte del 15 % de la biomasa terrestre; este polímero se encuentra en una proporción que oscila entre el 20 y el 35 % en la madera [57]. En las plantas la lignina proporciona rigidez a las paredes celulares y protege los polisacáridos contra la degradación microbiana, también es una barrera contra la penetración del agua ya que es un polímero hidrofóbico. Debido a estas funciones biológicas, la lignina es uno de los compuestos naturales más recalcitrantes [5]. También, existen polímeros complejos como la celulosa y hemicelulosa, que hacen parte de la composición de la madera y otros compuestos lignocelulíticos. En general la industria requiere de la degradación de compuestos recalcitrantes; lo cual puede realizarse por medio de

procesos termoquímicos como la pirólisis; sin embargo, este proceso, además, de ser costoso, genera productos tóxicos y nocivos para la salud y el medio ambiente como el licor negro que se obtiene del pulpeo de celulosa en la industria papelera [36, 58-60]. Igualmente, en el proceso se generan compuestos que inhiben la hidrólisis enzimática, por tanto, la degradación biológica de la lignina es una alternativa ventajosa por su bajo costo e impacto ambiental vs. los procesos termoquímicos [8].

La degradación biológica de la lignina, al igual que la degradación de otros compuestos xenobióticos como la celulosa y la hemicelulosa, ocurre debido a una batería enzimática de los hongos de podredumbre blanca; enzimas ligninolíticas oxidorreductasas extracelulares no específicas, las cuales se clasifican en fenol oxidasas y hemo-oxidasas [6]. Las enzimas fenoloxidasas utilizan el O₂ como aceptor final de electrones, mientras que las hemo-oxidasas utilizan el H₂O₂ como aceptor final de electrones. Dentro de estas primeras se encuentran las lacasas, mientras que, dentro de las hemo-oxidasas se incluyen enzimas como lignina peroxidasas (LiP, E.C 1.11.1.14) manganeso peroxidasas (MnP, E.C 1.11.1.13), versátil peroxidasa (VP, E.C 1.11.1.16) y peroxidasas tipo dyP (E.C 1.11.1.19) [2, 7, 8]. También, existen enzimas accesorias implicadas en la degradación de la lignina, las cuales producen peróxido de hidrógeno (H₂O₂) requerido por las peroxidasas, como aril-alcohol oxidasa (AAO, E.C 1.1.3.7), glioxal oxidasa (E.C 1.2.3.5) y glucosa 1-oxidasa (E.C 1.1.3.4) [6]. La producción, actividad y habilidad de estas enzimas para degradar los compuestos varía según la especie y las propiedades catalíticas [8]. Se ha reportado que hongos como *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, son capaces de producir enzimas como Lac, MnP, LiP, VP, o AAO en presencia de diferentes sustratos [61, 62].

Las lacasas son las enzimas que participan principalmente en la degradación de la lignina. Se ha demostrado que la tasa de degradación de la lignina está correlacionada con la producción de lacasas. En efecto, los hongos de podredumbre café no producen lacasas, por tanto, no son capaces de degradar completamente la lignina [63], mientras que los hongos de podredumbre blanca, degradadores de lignina se caracterizan por presentar una actividad lacasa alta [63, 64]. Dentro de los hongos de podredumbre blanca productores de lacasas se encuentran *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum* o *Pycnoporus cinnabarinus* [7]. Las lacasas, al igual que las otras enzimas son producidas durante el metabolismo secundario. Usualmente la síntesis y secreción de estas enzimas es inducida en limitación de nutrientes, principalmente carbono y nitrógeno, también, son inducidas por la presencia de monómeros de lignina [7].

2.1.3. Estructura de las lacasas

La mayoría de las lacasas tienen una masa molecular entre 60 y 75 kDa [65] y se componen de tres dominios tipo cupredoxina, cada uno con al menos 7 láminas antiparalelas tipo β dispuestas en barril de clave griega [1, 56]. Esta estructura se estabiliza con dos puentes disulfuro, el primero se sitúa entre los dominios 1 y 3; el otro, está localizado entre los dominios 2 y 3. Los dominios 1 y 3 proporcionan residuos de aminoácidos involucrados en la coordinación de cobre [3].

Sobre estos dominios se encuentran cuatro átomos de cobre (Cu^{2+}), que se dividen en tres clases de acuerdo con sus características espectroscópicas y al entorno del ion metálico [56]. El tipo 1 (T1), se encuentra en el dominio 3, cerca de la superficie de la proteína. Contiene un átomo de cobre azul paramagnético, que confiere el color azul característico de las enzimas multicobre, debido a la intensa absorción electrónica a 610 nm, causada por el enlace covalente cobre-cisteína [66]. El cobre T1 se encuentra unido a dos residuos de histidina y uno de cisteína, como ligandos ecuatoriales conservados y a un ligando axial variable, que en el caso de los hongos, puede ser leucina o fenilalanina [56, 66].

El tipo 2 (T2), contiene un átomo de cobre paramagnético no azul, mientras que el tipo 3 (T3), con máxima absorbancia a 330 nm está conformado por 2 átomos de cobre unidos por un enlace hidroxilo. Los cobres T2 y T3, se encuentran presentes en la interface de los dominios 1 y 3, formando un cluster trinuclear, unido a 8 átomos de histidina; estructura altamente conservada [3, 56, 66]. La oxidación del sustrato ocurre en T1, debido a su alto potencial de oxido-reducción, posteriormente, se transfieren cuatro electrones desde el T1 hasta el clúster trinuclear (T2, T3), donde ocurre la reducción del O_2 a H_2O [1, 56, 66].

Existen también lacasas con sólo dos dominios cupredoxina y se denominan lacasas de dos dominios o lacasas pequeñas. Debido a su bajo peso molecular (entre 30 y 40 kDa), se ensamblan formando una estructura cuaternaria para su funcionamiento [67]. También, se ha reportado la producción de diferentes isoformas de lacasas; sin embargo, aún no es claro por qué coexisten en una misma cepa. Se plantea que su expresión depende de la especie y de las condiciones ambientales [68]. Igualmente, se ha reportado que propiedades como el potencial de Redox varía para cada isoforma, por tanto, la afinidad por los sustratos también [69, 70].

2.1.4. Potencial redox de las lacasas

En las lacasas, el potencial redox (E°) se relaciona directamente con la energía requerida para desprender un electrón del sustrato. El comportamiento catalítico de estas enzimas depende del E° del aceptor de electrones, Cu T1, el cual es mayor en hongos comparado con las lacasas de plantas, bacterias u otras oxidasas [71]. Igualmente, el E° puede diferir entre lacasas fúngicas. Estas tienen la capacidad de cambiar su potencial redox dependiendo del tipo de sustrato. Por tanto, enzimas con alto E° son de gran interés en biotecnología, por su capacidad para oxidar sustratos con alto E° [3, 56].

2.1.5. Aplicaciones de las lacasas

Las lacasas son de gran importancia a nivel industrial ya que tienen la capacidad de catalizar la oxidación de gran variedad de sustratos debido a su baja especificidad, incluyendo, compuestos orgánicos e inorgánicos, compuestos aromáticos, no aromáticos y compuestos fenólicos como polifenoles, orto y para difenoles, fenoles sustituidos por grupos metoxilos, aminas aromáticas e hidroxilos [3]. También, compuestos los no fenólicos pueden ser oxidados a través del uso de mediadores como el ABTS ((ácido 2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) y el HBT (1-hydroxybenzotriazole), entre otros [72, 73].

Las lacasas son de gran importancia en el tratamiento de residuales que contengan compuestos como pesticidas, explosivos, agua residual y colorantes sintéticos [3], producidos por diferentes industrias, principalmente, por industrias papeleras, petroquímicas y textiles [9]. Estos compuestos tienen un impacto negativo en el ambiente, por ejemplo, los colorantes sintéticos poseen estructuras químicas complejas de difícil degradación que impactan negativamente en el ambiente y en la salud, por ser tóxicos, cancerígenos y altamente recalcitrantes [10-12]. Además, las lacasas son importantes en la producción de papel [74], síntesis química de polímeros complejos y síntesis productos farmacológicos [75]. También, son importantes en el desarrollo de biosensores para análisis de diferentes compuestos, o en la producción de biocombustible [3].

Morales-Álvarez et al., (2016), evaluaron la remoción de los colorantes Verde Malaquita y Cristal Violeta. Estos colorantes tienen un impacto negativo en el ambiente debido a su estructura química y toxicidad. En el estudio se observó que los tratamientos con biomasa viable de *Pleurotus ostreatus* alcanzaron mayor porcentaje de remoción (90.2 y 98.2 %) en comparación con los tratamientos con biomasa no viable (49.5 y 45.1 %), debido a que la morfología de *P. ostreatus*, favorece la remoción

de colorantes ya que la pared celular actúa como un adsorbente. Por tanto, el hongo tiene la capacidad de remover colorantes mediante dos mecanismos, bioadsorción y biotransformación [39].

También, Simões et al., (2019), estudiaron la degradación del colorante remazol azul brillante utilizado en la industria textil, con lacasas inmovilizadas de *Pleurotus ostreatus*. Para esto, utilizaron una celda de combustible compuesta por un ánodo y un cátodo, separados por una membrana conductora de iones. En la parte del ánodo, ocurrió la oxidación del sustrato; generando electrones y protones que posteriormente fueron transferidos al cátodo, con el fin de realizar el tratamiento de aguas residuales y recuperar la energía de una manera ecológica. Se observó una remoción del 86 % del colorante remazol azul brillante [76].

Otros hongos estudiados han sido *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium*; Fernández et al., (2009), evaluaron la remoción del colorante negro reactivo 5 utilizado en la industria textil. Se realizó la inmovilización en un soporte no inerte por sus características de baja toxicidad, maleabilidad, porosidad y economía e igualmente por ser un material rico en celulosa, hemicelulosa y lignina. *T. versicolor* generó mayores porcentajes de degradación (98 %), mediante dos procesos, adsorción y biotransformación [77].

También, se han estudiado las lacasas como mediadoras en la síntesis de biocolorantes, con el fin de obtener tintes con baja ecotoxicidad y citotoxicidad, sin tener que usar condiciones agresivas en las reacciones [78]. Wlizio et al., (2020) transformaron el ácido 2-amino-3-metoxibenzoico en un nuevo biocolorante denominado N15, utilizando lacasas inmovilizadas producidas por *Pleurotus ostreatus*. Según los autores, el proceso fue simple y no se requirió el uso de componentes tóxicos; también se probaron las propiedades de tintura en las fibras y el colorante resistió diferentes procesos fisicoquímicos [78].

Por otra parte, se ha documentado que las lacasas son de gran importancia en la remoción de compuestos provenientes de la industria farmacéutica, dentro de estos compuestos se incluyen antibióticos, hormonas, compuestos citostáticos, antiepilépticos, reguladores de lípidos, β -bloqueadores y antiinflamatorios. El uso de estos medicamentos es de gran importancia ya que son empleados en la prevención o tratamiento de alguna enfermedad, tanto en animales como en humanos [40].

Estos fármacos son de un elevado consumo a nivel mundial; en el 2017, la venta de fármacos alcanzó los 1143 mil millones de dólares y en el 2019 alcanzó 1.25 trillones de dólares en ventas. También, el consumo de fármacos está aumentando al ser requeridos para tratamiento de enfermedades cada vez más frecuentes como diabetes, hipertensión, depresión, entre otras enfermedades crónicas [40].

El incremento en la frecuencia de algunas enfermedades, la automedicación, al manejo inadecuado y a la disposición incorrecta de los residuos, ha incrementado la presencia de estos medicamentos en el medio ambiente. La presencia de fármacos y sus metabolitos en aguas residuales, aguas superficiales, sedimentos y aguas potables ha sido reportada. Estos compuestos son introducidos en el ambiente principalmente mediante la descarga de aguas residuales de hospitales, hogares e industrias farmacéuticas [40, 41]. La presencia de estos compuestos en el ambiente causa un impacto negativo en los ecosistemas, debido a la toxicidad de diferentes fármacos sobre organismos acuáticos, bacterias algas y peces [47].

Existen diferentes métodos para la eliminación de compuestos farmacéuticos en aguas, sin embargo, debido a la hidrofiliidad, la naturaleza persistente y la baja concentración en aguas residuales, la eliminación de estos productos químicos en las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales es mucho más difícil que la eliminación de otros compuestos orgánicos. Dentro de los tratamientos convencionales que favorecen la eliminación de fármacos en aguas residuales se incluyen; la adsorción con carbón activado [79], la ósmosis inversa [80], sonólisis [81] y los procesos de oxidación [51, 82], electrocatálisis [83] y la ozonización [82].

En algunos procesos se obtienen residuos con alta concentración de microcontaminantes, los cuales deben ser sometidos a tratamientos especiales como la incineración o fusión por plasma lo que incrementa considerablemente los costos del tratamiento [84]. Además, en los procesos de oxidación se pueden producir intermediarios de la degradación de los antibióticos que resulten tóxicos y cancerígenos [50, 51]. Existen también, métodos como la filtración por membrana para la eliminación de compuestos carbonados y contaminantes biogénicos; sin embargo, son poco efectivos para la eliminación de antibióticos [50]. Por lo anterior, se han buscado alternativas ecológicas y eficientes para la degradación de estos compuestos y así reducir la problemática de contaminación y resistencia bacteriana, se ha reportado la degradación de compuestos farmacéuticos contaminantes utilizando lacasas [85-88].

Naghdi et al., (2017), inmovilizaron lacasas de *Trametes versicolor* en nanobiochar para evaluar la remoción de la carbamazepina, un compuesto de uso farmacéutico de difícil degradación debido a su estabilidad química. Los autores obtuvieron 83 % de remoción del compuesto por medio de adsorción y biotransformación [89]. Igualmente, Masjoudi et al., (2021) evaluaron la degradación de la carbamazepina y de diclofenaco, inmovilizando lacasas de *Trametes hirsuta* en membranas de fluoruro de polovonolideno. Los autores obtuvieron una degradación del 95 % en 4 horas y del 27 % en 48 horas, para la carbamazepina y el diclofenaco respectivamente [90]. Tran et al., (2010), evaluaron la degradación de compuestos farmacéuticos empleando lacasas de *Trametes versicolor*. En este estudio fármacos como el diclofenaco, el naproxeno, la indometacina y el ibuprofeno fueron degradados completamente en presencia de ABTS en 48 horas [91].

Por otra parte, el uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas humanas y animales se ha incrementado. Los antibióticos son de los fármacos con mayor presencia en aguas residuales a nivel mundial [42] y generan un grave problema de contaminación ambiental, por tanto, se han realizado diferentes estudios para su degradación utilizando lacasas [40].

2.2. Antibióticos

Los antibióticos son moléculas naturales o sintéticas, capaces de inhibir el crecimiento de bacterias (bacteriostático), o incluso matar a algunas bacterias (bactericidas). Estos ejercen una acción específica sobre algunas estructuras o funciones del microorganismo. Los antibióticos se clasifican según su mecanismo de acción y pueden ser: inhibidores de la formación de la pared celular, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores de la replicación del DNA, inhibidores de la síntesis de la membrana citoplasmática e inhibidores de vías metabólicas [92]. También, pueden clasificarse según su espectro de acción en amplio espectro o de espectro reducido, además, se pueden clasificar también de acuerdo a su farmacocinética, lo cual hace referencia a la absorción, (gastrointestinal, subcutánea o muscular) distribución y eliminación (hepática o renal) en el organismo humano o animal [43].

En la [Tabla 1](#) se presentan las diferentes clases de antibióticos de importancia crítica e importancia alta según la WHO (World Health Organization) [43, 45, 93-95]. Para esta clasificación, se tuvieron en cuenta dos criterios; el primero, la clase antimicrobiana es la única, o una de las pocas disponibles para tratar infecciones en humanos; el segundo, la clase antimicrobiana se utiliza para tratar infecciones humanas causadas por: *i*) bacterias transmitidas provenientes de fuentes no humanas, *ii*)

bacterias que pueden adquirir genes de resistencia provenientes de fuentes no humanas. Si se cumplen los dos criterios, el antibiótico se considera de importancia crítica, mientras que, si se cumple sólo uno de los dos criterios, se considera de importancia alta [96, 97].

Tabla 1. Antibióticos de importancia crítica y e importancia alta según la WHO.

Estructura	blanco	Antibiótico	Abreviación		Uso	
			CLSI		H	A
Antibióticos de importancia crítica						
Aminoglucósidos						
Los aminoglucósidos constan de varios anillos ciclitos en su estructura, generalmente tres y cinco azúcares, unidos por medio de enlaces glicosídicos. Se encuentran, grupos amino e hidroxilo unidos a los anillos, aportando las propiedades químicas del compuesto [98].	Alteran la permeabilidad de la membrana celular, inhiben también la síntesis de proteínas, uniéndose a la subunidad ribosomal 30s [98].	Aminoglucósidos + 2 deoxistreptamina				
		amikacina	AN	X		
		paromomicina	PLZ	X		
		estreptomicina	STR	X	X	
		gentamicina	GM	X	X	
		kanamicina	K	X	X	
		netilmicina	NET	X		
		tobramicina	TM	X	X	
		apramicina	APR			X
		dihidroestreptomicina	DST			X
		plazomicina	PLZ	X		
		neomicina	NEO	X	X	
		isepamicina	ISE	X		
		arbakicina	ABK	X		
		fortimicina a	FM-A	X		
bekanamicina	AKM	X				
dibekicina	DKB	X				
ribostamicina	RIB	X				
Ansamincinas						
Contienen una cadena alifática que conecta los dos extremos de un núcleo de naftoquinona [99].	Se une a la subunidad β de la RNA-Polimerasa, inhibiendo su actividad [99].	Rifampicins				
		rifaximina	RFP	X		
		rifampicina	RIF	X		
		rifapentina	RPT	X		
		rifabutina	RFB	X		
β-lactámicos						
El anillo β -lactámico define químicamente esta clase de antibióticos. Este anillo está unido a otros radicales.	Actúan mediante dos mecanismos; inhibición de la síntesis de la pared e in-	Carbapenems				
		doripenem	DOR	X		
		ertapenem	ETP	X		

La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, modifica las propiedades del compuesto y se forman los diferentes grupos de antibióticos β -lactámicos [92, 100].

Los carbapenems contienen un anillo insaturado de 5 miembros fusionado con un anillo β -lactámico, Los carbapenems se diferencian de las penicilinas por el doble enlace C₂-C₃ y la presencia de un átomo de carbono en lugar de azufre en el C₁. También, los carbapenems tienen un sustituto trans-1-hidroxietil en lugar del acilamino en el anillo β -lactámico [101].

La estructura química de las cefalosporinas deriva del ácido-7-cefalosporánico. Las cefalosporinas están formadas por un sistema de dos anillos fusionados de β -lactam-3-dihidrotiazina, conocido como ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), y varían en sus sustituciones de cadena lateral en C3 (R₂), y C7 [102].

ducción de autólisis bacteriana. Las enzimas transpeptidasa (E.C. 3.4.16.4) participan en la última fase de la síntesis de pared, unen los enlaces de las cadenas del péptidoglicano. El anillo β -lactámico presenta similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen las transpeptidasas, por tanto, el anillo se une a estas enzimas inhibiendo la formación de la pared celular. También, los β -lactámicos activan una autolisina endógena que degrada el péptidoglicano [92, 100].

meropenem	MEM	X	
imipenem	IPM	X	
panipenem	PAPM	X	
faropenem	FRPM	X	
biapenem	BPM	X	
cefalosporinas de 1, 2, 3,4 y 5 generación			
cefditoren	CDN	X	
cefmenoxima	CMX	X	
cefpiroma	CPO	X	
ceftriaxona	CRO	X	
cefoperazona	CFP		X
cefquinoma	CEQ		X
cefotaxima	CTX	X	
ceftazidima	CAZ	X	
cefetameta	CAT	X	
cefpodoxima	CPD	X	
ceftibuten	CBT	X	
cefdinir	CDR	X	
cefepima	FEP	X	
cefixima	CFM	X	
fosamil ceftarolin	CPT	X	
ceftiofur	CFT		X
cefovecina	CFO		X
cefaclor	CEC	X	
cefadroxil	CFR	X	X
cefalexina	CN	X	X
cefalonium	CFL		X

cefapirina	CAP	X	X
cefalotina	CF	X	X
cefazolina	CZ	X	X
cefodoxitina	FOX	X	
cefprozil	CPR	X	
cefuroxima	CXM	X	X
loracarbef	LOR	X	
cefotetan	CTT	X	
cefradina	BAN	X	
tazobactam	TZB	X	
cefcape	CFPM	X	
cefodizima	CDZM	X	
cefosis	CFSL	X	
cefzopran	ZOP	X	
cefsulodin	CFS	X	
ceftizoxima	ZOX	X	
ceftobiprol	BPR	X	
ceftozolana	CTZ	X	
latamoxef	LMOX	X	
cefacetrila	CEC	X	
cefaloridina	CPH	X	
cefamandol	CFM	X	
cefatrizina	CTZ	X	
cefazedona	CFZD	X	
cefbuperazona	CFB	X	
cefmetazol	CMZ	X	
cefminox	CMNX	X	
cefonicid	CID	X	
ceforanida	CFR	X	
cefotiam	CTM	X	
cefroxadina	CXD	X	
ceftezol	CTZ	X	
flomoxef	FMOX	X	
Penicilina monobactam			
aztreonam	ATM	X	
carumonam	CAR	X	

Los monobactam tienen un grupo de ácido sulfónico en el nitrógeno en la posición N-1; el ácido sulfónico activa el anillo β-lactámico y por tanto, se acetilan las enzimas transpeptidasas (E.C. 3.4.16.4) [103].

La estructura básica de la penicilina (ácido 6-aminopenicínico) consiste en un anillo de tiazolidina, un anillo de β -lactama y una cadena lateral [92, 100].

Penicilina antipseudomonal			
carbenicilina	CB	X	
ticarcilín	TIC	X	X
piperacilín	PIP	X	
sulbenicilín	SBPC	X	
azlocilín	AZ	X	
carindacilín	CIPC	X	
mezlocilín	MEZ	X	
sultamicilín	SBTPC	X	
hetacilín	HET	X	
amdinocilín	MEC	X	
ampicilín	AM	X	
talampicilín	AMX	X	X
azidocilín	AZD	X	
bacampicilín	B	X	
epicilín	EP	X	
temocilín	TEM	X	
metampicilín	MTP	X	
pivampicilín	PMPC	X	
amoxicilina (ácido clavulánico)	AMC	X	X

Glucopéptidos and lipoglucopéptidos

Se componen de un núcleo central heptapéptido al cual se unen residuos de aminoácidos y azúcares [104].

En bacterias Gram positivas los Glucopéptidos y lipoglucopéptidos se unen a la terminación D-alanil-D-alanina en el extremo carboxilterminal de los péptidos precursores de la pared bacteriana, bloqueando así la síntesis del péptidoglucano [99, 104].

telavancina	TLV	X	
teicoplanina	TEC	X	
vancomicina	VA	X	
avoparcina	AV	X	
dalbavancina	DAL	X	
oritavancina	ORI	X	
ramoplanina	RAM	X	

Gliciliclinas

Es estructuralmente similar a las tetraciclina (TE)s. Presenta una estructura central de cuatro anillos carbocíclicos, con una sustitución de t-butilglicilamido en la posición 9 de la minociclina que confiere un amplio espectro de actividad [99].

Inhibe la síntesis de proteínas, al unirse reversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, ya que bloquea la entrada del aminoacil t-RNA al sitio A del ribosoma, e impide la incorporación de aminoácidos y la posterior

tigeciclina	TGC	X	
-------------	-----	---	--

	elongación de las cadenas peptídicas [99].				
Lipopéptidos					
Molécula cíclica con 13 aminoácidos, diez de estos forman parte de la estructura cíclica y los tres restantes componen una cadena lateral que presenta un residuo N-decanoilo [99].	Se insertan en la doble capa de la membrana provocando su despolarización, con una fuerte pérdida del ion potasio conduciendo a la muerte celular [99].	daptomicina	DAP	X	
		colistina	CL	X	
		polimixina b	PB	X	X
Macrólidos					
Se conforman por un anillo lactónico con 14 a 16 carbonos, que está unido a un azúcar aminado [99].	Se une a secuencias del dominio V del rRNA 23s de la subunidad ribosomal 50S, impidiendo la elongación de la cadena peptídica mediante el bloqueo del tunel de salida del polipéptido y así el complejo peptidil-RNA se disocia del ribosoma [99].	azitromicina	AZM	X	X
		gamitromicina	GM	X	X
		josamicina	JM	X	X
		tulatromicina	TUL		X
		tilvalosina	TVN		X
		tilosina	TLY		X
		tilmicosina	TMS		X
		midecamiacin	MDM	X	
		diritromicina	DTM	X	
		rokitamicina	RKM	X	
		roxitromicina	RXT	X	
		claritromicina	CLR	X	
		espiramicina	SP		X
		fidaxomicina	FDX	X	
		eritromicina	E	X	
		telitromicina	TEL	X	X
		fluoroeritromicina		X	
		kitasamicina	KIA	X	
		oleandomicina	OL	X	
		tildispirosina	TD	X	
troleandomicina	TAO	X			
quinupristina-dalfopristina	SYN	X			
pristinamicina	PT	X			
virginiamicina	VM		X		
solitromicina	SOL	X			

		cetromicina	CET	X	
Oxazolidinonas					
Se conforma de un anillo con tres átomos de carbono, un átomo de oxígeno en la posición 1 y un átomo de nitrógeno en la posición 3 [105].	Se une a la subunidad ribosomal 50S, afectando la síntesis proteica, también se une a la subunidad 70S inhibiendo el complejo de iniciación. El anillo D del tedizólido contribuye a la presencia de enlaces de hidrógeno adicionales que proporciona más interacciones entre el tedizólido y el ribosoma bacteriano; por lo tanto, el fármaco es aún más potente [105].	radezolid	RAD	X	
		linezolid	LZD	X	
		cadazolid	CDZ	X	
		tedizolid	TZD	X	
fosfomicina					
Es el ácido (-) cis-1,2-epoxipropilfosfónico, es una molécula sencilla e hidrosoluble, sólo tienen tres átomos de carbono y carece de nitrógeno. El átomo de carbono está unido al átomo de fósforo sin un puente de oxígeno intermedio. La actividad antimicrobiana se debe al enlace epoxi [99].	La fosfomicina penetra al interior de la membrana mediante dos permeasas (E.C. 3.1.3.9); el sistema de transporte del D-glucosa-6-fosfato, inducible, y sistema del L- α -glicerofosfato. El antibiótico compite con el sustrato de la enzima UDP-N-acetilglucosamina-3-O-enolpiruviltransferasa (MurA) (E.C. 2.5.1.7), enzima que cataliza la primera etapa de la biosíntesis del heteropolímero del péptidoglucano [99].	fosfomicina	FOS	X	X
Quinolonas y fluoroquinolonas					

<p>Las quinolonas tienen una estructura anular dual con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo unido al carbono de la posición 3 del anillo 1. Poseen un átomo de quinolona en la posición C-6 [99].</p>	<p>Interfieren en la síntesis de ADN induciendo la muerte celular. Penetran la pared a través de las porinas e interactúan con dos enzimas; ADN girasa (E.C. 5.6.2.2) y topoisomerasas IV (E.C. 5.99.1.2), encargadas del superenrollamiento del ADN [99].</p>	pefloxacina	PEF	X	
		besifloxacina	BES	X	
		delafloxacina	DLX	X	
		gemifloxacina	GEM	X	
		nadifloxacina		X	
		ácido nalidixico	NAL	X	
		ozenoxacina	OZN	X	
		ácido oxolínico	OA	X	
		enrofloxacina	ENR		X
		difloxacina	DIF		X
		pradofloxacina	PARA		X
		moxifloxacina	MXF	X	X
		levofloxacina	LVX	X	X
		ibafloxacina			X
		flumequina	FLU		X
		marbofloxacin	MAR		X
		orbifloxacina	OBFX		X
		rufloxacina	RFX	X	X
		ciprofloxacina	CIP	X	X
		norfloxacina	NX	X	
		gatifloxacina	GAT	X	
		ofloxacina	OFL	X	
		lomefloxacina	LOM	X	
		enoxacina	GRN	X	
		grepafloxacina	GRX	X	
		pazufloxacina	PZFX	X	
		ácido pipemídico	HPPA	X	
		prulifloxacina	PUFX	X	
		rosoxacina	RSX	X	
		sitafloxacina	STFX	X	
esparfloxacina	SPX	X			
termafloxacina	TEM	X			
Fenicoles					

Presenta un grupo p-nitrofenilo y un sustituyente N-dicloroacetilo unidos a una cadena de tres átomos de carbono [99].	Evita la formación de enlaces peptídicos uniéndose a la proteína L16 localizada en la subunidad 50S del ribosoma, la cual media la fijación del tRNA a la peptidil transferasa (E.C. 2.3.2.12) [99].	cloramfenicol	CHL	X	X
		tiamfenicol	TP	X	X
		florfenicol	FLO		X
Lincosamides					
La lincomicina está formada por un aminoácido unido a un amino azúcar, la clindamicina (CM) difiere estructuralmente por la sustitución de un átomo de cloro por un grupo hidroxilo y la inversión de un carbono [99].	Se une a secuencias del dominio V del rRNA 23s, que hace parte de la subunidad 50S del ribosoma, impidiendo la elongación de la cadena peptídica mediante el bloqueo del túnel de salida del polipéptido, y así el complejo peptidil-RNA se disocia del ribosoma [99].	clindamicina	CM	X	X
		lincomicina	LIN	X	X
		pirimicina	PIR		X
Ácidos pseudomónicos					
Se compone de una cadena de ácido 9-hidroxi-nonanoico, cierta estructura presenta similitud espacial con el aminoácido isoleucina [106].	Inhibidor de la ADN-girasa y de la topoisomerasa IV (E.C. 5.99.1.2), [107]. Se une a la enzima isoleucil-tRNA (E.C. 6.1.1.5), impidiendo la incorporación de isoleucina a las proteínas [106].	mupirocina	MUP	X	
Rinofenazinas					
Contiene un núcleo de fenazina con un grupo alquilimino (R-imino) en la posición 2 y los sustituyentes de fenilo en las posiciones 3 y 10 del núcleo de fenazina. El grupo alquilimino es fundamental para la actividad antimicrobiana [108].	Su blanco es la cadena respiratoria bacteriana y los transportadores de iones. El ciclo redox intracelular, que implica la oxidación de la clofazimina reducida, genera especies reactivas de oxígeno (ROS) antimicrobianas y peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂). También, la interacción de la clofazimina con los fosfolípidos de la membrana, promueve la	clofazimine	CFZ	X	

	disfunción de la membrana, lo que provoca una interferencia con la captación de K ⁺ . Ambos mecanismos resultan en una interferencia con el metabolismo energético celular al interrumpir la producción de ATP [108].				
Esteroidales					
Tiene una estructura esteroide (anillo ciclopentanoperhidrofenantreno), es un triterpenoide tetracíclico [109].	Inhibe la síntesis de proteínas evitando la translocación del factor de elongación (EF-G) durante la síntesis de proteínas [109].	ácido fusídico	FUS	X	
Sulfonamidas					
Tienen una estructura es similar a la del ácido para-aminobenzoico. Contienen un sustituyente aromático NH ₂ en la posición para del anillo benceno. Presencia de un sustituyente en la posición orto y meta del anillo de benceno. Contiene también una doble sustitución en la posición N1. Contiene un grupo sulfonamida en el anillo de benceno [99].	Son antagonistas competitivos del ácido p-aminobenzoico (PABA), se unen a la enzima tetrahidropteroico sintetasa (E.C 6.3.2.17), inhibiendo la síntesis de ácido fólico [99].	sulfametoxazol	SMX	X	X
		sulfadimetoxina	SDM		X
		sulfadiazina	SDZ	X	X
		sulfamerazina	SMZ		X
		sulfanilamida	SA		X
		sulfatiazol	STZ	X	X
		sulfadimidina = sulfametasina	SM2		X
		sulfametizol	SMZ	X	X
		sulfisoxazol	FIS		X
		trimetoprim	SXT	X	X
		brodimoprim	BDM	X	
		formosulfatiazol		X	
		iclaprim	ICL	X	
		ftalilsulfatiazol	PA	X	
		sulfaisodimidina	SU	X	
sulfalena		X			
sulfamazona	SZO	X			
sulfametoxipiridazina	SP	X			
sulfametomidina	SM	X			

		sulfametoxidiazina	SMD	X	
		sulfametrol	SMT	X	
		sulfamoxol	SMO	X	
		sulfaperin	SFL	X	
		sulfafenazol	SPZ	X	
		sulfapiridina	SP	X	
		sulfatiourea	SFTu	X	
		tetroxoprim	TXP	X	
tetraciclinas					
Se componen de un núcleo tetracíclico fusionado lineal al cual varios grupos funcionales están unidos como (Cloro (Cl), Hidrógeno (H) dimetilamina (N(CH ₃) ₂ , metil (CH ₂), metilenos (CH ₃) hidroxilo (OH) [110].	Se une a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano e impide la unión del aminoacil tRNA, interrumpiendo la incorporación de los aminoácidos al péptido creciente [110].	clortetraciclina	CTC	X	X
		demeclociclina	DMC		X
		omadaciclina	OMC		X
		limeciclina	LYME	X	
		eravaciclina	ERV		X
		doxiciclina	DO	X	X
		oxitetraciclina	OXT	X	X
		rolitetraciclina	RTC		X
		tetraciclina	TE	X	X
		minociclina	MI	X	
		clomociclina	CLM	X	
		penimepiciclina	PNM	X	
metaciclina	ME	X			

Dentro de la categoría de importancia crítica, se encuentran los aminoglucósidos (**Tabla 1**), estos son antibióticos de uso habitual en la práctica clínica. Se han reportado diversos mecanismos de resistencia; sin embargo, estos compuestos son activos frente a gran parte de los bacilos Gram negativos aerobios, en conjunto con los β -lactámicos. Debido a su naturaleza policatiónica, los aminoglucósidos son muy solubles en agua y presentan una absorción gastrointestinal baja, resultando en la excreta del compuesto al medio ambiente. También, debido su estructura química, estos antibióticos son estables. Se ha demostrado que la presencia de estos compuestos en aguas y suelos es problemática, debido a la ecotoxicidad del compuesto; por ejemplo, los residuos de estreptomycin (STR) son tóxicos para las algas [111]. Wollenberger et al., (2000) realizaron ensayos de biotoxicidad de la estreptomycin (STR) frente a *Daphnia magna*, obteniendo un valor de concentración efectiva media de 48 h EC₅₀ = 487 mg L⁻¹ [112]. También, se han identificado genes

de resistencia a la estreptomina (STR) en bacterias patógenas como *Salmonella* spp., y especies de *Enterococcus* spp., [113, 114]. Además de su ecotoxicidad, estos compuestos pueden generar efectos adversos en humanos; los aminoglucósidos son ototóxicos, nefrotóxicos y en menor frecuencia causan toxicidad neuromuscular y toxicidad del sistema hematopoyético, igualmente pueden causar reacciones alérgicas como erupciones, fiebre, angioedema o dermatitis exfoliativa; sin embargo, el riesgo de toxicidad depende de diferentes factores como las enfermedades preexistentes, la gravedad de la enfermedad, fármacos concomitantes y la predisposición genética [115, 116].

Igualmente, las ansamicinas son consideradas de importancia crítica, son antibióticos utilizados como terapia única o limitada contra la tuberculosis. Las rifamicinas son antibióticos utilizados para tratar varios tipos de infecciones por micobacterias, como el complejo *Mycobacterium avium*, la lepra y en combinación con otros antibacterianos se utiliza para tratar la tuberculosis latente o la activa. Hasta el 50 % de estos antibióticos es excretado en las heces al medio ambiente. Se ha detectado la presencia de estos compuestos en aguas y se han reportado sus efectos citotóxicos [96, 117, 118].

Los antibióticos β -lactámicos también se incluyen dentro de esta categoría. Constituyen la mayor parte de los antibióticos de uso humano en la mayoría de los países y representan aproximadamente el entre el 50 y 70 % de antibióticos utilizados [119]. En comparación con otros compuestos, los β -lactámicos no son estables en el medio ambiente ya que el anillo β -lactámico puede ser degradado por enzimas β -lactamasas (E.C 3.5.2.6), una enzima común en varias bacterias, e igualmente puede ser degradado por hidrólisis química [119]. Pese a lo anterior, se ha demostrado la presencia de β -lactámicos en aguas residuales y como consecuencia, la presencia de enzimas β -lactamasas, responsables de la resistencia bacteriana a estos antibióticos [120]. Por ejemplo, Hoelle et al., (2019), aislaron 332 cepas de *E. coli* de las cuales 65 (19.6 %) eran resistentes a los carbapenem [121]. También, se han realizado bioensayos de toxicidad; Havelkova et al., (2016), evaluaron la toxicidad de la penicilina G (PG) frente *Daphnia magna*, obteniendo valores de 48h EC50 = 1496.9 mg L⁻¹ [119]. Por otra parte, se ha demostrado que los efectos adversos de las penicilinas y las cefalosporinas son: hepatotoxicidad, neutropenia y encefalopatía; estos antimicrobianos pueden causar excitación neuronal debido a que el anillo β -lactámico es similar estructuralmente al inhibidor del neurotransmisor GABA, causando la inhibición del sistema del ácido gamma aminobutírico (GABA) [122]. Dentro de los β -lactámicos se encuentran las cefalosporinas, antibióticos de amplio espectro utilizados para el tratamiento de infecciones por microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Están agrupadas en 5 generaciones, de acuerdo con su actividad y espectro [123]. Estos

compuestos son empleados tanto en humanos como en animales y se sabe que aproximadamente más del 50 % de estos fármacos son eliminados en la orina sin modificaciones estructurales, o en forma de metabolitos activos [124]. Las cefalosporinas es la clase de antibióticos más producida, prescrita y consumida en Europa y su presencia en aguas residuales representa una problemática muy grande, se ha demostrado que la presencia de cefalosporinas contribuye al aumento del COD (Chemical Oxygen Demand), incrementando los costos de remediación [123]. También, se han reportado altas concentraciones de cefalosporinas, desde $\mu\text{g L}^{-1}$ hasta mg L^{-1} [125, 126]. También, las penicilinas son β -lactámicos de amplio espectro utilizadas para el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos y animales; sin embargo, la aparición de bacterias multirresistentes productoras de β -lactamasas o penicilinasas (E.C 3.5.2.6) ha limitado el uso de las penicilinas en los últimos años. Pese a esto, las penicilinas siguen siendo formuladas y son ampliamente utilizadas [127]. Se ha reportado que una dosis de penicilina generalmente se excreta sin cambios estructurales en la orina; sin embargo, pueden sufrir transformaciones [128]. Se ha reportado también, la presencia de estos compuestos en el medio ambiente, encontrando concentraciones de 1 a 1000 u $\mu\text{g L}^{-1}$ en ambientes acuáticos [129]. Las penicilinas son ecotóxicas, la presencia de penicilinas en efluentes no tratados puede provocar la muerte de *Daphnia magna* [130].

Por otra parte, los glucopéptidos, antibióticos considerados de importancia crítica, han sido detectados en altas concentraciones en aguas residuales [131, 132]; generando así, un fuerte impacto ambiental. Havelkova et al., (2016), desarrollaron bioensayos de biotoxicidad de vancomicina (VA) frente a *D. magna*, obteniendo valores de 48h EC50 = 686.9 mg L^{-1} [119]. También, la presencia de glucopéptidos en ambientes acuáticos representa un grave problema por la resistencia antimicrobiana; desde hace varios años se ha reportado la presencia de diferentes especies patógenas del género *Enterococcus* spp., que han sido aisladas de granjas ganaderas e clasificadas como resistentes a vancomicina (VA) y a teicoplanina (TEC). También, otras bacterias causantes de infecciones en humanos como *Staphylococcus aureus* han adquirido resistencia a antibióticos comúnmente usados, incluyendo la Vancomicina (VA) [133].

La Tigeciclina (TGC), es un antibiótico de importancia crítica, utilizado como terapia limitada para las infecciones causadas por enterobacterias multirresistentes y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (ME) [96, 97, 118]. Se utiliza para tratar infecciones como neumonía adquirida en la comunidad, infecciones intraabdominales complicadas e infecciones complicadas de la piel [134]. El 59 % de la dosis de tigeciclina (TGC) se elimina por excreción biliar/fecal y el 33 % se excreta en la

orina; siendo el 22 % el fármaco sin cambios estructurales. Esto ha incrementado resistencia bacteriana a este antibiótico; se ha identificado la presencia del gen *TetX* responsable de la resistencia a tigeciclina (TGC) en entornos acuáticos y sistemas de tratamiento de aguas residuales [135].

Los lipopéptidos son antibióticos de importancia crítica, el uso especialmente de las polimixinas disminuyó debido a sus efectos adversos (nefrotoxicidad); sin embargo, a causa de la aparición de bacterias Gram negativas multirresistentes y a la falta de nuevos antibióticos, estos se utilizan cada vez más como tratamiento de última línea contra estos patógenos. De acuerdo con [Zurfuh et al., \(2016\)](#), no existe literatura sobre la detección de polimixinas en aguas, lo que se atribuye a la falta de métodos de extracción; sin embargo, se han encontrado bacterias con genes de resistencia contra polimixinas en aguas residuales, aguas superficiales y subterráneas [136-138].

Los macrólidos también son considerados de importancia crítica, son utilizados como terapia limitada para el tratamiento contra *Legionella* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., multirresistente y *Shigella* spp., [96, 97, 118]. Los macrólidos tienen una alta actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, se utilizan para el tratamiento de infecciones tanto en humanos como en animales. Hasta 50 % de estos antibióticos es excretado en las heces al medio ambiente; se ha detectado la presencia de estos compuestos en aguas en diferentes concentraciones [139, 140] e igualmente se han demostrado sus efectos citotóxicos [85].

Las oxazolidinonas son consideradas de importancia crítica. Estos compuestos son utilizados como terapia limitada contra las infecciones por *Staphylococcus aureus* multirresistentes y *Enterococcus* spp., multirresistentes [96, 97, 118]. Igualmente, son considerados antibióticos de "última línea", muy importantes para el tratamiento contra bacterias Gram positivas resistentes a los β -lactámicos y a los glucopéptidos. No obstante, se han reportado genes de resistencia en géneros patógenos como *Enterococcus* spp., y *Clostridium perfringens* [141, 142]. Además, se ha demostrado la toxicidad de esta clase de antibióticos e igualmente de sus productos de degradación [143, 144].

La fosfomicina se incluye dentro de los antibióticos de importancia crítica e igualmente, dentro de los medicamentos esenciales [145]. Es utilizada como terapia limitada contra *E. coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL), causante de infecciones del tracto urinario [96, 97, 118]. En avicultura se utiliza para el tratamiento de enfermedades infecciosas, ya que es efectivo contra bacterias como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus* spp., y

Streptococcus agalactiae [146]. La fosfomicina se excreta sin cambios estructurales, aproximadamente el 38 % se elimina en la orina, mientras que el 18 % se recupera en las heces [147]. Se ha reportado la presencia de fosfomicina en aguas residuales de industria farmacéutica y la presencia de genes de resistencia a este compuesto. Las altas concentraciones de estos compuestos los hacen recalcitrantes y tóxicos para el medio ambiente, ya que puede desencadenar eutrofización provocando la contaminación del agua y el desbalance de nutrientes [148-150].

Las quinolonas también son consideradas de importancia crítica, y son utilizadas como terapia limitada contra *Campylobacter* spp., contra enfermedad invasiva causada por *Salmonella* spp., multiresistente y *Shigella* spp., [96, 97, 118]. Se utiliza para el tratamiento de enfermedades tanto en humanos como en animales. Por sus altos potenciales de adsorción estos compuestos no se degradan en plantas de tratamiento, sino, que se adsorben en el lodo en pequeñas fracciones, posteriormente estos compuestos son liberados al medio ambiente. Se ha detectado la presencia de quinolonas, como ofloxacina (OFL), ciprofloxacina (CIP), ácido nalidixico (NAL) y norfloxacina (NX) en aguas residuales y la presencia de genes de resistencia. También, se ha demostrado la toxicidad de estos compuestos y los efectos adversos en humanos, siendo la gastroenteritis y el dolor articular los más comunes [151-155].

Los fenicoles son antibióticos de amplio espectro para el tratamiento de enfermedades infecciosas tanto en humanos como en animales. Esta clase de antibióticos es considerada de importancia alta [96, 97, 118]. El florfenicol (FLO) y el cloranfenicol (CHL) se utilizan frecuentemente en acuicultura, a pesar de que su uso veterinario está restringido [156]. También, este antimicrobiano puede ser excretado sin cambios estructurales, lo que incrementa la presencia de estos compuestos en el medio ambiente.

Las lincosamidas son antibióticos considerados de importancia alta, utilizados para el tratamiento de infecciones causadas por *Enterococcus* sp., y *Staphylococcus aureus*. Debido a la reducida susceptibilidad de *S. aureus* a los antibióticos β -lactámicos, se ha impulsado el uso clínico de macrólidos y lincosamidas, contra *S. aureus* resistente a la penicilina [157]. Bruyndonckx et al., (2021) reportaron que las lincosamidas fueron unas de las clases más consumidas en Suecia y representaron más del 20 % del consumo de macrólidos, lincosamidas y estreptograminas en Austria, Finlandia Alemania, Hungría y Luxemburgo entre 1997 y 2017 [127]. Igualmente, se ha reportado la presencia de genes de resistencia a las lincosamidas, en plantas de tratamiento de aguas residuales farmacéuticas [158].

Los ácidos pseudomónicos tienen una estructura química y un modo de acción únicos, son de importancia alta, tienen un amplio espectro de actividad contra Gram positivos y presentan actividad “*in vitro*” contra algunos Gram negativos [159]. Se utilizan principalmente para tratar el impétigo causado por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*; sin embargo, ya se ha reportado la existencia de *S. aureus* resistente a la mupirocina (MUP) [159].

Las riminofenazinas (RPZ) son antibióticos de importancia alta, para el tratamiento contra la lepra lepromatosa resistente a la dapsona y la lepra lepromatosa complicada con eritema nodoso leproso. Se utiliza en conjunto con otros compuestos como la dapsona. La clofazimina (CFZ) es un tinte antimicrobiano que produce una decoloración de la piel y fluidos corporales, tiene actividad “*In Vitro*” contra micobacterias como *Mycobacterium tuberculosis*; sin embargo, se considera un tratamiento ineficaz en comparación con los tratamientos clásicos contra la tuberculosis, como rifampicina (RIF) e isoniazida (INH). Después de una dosis de 300 mg, la concentración en la orina y heces es insignificante [160].

El ácido fusídico (FUS) también hace parte de los antibióticos de importancia alta [96, 97, 118], es de uso tópico y se utiliza para prevenir y tratar las infecciones cutáneas. Tiene actividad contra Gram positivos y es ampliamente utilizado en Europa. Se ha reportado la resistencia de *S. aureus* a este compuesto [161].

Las sulfonamidas son antibióticos también considerados de importancia alta [96, 97, 118], son de amplio espectro utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas tanto en humanos como en animales (en conjunto con otros compuestos). Anteriormente, estos antibióticos eran ampliamente utilizados en humanos; pero, por sus efectos adversos y por la aparición de bacterias resistentes, su uso se ha restringido. Sin embargo, son ampliamente utilizados en ganado porcino y bovino. La principal ruta de liberación de estos antibióticos al medio ambiente es en las aguas residuales de granjas y se ha detectado la presencia de esta clase de compuestos en efluentes de plantas de tratamiento, aguas superficiales y subterráneas. Igualmente, se han identificado los genes que confieren resistencia a estos antibióticos [162, 163].

Las tetraciclinas (TE), se consideran de importancia alta, son unas de las clases principales de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos y en ganadería. Son

antibióticos de amplio espectro y bajo costo. Debido a su naturaleza hidrofílica, más del 75 % de una dosis puede ser excretada al medio ambiente sin cambios estructurales [164]. Se ha reportado la presencia de estos antibióticos en aguas y lodos; las tetraciclinas (TE) pueden combinarse con cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Cu^{2+}), por lo que se han encontrado con frecuencia en diversos medios acuáticos [165]. Se han identificado 65 genes de resistencia a tetraciclinas (TE) de primera y segunda generación, estos genes están ampliamente distribuidos entre 130 especies de microorganismos Gram negativos y Gram positivos, incluyendo *Mycobacterium* spp., y *Streptomyces* spp., [166].

2.2.1. Uso de los antibióticos en ganadería

Los antibióticos son ampliamente utilizados en la industria ganadera para la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por bacterias, permitiendo así un crecimiento saludable con menor mortalidad y morbilidad de los animales. El uso de estos antibióticos ocurre especialmente en las principales fuentes de carnes; cerdos, bovinos, aves de corral y en acuicultura [43, 167]. Los ganaderos utilizan antibióticos con fines metafilácticos, profilácticos y para la promoción del crecimiento. De acuerdo con el reglamento sobre medicamentos en animales de la Unión Europea, la metafilaxis hace referencia a la administración de un medicamento a un grupo de animales, presumiblemente infectados o susceptibles a enfermarse, con el fin de tratar a los animales clínicamente enfermos y controlar la transmisión de la enfermedad entre animales que están en contacto cercano. Mientras que la profilaxis hace referencia a la administración de un medicamento a un grupo de animales antes de existir signos clínicos de una enfermedad con el fin de evitar su aparición [168]. Igualmente, los antibióticos también son utilizados como promotores del crecimiento; por medio de la destrucción de la microbiota intestinal se logra mayor asimilación del alimento consumido y por tanto aumento en la masa muscular del ganado en menor tiempo; sin embargo, esta práctica ha sido prohibida en algunos países [48].

El ganado a nivel mundial representa el 34 % del suministro de proteínas alimentarias. En 2019, China fue el mayor consumidor de carne de vacuna, aves de corral y cerdo (71.338 mil toneladas), seguido de la región europea (39.862 mil toneladas), Estados Unidos (39.225 mil toneladas), Brasil (20.956 mil toneladas) y Rusia (9.894 mil toneladas). Se ha estimado que en 2019 se consumieron 261,906 millones de toneladas de carne (vacuno, cerdo y pollo) en todo el mundo (<https://comecarne.org> acceso 12 abril 2022). En Colombia, para el año 2020, había 28.245.262 cabezas de ganado bovino, 221.011 cabezas de cerdo y 463.113 cabezas de aves de corral (<https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos->

[2016/censo-2018.aspx](#) acceso 12 abril 2022). De acuerdo con un reporte de la Food and Drug Administration entre el 2009 y el 2018 la cantidad anual de antibióticos utilizados en animales alcanzó valores de 8,000,000 Kg, siendo las tetraciclinas (TE) las más utilizadas [44]. Se ha estimado que el consumo mundial de antimicrobianos para uso en animales destinados a la alimentación ascendió 63151 toneladas (<http://www.fao.org/antimicrobial-resistance/key-sectors/animal-production/en/>).

2.2.1.1. Uso de los antibióticos en la ganadería vs. enfermedades de transmisión alimentaria (ETA)

Según la OMS, las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) se transmiten normalmente a través de la ingestión de alimentos contaminados. Las ETAs comprenden un amplio grupo de enfermedades causadas por patógenos microbianos, parásitos, contaminantes químicos o biotoxinas [169]. La gravedad de estas enfermedades en los seres humanos varía de síntomas leves a graves, que requieren un tratamiento de por vida. Se ha estimado que, en los países industrializados, más del 10 % de la población podría sufrir una enfermedad asociada a la ingestión de alimentos contaminados [170]. Uno de los aspectos que aumentan la gravedad de las ETAs es la presencia de microorganismos resistentes a los antibióticos, lo que lleva al fracaso del tratamiento en el ser humano. Esta resistencia está directamente asociada al uso de antimicrobianos para profilaxis, metafilaxis o como factores de crecimiento en el ganado destinado a fuente de carne, huevos o leche [171].

En la producción de alimentos provenientes de animales, el uso de antibióticos ha aumentado; por ejemplo, en 2010 se utilizaron 63.151 toneladas de antibióticos en la producción ganadera, y se ha estimado que habrá un aumento del 67 % para 2030 [172].

El escenario tiende a empeorar con el estiércol utilizado como abono para los cultivos, esto incrementa la diseminación de bacterias y genes de resistencia a los antibióticos. Las bacterias diseminadas y los genes de resistencia tendrán contacto con el microbioma del suelo, lo que podría conducir a la pérdida de biomasa y a la reducción de la actividad de nitrificación, desnitrificación y respiración, así como al deterioro de la actividad enzimática como las deshidrogenasas (E. C. 1.1.-), fosfatasa (C.E. 3.1.3.-), fenoloxidasa (C.E. 1.10.3.), monooxigenasa de amonio (C.E. 1.14.99.39) y ureasas (C.E. 3.5.1.5), consideradas importantes indicadores de la actividad del suelo.

La cantidad exacta de uso de antibióticos en la producción animal es difícil de definir; sin embargo, es mayor que el uso hospitalario [172, 173].

La entrada de patógenos en la cadena de suministro de carne se produce en cualquier etapa de la producción (cría, procesamiento, distribución, venta, manipulación y preparación) [174]; algunos autores han descrito la etapa de sacrificio, específicamente durante la eliminación del tracto gastrointestinal o del contenido intestinal, como la principal fuente de diseminación de patógenos por contaminación cruzada a través de equipos, utensilios y personal [174-178], aumentando el riesgo de contaminación en la línea de producción, teniendo en cuenta la capacidad de algunos de los microorganismos (Enterobacterias) de generar biopelículas [179].

La entrada de antibióticos en la cadena de suministro de carne se produce en las operaciones de alimentación, donde los concentrados contienen antibióticos utilizados como promotores del crecimiento. Sin embargo, algunos países de la UE han prohibido (desde 2006) el uso de antibióticos como promotores del crecimiento porque se aplican para la profilaxis o metafilaxis [172, 173].

Por otro lado, en la etapa de procesamiento de la carne, las resistencias antimicrobianas se transmiten a través de la entrada de alimentos contaminados con microorganismos resistentes o a través del entorno de procesamiento de los alimentos. Microorganismos como *Salmonella* spp., y *Listeria monocytogenes* son dos de los agentes bacterianos más importantes en la ETAs. *Salmonella* spp., uno de los patógenos transmitidos durante el sacrificio del ganado, es el agente causante de la salmonelosis, una enfermedad con alta tasa de morbilidad tanto en los países industrializados como en los países en vías de desarrollo; causando enterocolitis aguda con dolor abdominal, diarrea con o sin sangre, náuseas y vómitos [179-181]. La transmisión de *Salmonella* no tifoidea al ser humano puede producirse de forma zoonótica por contacto con materia fecal de animales portadores o por consumo de alimentos contaminados [179-183].

Por otro lado, *L. monocytogenes* es uno de los patógenos transmitidos durante la producción de alimentos procesados y es el agente causante de la listeriosis, una enfermedad invasiva; por tanto, necesita atravesar la barrera intestinal para acceder a los órganos internos, la entrada se produce a través de las placas de Peyer por las células M. Posteriormente, la bacteria pasa al hígado y puede desarrollar una hepatitis granulomatosa, debido a la invasión de los hepatocitos. La bacteria se

internaliza y en algunos casos, hay proliferación intracelular y diseminación a otros tejidos, con tropismo por el Sistema Nervioso Central (SNC) y por el útero grávido [184-188].

En los países en vías de desarrollo, la principal vía de contaminación es el consumo de vegetales contaminados, el agua contaminada y el contacto humano-humano, mientras que, en los países industrializados, la principal vía de contaminación está relacionada con la ingestión de productos alimenticios de origen animal contaminados, especialmente carne y huevos [179, 181].

El consumidor final de alimentos entra en contacto con microorganismos resistentes a los antibióticos presentes productos cárnicos, lácteos y vegetales listos para el consumo [189]. El contacto con microorganismos portadores de genes de resistencia genera dos posibles escenarios: *i*) la modificación del microbioma intestinal [173], *ii*) un peligro potencial en la medicina humana debido a la incapacidad de gestionar las infecciones en la población general, dando lugar a tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro, generando un bucle constante entre las resistencias que pasan al medio ambiente y la población [172, 173].

2.2.1.2. Residuos de la industria ganadera

De acuerdo con el departamento de agricultura de los Estados Unidos de América (USA) los animales confinados para la producción de alimento producen aproximadamente 335 millones de toneladas de residuos por año, superando 40 veces la masa de biosólidos producida por los humanos [43]. La mayor parte de los antibióticos suministrados al animal no son absorbidos por el intestino, lo que resulta en la excreta; la mayoría de los antibióticos son hidrosolubles, lo que facilita que el 90 % de la dosis sea excretada en la orina, mientras que aproximadamente el 75 % del antibiótico es excretado en las heces [45].

La principal causa de resistencia bacteriana a los antibióticos es la eliminación de estos en los desechos del ganado en suelos, aguas subterráneas y superficiales, atmósfera y cultivos [43, 190]. Al realizar la disposición de los residuos ganaderos, los antibióticos presentes en las heces suelen descomponerse debido a reacciones de oxidación-reducción, hidrólisis, biodegradación y fotodegradación; lo que hace que se reduzca la concentración del antibiótico y por ende, su habilidad de matar las bacterias [190]; esto genera un grave problema, ya que la exposición bacteriana a concentraciones subletales de los antimicrobianos favorece la adaptación y la proliferación de bacterias con fenotipos multiresistentes. A causa de la rápida reproducción bacteriana, esta resistencia puede expresarse con mayor facilidad. Igualmente, los antibióticos son bioactivos, por

tanto, un porcentaje importante de antibióticos es excretado al medio ambiente en formas activas [45].

Las bacterias son capaces de desarrollar resistencia a antibióticos a través de diferentes mecanismos; por medio de adaptación fisiológica, las bacterias son capaces de desarrollar cambios en las bombas de transporte de membrana (porinas), excluyendo agentes nocivos; sin embargo, este mecanismo es limitado [43]. Otro mecanismo son las mutaciones, estas pueden alterar o eliminar el punto de unión (blanco) del antibiótico [191], igualmente las mutaciones pueden regular la producción de enzimas que inactivan el agente microbiano; por ejemplo, las β -lactamasas (E.C. 3.5.2.6), son capaces de desactivar el anillo β -lactámico, que hace parte de la estructura de los antibióticos β -lactámico (Tabla 1). Estas enzimas rompen el puente amida del anillo y ocurre la generación de derivados ácidos que no tienen propiedades antibacterianas; evitando que los antibióticos se unan a las proteínas transportadoras bacterianas [192].

Los genes de resistencia pueden ser compartidos entre bacterias por medio de tres mecanismos diferentes (transformación, conjugación y transducción) transfiriendo así, la resistencia entre bacterias patógenas y no patógenas. Esta transferencia se denomina evolución o transferencia horizontal y puede ocurrir entre bacterias de diferente género. También, la transferencia vertical se produce durante la división celular a través de la transmisión de material genético de la célula madre a la hija [193].

La conjugación es uno de los mecanismos más efectivos para la transferencia de material genético y es considerada una de las mayores razones de la resistencia a antibióticos. La conjugación ocurre mayoritariamente en bacterias Gram negativas y en menor proporción en bacterias Gram positivas [194, 195]. Durante la conjugación en Gram negativas, una bacteria donadora transfiere un plásmido que contiene genes de resistencia a una bacteria receptora a través del pili [195, 196], mientras que, en Gram positivas las células receptoras excretan un péptido inductor denominado feromonas o autoinductores. Cuando se alcanza un determinado nivel de concentración del péptido, la célula donante activa la transcripción de los genes relacionados con la producción de sustancias de agregación, incluidas las adhesinas y las proteínas de acoplamiento. La célula donante se une a la célula receptora, que genera un canal para transferir el material genético [197].

Por otra parte, durante la transducción, los genes de resistencia son transferidos de una bacteria a otra mediante bacteriófagos. La transformación en cambio, ocurre cuando una bacteria incorpora DNA del ambiente, durante el estado de competencia que se genera durante el crecimiento celular [191]. También, los elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones, integrones y los bacteriófagos son responsables del 95 % de la resistencia antibióticos [43].

La resistencia bacteriana a antibióticos implica el fracaso en los tratamientos contra las infecciones; latencia de los procesos infecciosos, progresión de la enfermedad a procesos crónicos, transmisión de la infección a otros animales, brotes, pérdidas económicas e incluso reacciones adversas a los antibióticos [48]. En muchas ocasiones los cultivos agrícolas de consumo humano son fertilizados con heces de animales y regados con fuentes hídricas contaminadas con antibióticos, ocasionando la diseminación de cepas resistentes a humanos y animales. Esta diseminación genera un problema de salud pública, ya que las opciones de tratamientos contra bacterias patógenas son limitadas [49].

Por otra parte, los antibióticos se utilizan en la agricultura para combatir enfermedades, como biocidas en la producción de cultivos y frutas. El uso de antibióticos en los cultivos no está ampliamente documentado; sin embargo, el uso de antibióticos en esta área es más problemático para el medio ambiente, ya que las toneladas de estreptomina (STR) utilizadas para los cultivos pueden llegar a ser 292 toneladas, frente a las 6,3 toneladas utilizadas anualmente para la medicina estadounidense [198].

En los últimos 20 años se ha documentado la presencia de antibióticos en diferentes fuentes hídricas; aguas superficiales, subterráneas y oceánicas [50, 199]. Además, las fuentes hídricas y los alimentos contaminados con antibióticos pueden generar reacciones adversas o alergias en personas hipersensibles [48]. Por ejemplo, se ha reportado la presencia de trazas de antibióticos en leche sin tratar; Ramírez et al., (2012) inyectaron seis antibióticos (oxitetraciclina (OXT), ceftiofur (CFT), tilosina (TYL), oxacilina (OX), espiramicina (SP) y amoxicilina (AMC)), a 115 vacas, vía intramuscular e intramamaria, encontrando que en la leche del 65.2 % de los animales había oxitetraciclina (OXT) en el 58.8 % había tilosina (TYL), en el 69.2 % había espiramicina (SP) y en el 65 % encontraron trazas de amoxicilina (AMC) [200].

Por otra parte, la presencia de antibióticos en aguas es un problema grave para los ecosistemas, Xu et al., (2019) demostraron la toxicidad de la tetraciclina (TE) y de sus intermediarios de degradación,

la anhidrotetraciclina y el clorhidrato de epitetraciclina, en microalgas. A altas concentraciones de tetraciclina (TE) (> 5 mg/L) la permeabilidad de las microalgas es afectada; también observaron cambios estructurales en las células y el incremento de la actividad de especies reactivas de oxígeno (ROS), [201].

2.2.2. Uso de los antibióticos en humanos

La tasa de consumo por clase difiere entre los países; según el informe de seguimiento del consumo de antibióticos de la OMS, en el 2015, Mongolia fue el mayor consumidor de antibióticos entre los países de Asia oriental y sudoriental, alcanzando aproximadamente 65 dosis diarias definidas (ddd) por cada 1000 habitantes. En este país, el mayor consumo correspondió a las penicilinas y otros β -lactámicos. Otros países de la región de Asia Oriental y Sudoriental también participaron en la vigilancia del consumo de antibióticos: la República de Corea (27 ddd), Nueva Zelanda (23 ddd), Japón (15 ddd), Filipinas (8 ddd) y Brunei Darussalam (5 ddd). Entre estos seis países, la Amoxicilina (AMC) fue el más consumido [118]. Por otro lado, en China, el porcentaje de prescripciones en humanos (entre el 41 y el 61 %) supera el umbral recomendado por la OMS (30 %). China se considera el mayor consumidor mundial de antibióticos para uso animal y humano; en 2011, el uso anual de antibióticos per cápita fue de 138 g, superando diez veces el de Estados Unidos [202]. Algunos autores atribuyen este elevado consumo a diferentes factores: *i*) la automedicación, *ii*) la gran proporción de pacientes que reciben una terapia combinada con múltiples antibióticos, *iii*) la gestión inadecuada de los antibióticos en los centros sanitarios y las farmacias (especialmente en las zonas rurales), *iv*) y la falta de comprensión y concienciación del público sobre el uso de los antibióticos [202, 203]. Los países de Asia oriental y sudoriental se han esforzado por prevenir el uso inadecuado de los antibióticos y la resistencia a los mismos; sin embargo, siguen existiendo algunas falencias, como la falta de directrices para la eliminación de residuos de antibióticos, la falta de normas medioambientales y la falta de bases de datos de seguimiento [203].

Los países pertenecientes a la región del Mediterráneo Oriental también informaron del consumo de antibióticos; países como Irán, Jordania y Sudán reportaron 38, 8 y 35 ddd por cada 1000 habitantes, respectivamente. El mayor consumo en 2015 correspondió a las penicilinas, otros β -lactámicos, macrólidos y tetraciclinas (TE) [118]. También, países africanos como la República Unida de Tanzania, Costa de Marfil, Burundi y Burkina Faso notificaron un consumo de 27, 11, 4 y 14 ddd por cada 1000 habitantes en 2015, respectivamente. En estos países, las penicilinas, las tetraciclina (TE)s, las sulfonamidas y las quinolonas fueron las más consumidas [118].

Los países del Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades pusieron en marcha un sistema de vigilancia del consumo de antibióticos en el sector primario y hospitalario. Como resultado, desde 1997, 31 países han notificado habitualmente los datos de consumo expresados en ddd por 1000 habitantes. El mayor consumo ha sido de β -lactámicos, siendo las penicilinas los principales antibióticos consumidos (<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/country-overview> acceso 27 abril 2022). Algunos países europeos también participaron en el sistema de vigilancia de la OMS en 2015. Los informes de países como Turquía (37 ddd), Serbia (32 ddd), Grecia (28 ddd), Rumanía (29 ddd), Montenegro (27 ddd), Italia (27 ddd), Francia (26 ddd) y Bélgica (25 ddd) fueron los más altos. Las penicilinas, otros β -lactámicos, macrólidos y tetraciclinas (TE) fueron los más consumidos [118].

Algunos países de las Américas participaron en el informe de la OMS; Bolivia, Brasil, Canadá, Costa Rica, Paraguay y Perú reportaron un consumo de 19, 23, 17, 14, 18 y 11 ddd por cada 1000 habitantes, respectivamente, siendo las penicilinas las más consumidas, seguidas de otros β -lactámicos, macrólidos y quinolonas [118]. Estados Unidos cuenta con un sistema de vigilancia del consumo de antibióticos, con aproximadamente 200.000 recetas de antibióticos dispensadas en farmacias minoristas reportadas en 2020 [204].

En América Latina, la vigilancia y los registros de consumo de antibióticos en humanos son escasos. En Colombia, existen algunas instituciones encargadas de la vigilancia y control del consumo humano de antibióticos; el Instituto Nacional de Salud publicó un informe sobre el consumo de antibióticos en el ámbito hospitalario entre 2013 y 2017; monitoreando antibióticos como ceftriaxona (CRO), imipenem (IPM), meropenem (MEM), piperacilina-tazobactam (PIP-TZB), vancomicina (VA) y ciprofloxacina (CIP). Siendo meropenem (MEM) y ciprofloxacina (CIP) los más consumidos [205]. Algunos estudios han implementado sistemas de vigilancia; Pallares et al., (2011) implementaron un programa para el uso regulado de antibióticos en el Hospital Universitario del Valle, logrando una reducción importante en el consumo de antibióticos en dos unidades de cuidados intensivos (UCI) y en la infección por microorganismos resistentes. En el estudio hubo una reducción significativa en el consumo de antibióticos como ceftriaxona (CRO) (UCI-1 $p = 0.015$ y UCI-2 $p = 0.018$), cefepima (FEP) (UCI-1 $p = 0.028$ y UCI-2 $p = 0.004$), meropenem (MEM) (UCI-1 $p = 0.009$ y UCI-2 $p = 0.000$), ciprofloxacina (CIP) (UCI-1 $p = 0.027$ y UCI-2 $p = 0.018$) y vancomicina (VA) (UCI-1 y UCI-2 $p = 0.018$). Sin embargo, el uso de piperacilina-tazobactam (PIP-

TZB) aumentó en ambas UCI. Además, se redujo la incidencia de infecciones por *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (UCI-1 = 83 % y UCI-2 = 78 %), también las infecciones por *P. aeruginosa* resistente a ciprofloxacina (CIP) (UCI-1 = 87 % y UCI-2 = 82 %) y las cefalosporinas de cuarta generación (UCI-1 83 %/UCI-2 76 %) [206].

Villalobos et al., (2013) implementaron un sistema de vigilancia en 10 instituciones de salud de Antioquia, Valle del Cauca y Bogotá. El mayor consumo en las UCI fue de antibióticos Meropenem (MEM) y se observó una alta resistencia de la familia Enterobacteriaceae a las cefalosporinas de tercera generación (> 25.6%), y un alto porcentaje de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (ME) [207]. A pesar de los sistemas de vigilancia, el alcance de estos estudios es limitado y no existe un registro nacional de consumo de antibióticos en humanos. Al igual que en los animales, en el ser humano los antibióticos no se metabolizan completamente, y ciertas cantidades se excretan al medio ambiente a través de la orina y las heces, contaminando las fuentes de agua. Las principales fuentes de contaminación humana por antibióticos son los residuos de las empresas farmacéuticas, las residencias de para adultos mayores y aguas residuales de los hospitales [208-210].

2.2.3. Presencia de antibióticos en aguas residuales

En los últimos años se ha documentado la presencia de antibióticos en diferentes fuentes hídricas; aguas superficiales, subterráneas y oceánicas [50, 199]. Los reportes sobre el estado de contaminación, los riesgos por la presencia de antibióticos en el medio ambiente, la disposición de antibióticos y la prevalencia de bacterias resistentes procedentes de diferentes sectores (acuicultura y ganadería, aguas residuales y plantas de tratamiento) ha venido en aumento gradual [211]. Hoy en día, los antibióticos son el segundo grupo de fármacos que se encuentran en aguas residuales en todo el mundo [42].

La presencia de antibióticos en el ambiente varía por región, por ejemplo, los antibióticos orales y parenterales que representan al menos el 75 % del consumo total de antibióticos en África son las penicilinas (amoxicilina (AMC)), cefalosporinas (ceftriaxona (CRO)), quinolonas (ciprofloxacina CIP), sulfonamidas (sulfametoxazol (SMX) y trimetoprim (SXT)), tetraciclinas (TE) (doxicilina (Do)) y nitroimidazol (metronidazol (MNZ)), [212].

En China, por ejemplo, se han realizado numerosos estudios sobre la presencia de antibióticos en medios acuáticos. China es considerado el mayor productor, exportador y consumidor de antibióticos de uso animal y humano a nivel mundial [211]. Más de 90 antibióticos pertenecientes a las principales clases (sulfonamidas, fluoroquinolonas, tetraciclinas (TE), macrólidos y β -lactámicos) se

monitorearon durante los años 2005 a 2016 y se detectaron concentraciones entre 0.1 y 1000 ng L⁻¹ [213]. Igualmente, otros estudios han reportado la presencia de estas clases de antibióticos en medios acuáticos de China. La concentración reportada entre estudios varía desde 1 µg L⁻¹ to 100 ng L⁻¹ [211].

Yang et al., (2004) determinaron la concentración de macrólidos (eritromicina (E), roxitromicina (RXT) y tilosina (TYL) en matrices de aguas naturales y residuales. La concentración (µg L⁻¹) de estos macrólidos en aguas superficiales fue de 93.6 ± 8.6, 92.1 ± 10.0 y 94.3 ± 8.9 % para eritromicina (E), roxitromicina (RXT) y tilosina (TYL) respectivamente. En el afluyente de una planta de tratamiento de aguas residuales la recuperación (µg L⁻¹) fue de 84.8 ± 14.0, 83.2 ± 13.1 y 86.1 ± 13.4 % para eritromicina (E), roxitromicina (RXT) y tilosina (TYL) respectivamente [214].

Por otra parte, Lien et al., (2016) determinaron la concentración de antibióticos en aguas residuales provenientes de un hospital urbano en Vietnam antes y después del tratamiento de estas durante un período de un año. Se encontraron altas concentraciones de antibióticos como la ciprofloxacina (CIP), antes del tratamiento (171.8 µg L⁻¹) y después del tratamiento (71.1 µg L⁻¹). Igualmente, el metronidazol (MNZ) se detectó también en altas concentraciones antes y después del tratamiento (328.2 y 133.5 µg L⁻¹ respectivamente). Otros antibióticos fueron detectados antes y después del tratamiento, como el sulfametoxazol (SMX) (87.2 y 26.5 µg L⁻¹ respectivamente) la ofloxacina (OFL) (212.2 y 45.1 µg L⁻¹ respectivamente), la espiramicina (SP) (18.1 y 3.7 µg L⁻¹ respectivamente) y el trimetoprim (SXT) (2.7 y 1.3 µg L⁻¹ respectivamente) [215].

Por otra parte, en las Américas, del 2016 al 2018 prevaleció el consumo de amoxicilina (AMC), azitromicina (AZM), amikacina (AN), cefalexina (CN), ceftriaxona (CRO), cefazolina (CZ), cefotaxima (CTX), cefepime (FEP), ciprofloxacina (CIP), nitrofurantoína (FM), el sulfametoxazol (SMX), trimetoprim (SXT), claritromicina (CLR), dicloxacina (DX), bencil-penicilina (PG), clindamicina (CM), gentamicina (GM) y oxacilina (OX) [212].

En Colombia los antibióticos de mayor consumo humano son los β-lactámicos, principalmente las penicilinas, como Amoxicilina (AMC) (el más consumido por automedicación), ampicilina (AM), y dicloxacina (DX), algunas cefalosporinas (cefalexina (CN), ceftriaxona (CRO) y la cefradina (BAN)), igualmente, las fluoroquinolonas (ciprofloxacina (CIP)). También se ha reportado tetraciclina (TEs) (doxiciclina (DO)) y macrólidos (azitromicina (AZM)) [216]. La mayor concentración de antibióticos

en Colombia se ha reportado en aguas hospitalarias, seguidas por aguas residuales municipales y ambientes acuáticos naturales. Antibióticos como ciprofloxacina (CIP), Azitromicina (AZM) y sulfametoxazol (SMX) son encontrados frecuentemente en aguas residuales colombianas [216].

También, se ha reportado la presencia de patógenos resistentes (a nivel mundial) en aguas y en ambientes clínicos (nosocomiales); bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii* productores de β -lactamasas y carbapenemasas y bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, resistente a meticilina (ME), o *Enterococcus* sp., resistentes a vancomicina (VA) [118].

2.2.4. Problemática global de la resistencia a antibióticos

La WHO ha reconocido la resistencia a los antibióticos como una amenaza de salud pública, ya que estos compuestos son cada vez más ineficientes en el tratamiento de enfermedades infecciosas, También el desarrollo clínico de nuevos antimicrobianos está estancado. Entre los años 2010 y 2015, la FDA (Food and Drug Administration) aprobó el uso de 8 nuevos antibióticos (ceftarolina (CPT), fidaxomicina (FDX), bedaquilina (BQ), dalbavancina (DAL), tedizolid (TZD), oritavancina (ORI), ceftolozane-tazobactam (C/T) y ceftazidima-avibactam (CZA)) [217]. En 2018 y 2019, se aprobaron sólo 9/107 (8.4 %) de los fármacos introducidos [218]. La WHO ha manifestado que, se necesita con urgencia nuevos compuestos para el tratamiento de enfermedades infecciosas; sin embargo, sin un mejor control de la autoridad y responsabilidad en la forma de uso, los nuevos antibióticos podrían ser ineficaces. Según un informe de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), el número de medicamentos antimicrobianos (medicamento relevantes) aprobados para su uso en animales productores de alimentos y comercializados activamente desde 2011 hasta 2020 en los Estados Unidos de América osciló entre 6.002.056 y 9.702.943 Kg totales anuales, con una notable reducción en 2018, 2019 y 2020 (6.032.298; 6.189.260 y 6.002.056 Kg respectivamente). Por otro lado, el uso de medicamentos antimicrobianos (sin relevancia médica) osciló entre 4,447,420 y 5,882,221 Kg totales anuales, también con una disminución importante en los últimos tres años (5,530,784; 5,279,098; 4,447,420 Kg, respectivamente), lo que demuestra el gran esfuerzo realizado para controlar el uso de estas moléculas [44].

Según la WHO, las principales causas de la resistencia a los antibióticos son: su uso indebido y excesivo, explotaciones agrícolas, falta de acceso a agua limpia, falta de condiciones de higiene tanto en animales como en humanos, medidas deficientes en centros de atención de salud, acceso limitado a medicamentos, incumplimiento de la legislación y falta de conocimientos. Esta situación se hace

más crítica en regiones marginadas, pobres y con crisis sanitarias. Las tasas de resistencia a los antibióticos han aumentado, hasta el punto de que las infecciones causadas por los patógenos resistentes han sido tratadas con fármacos de último recurso, que podrían ser menos eficaces, menos seguros y más costosos; en muchas ocasiones, estos fármacos son limitados y se encuentran únicamente en países en desarrollo [118, 217].

En el 2015 la WHO propició una colaboración global para estandarizar la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, el “Global Antimicrobial Resistance Surveillance Syate” (GLASS), organización en la que participan diferentes países con el fin de producir datos fiables y completos, que permitieron la evaluación de las tendencias de la resistencia antibacteriana entre los años 2015 y 2019. Los países proporcionaron datos de patógenos aislados a partir de muestras de sangre, orina, heces, cuello uterino y uretra. Los patógenos resistentes reportados con mayor frecuencia fueron *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *N. gonorrhoeae* y *Shigella* spp., [118].

En el 2017, la WHO publicó la lista de “patógenos prioritarios” resistentes a antibióticos, con el fin de guiar y promover la investigación para combatir esta problemática mundial. Se incluyen 12 géneros de bacterias clasificadas en prioridad crítica, alta y media. Entre los patógenos de prioridad crítica se incluyeron *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacteriaceas, resistentes a los carbapenémicos y productoras de ESB. Según la OPS (Organización Panamericana de la Salud), estos microorganismos son peligrosos en hospitales, residencias para adultos mayores y pacientes que utilizan dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. También, causan infecciones que comprometen sangre y pulmones, vías urinarias, heridas quirúrgicas y puede causar enfermedades nosocomiales, también, se asocian con elevada mortalidad. La categoría de alta prioridad incluye patógenos como *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VA), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ME) y a vancomicina (VA), *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina (CLR), *Salmonella* spp., resistente a las fluoroquinolonas y *Neisseria gonorrhoeae* resistente a las cefalosporinas. La categoría de prioridad media incluye *Streptococcus pneumoniae* con sensibilidad reducida a penicilina (P), *Haemophilus influenza* resistente a ampicilina (AM) y *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas.

En el 2018 se detectó aproximadamente medio millón de nuevos casos de tuberculosis causada por *Mycobacterium tuberculosis* resistente a la rifampicina (TBRR); según la WHO, la TBMR requiere

tratamientos más prolongados, que son menos eficaces y mucho más caros que los de la tuberculosis no resistente [219].

2.2.5. Entidades regulatorias del uso de antibióticos

Internacionalmente, el uso de medicamentos es estrictamente regulado por entidades como; Food and Drug Administration (FDA), United States Department of Agriculture (USDA) y la World Health Organization (WHO). La FDA, es la agencia encargada de garantizar la seguridad y eficacia de los medicamentos de uso humano y animal, previo a su aprobación. Para la aprobación de fármacos de uso humano, inicialmente se deben realizar ensayos en animales para evaluar la toxicidad del compuesto, posteriormente la empresa debe presentar a la FDA una solicitud de investigación en el cual presenta la composición del compuesto, información de manufactura y un plan para la prueba del fármaco en humanos. La FDA revisa que dentro de los planes de estudio no se ponga en riesgo a los humanos. Posteriormente el medicamento entra en fase 1 en donde es ensayado en humanos (entre 80 y 100 voluntarios). En esta etapa se evalúa los efectos adversos y la farmacocinética. Después, el fármaco entra en fase 2, en la cual, se estudia la efectividad del compuesto en personas con ciertas enfermedades o condiciones. En la fase 3 el fármaco es probado en más de 1000 voluntarios y se reúne más información acerca de la efectividad, dosis, seguridad y uso con medicamentos concomitantes. La FDA revisa los datos clínicos y la información de su etiqueta. El fármaco es aprobado si se demuestran mayores beneficios en lugar de riesgos y si se garantiza la calidad del producto durante su fabricación. Finalmente, la fase 4 corresponde al seguimiento del fármaco post-marketing (<https://www.drugwatch.com/fda/approval-process/#:~:text=FDA%20Drug%2DApproval%20Process,FDA%20post%2Dmarket%20safety%20monitoring> acceso 18 julio 2022).

Para la aprobación de fármacos en animales, el fabricante debe realizar estudios de seguridad en animales, efectividad, dosis y efectos adversos. Cuando se van a utilizar antibióticos en animales productores de carne, el fabricante debe realizar estudios de seguridad alimentaria en humanos. El objetivo de estos estudios es garantizar que el nivel de residuos del fármaco en los productos alimenticios no perjudique a las personas. Se realizan estudios con diferentes dosis en las fuentes de carne (bovinos, ovinos, cerdos, aves y peces), para detectar reacciones alérgicas, determinando así el “nivel sin efecto observable” (NOEL por sus siglas en inglés). Cuando la dosis adecuada es determinada, se publica en el Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos, con esto se garantiza que los consumidores de carne ingieran una dosis de antibiótico 100 o 1000 veces menor que la dosis que demostró no tener efectos sobre la salud [220].

También, se realizan estudios para identificar problemas asociados al fármaco. La FDA evalúa estos datos de seguridad farmacológica, toxicológica y de eficacia para determinar la idoneidad del fármaco. Una vez aprobados, la FDA, al igual que la USDA, controlan mediante programas de vigilancia activa el cumplimiento de las regulaciones para garantizar la seguridad y el uso de los antibióticos mediante la recolección y el análisis de muestras; los tejidos se analizan con el fin de determinar si se supera la dosis establecida. Si se determina una infracción, se adoptan medidas correctivas [220].

Desafortunadamente las regulaciones nacionales e internacionales, no se cumplen a cabalidad. Varios autores reportan el uso indebido e ilegal de antibióticos en ganado, favoreciendo el incremento de la problemática mundial de resistencia bacteriana [221, 222]. Oliveri Conti et al., (2015) determinaron la presencia de compuestos como cloranfenicol (CHL), nitrofuranos, verde malaquita (VM) y cristal violeta (CV) en el tejido muscular de peces. El cloranfenicol (CHL) y los nitrofuranos han sido prohibidos en países como U.S.A., y China, debido a sus efectos adversos; sin embargo, todavía se utilizan en acuicultura en países de Asia y América Latina. También, compuestos como la verde malaquita y el cristal violeta (CV) (agentes antifúngicos y antiprotozoarios) han sido prohibidos ya que son compuestos mutagénicos y carcinogénicos [223].

Zhang et al., (2021) determinaron las concentraciones de 16 antibióticos en carne (músculos de bovino y músculos, riñones e hígados de ovino). El 28.41 % de muestras no cumplieron las especificaciones y superaron el límite máximo de residuos en 1.14 %. También identificaron el uso ilegal de norfloxacin (NX, 27.27 %) [224].

En el 2007 se reportó que la presencia de antibióticos en comida para perros estaba relacionada con la aparición de enfermedades en estos animales, como el síndrome de Fanconi. Sheridan et al., (2014) evaluaron la presencia de antibióticos en comida para perros a base de cecina de pollo, y encontraron 6 antibióticos ilegales en aves (trimetoprim (SXT), tilmicosina (TMS), enrofloxacin (ENR), sulfaclozina y sulfametoxazol (SMX)) en concentraciones superiores a 2800 ng g⁻¹ [225].

Por otra parte, García et al., (2020) verificaron la facilidad con que algunos antibióticos veterinarios (fluoroquinolonas, macrólidos, cefalosporinas de 3^{ra} y 4^{ta} generación, polimixinas y glicopéptidos) pueden adquirirse online. En el estudio identificaron que el 50 % de los sitios web operaban en América del Sur y el 65 % de los sitios web no exigían prescripción facultativa. También, el 57 % de

los sitios web operaban en los Estados Unidos de América (U.S.A.) y el 55 % de ellos no exigían una prescripción médica [226].

2.2.5.1. Entidades regulatorias del uso de antibióticos en Colombia

En Colombia existen diferentes entidades regulatorias que controlan el uso de antibióticos tanto en humanos como en animales. El Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) entre otras funciones, se encarga de aprobar el uso de medicamentos en animales. También, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), aprueba el uso de fármacos para uso humano.

Para un adecuado uso de medicamentos, se han expedido diferentes resoluciones de acuerdo con las Buenas Prácticas en el uso de Medicamentos Veterinarios (BPMV). En estas resoluciones se especifican los límites máximos para residuos de antibióticos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y otros medicamentos de uso veterinario, en los alimentos de origen animal destinados a consumo humano [227]. También, existe una regulación que controla el uso de sustancias antimicrobianas como promotores del crecimiento o mejoradores de la eficiencia alimentaria. Esta regulación prohíbe el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento utilizados con fines terapéuticos en medicina humana o en animales. También, permite el uso de antibióticos como promotores del crecimiento si el compuesto no se absorbe a nivel tracto gastro intestinal [228].

2.2.6. Degradación de antibióticos

2.2.6.1. Panorama de la degradación de los antibióticos

Los antibióticos son ionizables y pueden estar en el medio ambiente como especies neutras o cargadas (negativas o positivas). Estas especies tienen diferentes propiedades químicas y, por tanto, diferentes mecanismos de sorción y degradación en el suelo [229]. Varios factores bióticos y abióticos influyen en la tasa de degradación de estos compuestos, por lo que cada uno puede tener una vida media diferente en el suelo, que oscila entre < 1 y 3.466 días [230, 231]. La hidrólisis enzimática es una de las vías de degradación abiótica más frecuentes. Los β -lactámicos son más susceptibles a esta degradación que los macrólidos o las sulfonamidas, mientras que las quinolonas y las tetraciclinas (TE) son susceptibles a la fotodegradación. Estas diferencias dependen de la estructura química de cada clase de antibióticos [231].

Se han estudiado varias técnicas para implementar la degradación y mineralización de los antibióticos y reducir su impacto ambiental [232]; estrategias que han estado enfocadas en diseño de procesos físicos, químicos y biológicos para la degradación [232-238]. Los métodos físico-químicos incluyen

procesos como la sedimentación, la filtración y la oxidación utilizando compuestos químicos, la luz UV o Vis, sonido, e iones. Los métodos biológicos incluyen procesos de degradación con microorganismos y/o sus enzimas [233-235].

Desafortunadamente muchas de las plantas de tratamiento convencionales de aguas a nivel mundial no están diseñadas para la eliminación de microcontaminantes altamente polares como los antibióticos [233]. Estas plantas usualmente utilizan métodos como la filtración para la eliminación de los sólidos de mayor tamaño, las aguas residuales pasan a través de un medio granular como arena, carbón, tierra de diatomeas o carbón activado. Posteriormente, los sólidos más pequeños son eliminados por mecanismos como la retención de partículas por atracción electrostática, o la adsorción. Estos residuos no son degradados y se concentran en una fase sólida, generando un nuevo residuo. En algunas ocasiones, estos lodos con concentraciones de antibióticos que oscilan desde ng Kg^{-1} hasta 100 mg Kg^{-1} son utilizados como fertilizantes, lo que indica que el problema no se ha resuelto, sino que desplaza los contaminantes a otros ambientes [230]. También, se utiliza la sedimentación para la eliminación de sólidos suspendidos, para lo cual, se utilizan compuestos químicos como la cal (Cao) alumbre ($\text{KAl}(\text{SO}_4) 2.12\text{H}_2\text{O}$) o la sal de hierro (FeSO_4), que facilitan la precipitación de los sólidos y su posterior eliminación [233]. Además, las plantas de tratamiento de aguas convencionales utilizan procesos de oxidación para la eliminación de materia orgánica. Los compuestos clorados son utilizados frecuentemente en plantas de tratamiento de agua potable como desinfectantes o como agentes oxidantes. Sin embargo, se ha demostrado que la reacción del cloro con los anillos aromáticos, las aminas neutras y los dobles enlaces generan compuestos halogenados, que pueden ser cancerígenos [232, 234].

Para solucionar lo anterior, se han propuesto procesos de oxidación avanzada (POA) (procesos de fotodegradación con TiO_2 , utilizando semiconductores heterogéneos, fotodegradación con catalizadores semiconductores no basados en TiO_2 , y procesos de foto-Fenton o electro-Fenton). Por otra parte, algunas plantas de tratamientos utilizan sistemas biológicos (lodos activados convencionales o biorreactor de membrana) para la degradación de compuestos, especialmente en tratamientos de efluentes industriales

2.2.6.2. Degradación biótica de antibióticos

Varios autores han estudiado la biodegradación de los antibióticos, Jiang et al., (2010) evaluaron la degradación de las cefalosporinas en el agua superficial y en los sedimentos del lago Xuanwu, China, mostrando que la hidrólisis abiótica (para cefradina (BAN), cefuroxima (CXM) y cefepima (FEP)) y

la fotólisis directa (para ceftriaxona (CRO)) fueron los principales mecanismos de eliminación de las cefalosporinas en el agua superficial del lago; mientras que la biodegradación aeróbica y anaeróbica eliminó las cefalosporinas en el sedimento [239].

Por otra parte, la degradación de antibióticos en el suelo depende de las características fisicoquímicas del mismo [230, 231]. Los antibióticos se acumulan en las capas superiores del suelo, el cual actúa como sumidero, estos compuestos son transportados a aguas superficiales y luego filtrados a aguas subterráneas. El transporte de los antibióticos depende de las propiedades químicas de cada antibiótico y del suelo; el contenido de carbono orgánico en el suelo, el contenido de arcilla, la textura, el pH y la fuerza iónica, pueden alterar el grado de sorción [229, 240]. La sorción de los antibióticos en el suelo puede modificar su movilidad, su ecotoxicidad y su biodisponibilidad para la degradación microbiana; al tener una baja sorción, existe mayor riesgo de lixiviación y mayor riesgo de contaminación para las aguas subterráneas [229, 241].

Se han cuantificado diferentes clases de antibióticos, como tetraciclina (TE)s, sulfonamidas y macrólidos, en suelos, lodos y estiércol. En los lodos, por ejemplo, se han reportado concentraciones de ciprofloxacina (CIP), norfloxacina (NX) y tilosina (TYL) con un valor promedio superior a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Otros antibióticos como la tetraciclina (TE) y la oxitetraciclina (OXT) fueron encontrados en los lodos con concentraciones superiores a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de materia seca. También se ha identificado la concentración de antibióticos en el estiércol, con valores entre 100 y 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de materia seca. La aplicación de estiércol o lodos como abono puede facilitar la propagación de bacterias resistentes en el suelo, en particular de bacterias patógenas humanas. Sin embargo, también se ha informado la degradación microbiana de antibióticos [230, 240-246].

Lin & Gan (2011) estudiaron los suelos áridos en relación con la capacidad de sorción y la persistencia del sulfametoxazol (SMX) y el trimetoprim (SXT). La sorción de sulfametoxazol (SMX) fue mínima ($C_s = 0.973 \mu\text{g kg}^{-1}$), lo que indica un alto riesgo de lixiviación, mientras que el trimetoprim (SXT) mostró una sorción de moderada a alta ($k_d = 7.4242 \text{ L kg}^{-1}$). La degradación de los antibióticos depende de la actividad microbiana, el oxígeno en el suelo, el tipo de suelo y las características del antibiótico [241]. Pan & Chu (2016) obtuvieron resultados similares; los antibióticos pertenecientes a las sulfonamidas presentaron una baja sorción medida como coeficiente de adsorción o distribución en el suelo ($k_d = 1.365 \text{ L kg}^{-1}$), lo que implica un mayor riesgo para las aguas subterráneas. Por el contrario, la tetraciclina (TE) obtuvo el mayor valor de sorción ($k_d = 1.093 \text{ L kg}^{-1}$), lo que significaría

un menor riesgo de contaminación de las aguas subterráneas con los lixiviados. Además, los antibióticos evaluados eran susceptibles de degradación microbiana en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. También mostraron que, a altas concentraciones de antibióticos, los procesos de degradación son más lentos y su persistencia en el suelo es prolongada [229].

Microorganismos como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Sphingobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Bacillus* sp., *Shewanella* sp. y *Trichosporon mycotoxinivorans* participan en la degradación microbiana de las tetraciclinas (TE)s. En el caso de *Stenotrophomonas maltophilia* se han propuesto varias rutas de degradación; se han identificado reacciones como la desnitrometilación, la descarbonilación y la desaminación. También, en la ruta de degradación por *Klebsiella* sp., se incluyen reacciones de oxidación, hidrólisis de apertura del anillo, descarbonilación, desaminación y desmetilación. Mientras que la vía de degradación por el hongo *Trichosporon mycotoxinivorans* incluye reacciones de epimerización, deshidratación y vía de transferencia de protones [242].

Sin embargo, Alexy et al., (2004) evaluaron la degradación de antibióticos utilizando la técnica de la botella cerrada, que contenía un medio mineral, un inóculo, el antibiótico y acetato de sodio. En estas condiciones, demostraron que la amoxicilina (AMC), la bencilpenicilina (PG), la ceftriaxona (CRO), la cefuroxima (CXM), la clortetraciclina (CTC), la clindamicina (CM) la eritromicina (E), el sulfato de gentamicina (GM), el imipenem (IPM), la ofloxacina (OFL), y el sulfametoxazol (SMX), se biodegradaron menos del 60 % en 28 días. Los autores también afirman que es posible su eliminación del medio ambiente por otros mecanismos abióticos como la temperatura (tratamiento térmico) y la luz (fototratamiento) [246].

Por otro lado, en un proceso de compostaje de lodos o estiércol, la eliminación de antibióticos puede oscilar entre el 17 y el 100 % [230, 247]. El compostaje es una de las técnicas utilizadas para la eliminación de antibióticos y genes de resistencia en lodos o estiércol. La persistencia y la movilidad de los antibióticos en el compost dependen de sus propiedades químicas, de su concentración y de las condiciones fisicoquímicas, incluyendo el pH, la temperatura, el carbono orgánico total (COT), el nitrógeno total (NT), el fósforo total (PT) y el contenido de metales. Sin embargo, la eficiencia de eliminación de los antibióticos residuales, y de los genes de resistencia a los antibióticos, sigue siendo muy baja [247].

2.2.6.3. Oxidación química “*In Situ*” (ISCO) de antibióticos

La oxidación química “*In Situ*” es una estrategia de eliminación de diferentes compuestos, basada en la adición de compuestos químicos oxidantes en el suelo y las aguas subterráneas para eliminar los contaminantes orgánicos. Varios autores han estudiado la degradación de antibióticos basada en esta estrategia: oxidación de persulfato termoactivada [248], oxidación de peroximonosulfato [249], oxidación con ozono [250], o proceso de oxidación avanzada basado en el ozono [251]. Wu et al., (2020) utilizaron un soporte de activación de peroximonosulfato (catalizadores de oxidación avanzados de jaulas amorfas de CoSx) para detectar la degradación de tetraciclina (TE, 90 %) y ciprofloxacina (CIP, 90 %). También identificaron los intermediarios y las posibles rutas de degradación tras la activación con peroximonosulfato, en la que se formaron especies reactivas (SO_4 , O_2 y OH) que oxidaron la tetraciclina (TE) en reacciones como la desamidación, la hidroxilación y la reacción de apertura del anillo. Los autores sugirieron que algunos productos intermediarios (SO_4 -/ O_2 -/ OH) podrían mineralizarse (H_2O y CO_2) [252].

Guo et al., (2013) utilizaron la oxidación del peroximonosulfato (PMS) catalizada por Co_3O_4 basada en radicales de sulfato para la degradación de amoxicilina (AMC). Este proceso se basa en la generación de radicales sulfatos a través de la activación del peroximonosulfato (PMS) mediada por el Co_3O_4 . Los autores observaron una disminución de la demanda química de oxígeno (DQO) del 91,01 % [253].

2.2.6.4. Procesos fotocatalíticos de oxidación avanzada (POA) para la degradación heterogénea de antibióticos

Los POA son procesos oxidativos avanzados basados en la generación de radicales hidroxilos (OH^*) altamente reactivos. Estos radicales provienen de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el ozono (O_3), generalmente utilizando catalizadores como el dióxido de titanio (TiO_2) y la luz UV, lo que se conoce como catálisis heterogénea [254]. Varios autores informaron las tasas de eliminación de POA (> 90 %) para penicilinas, sulfonamidas, fenicoles, β -lactámicos, tetraciclinas y fluoroquinolonas [255-259]. Sin embargo, la toxicidad puede no reducirse totalmente y algunos productos intermediarios generados podrían ser más tóxicos que los compuestos originales [232, 260]. Por otro lado, los POAs combinados con tratamientos biológicos (irradiación gamma, irradiación ionizante integrada con lodos activados, un tratamiento biológico combinado con floculación y ultrafiltración) han mostrado altos rendimientos de eliminación (cerca del 100 %) de compuestos tóxicos y recalcitrantes [258, 261].

2.2.6.5. Fotodegradación de antibióticos utilizando semiconductores heterogéneos basados en TiO₂

La fotocatalisis mediante semiconductores es un POA fotocatalítico indirecto que utiliza electrodos de TiO₂ para las reacciones de oxidación-reducción de compuestos orgánicos e inorgánicos. El TiO₂ no es tóxico y tiene una alta actividad catalítica; sin embargo, su actividad catalítica es atenuada por la irradiación solar, por lo que se han aplicado otras técnicas de irradiación como la luz ultravioleta (UV), [254, 262].

Algunos autores han reportado tasas de eliminación de antibióticos superiores al 80 %, bajo ciertas condiciones específicas (intensidad de la radiación, composición, concentración del material híbrido, la matriz utilizada, pH y temperatura), en la degradación de ciprofloxacina (CIP, 88 %), gatifloxacina (GAT, 96 %), levofloxacina (LVX, 96 %), tetraciclina (TE, 83 %), penicilina (P, 90 %), sulfonamida (SUL, 97 %), sulfametoxazol (SMX, 80 % de mineralización), ampicilina (AM, 98 %) y eritromicina (E, 90 %) [254]. Otros han evaluado la degradación de penicilinas (amoxicilina (AMC), ampicilina (AM) y cloxacilina (CLO)) mediante fotocatalisis con TiO₂ y H₂O₂, encontrando una degradación del 100 % [263].

La degradación de amoxicilina (AMX), ampicilina (AM) y cloxacilina (CLO) también se ha ensayado utilizando fotocatalisis con ZnO; los porcentajes de degradación han sido superiores al 80 % en los tres antibióticos [264]. Zheng et al., (2018) utilizaron un nanocompuesto de carbono mesoporoso grafitado (GMC)-TiO₂, y reportaron una adsorción de antibióticos eficiente. Posteriormente, se pusieron en contacto los fotocatalizadores y las especies reactivas (radical hidroxilo) para la degradación de los antibióticos. 15 mg L⁻¹ de ciprofloxacina (CIP) fueron mineralizados completamente (CO₂ y H₂O) en 1,5 horas [265].

Abellán et al., (2009) mediante el uso de varias concentraciones de TiO₂ ensayaron la eliminación de sulfametoxazol (SMX) y trimetoprim (SXT); se observó una degradación > 90 % para ambos compuestos; las concentraciones óptimas fueron 1.0 y 0.5 g de TiO₂ L⁻¹, respectivamente. También observaron que el SMX redujo su contenido aromático mientras que el SXT aumentó su contenido aromático durante las primeras tres horas debido a la formación de dímeros; finalmente, el contenido aromático disminuyó [266].

2.2.6.6. Fotodegradación de antibióticos utilizando catalizadores semiconductores no basados en TiO₂

Se han utilizado otros catalizadores distintos al TiO₂ para la eliminación de antibióticos; por ejemplo, el material híbrido compuesto por nanoescamas de NiS y MoS₂ co-modificadas (g-C₃N₄-NiS-MoS₂), sintetizado por mezcla directa de nitruro de carbono grafitico con sales de níquel y tiourea. Las tetraciclinas (TE) han sido los compuestos más estudiados utilizando este catalizador, obteniendo tasas de degradación > 90 % [254]. Varios autores han evaluado diferentes materiales híbridos como catalizadores para la degradación de antibióticos y han demostrado que son sistemas eficientes; utilizando el catalizador Ppy-BiOI se obtuvo una degradación del 54 y 61 % para la Clortetraciclina (CTC) y la tetraciclina (TE), respectivamente. El material híbrido CQDs-Bi₂WO₆ degradó el 87 % de la ciprofloxacina (CIP) en 120 min, [262, 267-273].

2.2.6.7. Foto-Fenton o electro-Fenton de eliminación de antibióticos

Fenton es un proceso de oxidación avanzado en el que se producen reacciones en cadena mediadas por un catalizador no tóxico (Fe²⁺), un medio ácido (pH = 2,8 - 3,0) y un oxidante (H₂O₂) para la formación de radicales hidroxilos (OH). Varios estudios abordan la degradación de tetraciclina (TE), norfloxacina (NX) y penicilina (P) utilizando este método, mostrando tasas de degradación > 80 % [254, 274]. Sin embargo, la aplicación práctica a gran escala del proceso Fenton presenta inconvenientes debido a la gran cantidad de lodos férricos que genera. Estos lodos sólidos se consideran un peligro potencial debido a los residuos orgánicos adsorbidos de las aguas residuales tratadas. Por lo tanto, se requiere un tratamiento especial y la eliminación de los residuos sólidos debe realizarse en lugares específicos [242].

2.2.6.8. Degradación de antibióticos en el agua mediante tratamiento con plasma

Otra técnica utilizada para la eliminación de antibióticos es la descarga de plasma de barrera dieléctrica (DBD); esta técnica genera especies oxidantes: radicales (H, O, OH) y moléculas como H₂O₂ y O₃ para la eliminación de contaminantes en el aire y el agua [274]. El tratamiento con plasma tiene una fuerte capacidad oxidante, una alta eficiencia y facilidad experimental y no requiere reactivos exógenos. Magureanu et al., (2011) evaluaron la degradación de amoxicilina (AMC, 100 %), oxacilina (OX, 100 %) y ampicilina (AM, 100 %). La amoxicilina (AMC) se degradó después de 10 minutos, mientras que la degradación de los otros dos antibióticos tomó alrededor de 20 a 30 minutos [275].

Kim et al., (2013) evaluaron la degradación de lincomicina (LIN), ciprofloxacina (CIP), enrofloxacin (ENR), clortetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OXT), sulfatiazol (STZ), sulfametoxazol (SMX) y

trimetoprim (SXT). Los resultados indicaron que se degradan fácilmente por plasma de descarga de barrera dieléctrica; las tasas de degradación fueron > 90 % pero dependiendo de la cantidad de energía suministrada, y de cada antibiótico, se reportó una degradabilidad diferente [276].

Li et al., (2020) también ensayaron la degradación de tetraciclina (TE), sulfadiazina (SD) y ciprofloxacina (CIP) mediante plasma de descarga no térmica. Todos los antibióticos mostraron diferentes tasas de degradación, y 20 minutos después del tratamiento con plasma a 19 Kv, se encontraron eficiencias de degradación de 93.3, 81.2 y 58.5 % para TE, SD y CIP, respectivamente. La eficiencia de eliminación y el rendimiento de mineralización de la tetraciclina (TE) fueron relativamente más altos que los otros antibióticos [274].

Sarangapani et al., (2019) evaluaron la degradación de ofloxacina (OFL) y ciprofloxacina (CIP) por el método de plasma frío atmosférico. Dichos plasmas generan reacciones químicas responsables de la formación de especies reactivas. La degradación fue del 92 y 89 % para OFX y CIP, respectivamente, reduciendo la actividad de ambos antibióticos [277].

2.2.6.9. Degradación catódica de antibióticos

La degradación catódica es una tecnología emergente que tiene potencial en el tratamiento de aguas residuales para la eliminación de compuestos nitro, aromáticos, colorantes azoicos y compuestos halogenados. Esta técnica proporciona electrones para la degradación reductora de los contaminantes, es respetuosa con el medio ambiente ya que no se necesitan productos químicos, requiere una aplicación de bajo voltaje y es de bajo costo [278]. Kong et al., (2015) ensayaron la degradación de nitrofurazona (NFZ, 98.71 %), metronidazol (MNZ, 98.21 %), cloranfenicol (CHL, 99.86 %) y florfenicol (FLO, 99.72 %) utilizando un reactor electroquímico de doble cámara. Los diferentes potenciales catódicos aplicados generaron una alta eficiencia en la degradación de los antibióticos. Finalmente, los autores concluyen que la reducción electroquímica es prometedora como pretratamiento o tratamiento avanzado de aguas residuales que contienen antibióticos [278].

2.2.6.10. Degradación térmica de antibióticos

Varios autores han estudiado el efecto de diferentes temperaturas en la degradación de antibióticos. Lin et al., (2017) evaluaron el efecto de la temperatura en la degradación de antibióticos en el estiércol (uno de los principales reservorios de antibióticos y bacterias resistentes); incubaron estiércol de cerdo y pollo a 30, 40, 50 y 60 °C durante cinco días, identificando la presencia de diferentes clases de sulfonamidas. En el estiércol de cerdo, encontraron sulfadiazina (SDZ), sulfadimetoxina (SDM),

sulfametoxina (SMZ) y sulfametoxina (SMM); en el de pollo, encontraron sulfadiazina (SDZ), sulfadimetoxina (SDM), sulfametoxina (SMZ) y sulfaquinolaxina (SQ). El efecto de la temperatura varía según el origen del estiércol y la clase de antibiótico; a 60 °C, la concentración residual de antibióticos en el estiércol de cerdo disminuyó hasta 2 mg kg⁻¹. En cambio, las sulfonamidas en el estiércol de pollo fueron las más bajas a 30 °C (0,5 mg Kg⁻¹); sin embargo, aumentaron a 40 °C (7 mg Kg⁻¹) y luego disminuyeron continuamente a medida que aumentaba la temperatura [279].

Loftin et al., (2008) probaron la degradación a diferentes temperaturas (7, 22 y 35 °C), pH (2, 5, 7, 9 y 11) y fuerza iónica (0.0015, 0.050 y 0.084 mg L⁻¹) de clortetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OXT), tetraciclina (TE), lincomicina (LIN), sulfacloropiridazina (SCP), sulfadimetoxina (SDM), sulfatiazol (STZ), trimetoprim (SXT) y tilosina (TYL), observando que la temperatura y el pH afectaban a la velocidad de degradación de CTC (22 °C, pH 9 ± 0.2), OXT (22 °C, pH 7.0 ± 0.2), y TE (35 °C, pH 9 ± 0.2). La velocidad de degradación aumenta con el incremento de la temperatura [235].

2.2.6.11. Degradación sonocatalítica de antibióticos

La sonocatálisis es un proceso de oxidación avanzada (POA) utilizado recientemente para el tratamiento del agua mediante ultrasonidos; este proceso induce la cavitación acústica “*in situ*” para eliminar los contaminantes en una fase líquida [280, 281]. La cavitación es la formación, el crecimiento y el colapso implosivo de microburbujas llenas de gas o vapor (consideradas microrreactores) que resultan de la compresión inducida por las ondas acústicas/la rarefacción en un líquido [281]. Debido a las altas temperaturas (>5000 K) y presiones (>1000 atm) que se alcanzan durante el proceso, se genera un ambiente oxidativo con especies altamente reactivas (ROS), como los radicales libres de hidrógeno H*, hidroxilo (*OH) e hidroperoxilo (HO₂*) [280, 281]; especies capaces de degradar contaminantes recalcitrantes, atacando las moléculas orgánicas instantáneamente [280].

De Bel et al., (2009) utilizaron la sonólisis a 520 kHz y 92 WL⁻¹ para la degradación de la Ciprofloxacina (CIP), encontrando que la tasa de degradación es dependiente del pH debido al grado de protonación y a las cargas positivas adquiridas por la ciprofloxacina (CIP) durante el tratamiento, que favorecen la degradación ultrasónica. En este estudio, la tasa de degradación aumentó, ya que la constante de degradación de pseudo-primer orden se incrementó casi cuatro veces al comparar el tratamiento a pH 3.0 (0,021 min⁻¹), pH 7.0 (0,0058 min⁻¹) y pH 10 (0,0069 min⁻¹), obteniendo una relación DBO/COD de 0,06 a 0,60; 0,17 y 0,18, tras 120 min de irradiación respectivamente [282].

La degradación sonoquímica de antibióticos ha tenido un éxito prometedor debido a la reducción del COT (Carbono Orgánico Total), la eliminación de la DQO (Demanda Química de Oxígeno) el aumento de la DBO₅ (Demanda Biológica de Oxígeno) y la relación DBO₅/COD. En este sentido, [Liu et al., \(2021b\)](#) proporcionaron una visión general relacionada con la eficiencia de eliminación (EE) de varios antibióticos utilizando diferentes condiciones; la frecuencia ultrasónica (US, 20 – 600 kHz), la entrada de potencia eléctrica (PE, 60 – 860 W) y los tiempos de sonicación (t, 20 – 300 min), de los procesos de eliminación como la sonicación sola, la sonocatálisis, el Sono/Fenton, el Sono/PS, el Sono/Foto y la sonozonación. En general, los resultados resumidos por [Liu et al., \(2021b\)](#) mostraron diferentes eficiencias de eliminación para antibióticos como sulfametazina (SM2), oxacilina (OX) y dicloxacilina (DCX), todos ellos con un 100 % de EE; sulfadiazina (SD, 90 % EE); ceflexin (CN), ciprofloxacina (CIP), penicillin G (PG), con un EE entre 52 – 66.7 %; ofloxacina (OFL, 31 % RE); y levofloxacina (LVX, < 10 % EE), [283].

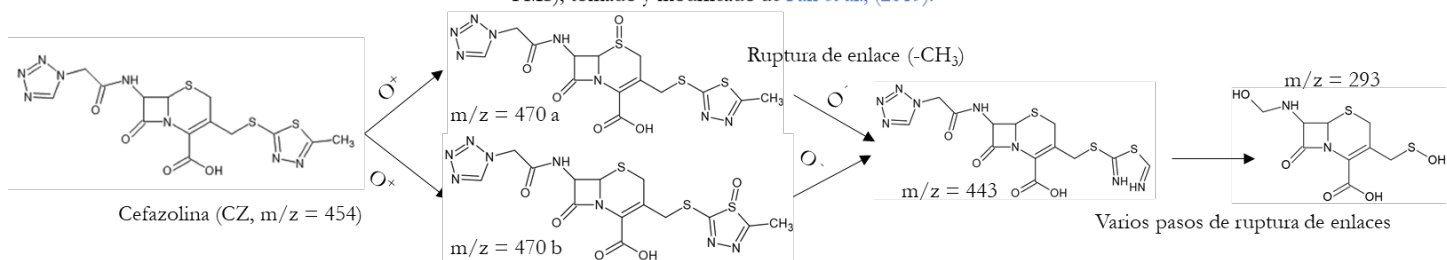
Sin embargo, los resultados revisados por [Liu et al., \(2021b\)](#) también mostraron que: *i*) la distancia del antibiótico a las burbujas de cavitación es crucial, *ii*) que la eficiencia de eliminación (EE) es dependiente del pH en algunos casos, *iii*) la hidrofobicidad del antibiótico es crítica para algunos procesos, *iv*) en algunos casos no se logra la mineralización y *v*) el volumen molar es crítico para las reacciones, indicando que incluso son necesarios algunos ajustes para el tratamiento de cada molécula; sin embargo, los residuos a tratar son una mezcla de estas moléculas y demás compuestos [283].

En resumen, los procesos de degradación biótica, física y química de antibióticos han obtenido altos porcentajes de eliminación (72.5 – 90 %); sin embargo, sólo unos pocos autores han reportado los intermediarios y posibles pasos o secuencia de degradación, ya que los compuestos intermediarios generados varían según el antibiótico degradado, el proceso (biológico, químico, físico o combinado) y las condiciones utilizadas (pH, temperatura o presencia de químicos) [284]. La identificación de los compuestos intermediarios resultantes de la degradación del antibiótico, su toxicidad y la actividad antimicrobiana residual es crucial para establecer la eficiencia del proceso; También, conocer las diferentes etapas de degradación es la clave para mejorar cada tratamiento [285]. En este sentido, [Fan et al., \(2019\)](#) propusieron una ruta de degradación de cefazolina (CZ) partir de un proceso de oxidación avanzada con peroximonosulfato activado (PMS); se identificaron compuestos sulfóxidos de alto peso molecular (**Figura 1a**), [286]. Algunos autores también han identificado intermediarios generados en la degradación de cefazolina (CZ) utilizando reacciones de oxidación; [Li et al., \(2016\)](#)

utilizaron permanganato (Mn (VII)) como oxidante e identificaron cinco intermediarios, de los cuales uno de ellos coincide con los compuestos detectados por [Fan et al., \(2019\)](#), (**Figura 1b**), [284]. [Ghasemi et al., \(2020\)](#) determinaron los compuestos intermediarios generados en la degradación de cefazolina (CZ) a partir de un proceso de electro Fenton (EF), identificando compuestos de bajo peso molecular, por lo que los autores afirman que es posible su mineralización mediante un tratamiento biológico (**Figura 1c**), [287].

Por otro lado, se ha propuesto la posible degradación de cefazolina (CZ) tras procesos de fotocatalisis; [Gurkan et al., \(2012\)](#) utilizaron luz UV y TiO₂, los autores determinaron que la degradación de cefazolina (CZ) se produce a través de la escisión intramolecular de los anillos lactámicos, el tiadiazol, el tetrazol, y las posteriores reacciones con radicales -OH* que transforman los fragmentos en especies más pequeñas. La **Figura 1d** muestra algunos de los intermediarios generados [288]. [Chen et al., \(2021\)](#) utilizaron un fotocatalizador de oxibromuro de bismuto (BiOBr) para la eliminación de cefazolina (CZ) [289]; en este estudio se identificaron reacciones de hidrólisis y oxidación (**Figura 1e**). Otras técnicas, como la sonocatálisis, también han identificado algunos intermediarios (**Figura 1f**) [290].

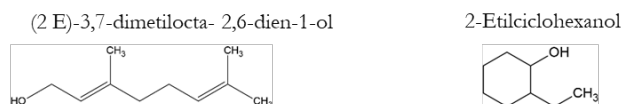
a. Posibles pasos de degradación en un proceso de oxidación con compuestos de óxido de grafeno-CoFe₂O₄ activados por peroximonosulfato (CFGO202-PMS), tomado y modificado de [Fan et al., \(2019\)](#).



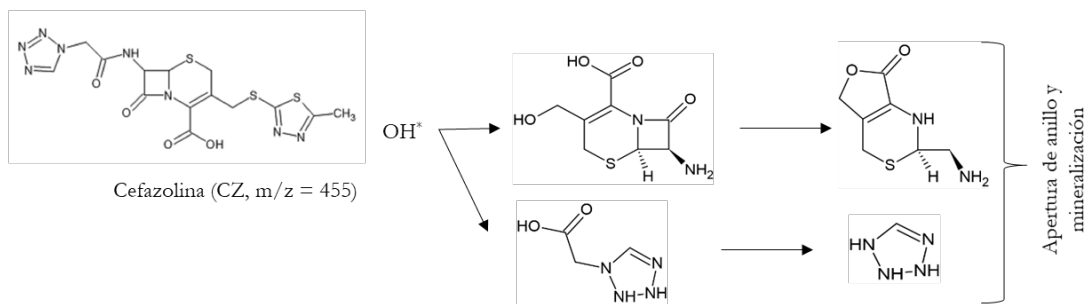
b. Intermedios generados a partir de un proceso de oxidación con permanganato (Mn(VII)), tomado y modificado de [Li et al., \(2016\)](#).



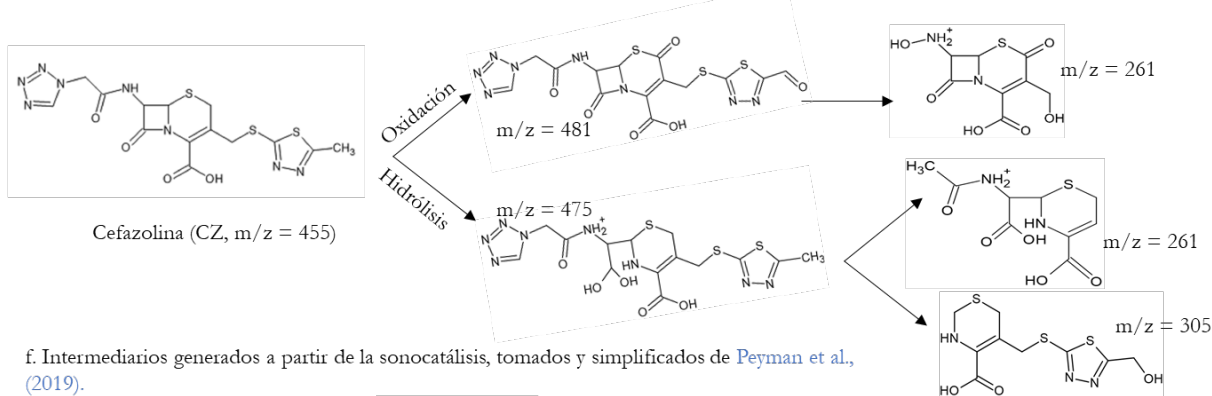
c. Intermedios generados en un proceso de electro-Fenton (EF), tomados y simplificados de [Maoumeh et al., \(2020\)](#).



d. Intermedios generados a partir de la fotocatalisis con luz UV y TiO₂, tomado y modificado de [Yalcin et al., \(2021\)](#).



e. Intermedios generados a partir de la fotocatalisis con oxibromuro de bismuto (BiOBr), tomados y simplificados de [Chen et al., \(2021\)](#)



f. Intermedios generados a partir de la sonocatálisis, tomados y simplificados de [Peyman et al., \(2019\)](#).

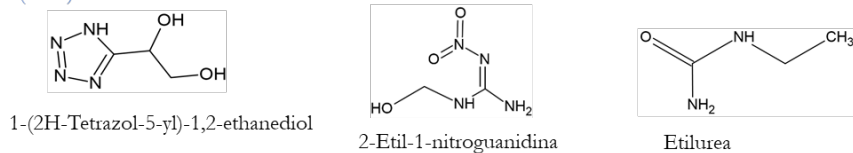


Figura 1. Algunos intermediarios generados y pasos de degradación de cefazolina (CZ) a partir de diferentes técnicas, m/z es la relación masa/carga. a) degradación de cefazolina (CZ) en un proceso de oxidación con peroximonosulfato activado (PMS). **b)** intermediarios generados a partir de un proceso de oxidación con permanganato (Mn (VII)). **c)** intermediarios generados de un proceso Fenton. **d)** intermediarios generados a partir de la fotocatalisis con luz UV y TiO₂. **e)** intermediarios generados a partir de la fotocatalisis con oxibromuro de bismuto (BiOBr). **f)** intermediarios generados a partir de la sonocatálisis.

Adicionalmente, la degradación de la levofloxacina (LVX) ha sido ampliamente estudiada por diferentes métodos. Liu et al., (2021) y He et al., (2022) identificaron los intermediarios generados a partir de la oxidación química usando peroximonosulfato; estos autores, a pesar de estudiar la degradación de la misma molécula usando la misma técnica, han encontrado que las condiciones que rodean las reacciones influyen crucialmente en que los intermediarios generados sean diferentes; sin embargo, ambos autores reportaron la obtención de pequeñas moléculas que pueden ser mineralizadas. La **Figura 2a** muestra algunos intermediarios encontrados [291, 292]. Otros estudios han informado de la degradación de la levofloxacina (LVX) por oxidación química utilizando permanganato (Mn (VII)) (**Figura 2b**), [293, 294]. Otros autores también evaluaron la degradación de la levofloxacina (LVX) utilizando Fenton y propusieron las posibles etapas de degradación (**Figura 2c**), [295-298].

Además, otros autores han evaluado la degradación de la levofloxacina (LVX) utilizando la fotocatalisis en diferentes condiciones, generando diferentes compuestos (**Figura 2d**), [286, 299, 300]. La sonocatálisis también ha sido probada para la degradación de la levofloxacina (LVX); Wei et al., (2015) propusieron los posibles pasos de degradación para lograr la mineralización del compuesto (**Figura 2e**), [301].

La **Tabla 2** resume algunos tratamientos bióticos, químicos, físicos y combinados para la degradación de varios antibióticos.

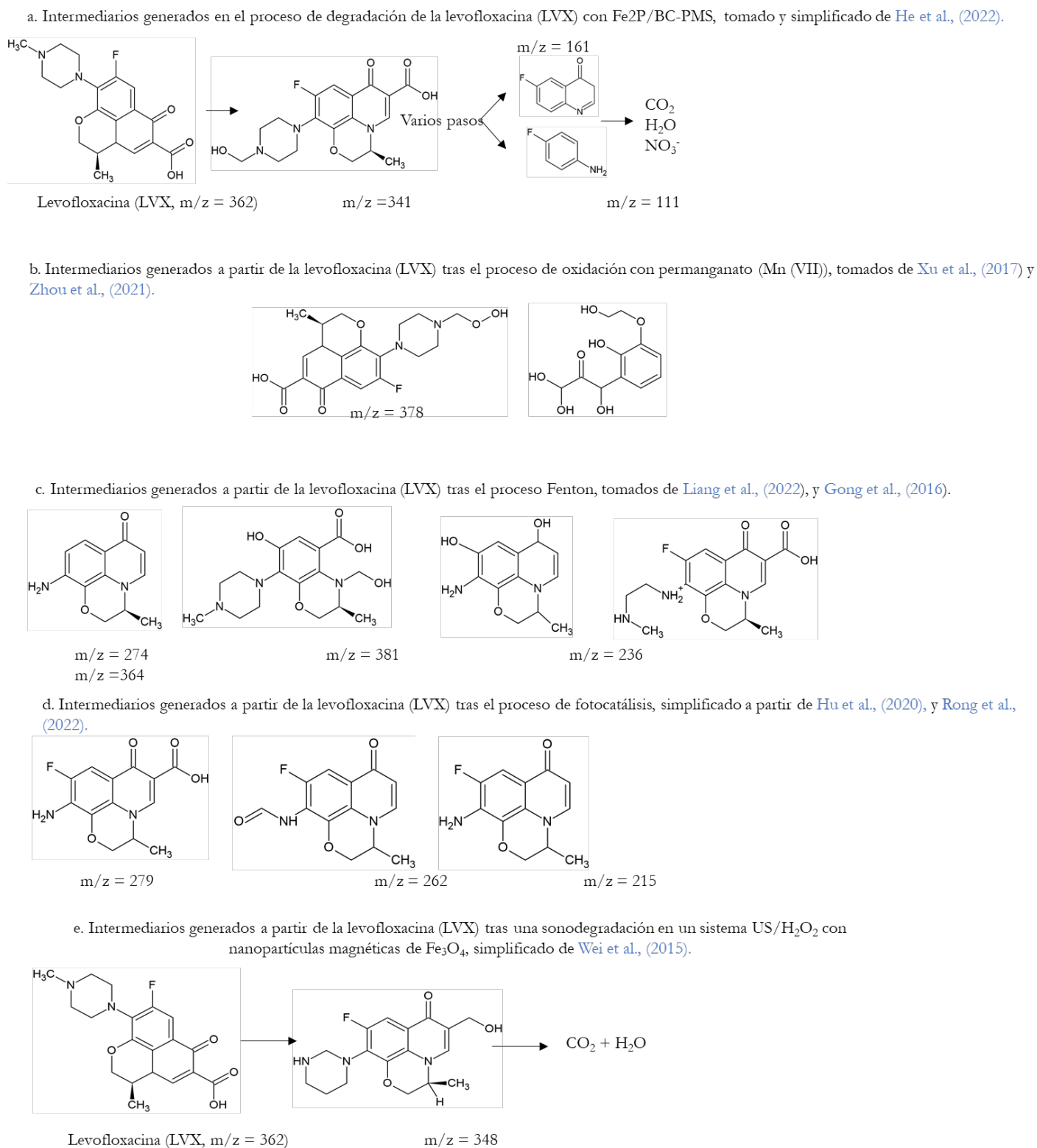


Figura 2. Algunos pasos intermedios y de degradación de levofloxacin (LVX) empleando diferentes técnicas de degradación, m/z es la relación masa/carga. a) vía de degradación de levofloxacin (LVX) en un proceso de oxidación con peroximonosulfato (PMS) b) intermedios generados a partir de un proceso de oxidación con permanganato (Mn (VII)). c)

intermediarios generados a partir de un proceso Fenton. **d)** intermediarios generados a partir de la fotocatalisis. **e)** intermediarios generados a partir de la sonocatálisis.

Tabla 2. Tipos de tratamientos y técnicas para la degradación de antibióticos, resumen del porcentaje de degradación o eliminación.

Tipo de degradación	Técnica	Proceso o materiales	Antibióticos reportados	Degradación / Eliminación	Referencias
Biótica	Hidrólisis	Sedimento de lago	cefradina (BAN), cefuroxima (CXM), ceftriaxona (CRO), cefepima (FEP).	Eliminación del 3 % de la Ceftriaxona (CRO) disódica y 7 % del dihidrocloruro de Cefotiam (CTM) en 28 d.	[239]
	Degradación microbiana	Suspensiones bacterianas en estiércol de aves de corral y tierra que producen ácidos húmicos.	tetraciclina (TE) oxitetraciclina (OXT), clortetraciclina (CTC).	Eliminación entre el 88 y 75 % en 15 min.	[302]
	Degradación por un proceso co-metabólico	La cepa se aisló de un reactor utilizado para el tratamiento de efluentes de acuicultura.	oxitetraciclina (OXT), ciprofloxacina (CIP).	Oxitetraciclina (OXT) entre 90.3 y 97.4. Ciprofloxacina (CIP) no se degradó.	[243]
Química	Activación por calor del Persulfato	Solución acuosa a diferentes pH.	penicilina G (PG).	A pH 5 se obtuvo una eliminación del 82.6 %. A pH más alto la remoción disminuyó.	[303]
	Oxidación electroquímica	Reactor EC con contraelectrodo de platino incorporado y potenciador Roxy.	ciprofloxacina (CIP), norfloxacina (NX), ofloxacina (OFL).	Eliminación de la CIP del 90 %, la NX el 62 % y OFL el 97.3 %.	[304]
	Proceso de Fenton	La reacción mejora con H ₂ O ₂ , promoviendo la producción catalítica.	sulfato de tiazol, tilosina (TYL), ciprofloxacina (CIP), amoxicilina (AMC) cloxacilina (CLO), tetraciclina (TE).	eliminación entre el 77 y el 97.1 %.	[305]
Físicos	Adsorción	Biocarbón de lodos residuales.	tetraciclina (TE) y sulfametazina (SM2)	Baja adsorción con el biocarbón que podría superarse	[306]

				con el uso de peroximonosulfato.	
		Zeolita ZSM-5 y nanocristales de zeolitas.	ciprofloxacina (CIP).	Eliminación entre 54 y 90 % según material, tiempo y concentración de antibiótico.	[307]
	Temperatura	Aumento de la temperatura con la incubación	sulfonamida (SUL).	La temperatura mínima del 60 °C eliminando entre 78.1 y 98.3 en diferentes sobre antibióticos sulfonamidas.	[279]
	Fotodegradación	Se evaluó bajo una irradiación UV A-B-C de 125W (200-600 nm)	ciprofloxacina (CIP), ofloxacina (OFL).	No existe evidencia de degradación de antibióticos por la exposición a luz ultravioleta.	[308]
Fisicoquímico	Tratamiento con plasma	Reactor de plasma en configuración coaxial operado en modo pulsado.	oxacilina (OX), amoxicilina (AMC), ampicilina (AM).	La Oxacilina (OX) y la Amoxicilina (AMC) tuvieron una degradación superior al 90 %. La Ampicilina (AM) del 29 %.	[275]
	Fotocatálisis	Fotoreactor Solarbox 1500 producido por una lámpara de xenón refrigerada por aire.	ampicilina (AM), enrofloxacina (ENR), tilosina (TLY), vancomicina (VA), clindamicina (CM), trimetoprim (SXT), zetronidazol, sulfadiazina (SD), doxiciclina (DO) oxitetraciclina (OXT)	Eliminación de antibióticos por oxidación fotocatalítica entre el 40 y el 100 %, con la excepción de la clindamicina (CM), que no se eliminó	[309]
		Reactor de cuarzo con una lámpara de 20 W e irradiación de 2300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$.	ciprofloxacina (CIP), ofloxacina (OFL).	Eliminación del ~70 %.	[310]
	Procesos de oxidación avanzada (POA)	Oxidación con agentes como el peróxido de hidrógeno, el ozono, el dióxido de titanio y la luz ultravioleta utilizando	penicilinas, sulfonamidas, fenicoles, β -lactámicos, tetraciclina (TE)s, fluoroquinolonas	Eliminación con rangos entre 78 y 100 %.	[311]

		materiales semiconductores (TiO ₂ , SnO ₂ , CeO ₂ , ZnO) como catalizadores.		
--	--	--	--	--

Por otra parte, las técnicas químicas para la eliminación de compuestos contaminantes han mostrado una alta eficiencia en la degradación de antibióticos; sin embargo, algunas de estas tienen un alto costo. En la mayoría de estas, no se logra la mineralización del compuesto y es posible que se generen intermediarios aún más tóxicos. Por esta razón, varios autores han propuesto que los procesos combinados de degradación y biodegradación pueden ser la mejor solución para el tratamiento de las aguas residuales. El tratamiento enzimático puede ser previo o posterior al tratamiento químico en las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales para aumentar la biodegradabilidad o degradar los compuestos recalcitrantes que no se eliminaron o mineralizaron completamente en las convencionales [312]. Una mayor tasa de eliminación de entre el 20 y el 50 % de los procesos híbridos parece ser más eficaz para la eliminación de antibióticos recalcitrantes [313].

2.2.6.12. Degradación enzimática de los antibióticos

Desde hace varios años, se ha reportado la biodegradación de antibióticos por microorganismos como bacterias y hongos. Por ejemplo, las bacterias heterótrofas aerobias como las Actinos o las Proteobacterias pueden transformar las sulfonamidas (N4-acetilsulfametoxazol) o incluso mineralizarlas (CO₂ y H₂O). Sin embargo, en algunos antibióticos, sólo se producen cambios menores de la molécula sin alterar la actividad antibacteriana, mientras que, en otros, los intermediarios se transforman de nuevo en la forma parental; se ha reportado que transformación de las sulfonamidas al compuesto N4-acetilsulfametoxazol puede ser reversible al compuesto original [314]. Además, la capacidad de degradar antibióticos está limitada en algunas bacterias por las condiciones ambientales [314].

Algunas técnicas utilizan la degradación enzimática en condiciones controladas para el tratamiento de aguas residuales, como el biorreactor de lodos activados (BLA), en el que los contaminantes se someten a aireación para promover el crecimiento de bacterias que degradan las sustancias orgánicas tóxicas [313]. El BLA es el sistema más adoptado para el tratamiento biológico de aguas residuales; sin embargo, este método no está diseñado específicamente para la eliminación de antibióticos, la cantidad eliminada de antibiótico puede variar significativamente entre clases [315].

Por otro lado, el uso de biorreactores de membrana (MBR) es una de las alternativas para la eliminación de antibióticos como la ciprofloxacina (CIP), la eritromicina (E), la tetraciclina (TE), la ofloxacina (OFL) y la clortetraciclina (CTC) con tasas de eliminación superiores al 90 % [312]. En los MBR, el mecanismo de eliminación de antibióticos es la biodegradación enzimática, una alternativa prometedora para eliminar estos contaminantes debido a sus bajos requerimientos energéticos y su alta eficiencia [316].

Las enzimas oxidasas han sido las más estudiadas en la degradación de antibióticos. Las enzimas ligninolíticas producidas por hongos, bacterias, plantas y algas, incluidas las lacasas (Lac, C.E. 1.10.3.2), la lignina peroxidasa (LiP, C.E. 1.11.1.14), el manganeso peroxidasa (MnP, C.E. 1.11.1.13), y la peroxidasa versátil (VP, C.E. 1.11.1.16), se han ensayado para la eliminación de antibióticos, mostrando altas tasas de degradación (72.5 - 90 %), [86, 317-319].

Por ejemplo, Wen et al., (2019) evaluaron la degradación de la oxitetraciclina (OXT) inmovilizando enzimas LiP de *Phanerochaete chrysosporium* en materiales mesoporosos derivados de la bentonita; la degradación fue del 95 % [320]. Algunos autores han identificado los intermediarios generados en la biotransformación, su toxicidad y las posibles rutas de degradación. Tian et al., (2020) evaluaron la degradación de la oxitetraciclina (OXT) utilizando la lacasa producida por el hongo *Pycnoporus* sp., en presencia de ABTS e iones Al^{3+} , Cu^{2+} y Fe^{3+} . Los autores demostraron que la OXT se degradaba 100 % y que la actividad antimicrobiana se reducía tras el tratamiento. En este trabajo, la vía de degradación incluye las reacciones de desaminación, desmetilación y deshidratación. Además, se identificaron siete productos intermediarios en la degradación de la OXT [321].

Copete-Pertuz et al., (2018) evaluaron la degradación de oxacilina (OX), cloxacilina (CLX) y dicloxacilina (DCX) utilizando el extracto crudo del hongo *Leptosphaerulina* sp. Los tres antibióticos se degradaron el 100 % y la lacasa (Lac, C.E. 1.10.3.2) y la peroxidasa versátil (VP, C.E. 1.11.1.16) fueron las enzimas responsables de la transformación de los antibióticos. Los autores también demostraron la pérdida de actividad antimicrobiana de los tres antibióticos y los intermediarios no demostraron toxicidad en el ensayo de citotoxicidad [322].

Zhang et al., (2020) evaluaron la degradación de antibióticos como la ampicilina (AM) y la tetraciclina (TE) mediante la inmovilización de las lacasas producidas por la bacteria *Bacillus subtilis* en un marco

de cobre-ácido trímico (Cu-BTC). Sin mediadores químicos en el tratamiento enzimático, se obtuvo una alta eficiencia de degradación para ambos antibióticos (cercana al 100 %). Se identificaron once y catorce productos intermediarios de la degradación de la tetraciclina (TE) y de la ampicilina (AM) respectivamente, así como las posibles rutas de degradación. Además, se demostró la pérdida de actividad antimicrobiana y la baja ecotoxicidad de los productos de degradación generados [85].

Sun et al., (2021) evaluaron la degradación de la tetraciclina (TE) utilizando la enzima MnP. El 80 % se degradó en tres horas, la actividad antimicrobiana de los productos de transformación de la tetraciclina (TE) disminuyó durante el tiempo de reacción. Siete compuestos resultaron de la degradación de la TE y se propuso una posible ruta de degradación que incluía reacciones de desmetilación, oxidación dimetilamino, descarbonilación, hidroxilación y deshidrogenación oxidativa [323].

En cambio, otros autores han demostrado la formación de productos tóxicos debido a la presencia de mediadores químicos. El efecto de un mediador en la oxidación depende del tipo de lacasa, el sustrato, los radicales formados, la reciclabilidad del mediador y la estabilidad de la lacasa [86]. Weng et al., (2012) evaluaron de la degradación de la sulfadimetoxina (SDM) y la sulfamonometoxina (SMM) utilizando ácido violúrico (VLA), siringaldehído (SIR) y alcohol bencílico 4-hidroxi (HBA) como mediadores de la actividad enzimática. La degradación de antibióticos utilizando lacasas en presencia de los mediadores VLA o HBA generó productos de degradación de menor toxicidad, contrario los tratamientos con ABTS o SIR, que mostraron una alta toxicidad [324].

Becker et al., (2016) reportaron que el mediador ABTS aumentó las eficiencias de degradación del sulfametoxazol (SMX), la ampicilina (AM) y trimetoprima (SXT), pero disminuyó la eficiencia de degradación de la tetraciclina (TE) y la oxitetraciclina (OXT), además, la lacasa no fue capaz de transformar el cloranfenicol (CHL) en presencia o ausencia de ABTS. La lacasa y el ABTS, indujeron una toxicidad no específica en algunos bioensayos, implicando la generación de productos de transformación o radicales tóxicos [86].

Zhang et al., (2020) obtuvieron un porcentaje de degradación de tetraciclina (TE) (1 mg mL⁻¹) cercano al 100 %, utilizando lacasas inmovilizadas producidas por *Bacillus subtilis* [85]. Por otra parte, Yang et al., (2017), inmovilizaron lacasas producidas por *Cerrena unicolor* para evaluar la degradación de seis antibióticos; oxitetraciclina (OXT) tetraciclina (TE), trimetoprim (SXT), sulfametoxazol

(SMX), ampicilina (AMP), eritromicina (E) y cloranfenicol (CHL), en presencia y ausencia ABTS. La mayor degradación (80 %) se encontró sobre la tetraciclina (TE) ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), utilizando 40 U mL^{-1} , pH de 6.0 ± 0.2 , $25 \text{ }^\circ\text{C}$ en 12 horas [325].

Becker et al., (2016) evaluaron la degradación de 38 antibióticos de diferentes clases en un biorreactor de membrana enzimática mediante la inmovilización de lacasas producidas por *Trametes versicolor*. En presencia del mediador siringaldehído, se observó la degradación de 32 antibióticos ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) mayor al 50 % en 24 horas [86]. Igualmente, Navada et al., (2019) evaluaron la degradación de cloranfenicol (CHL) (10 mg mL^{-1}), un antibiótico recalcitrante y termoestable, utilizando lacasas producidas por *Trametes hirsuta*, en presencia del mediador ABTS (0.25 mM) y observaron una degradación del 82 % en 48 horas [87].

Najafabadipour et al., (2021) propusieron la degradación de la levofloxacina (LVX), generada a partir de una reacción enzimática con una lacasa osmóticamente estable (C.E. 1.11.1.7) en una solución que contiene urea, (Figura 3).

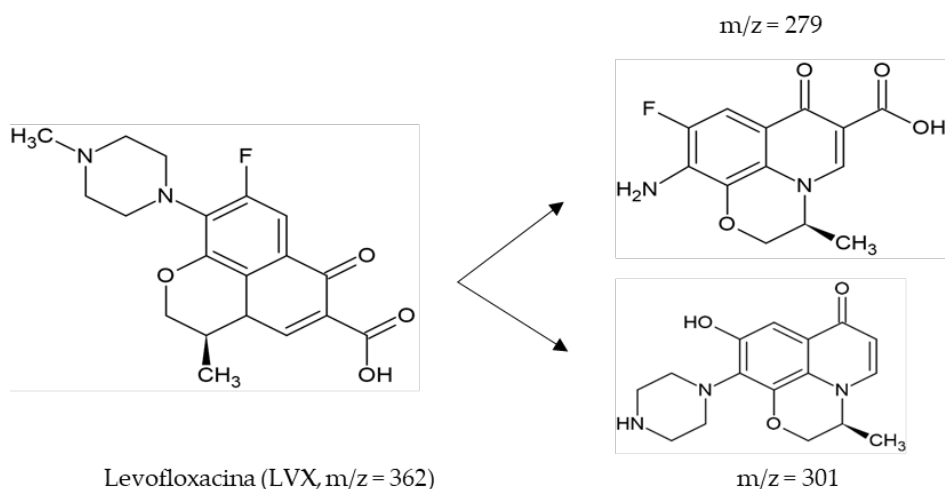


Figura 3. Intermediarios resultantes de la degradación de levofloxacina (LVX) utilizando una lacasa osmotolerante (C.E. 1.11.1.7) de *Trametes versicolor* en presencia de urea, m/z es la relación masa/carga. Tomado y simplificado de [326].

Por otra parte, se ha documentado que algunos fármacos son citotóxicos, mutagénicos teratogénicos y carcinogénicos, incluso en concentraciones bajas, la doxorubicina ha sido detectada en aguas residuales de hospitales, ya que es eliminada en la orina entre el 3 - 10 % y en las heces fecales entre 40 - 50 % de la dosis administrada al paciente. Se ha demostrado que la doxorubicina a

concentraciones de $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ causa daño en el DNA de *Ceriodaphnia dubia*. Kelbert et al., (2020) evaluaron la degradación de doxorubicina empleando lacasas de *Trametes versicolor*. Las lacasas degradaron diferentes concentraciones (50, 250 y $500 \mu\text{g L}^{-1}$) de la doxorubicina en 4 horas; las condiciones del ensayo fueron 1800 UL^{-1} de lacasa, pH 7.0 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$, [88].

Aunque se han realizado algunos estudios sobre la biotransformación de los antibióticos, aún no están claras las vías de degradación, los intermediarios formados, los microorganismos y las enzimas implicadas en cada etapa. Existen antibióticos ampliamente utilizados en humanos y animales; sin embargo, no se ha ensayado su degradación enzimática [312].

2.2.6.12.1. Ultrasonido (sonólisis) combinado con enzimas para la degradación de antibióticos.

Sutar & Rathod (2015) estudiaron la degradación catalítica de ciprofloxacina (CIP), utilizando la Lacasa (Lac, C.E. 1.10.3. 2) en un proceso combinado con sonólisis, logrando una degradación del 51 % en condiciones específicas (0.02% (p/v) de carga enzimática; $60 \text{ }^\circ\text{C}$; 75 W de potencia de entrada; 22 kHz de frecuencia; 50 % de ciclo de trabajo; y 200 rpm de agitación); superando la degradación obtenida en el proceso convencional (16 %) y reduciendo el tiempo de tratamiento [327].

Chakma et al., (2020) investigaron los vínculos entre los procesos enzimáticos (peroxidasa de rábano picante (HRP, EC: 1.11.1.7) acoplados a los ultrasonidos para la degradación de la Ciprofloxacina (CIP) y encontraron que los ultrasonidos y la cavitación mejoran la eficiencia de la degradación al aumentar la interacción entre la enzima y las moléculas orgánicas (energía cinética). Como la Ciprofloxacina (CIP) se transforma enzimáticamente, no hay una mejora significativa en el proceso sono-enzimático, las mayores tasas de degradación enzimática en condiciones óptimas (pH 7.0 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$) fueron del 68,41 %. Por el contrario, los productos intermediarios como el ácido acético, el alcohol etílico y otros productos con grupos -OH generados durante la reacción sono-enzimática son menos tóxicos que los formados en el proceso enzimático; lo que significa que el ultrasonido favorece la mineralización al degradar los productos intermediarios formados durante el tratamiento enzimático [280].

Los antibióticos deben ser utilizados por prescripción veterinaria o médica ya sea para metafilaxis o profilaxis; sin embargo, el uso indiscriminado como factor de crecimiento en animales (actividad prohibida en varios países) y por automedicación en humanos genera una gran afectación al medio

ambiente y favorece el aumento y diseminación de microorganismos resistentes a los antibióticos. Como muestra esta revisión, la naturaleza química de muchos antibióticos facilita su excreción a través de la orina o las heces, tanto en animales como en humanos. El uso de antibióticos es indispensable, a pesar de que muchas organizaciones internacionales se han pronunciado a favor de su uso controlado, muchos países no cumplen con las normas y continúan con prácticas inadecuadas como el uso de antibióticos exclusivos para humanos en animales, su uso como factores de crecimiento, biocidas en cultivos, la falta de tratamiento adecuado de las aguas residuales en plantas farmacéuticas, residencias para adultos mayores, granjas y hospitales, el uso de estiércol animal como parte de los biofertilizantes y el uso de antibióticos como complemento en la alimentación animal, entre otros.

La mayoría de los antibióticos son recalcitrantes y tóxicos para el medio ambiente, ya que pueden desencadenar la eutrofización que conduce a la contaminación del agua y al desequilibrio de los nutrientes, y la exposición de los microorganismos a las concentraciones subletales de antibióticos también presiona la resistencia a los mismos, lo que conduce irremediablemente a la transmisión de microorganismos resistentes y, en consecuencia, al fracaso terapéutico en los seres humanos y los animales. Muchos procedimientos físicos y químicos han demostrado ser eficaces y mejorar la gestión de las aguas residuales que contienen residuos de antibióticos, pero el tratamiento de estas aguas residuales mediante enzimas (incluidas las lacasas) es muy prometedor y parece ser menos costoso.

2.3. Lacasas recombinantes

En basidiomicetos, las lacasas extracelulares son sintetizadas durante el metabolismo secundario; sin embargo, su producción es muy baja y los altos costos en el proceso de purificación hacen que sea poco atractivo el uso industrial de lacasas nativas. Por tanto, se han implementado diferentes estrategias para aumentar la producción enzimática, reduciendo costos y tiempo [13, 14]. El uso de lacasas recombinantes es una alternativa para facilitar el proceso de purificación y aumentar la producción [15]. Para simplificar el downstream se utilizan múltiples copias de genes, la optimización de codones, promotores fuertes y eficientes y secuencias señales adecuadas para la secreción de la enzima al medio de cultivo [15]. Las lacasas recombinantes han sido producidas en diferentes hospederos, los hongos filamentosos han sido llamativos para la producción de lacasas recombinantes ya que tienen la capacidad de secretar proteínas al medio; sin embargo, sólo un

número limitado de hongos, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Trichoderma reesei* [13] han sido utilizados para la expresión heteróloga de lacasas [15].

Las bacterias, debido a su manipulación fácil y económica también han sido utilizadas para producir lacasas recombinantes. *Escherichia coli* ha sido un hospedero ampliamente utilizado, ya que está caracterizado fisiológica y genéticamente [328]; sin embargo, en algunos casos se ha reportado baja productividad y rendimiento, debido a que las enzimas recombinantes pueden formar agregados (cuerpos de inclusión) y por tanto, son difíciles de purificar. Susuki et al., (2003) expresaron la lacasa de *Streptomyces lavendulae* en *E. coli* y detectaron la naturaleza agregativa con otras enzimas de *E. coli*, haciendo difícil su purificación [15, 329]. *Bacillus subtilis* ha sido utilizado para la producción de lacasas ya que tiene la capacidad de secretar gran cantidad de enzimas al medio de cultivo; sin embargo, los plásmidos recombinantes son poco estables en *B. subtilis* y los rendimientos son menores debido a la alta actividad proteolítica [328].

Las levaduras han sido los hospederos más utilizados para la producción de lacasas recombinantes [15], ya que presentan ventajas como fácil manipulación genética, medios de cultivos económicos y también, tienen la capacidad para realizar modificaciones postraduccionales [13]. También, la ingeniería de lacasas permite la producción de enzimas con ciertas propiedades; mayor estabilidad en amplios rangos de temperaturas y pH y aumento de la afinidad por el sustrato (K_M). Por otra parte, la expresión de lacasas depende de la especie de levadura, e igualmente de la isoforma de la lacasa. Además, la producción de lacasas en levaduras ha permitido el estudio y caracterización a mayor profundidad a nivel molecular y estructural de las lacasas [15].

2.3.1. Expresión de lacasas en *Pichia pastoris* (actualmente *Komagataella phaffii*)

Pichia pastoris ha sido utilizada como modelo de expresión de genes heterólogos para la producción de enzimas recombinantes ya que presenta ventajas sobre otros sistemas de expresión eucariotas (hongos filamentosos, células de mamíferos o insectos); el costo de medios, los equipos e infraestructuras para los cultivos de levadura son más económicos que los de células de mamíferos o insectos [330]. Además, *Pichia pastoris* tiene una alta tasa de crecimiento, altos niveles de productividad, es de fácil manipulación genética, se cuenta con varios vectores de expresión muy caracterizados y no es patógena para humanos ya que no produce endotoxinas.

Por otra parte, las lacasas secretadas son glicosiladas; modificación post-traducciona que confiere estabilidad a los centros de cobre, protege contra la proteólisis, participan en el direccionamiento de la secreción de la enzima y en el aumento en la termoestabilidad [331]. También, se sugiere que la glicosilación puede provocar ligeros cambios en las propiedades cinéticas y en el pH óptimo de la enzima [332]. *Pichia pastoris* realiza modificaciones postraduccionales, lo que representa una para la expresión de algunas proteínas.

Pichia pastoris también tiene la capacidad de expresar genes que codifican para enzimas relacionadas con la degradación del metanol; el cual puede ser empleado como única fuente de carbono y energía [330, 333]. Dentro de estas enzimas se encuentra la alcohol oxidasa 1 (AOX 1) (E.C.1.1.3.13) regulada por el promotor *AOX* [334]. La enzima AOX 1 cataliza el primer paso en el metabolismo del metanol; la conversión de metanol en formaldehído; sin embargo, tiene baja afinidad por el metanol por lo que es necesario la producción de grandes cantidades de la enzima para mantener el crecimiento en metanol [335], la enzima AOX 1 representa el 90 % del total de la actividad alcohol oxidasa en la célula e igualmente representa el 30 % del total de proteínas en las células crecidas en metanol [330, 334].

Cuando la levadura crece en presencia de glicerol, glucosa o etanol, el *pAOX* es reprimido (represión por catabolito) por tanto, no se sintetiza la enzima AOX 1, mientras que, en presencia de metanol como única fuente de carbono la síntesis de la enzima es inducida [333]. Con esto, ha sido posible regular la expresión de la alcohol oxidasa a nivel transcripcional y el *pAOX* puede usarse para controlar la expresión de genes foráneos, los cuales pueden estar encendidos o apagados en presencia o ausencia de metanol respectivamente [330]. Otro promotor empleado en la expresión de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris* es el *pFLD1*, el cual regula la enzima formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (E.C. 1.2.1.1), [336]. La enzima es sintetizada en presencia de metanol o de metilamina. Sin embargo, la expresión de proteínas heterólogas reguladas por promotores que son inducidos por metanol tiene algunas desventajas; el metanol es inflamable, por lo que la manipulación de altas cantidades no es recomendable y es tóxico para la célula a ciertas concentraciones. Igualmente, algunos autores afirman que el monitoreo del metanol residual durante el proceso de producción suele ser complicado [334].

También, el *pGAP* que regula la expresión de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (E.C.1.2.1.12) ha sido empleado en la producción de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*. Es un

promotor fuerte y constitutivo, capaz de alcanzar niveles de expresión similares y mayores al *pAOX1* [335]. Al ser constitutivo no requiere una fase de inducción, lo que acorta y simplifica el proceso de producción de la enzima. Por tanto, el *pGAP* ha sido una alternativa al *pAOX1* en la expresión heteróloga. A pesar de ser constitutivo, la fuerza de la expresión del promotor es influenciada por las diferentes fuentes de carbono; las células crecidas en glucosa presentan mayor expresión de la enzima GAP que las células crecidas en glicerol, ácido oleico o metanol [337].

Otro promotor fuerte empleado en la expresión heteróloga de proteínas es el *pTEF 1*, que regula la proteína factor de elongación de traducción 1 alfa, un componente de gran importancia en la traducción eucariota que media la transferencia del aminoacil-tRNA hasta el ribosoma, para su incorporación en la cadena polipeptídica naciente [335]. Este promotor ha mostrado una expresión constitutiva y fuerte. En *Pichia pastoris*, su expresión está asociada a la fase de crecimiento y el nivel de expresión es similar al del *pGAP* [338]. También, existen otros promotores que han sido estudiados y utilizados en la expresión de *Pichia pastoris*; sin embargo, su expresión es débil, o inferior con relación a *pGAP* [335].

2.4. Estudios computacionales de lacasas

Las herramientas bioinformáticas facilitan la predicción de mecanismos moleculares y el comportamiento de enzimas frente a diferentes ligandos con el fin de obtener una estimación previa de su potencial uso industrial en procesos de biorremediación. Además, es económico realizar esta simulación computacional previo a los ensayos experimentales. La interacción enzima-sustrato puede ser evaluada a través de análisis de acoplamiento molecular [22, 339-344] y dinámica molecular [33]; para estos estudios se utilizan algoritmos para calcular las interacciones electroestáticas de los residuos de los aminoácidos en contacto con los sustratos específicos a estudiar [345].

Las herramientas informáticas permiten la predicción de las propiedades de una molécula mediante la modelación por homología de su estructura 3D. El conocimiento estructural de las moléculas es un requisito indispensable para análisis de acoplamiento molecular, este se constituye como la mayor limitante debido a que en muchos casos no se conoce la estructura terciaria de las proteínas, ya que estas no han sido purificadas y cristalizadas [340-344].

Los procedimientos experimentales para la determinación de estructuras presentan ciertas desventajas y limitaciones, debido a que durante la cristalización de utilizan cristales altamente hidratados estos pueden causar distorsión de algunas regiones ya que en ocasiones no es claro si un átomo corresponde a la proteína o a la molécula de agua. También, con técnicas como la resonancia magnética nuclear (NMR por sus siglas en inglés) se puede determinar la estructura de proteínas; sin embargo, estas deben ser proteínas pequeñas de difícil cristalización (menores a 30 kDa) [341]. Igualmente, la determinación experimental de la estructura es costosa y requiere una alta demanda de tiempo [346].

Se ha documentado el estudio de las interacciones entre lacasas y diferentes compuestos contaminantes de la industria farmacéutica. Singh et al., (2015) evaluaron computacionalmente la interacción de lacasas de *Trametes versicolor* con diferentes contaminantes provenientes de la industria farmacéutica (roxitromicina (RXT), claritromicina (CLR), indometacina (IND), bezafibrato (Bz), metoprolol (MP), celiprolol (CEL) e iopromida (IP)), para lo cual emplearon ABTS como control positivo del acoplamiento ($-328.4 \text{ Kcal mol}^{-1}$). Los contaminantes roxitromicina (RXT), claritromicina (CLR) e iopromida (IP), obtuvieron valores más bajos de energía que en el control positivo, (-396.7 , -380.5 , $-337.7 \text{ Kcal mol}^{-1}$, respectivamente), por tanto, concluyeron que estos contaminantes pueden ser degradados por lacasas, contrario a lo que sucede con los otros contaminantes, los cuales obtuvieron valores de energía superiores comparados con la degradación de ABTS, como indometacina (IND) ($-294.0 \text{ Kcal mol}^{-1}$), bezafibrato (Bz) ($-304.7 \text{ Kcal mol}^{-1}$), metoprolol (MP) ($-263.6 \text{ Kcal mol}^{-1}$) y celipropol (CEL) (-299.7) [347].

Sakar et al., (2020) analizaron computacionalmente la estructura de lacasas producidas por *Thermus thermophilus*, las proteínas fueron caracterizadas bajo parámetros fisicoquímicos, en donde se determinó que están principalmente compuestas por aminoácidos alifáticos con carga negativa, mayoritariamente de valina y en menor proporción de cisteína. También, debido al alto valor del índice alifático (41.29) y a la presencia de puentes de sal en su estructura se determinó que son enzimas termoestables. Además, se identificó la presencia de plegamientos al azar que juegan un papel importante en la flexibilidad y cambios conformacionales de la proteína. Por otra parte, el análisis de Ramachandran muestra la distribución estadística de los ángulos de torsión de los residuos de aminoácidos de una proteína en las regiones favorecidas, permitidas y no permitidas estéricamente, en este caso se determinó que más del 90 % de los aminoácidos se encontraban en regiones favorecidas energéticamente, demostrando una alta calidad del modelo. Adicionalmente,

de acuerdo con el valor negativo de la hidropatía, confirmaron que las lacasas son hidrofílicas, además de identificar los sitios de unión y los motivos funcionales de las lacasas [346].

Cárdenas-Moreno et al., (2019) evaluaron computacionalmente las interacciones de las lacasas de *Ganoderma weberianum* con diferentes compuestos farmacéuticos incluyendo antibióticos como tetraciclina (TE) y sulfisoxazol (FIS). En el estudio modelaron y optimizaron la estructura de la lacasa, identificaron el sitio activo de unión al sustrato y las conformaciones angulares permitidas, para establecer las coordenadas del acoplamiento, también modelaron los ligandos. Los autores corrieron diferentes análisis teniendo en cuenta conformaciones al azar y el número de interacciones, utilizando ABTS ($-7.1 \text{ Kcal mol}^{-1}$) y DMP ($-4.8 \text{ Kcal mol}^{-1}$) como controles positivos. Se observó que la tetraciclina (TE) no tuvo interacción con ningún sitio de unión; sin embargo, tuvo una energía de $-5.2 \text{ Kcal mol}^{-1}$, debido probablemente por la alta densidad de grupos polares incapaces de interactuar con los residuos de aminoácidos del sitio activo. El sulfisoxazol (FIS) tuvo una energía de $-6.8 \text{ Kcal mol}^{-1}$ y se detectó una interacción hidrofóbica con un aminoácido y una distancia de interacción atómica menor 7 \AA . Esta distancia entre un átomo del ligando y un átomo del receptor indica la orientación relativa de estos. Distancias muy pequeñas ($<1.5 \text{ \AA}$) representan una superposición atómica generando una gran fuerza repulsiva, mientras que distancias más grandes dan como resultado una baja energía efectiva constante [348].

Por otra parte, se calculó la desviación cuadrática media (RMSD por sus siglas en ingles), en este análisis se realiza la comparación estructural por medio de un alineamiento de dos estructuras. A menor valor de RMSD, mayor similitud entre estructuras; sin embargo, este criterio depende del tamaño de la estructura [341, 349], valores inferiores a 3.0 \AA (valores típicos de RMSD en proteínas homólogas) indican que los modelos son de alta calidad. en este caso se obtuvo 1.991 para lacasa-sulfisoxazol (FIS) y 1.318 para lacasa-tetraciclina (TE), lo que sugiere una gran habilidad de estos sustratos para interactuar con el sitio de unión activo de lacasa [350].

2.5. Antecedentes del trabajo en el grupo de investigación

El grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI) expresó de manera recombinante las lacasas rPOXA 1B y rGILCC 1 de *P. ostreatus* y *Ganoderma lucidum* respectivamente en *P. pastoris* (actualmente *Komagataella phaffii*) [22]. Para la expresión se utilizó el promotor constitutivo de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*pGAP*), con el objetivo de evitar el uso de metanol como

fuente de carbono inductora de la expresión cuando se utiliza el *pAOX 1*. Para facilitar la expresión se optimizaron las secuencias génicas de ambas enzimas, se ajustaron los codones de inicio, el contenido de guanina y citocina, los elementos regulatorios en *cis*, se agregaron sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *EcoR I* y *Not I* y se eliminaron los péptidos señal nativos para que el gobierno de la secreción estuviera a cargo de la señal de secreción leader del α -factor de *S. cerevisiae*. Posteriormente, se propuso un modelo computacional 3D de las enzimas, en el cual se determinó que ambas presentan alta identidad de secuencia y estructura con enzimas de *Trametes versicolor*. Con esto se identificó la ubicación de los iones de Cu^{2+} y los diferentes dominios estructurales [22].

Posteriormente se realizó la clonación en *Pichia pastoris* X33, obteniéndose los clones X33/pGAPZ α A-*LaccGluc-Stop* y X33/pGAPZ α A-*LaccPost-Stop*. Al evaluar la actividad enzimática se obtuvieron valores de $0.13 \pm 0.028 \text{ UL}^{-1}$ para rGILCC 1 y $451.08 \pm 6.46 \text{ UL}^{-1}$ para rPOXA 1B. Los autores plantearon que estas diferencias podían deberse al número de copias del gen o a las interacciones del centro activo de cada enzima con el sustrato (ABTS), [22].

Con estas lacasas el Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI) ha realizado diversos estudios estadísticos para optimizar la producción y la actividad enzimática. Morales-Álvarez et al., (2017) realizaron un diseño Plackett-Burman para determinar el efecto de diferentes concentraciones de nutrientes en la actividad de rGILCC 1; de la misma manera Ardila-Leal et al (2019) implementaron estudios estadísticos de optimización para la producción de rPOXA 1B. Ambos grupos de autores estudiaron la estabilidad a temperatura, pH y parámetros cinéticos mediante la oxidación de ABTS [29-32].

Las células recombinantes (*P. pastoris* X33/pGAPZ α A-*LaccPost-Stop*) productoras de rPOXA 1B fueron inmovilizadas en alginato de calcio, para la producción de rPOXA 1B, obteniendo una actividad enzimática de $12.5 \pm 2.6 \text{ UL}^{-1}$; proceso que fue mejorado estadísticamente (Plackett-Burman, Box-Behnken) y se obtuvo $1,453.93 \pm 0.43 \text{ UL}^{-1}$ [351].

Igualmente, se estudió la remoción de colorantes empleando lacasas nativas y las recombinantes. Morales-Álvarez et al., (2018) evaluaron la degradación de los colorantes verde malaquita (VM) y cristal violeta (CV). Para el colorante CV, *Ganoderma lucidum* obtuvo un porcentaje de decoloración del 23.6 % y *Pleurotus ostreatus* del 5 %, utilizando el sobrenadante del cultivo de cepas nativas,

mientras que con los concentrados enzimáticos de las enzimas recombinantes se obtuvieron porcentajes del 9.9 % para rGILCC 1 y 7.5 % para rPOXA 1B. Para el colorante VM, se obtuvieron porcentajes del 52.1 % (*Ganoderma lucidum*) y 2.3 % (*Pleurotus ostreatus*) utilizando sobrenadante del cultivo de cepas nativas; mientras que los concentrados enzimáticos de las lacasa recombinantes presentaron menores porcentajes de decoloración, 9.4 % (rGILCC 1) y 2.1 % (rPOXA 1B). Los autores plantearon que estos resultados pudieron deberse a la presencia varias lacasas y de otras enzimas ligninolíticas en los sobrenadantes de *P. ostreatus* y *G. lucidum*, mientras que, en los concentrados de enzimas recombinantes, sólo actuó una lacasa. Igualmente, estos resultados pueden explicarse por las diferencias estructurales de los colorantes y las interacciones enzima-sustrato [35].

Ardila-Leal et al., (2019) optimizaron un medio de cultivo para la producción de la lacasa rPOXA 1B en biorreactor de 10 L, a través de un diseño experimental Plackett-Burman seguido de un diseño experimental One Factor, obteniendo una actividad enzimática de $3,159.93 \pm 498.90 \text{ UL}^{-1}$ [32].

Posteriormente, Ardila-Leal et al., (2020) diseñaron y optimizaron estadísticamente un medio de cultivo de bajo costo para aumentar la producción de la rPOXA 1B en *Pichia pastoris*. Para esto, utilizaron dos Central Composite Designs (CCD) seguidos de un One Factor Experimental Design (OFED) en los que evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno de bajo costo como extracto de malta, proteína de soya y suero de leche, de los cuales, el extracto de malta (11.74 g L^{-1}) y la proteína aislada de soya (50 g L^{-1}), hicieron parte de la composición final del medio de cultivo optimizado. Igualmente evaluaron diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio fueron evaluadas, escogiendo 20 y 4.91 g L^{-1} respectivamente. Finalmente se alcanzó una actividad enzimática de $12,877.3 \pm 481.2 \text{ UL}^{-1}$ y se redujo el costo del medio en 89.84 % [31].

Recientemente el grupo de investigación ha demostrado en varios medios de cultivo que la adición de metanol después del agotamiento de la glucosa, estimula la producción de rPOXA 1B pese a que el gen se encuentra bajo el control del *pGAP*; lo que rompe con el hábito de utilizar *pGAP* estrictamente con glucosa [30], obteniendo una actividad de $14,868.06 \pm 461.58 \text{ UL}^{-1}$.

2.5.1. Estudios computacionales de GILCC 1 y POXA 1B realizados por el grupo GBAI

Sáenz-Suárez et al., (2014) predijeron modelos computacionales de la estructura secundaria y terciaria de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B para esto, obtuvieron las secuencias génicas del GenBank, y posteriormente se realizaron alineamientos con múltiples proteínas de estructura conocida experimentalmente, se obtuvieron fragmentos de otras moléculas con secuencias similares;

para las lacasas GILCC 1 y POXA 1B se obtuvo homología con 100 moléculas diferentes incluyendo lacasas de distintas especies. De acuerdo con los modelamientos 3D se obtuvieron los porcentajes correspondientes a hélices, hojas plegadas y plegamientos al azar de ambas enzimas, corroborando que son enzimas globosas. Finalmente se realizó una validación de los modelos con lacasas producidas por *Trametes versicolor*, y se observó una identidad del 79.158 y 61.741 % para GILCC 1 y POXA 1B respectivamente, (valores superiores al 40 % se consideran dentro del rango de aceptación). También, se evaluó la calidad de las estructuras mediante el cálculo del QMEAN4, un valor compuesto por cuatro parámetros estadísticos que estima la confiabilidad del modelo, en este caso se obtuvieron valores de 0.719 y 0.755 para GILCC 1 y POXA 1B (valores debajo de 1 se consideran confiables). También, se realizó un análisis RMSD, se obtuvieron valores de 0.38 y 1.25 para GILCC 1 y POXA 1B respectivamente. Por lo anterior, se sugirió que los modelos elaborados eran susceptibles a existir en la naturaleza y que tenían una alta probabilidad de realizar una actividad biológica [341].

Rivera-Hoyos et al., (2015) analizaron por medio de acoplamiento molecular la interacción entre el ABTS y las lacasas GILCC 1 y POXA 1B; para esto se realizaron un análisis estructural mediante BLAST utilizando el PDB y demostraron que las lacasas producidas por *Trametes versicolor* tienen una alta identidad a nivel de secuencia con las lacasas producidas por *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum*. Determinaron que a nivel estructural presentan 83.5 % (GILCC 1) y 84.9 % (POXA 1B) de identidad con relación a 1GYC (estructura cristalográfica de *T. versicolor* en el PDB). Para los modelos se obtuvieron valores de QMEAN de 0.988 y 0.797 para POXA 1B y GILCC 1, respectivamente, se estableció que la estructura molecular de estos modelos coincide con las estructuras anteriormente descritas para las enzimas lacasas. Al realizar el acoplamiento molecular con el ABTS se observó que la interacción ocurría en el sitio activo de la proteína y se determinó que POXA 1B tenía mayor afinidad por el sustrato comparada con GILCC 1. También, los valores de RMSD fueron cercanos al modelo 3ZDW (lacasa de *Trametes versicolor*, único complejo LACASA-ABTS que se ha cristalizado), 4.036 Å para GILCC 1, con energía de enlace de $-4.97 \text{ Kcal mol}^{-1}$, y 5.618 Å para POXA 1B y una energía de enlace de $-4,15 \text{ Kcal mol}^{-1}$ [22].

Ardila-Leal et al., (2021) analizaron la estabilidad a tiempo real, acelerada y por dinámica molecular de la lacasa POXA 1B; analizaron la estabilidad a tiempo real, acelerada y por dinámica molecular de la lacasa POXA 1B; se evaluaron cinco temperaturas de almacenamiento (243.15 K 277.15 K, 298.15 K, 303.15 K, 308.15 K y 313.15 K) durante 12 meses y se realizaron mediciones de diferentes

parámetros cinéticos incluyendo valores de actividad enzimática, tamaño de la población, (N), V_{max} , y K_M . En base a estos estudios de estabilidad en tiempo real se calculó la estabilidad enzimática acelerada, se obtuvieron parámetros como la constante de inactivación, (k_d), energía de inactivación (Ed), y tiempo medio enzimático ($t_{1/2}$) También, se calcularon parámetros termodinámicos (ΔH , ΔG , ΔS). De acuerdo con los parámetros cinéticos y termodinámicos obtenidos se estableció que durante los 12 meses la enzima presentó una alta estabilidad comparada con otras lacasas; durante el estudio los valores de V_{max} y K_M presentaron variación; sin embargo, no fue significativa. También se obtuvieron valores altos de Ed ($41.40 \text{ KJ mol}^{-1}$), valores altos y constantes de ΔH y ΔG y valores negativos de ΔS , indicando una alta estabilidad, máxima compacidad y mayor resistencia al proceso de inactivación térmica. Además, los valores de $t_{1/2}$ demostraron que a temperaturas entre $240 \pm 5.38 \text{ K}$ y $277.40 \pm 1.32 \text{ K}$ la enzima presenta estabilidad por 230 y 46 meses respectivamente, tiempos de vida media mayores a otras lacasas. Por otra parte, estos resultados fueron soportados por dinámica computacional ya que las temperaturas simuladas presentaron algunas fluctuaciones producto del incremento de la temperatura. Para esto se realizaron análisis de RMSF y PCA, que demostraron que residuos como LYS³⁰⁹ y ALA³⁶³ permanecieron constantes durante la exposición a diferentes temperaturas, indicando la resistencia del sistema en esos residuos; sin embargo, algunas regiones presentaron flexibilidad, movimientos de átomos de la estructura de la proteína, al igual que sitios de interacciones débiles en regiones [33].

2.6. Otros estudios de lacasas producidas en *Pichia pasatoris*

Igualmente, otros autores han estudiado la expresión de lacasas en *Pichia pastoris*. Xu et al., (2019) expresaron de manera recombinante la lacasa Lcc9 de *Coprinopsis cinerea* en *P. pastoris* GS115, bajo la regulación del *pAOX1*. Se aplicó un diseño experimental ortogonal con el fin de optimizar las condiciones de expresión, alcanzándose una actividad de 3138 UL^{-1} . Igualmente se observó que la actividad específica de la lacasa recombinante (rLcc9) presentó mayores valores (315.3 U mg^{-1}) que la lacasa nativa (92.9 U mg^{-1}). Además, se evaluó la remoción de diferentes colorantes por parte de rLcc9, presentando valores del 99 %, en amplios rangos de temperatura y pH [352].

Huang et al., (2011) expresaron la enzima lacasa *lac1* del hongo *Ganoderma fornicatum* en *Pichia pastoris*; para lo cual evaluaron la actividad enzimática en diferentes sustratos como ABTS, guaiacol y dimetilformamida (DMP). También, establecieron los valores óptimos de pH (2.5 y 3.0 ± 0.2) y temperatura (valores entre 55 y $60 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Luego de 7 días de incubación la lacasa recombinante

(rlac1) alcanzó una actividad enzimática de 3.46 U mL⁻¹; valor 29 veces mayor que la actividad enzimática de la lacasa nativa (0.12 U mL⁻¹), [353].

Li et al., (2014) expresaron de manera recombinante la lacasa lccA producida por *Trametes versicolor* en *Pichia pastoris*. Se optimizaron las condiciones de expresión mediante diseños experimentales, alcanzándose una actividad enzimática de 11.97 UL⁻¹. Los resultados de la optimización fueron extrapolados a la producción de la enzima en biorreactor de 5 L, en donde se alcanzó una actividad de 18.23 UL⁻¹ [354].

También, Behrens et al., (2017) expresaron de manera recombinante la lacasa PpuLcc producida por *Pleurotus pulmonaris* en *Pichia pastoris* GS115. Se alcanzó una actividad enzimática de 7,000 UL⁻¹ mediante la optimización de los codones. Igualmente, se evaluó la capacidad de remoción de colorantes, para lo cual se añadió ABTS para incrementar la tasa de reacción, permitiendo 90 % de decoloración del colorante azul bromofenol [355].

Avelar et al., (2017) expresaron la lacasa de *Corioloopsis gallica* en *Pichia pastoris* bajo la regulación del *pAOX1*. Variables como las concentraciones de metanol y sales de cobre, y la temperatura fueron optimizadas y se alcanzó una actividad enzimática de 250 UL⁻¹ y una producción de 3.75 mg L⁻¹ de lacasas. También, se demostró que las características funcionales de la enzima recombinante fueron similares a la enzima nativa [356].

Por otra parte, Liu et al., (2020) expresaron de manera recombinante la lacasa del hongo *Lentinula edodes* en *Pichia pastoris* con el fin de optimizar la degradación de paja compuesta principalmente por lignina. Se evaluaron diferentes sustratos fenólicos y no fenólicos, incluyendo ABTS, 2,6-dimetoxi fenol (DMP), o-tolidina, ácido 3-aminobenzoico y guaiacol. La lacasa recombinante (LeLac) mostró máxima actividad enzimática sobre los sustratos o-tolidina y ABTS con pH óptimo de 4.0 y 3.0 ± 0.2 y temperaturas de 50 y 60 ± 2 °C respectivamente. Sin embargo, la enzima no presentó estabilidad térmica a 60 ± 2 °C. El pH óptimo para la degradación de la lignina presente en la paja fue de 4.0 ± 0.2. También, la actividad enzimática aumentó 15 % en presencia de iones de Cu²⁺ [357].

Song et al., (2020) expresaron la lacasa lac-2 producida por *Pleurotus ostreatus* en *Pichia pastoris* X33, determinaron las condiciones óptimas de temperatura (50 ± 2 °C) y pH (3.0 - 3.5 ± 0.2). Igualmente,

se encontraron diferencias significativas entre los valores de degradación de lignina de la lacasa recombinante (18.36 %) vs. la nativa (14.05 %), [358].

3. Justificación

El uso de los antibióticos en ganadería y en humanos es desmesurado. Se espera que en el 2030 se consuman aproximadamente 100.000 toneladas de antibióticos. Por sus características químicas, los antibióticos no son metabolizados completamente en los humanos y en animales, por lo que más del 60 % de la dosis es excretada al medio ambiente sin cambios en su estructura, contaminando suelos y cuerpos acuáticos. En la literatura se han reportado diferentes estudios sobre la presencia de antibióticos en aguas subterráneas, aguas superficiales, lodos e incluso, aguas potables. La presencia de estos compuestos en el medio ambiente representa un grave problema, pues se ha demostrado que son tóxicos, se bioacumulan y también afectan los ciclos biológicos naturales. Además, se ha reportado que la presencia de antibióticos en el medio ambiente es la principal causa de resistencia bacteriana a los antibióticos, representado una amenaza crítica de salud pública al potenciar la resistencia antimicrobiana, entre otros. Se ha demostrado que las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales no son capaces de eliminar estos compuestos del agua, por lo que varios autores sugieren que las plantas de tratamiento de aguas residuales deberían contar con un tratamiento terciario o biológico capaz de eliminar los antibióticos del agua. Las lacasas presentan una alternativa prometedora a los métodos tradicionales. Estas enzimas poseen la capacidad de oxidar y degradar una gran variedad de compuestos incluyendo antibióticos. Además, el estudio de las lacasas GILCC 1 de *Ganoderma lucidum* y POXA 1B de *Pleurotus ostreatus* en su interacción con antibióticos representa una alternativa para degradar los antibióticos del medio ambiente, evitando la resistencia a los antibióticos y la contaminación ambiental. A pesar de que varios autores han estudiado la degradación de antibióticos utilizando lacasas, la especificidad por los sustratos entre lacasas puede variar significativamente. El potencial de oxidoreducción de las lacasas y su especificidad dependen entre otras cosas, de los aminoácidos que conforman el bolsillo del centro activo de la enzima. GILCC 1 y POXA 1B, aún no han sido estudiadas en la degradación de antibióticos. GILCC 1 y POXA 1B al presentar un alto potencial de oxidoreducción y una alta actividad enzimática respectivamente representan una alternativa prometedora para la degradación de antibióticos. En el ámbito computacional, técnicas como el acoplamiento y la dinámica molecular son cruciales para comprender a nivel molecular cómo interactúan las lacasas y los antibióticos y cómo evolucionan estas interacciones en el tiempo. En conjunto, el estudio de las lacasas GILCC 1

y POXA 1B representa una estrategia prometedora para combatir la resistencia antibiótica y mitigar la contaminación.

4. Objetivo General

Demostrar computacionalmente si la interacción entre las lacasas GILCC 1 de *Ganoderma lucidum* y POXA 1B de *Pleurotus ostreatus* con antibióticos de uso humano y/o animal sugiere una posible degradación de los ligandos.

3.1. Objetivos específicos

1. Generar y validar un nuevo modelo computacional de la lacasa GILCC 1 de *Ganoderma lucidum*
2. Caracterizar molecularmente la interacción de las enzimas GILCC 1 y POXA 1B con antibióticos (ligandos) de uso común en humanos y animales (acoplamiento molecular).
3. Simular computacionalmente la dinámica molecular de las interacciones de las enzimas GILCC 1 y POXA 1B con los ligandos.

4. Materiales y Métodos

4.1. Modelado y parametrización del centro activo de las enzimas GILCC 1 y POXA 1B

En ausencia de una estructura cristalográfica previamente descrita para la GILCC 1 de *Ganoderma lucidum*, se realizó un modelo 3D de la enzima. Para identificar y eliminar los aminoácidos del péptido señal, se introdujo la secuencia de la enzima en el servidor SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). La estructura 3D de la lacasa se predijo y analizó según la metodología utilizada previamente por [Ardila-Leal et al., \(2021\)](#) utilizando el servidor Swiss-model. La parametrización del modelo del cobre (Cu^{2+}) T1 y del TNC en el bolsillo de unión de GILCC 1 se realizó con el constructor de parámetros de centros metálicos basado en Python (MCPB.py) [359] incluido en el paquete Amber tools 18 [360], apoyado por cálculos de Gaussian 16 ([Frisch et al. 2016](#)).

El modelo de la enzima POXA 1B utilizado en este estudio fue previamente generado, validado y parametrizado a pH 3.0 por [Ardila-Leal et al., \(2021\)](#); siguiendo la misma metodología se parametrizaron los modelos 3D de GILCC 1 a pH 3.0 y 7.0, así como de POXA 1B a pH 7.0 [361].

4.2. Dinámica molecular con las enzimas GILCC 1 y POXA 1B

Se realizó una dinámica molecular en Amber 18 [360] con el fin de evaluar la estabilidad de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B sin la presencia de ligandos. Para esto, se realizó la minimización de energía utilizando 100.000 pasos del algoritmo de descenso seguido de 100.000 pasos de gradientes conjugados. El sistema se calentó a 300 K utilizando un conjunto canónico (NVT) y el termostato Langevin con una frecuencia de colisión de 1.0 ps^{-1} y un tamaño de paso de 0.001 ps. Posteriormente se realizó la simulación de densidad y producción con tiempos de 1000 ps, 200000 ps respectivamente, utilizando un ensamblaje isotérmico-isobárico (NPT), con restricciones en la longitud de los enlaces de hidrógeno (SHAKE). Los archivos de las trayectorias (200 ns) se analizaron cada 2000 ps. [Ardila-Leal et al., \(2021\)](#) también realizaron la dinámica molecular con el modelo 3D de POXA 1B utilizando los mismos parámetros de este estudio [361].

4.3. Selección de los ligandos (antibióticos)

Previo a la selección de los ligandos se preparó una biblioteca de los antibióticos de uso humano y/o animal, incluyendo los antibióticos aprobados por la FDA, por el INVIMA y por el ICA según las regulaciones colombianas. Los criterios de selección fueron: incluir antibióticos de importancia crítica según la OMS, de amplio espectro, de uso humano y animal y con un PM cercano o inferior al peso molecular (PM) del ABTS (514.62 Da). Se excluyeron los antibióticos en los que ya se haya descrito su degradación utilizando lacasas. Para corroborar la información de selección de antibióticos y complementar la información de la librería se consultó la base de datos DrugBank (<https://www.drugbank.ca>).

4.4. Preparación de los ligandos (antibióticos)

Para la selección de ligandos se construyó una biblioteca con 226 entradas (antibióticos); cada entrada incluyó información sobre la importancia del antibiótico, su uso, los microorganismos susceptibles, la prescripción y sus características químicas y farmacológicas. Una vez seleccionados los antibióticos se revisó si el ligando fue co-cristalizado en alta resolución, de lo contrario, se descargó de la base de datos DrugBank o PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los ligandos se prepararon empleando el software Avogadro [362] en el cual se realizó la asignación de cargas, la minimización de energía y el ajuste de la protonación del ligando de acuerdo con los pH a evaluar. La posición inicial, la orientación y las torsiones de las moléculas de ligando se establecieron al azar. La optimización de la estructura se realizó con Gaussian 09 [363].

4.5. Preparación de los modelos 3D de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B

En las enzimas GILCC 1 y POXA 1B se ajustaron los estados de protonación de las cadenas laterales a pH 3.0 y 7.0, la protonación fue realizada usando el servidor H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/>). Para la preparación de las enzimas se adicionaron hidrógenos polares y se mantuvo el campo de fuerza ff14SB para modelar todos los residuos de la lacasas durante la parametrización de cada centro activo [364].

4.6. Acoplamiento molecular de los modelos 3D de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B con los ligandos

4.6.1. Identificación de los residuos que hacen parte del bolsillo de unión al sustrato de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B

El acoplamiento proteína-ligando se hizo para predecir la interacción de las enzimas con los antibióticos empleando el software AutoDock Tools y AutoDock Vina. Para el cálculo del Grid se detectaron los residuos que hacen parte del bolsillo de unión al sustrato, utilizando el programa FTsite (<https://ftsites.bu.edu/>) [365] y se confrontaron con los residuos característicos reportados en otras investigaciones para las dos enzimas [361].

4.6.2. Parámetros del acoplamiento molecular entre los modelos 3D de las enzimas GILCC 1 y POXA 1B con los ligandos

En cada acoplamiento se realizaron 10 ejecuciones una exhaustividad de 20. La eficiencia de unión y las interacciones lacasa-ligando se evaluaron a través de la energía libre de Gibbs (ΔG), empleando Autodock Vina con acoplamiento semiflexible. El ABTS se utilizó para comparar los resultados del acoplamiento molecular, al ser la molécula más frecuentemente utilizada en la medición de la actividad lacasa.

4.6.3. Comparación de la conformación del ABTS acoplado con los receptores vs. la conformación del ABTS en el complejo cristalizado 3ZDW

Se realizó el cálculo del RMSD para evaluar qué tan parecida es la conformación adoptada por el ABTS acoplado a los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B vs. al ABTS acoplado al complejo cristalizado con la lacasa de *Bacillus subtilis* (3ZDW). El cálculo se realizó con el programa Pymol (<http://www.pymol.org/pymol>) [366-368].

4.6.4. Análisis de las interacciones de los complejos enzima-ligando

En la mejor conformación de cada uno de los complejos enzima-ligando y la menor (ΔG) se describieron las interacciones de los residuos empleando el programa Maestro 10.5. Se utilizaron las siguientes convenciones para representar estas interacciones (**Figura 4**).

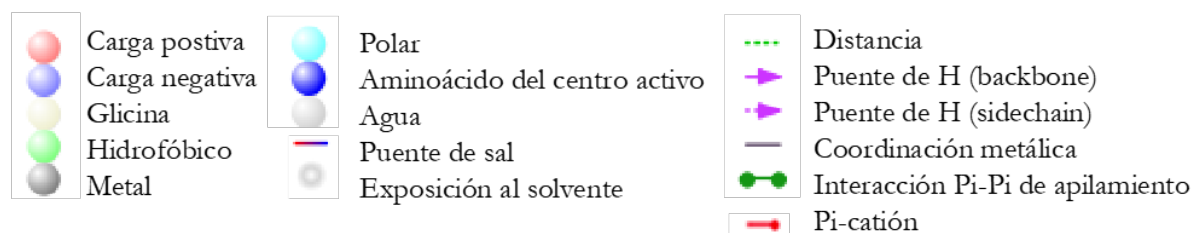


Figura 4. Convenciones utilizadas para representar las interacciones formadas entre las enzimas y los ligandos (Tomado de: <https://www.schrodinger.com/products/maestro>).

4.7. Simulaciones de la dinámica molecular GILCC 1-ligandos y POXA 1B-ligandos

Se escogieron las mejores interacciones enzima-ligando (de acuerdo a la energía de afinidad) y la cercanía al CuT1) para cada modelo y se realizaron simulaciones de dinámica molecular empleando Ambertools 18 [360]. Los archivos de topología y las coordenadas del sistema se prepararon usando el programa tleap. El complejo modelo de la enzima-ligando fue inmerso en una caja de aguas TIP3P [364] y se adicionaron iones Na^+ y Cl^- para neutralizar los sistemas y se fijó la fuerza iónica a concentración de 150 mM. Finalmente, se generaron los archivos de las topologías y las coordenadas para las diferentes etapas de simulación [369].

Se minimizó la energía de los modelos utilizando 100000 ciclos de minimización seguido de 10000 pasos de gradientes conjugados. El sistema se calentó a 300 K utilizando un conjunto canónico (NVT) y el termostato Langevin con una frecuencia de colisión de 2.0 ps^{-1} y un tamaño de paso de 2 fs para la integración de las ecuaciones de Newton. Posteriormente se realizó la simulación de densidad, equilibrio y producción con tiempos de 400 ps, 4 ns y 200 ns, respectivamente, utilizando un ensamblaje isotérmico-isobárico (NPT), con restricciones en la longitud de los enlaces de hidrógeno (SHAKE). Los archivos de las trayectorias (200 ns) se analizaron cada 0.2 ns para analizar los cambios de la geometría del complejo modelo de la enzima-ligando en comparación con el modelo de la enzima sin ligandos.

Cada complejo modelo-ligando seleccionado se solvató en una caja de aguas con parámetros TIP3P y una dimensión de 10.0 \AA entre cualquier átomo de la proteína y el borde de la caja. Se adicionaron iones Na^+ y Cl^- para neutralizar los sistemas y se fijó la fuerza iónica a una concentración de 150 mM. Finalmente, se generaron los archivos de las topologías y las coordenadas para las diferentes etapas de simulación [369].

4.7.1 Análisis de dinámica molecular - área de superficie con solvatación generalizada (MMGBSA).

El cálculo del MMGBSA permitió evaluar la estabilidad y afinidad de los complejos enzima-ligando, mediante la estimación de las energías libres de Gibbs (ΔG_{bind}). Este cálculo se realizó en aquellos complejos en los que el ligando permaneció en el bolsillo de los modelos a lo largo de toda la trayectoria.

5. Resultados

5.1. Modelado de la estructura 3D de la enzima GILCC 1

De los 50 moldes obtenidos en el servidor Siwss-model, se escogió la estructura de la lacasa producida por el hongo *Lentinus tigrinus* con código de acceso 2qt6 (1.5 Å), considerando la posición correcta de los átomos de cobre y de oxígeno del centro activo. El modelo obtenido para GILCC 1 presentó una cobertura del 100 % y una identidad del 78.98 %, con una puntuación QMEAN de 0.89 (**Figura 5**).

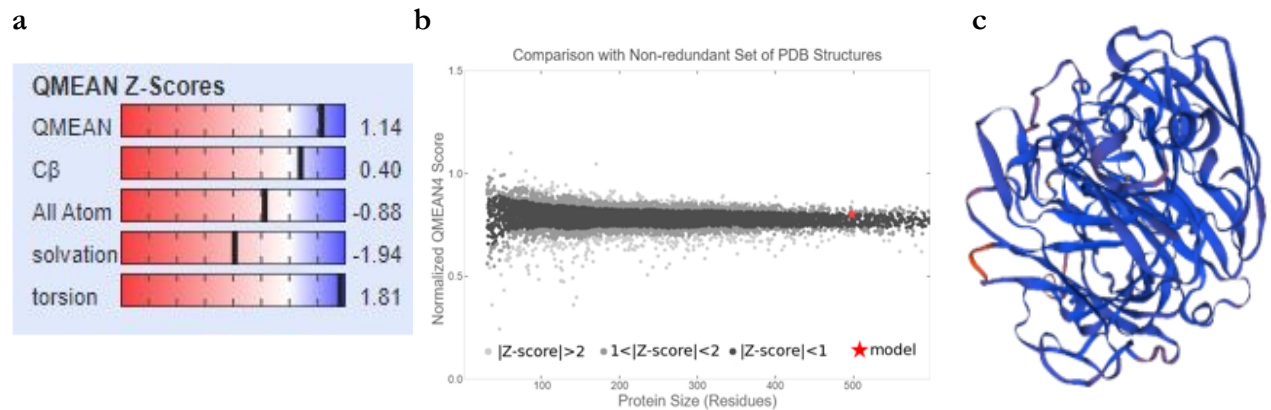


Figura 5. Calidad del modelo 3D de GILCC 1. **a.** Gráfico QMEAN, donde se observan valores confiables de Z-Scores (cerca de 1, en las zonas blancas) **b.** Gráfico de distribución, que muestra la tendencia de las puntuaciones QMEAN de un conjunto de estructuras cristalográficas de alta resolución del Protein Data Bank. El modelo generado está representado por medio de una estrella roja **c.** Modelo en cintas de color azul y rojo, la mayoría de los residuos tienden al color azul, indicando que la estructura es más confiable.

El servidor ProCheck evaluó la disposición de los ángulos diedrales mediante el diagrama de Ramachandran (**Figura 6a**). En el gráfico generado a partir del molde se observó que el 87.6 % (347 aminoácidos) de los residuos ocuparon regiones favorecidas, el 11.6 % (46 aminoácidos) ocuparon regiones permitidas. La Gly representada por triángulos se encuentra en regiones no permitidas.

El servidor PROVE, mostró en el modelo valores de 0.345 y 1.264 para el Z-score absoluto y Z score RMS respectivamente (**Figura 6b**). El gráfico del análisis ERRAT muestra regiones de discrepancia con un nivel de confianza del 99 y 95 % en rojo y en amarillo, respectivamente. Para el modelo generado, el factor de calidad global fue del 94.04 % con la mayoría de los aminoácidos por debajo del 99 % de error y del umbral de advertencia del 95 % (**Figura 6c**). El modelo 3D de

GILCC 1 mostró que el 97.19 % de los residuos tenían puntuación media 3D-1D ≥ 0.2 (Figura 6d).

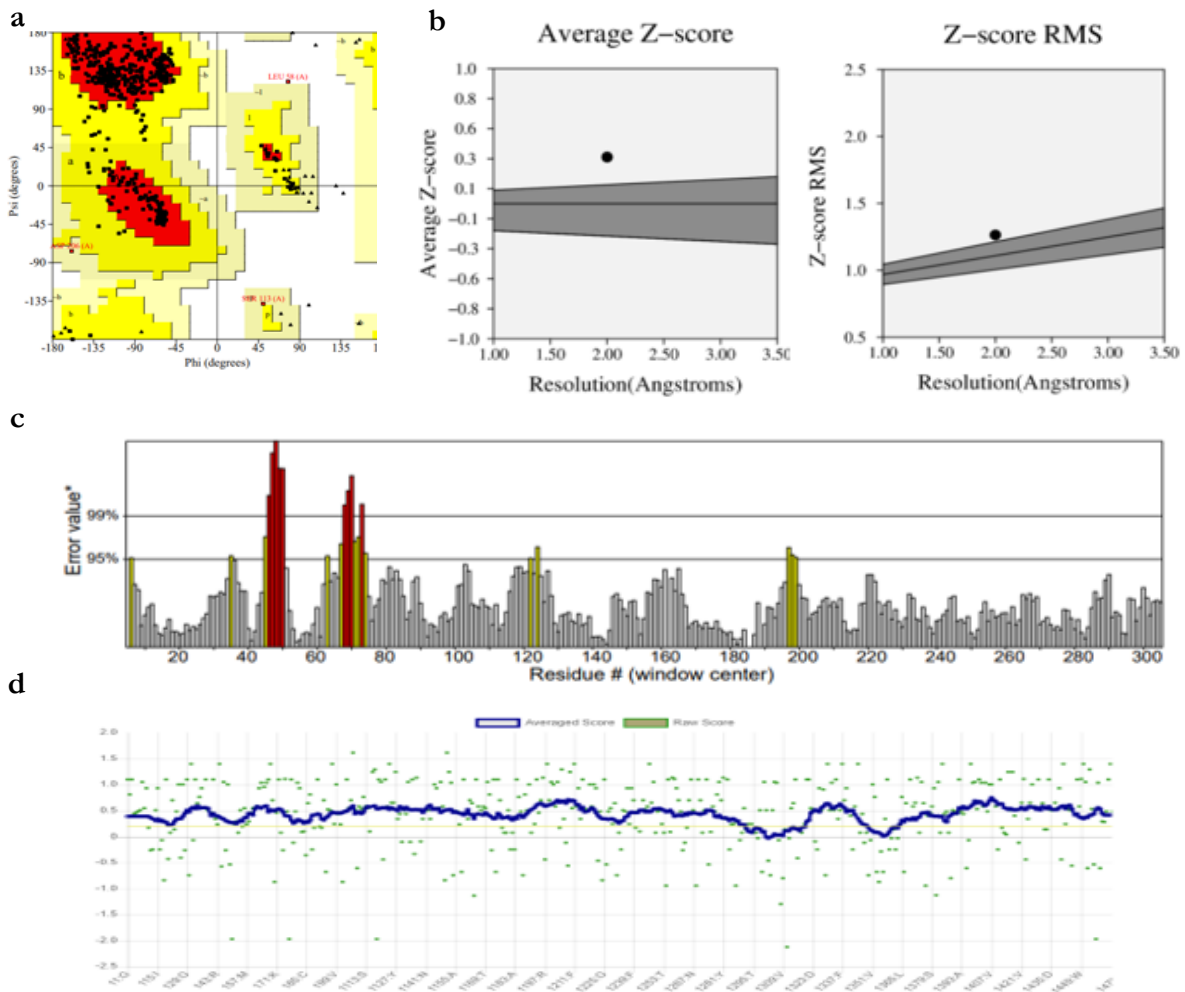


Figura 6. Validación del modelo 3D de GILCC 1. **a.** Diagrama de Ramachandran. En el eje X se observan los valores de los ángulos Φ y en el eje Y los ángulos Ψ . El color rojo representa regiones favorables, el amarillo regiones permitidas y la blanca regiones no permitidas energéticamente. El modelo fue confiable ya que más del 90 % de los aminoácidos se ubicaron en regiones permitidas. **b.** En la imagen de la izquierda se representa la desviación cuadrática media de la puntuación Z (Z-score rms) y a la derecha la puntuación Z absoluta. **c.** El gráfico muestra regiones de discrepancia con un nivel de confianza del 99 % en rojo y del 95 % en amarillo. **d.** Gráfico de Verify3D, el eje vertical da la puntuación media 3D-1D de los residuos dentro de una ventana deslizante de 21 residuos. Las regiones con una puntuación inferior a cero no fueron consideradas confiables.

La **Tabla 3** resume los resultados de la validación del modelo 3D GILCC 1 obtenidos en este estudio y los resultados obtenidos por [Ardila-Leal et al., \(2021\)](#) para el modelo 3D de POXA 1B.

Tabla 3. Comparación de los resultados de la validación de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B.

Servidor	Valor	GILCC 1 (Este estudio)	POXA 1B [361]
Swiss model	QMEAN	0.89	0.78
Procheck	Aminoácidos en zonas favorecidas	88.9	87.6
Errat2	Factor global de calidad	88.77	94.04
Verify3D	Puntuación 3D-1D	94.08	97.17

5.2. Parametrización del centro activo del modelo 3D de GILCC 1 a pH 3.0 y 7.0

La **Tabla 4** muestra los ángulos y enlaces del centro activo parametrizado a pH 3.0 del modelo 3D de GILCC 1 y los valores obtenidos para el modelo 3D de POXA 1B a pH 3.0 obtenido por [Ardila-Leal et al., \(2021\)](#).

Tabla 4. Ángulos y enlaces del centro activo parametrizado a pH 3.0 de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B.

GILCC 1 a pH 3.0 (este estudio)				POXA 1B a pH 3.0 [361]			
Ángulos °		Enlaces Å		Ángulos °		Enlaces Å	
Cu T1							
His ⁴⁵⁸ -CuT1-Cys ⁴⁵³	116.927	His ⁴⁵⁸ -CuT1	1.879	His ⁴⁵⁶ -CuT1-Cys ⁴⁵¹	129.536	His ⁴⁵⁶ -CuT1	1.832
His ³⁹⁵ -CuT1-Cys ⁴⁵³	123.260	His ³⁹⁵ -CuT1	1.929	His ³⁹⁴ -CuT1-Cys ⁴⁵¹	115.431	His ³⁹⁴ -CuT1	1.960
His ³⁹⁵ -CuT1-His ⁴⁵⁸	103.089	Cys ⁴⁵³ -CuT1	2.091	His ³⁹⁴ -CuT1-His ⁴⁵⁶	108.597	Cys ⁴⁵¹ -CuT1	2.216
Cu T2							
His ⁶⁴ -CuT2-OH	94.430	His ³⁹⁸ -CuT2	1.851	His ⁶⁴ -CuT2-OH	133.899	His ³⁹⁷ -CuT2	1.959
His ³⁹⁸ -CuT2-OH	101.349	His ⁶⁴ -CuT2	2.036	His ³⁹⁷ -CuT2-OH	108.509	His ⁶⁴ -CuT2	1.928
His ³⁹⁸ -CuT2-His ⁶⁴	164.27	CuT2-OH	1.805	His ³⁹⁷ -CuT2-His ⁶⁴	110.253	CuT2-OH	1.741
Cu T3 α							
His ¹¹¹ -CuT3-His ⁴⁰⁰	94.149	His ⁴⁵² -CuT3	1.949	His ¹¹¹ -CuT3-His ³⁹⁹	98.071	His ⁴⁵⁰ -CuT3	1.970
His ⁴⁵² -CuT3-His ¹¹¹	132.242	His ¹¹¹ -CuT3	2.083	His ⁴⁵⁰ -CuT3-His ¹¹¹	124.123	His ¹¹¹ -CuT3	1.977
His ⁴⁵² -CuT3-His ⁴⁰⁰	100.949	His ⁴⁰⁰ -CuT3	1.925	His ⁴⁵⁰ -CuT3-His ³⁹⁹	103.362	His ³⁹⁹ -CuT3	2.024
Cu T3 β							

His ⁴⁵⁴ -CuT3-His ¹⁰⁹	132.633	His ⁴⁵⁴ -CuT3	2.005	His ⁴⁵² -CuT3-His ¹⁰⁹	136.407	CuT3-His ¹⁰⁹	1.987
His ¹⁰⁹ -CuT3-His ⁶⁶	100.567	His ¹⁰⁹ -CuT3	2.022	His ¹⁰⁹ -CuT3-His ⁶⁶	103.406	CuT3-His ⁶⁶	2.069
His ⁴⁵⁴ -CuT3-His ⁶⁶	99.364	His ⁶⁶ -CuT3	2.054	His ⁴⁵² -CuT3-His ⁶⁶	94.494	CuT3-His ⁴⁵²	1.996
-	-	OH-CuT3	1.943	-	-	OH-CuT3	1.965

La **Figura 7** muestra el centro activo parametrizado de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B respectivamente [361].

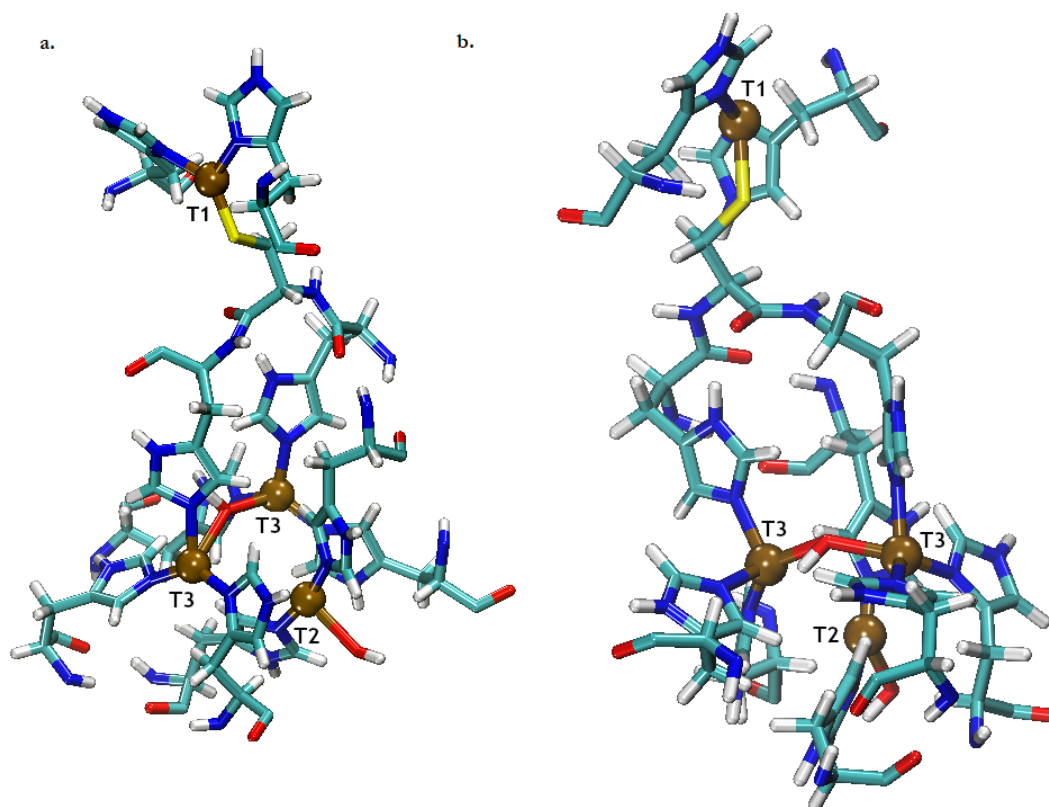


Figura 7. Centro activo parametrizado de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B a pH 3.0. Centro activo parametrizado a pH 3.0 de los modelos 3D de **a.** GILCC 1 y **b.** POXA 1B. En color café se muestran los cobres T1, T2 y T3 y alrededor, los aminoácidos que coordinan los cobres.

5.3. Parametrización del centro activo de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B a pH 7.0

En el modelo generado para POXA 1B a pH 7.0, los aminoácidos que coordinan el Cu T1, específicamente la His³⁹⁵ y la Cis⁴⁵¹ presentaron entre ellos una distancia menor a 2.5 Å. Adicionalmente, el cambio de la carga de los aminoácidos a pH 7.0 generó la formación de enlaces covalentes entre estos dos aminoácidos (**Figura 7.1**); esta conformación no es la correcta, ni es coherente con la estructura reportada para las lacasas. Por tanto, no fue posible parametrizar el

modelo de la enzima POXA 1B a pH 7.0, ni realizar estudios de acoplamiento y Dinámica molecular. Sólo se presentan los resultados de GILCC 1 a pH 3.0 y 7.0 y POXA 1B a pH 3.0.

La **Tabla 5** muestra los ángulos y enlaces del centro activo parametrizado a pH 7.0 del modelo 3D de GILCC 1.

Tabla 5. Ángulos y enlaces del centro activo parametrizado a pH 7.0 del modelo 3D de GILCC 1.

GILCC 1 a pH 7.0 (este estudio)			
Ángulos °		Enlaces Å	
Cu T1			
His ⁴⁵⁸ -CuT1-Cys ⁴⁵³	135.093	His ⁴⁵⁸ -CuT1	1.990
His ³⁹⁵ -CuT1-Cys ⁴⁵³	117.295	His ³⁹⁵ -CuT1	2.052
His ³⁹⁵ -CuT1-His ⁴⁵⁸	106.962	Cys ⁴⁵³ -CuT1	2.054
Cu T2			
His ⁶⁴ -CuT2-OH	97.059	His ³⁹⁸ -CuT2	1.794
His ³⁹⁸ -CuT2-OH	96.224	His ⁶⁴ -CuT2	2.036
His ³⁹⁸ -CuT2-His ⁶⁴	166.717	CuT2-OH	1.898
Cu T3 α			
His ¹¹¹ -CuT3-His ⁴⁰⁰	117.172	His ⁴⁵² -CuT3	1.965
His ⁴⁵² -CuT3-His ¹¹¹	117.093	His ¹¹¹ -CuT3	2.038
His ⁴⁵² -CuT3-His ⁴⁰⁰	115.275	His ⁴⁰⁰ -CuT3	1.948
Cu T3 β			
His ⁴⁵⁴ -CuT3-His ¹⁰⁹	111.170	His ⁴⁵⁴ -CuT3	2.070
His ¹⁰⁹ -CuT3-His ⁶⁶	136.967	His ¹⁰⁹ -CuT3	1.960
His ⁴⁵⁴ -CuT3-His ⁶⁶	111.127	His ⁶⁶ -CuT3	1.912
-	-	OH-CuT3	1.965

La **Figura 7.1** muestra el centro activo de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B respectivamente a pH 7.0.

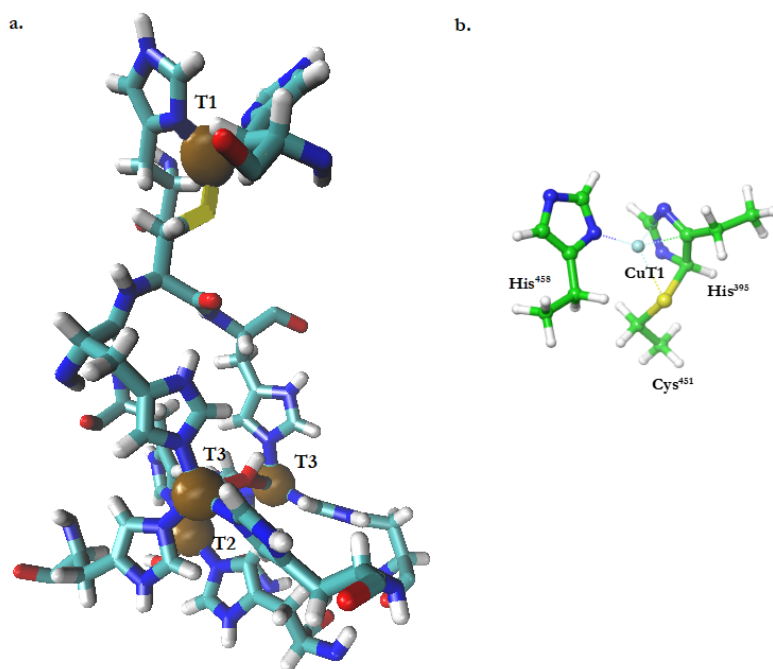


Figura 7.1. Parametrización de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B a pH 7.0. Centro activo parametrizado a pH 7.0 del modelo 3D de **a.** GILCC 1. En color café se muestran los cobres T1, T2 y T3 y alrededor, los aminoácidos que coordinan los cobres. **b.** En color azul se muestra el cobre T1 del modelo de POXA 1B formando enlaces con la His³⁹⁵, la His⁴⁵⁶ y la Cys⁴⁵¹. Los aminoácidos Cys⁴⁵¹ y la His³⁹⁵ formaron enlaces covalentes entre ellos, originando una conformación que no es la correcta, ni es coherente con la estructura reportada para las lacasas.

5.3. Dinámica molecular con los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B en ausencia de ligandos.

Ambos modelos, GILCC 1 y POXA 1B [361] obtuvieron valores de RMSD menores a $<2 \text{ \AA}$ a lo largo de la trayectoria (200 ns). No se observaron rupturas de enlaces en el centro activo de la enzima (**Figura 8**).

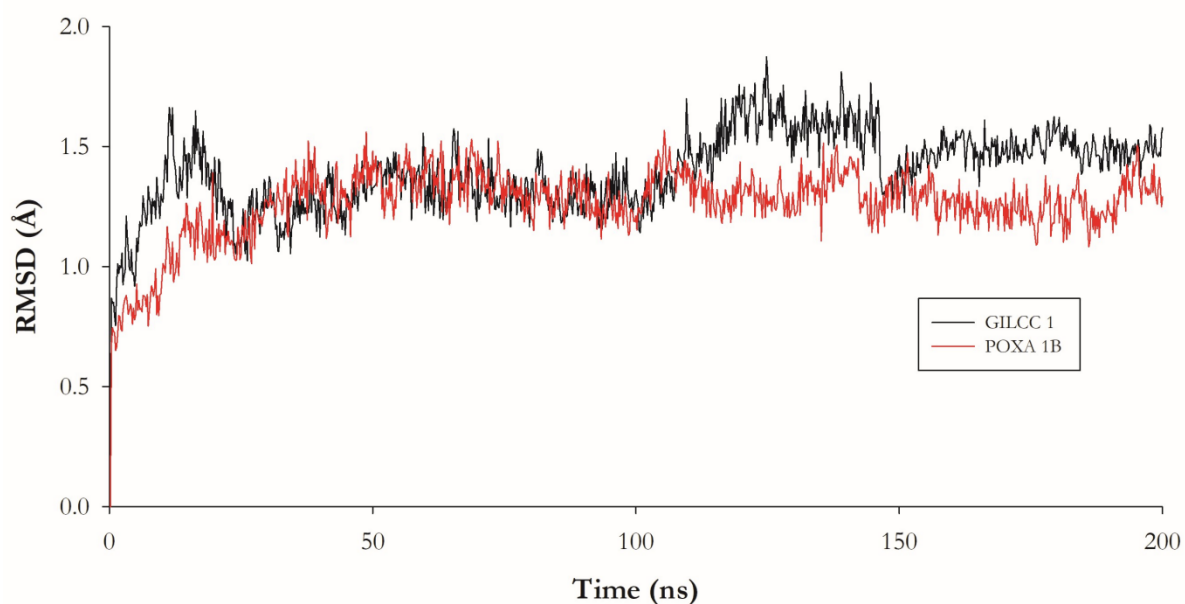


Figura 8. Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de los modelos GILCC 1 y POXA 1B en ausencia de ligandos. En negro y rojo se muestran los valores de RMSD a lo largo de la trayectoria (200 ns) para los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B [361], respectivamente.

La **Figura 8.1** muestra los resultados de la fluctuación cuadrática media (RMSF) del modelo 3D de GILCC 1 sin la presencia de ligandos a lo largo de toda la trayectoria. Las zonas entre los aminoácidos Leu³⁵⁶ y Gln³⁶³ y los aminoácidos Pro⁴³¹ y Gly⁴³⁴ presentaron valores superiores a los 2 Å (valores entre 2.2667 y 3.548 Å y 2.1867 y 3.9256 Å, respectivamente) indicando regiones de alta fluctuación.

La **Figura 8.2** muestra los resultados de la fluctuación cuadrática media (RMSF) del modelo 3D de POXA 1B en ausencia de ligandos a lo largo de toda la trayectoria. Ardila-Leal et al., (2021) demostraron que la región entre los aminoácidos Leu¹⁵⁹ - Val¹⁶² y Ser²⁶⁴ - Gly²⁶⁵, presentaban altas fluctuaciones [362].

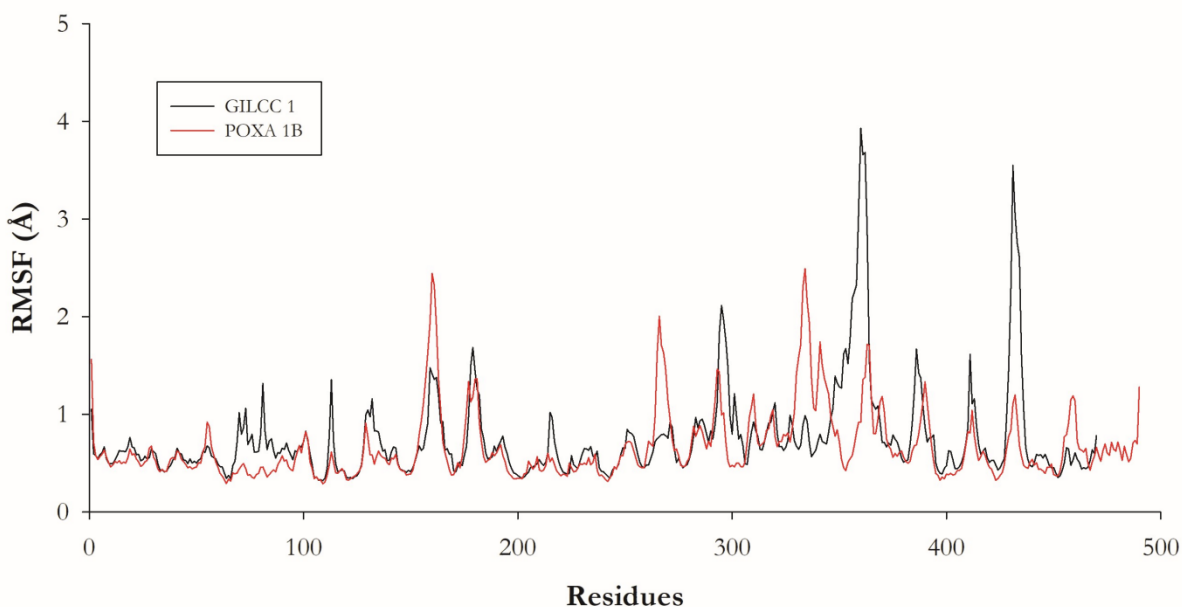


Figura 8.1. Fluctuación cuadrática media (RMSF) de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B en ausencia de ligandos. En negro y rojo se muestran las zonas de alta fluctuación ($RMSF < 2 \text{ \AA}$) de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B [362], respectivamente, a lo largo de la trayectoria (200 ns).

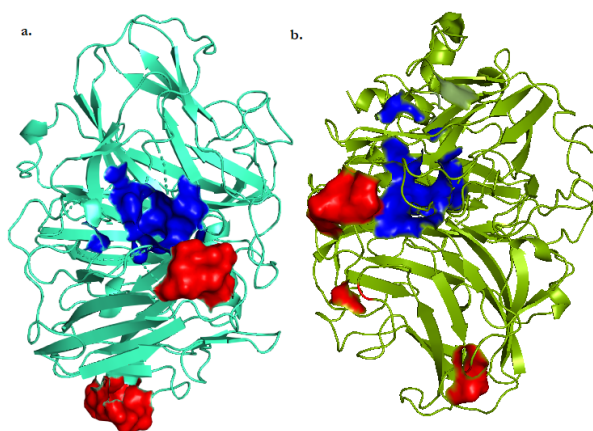


Figura 8.2. Zonas de fluctuación de los modelos GILCC 1 y POXA 1B en ausencia de ligandos. En azul se muestra el bolsillo de unión de los modelos y en rojo las zonas de alta fluctuación ($RMSF > 2 \text{ \AA}$) a lo largo de la trayectoria (200 ns), sin la presencia de ligandos. **a.** GILCC 1 y **b.** POXA 1B.

5.4. Selección de ligandos (antibióticos)

La **Tabla 6** ejemplifica una de las entradas a la biblioteca de 226 antibióticos. De un total de 226 moléculas, 100 estaban aprobadas por la FDA, el ICA o el INVIMA. De las 100 moléculas preseleccionadas 32 de estas ya tenían estudios experimentales de degradación mediado con

lacasas [370]. De las 68 moléculas restantes 16 de estas tenían un peso molecular (Da) inferior al del ABTS (514.62 Da).

Tabla 6. Ejemplo de la entrada de netilmicina (NET) a la biblioteca de 226 antibióticos preseleccionados para el estudio.

netilmicina			
Clase	Aminoglucósido	Estructura	Importancia
Subclase	Aminoglicosidos + 2 deoxistreptamina	Los aminoglucósidos constan de varios anillos ciclitos en su estructura, generalmente tres, y cinco azúcares enlazadas por medio de enlaces glicosídicos. Se encuentran, grupos amino e hidroxilo unidos a los anillos, aportando las propiedades químicas del compuesto [98].	La netilmicina (NET) está incluida entre los medicamentos esenciales según la [145]. Antibiótico de importancia crítica; única, o una de las limitadas terapias disponibles, para tratar infecciones bacterianas graves transmitidas por fuentes no humanas o humanas, con genes de resistencia [97].
Abreviatura			
NET			
Uso del antibiótico			
Animales	Humanos		
	x		
Aprobado por			
ICA	x		
INVIMA			
FDA	x		
Mecanismo de acción		Prescripción	Microorganismos susceptibles
Alteran la permeabilidad de la membrana, inhiben también la síntesis proteica, uniéndose a los fragmentos del ribosoma (fracción 30s) [98]. Espectro: amplio.		Infección de las vías biliares, Infecciones oculares, Infecciones del tracto gastrointestinal, Infección renal, Infección obstétrica, Inflamación ocular, Inflamación ocular postoperatoria Infecciones pulmonares, Sepsis, Infección del tracto urinario Infecciones bacterianas oculares. Tomado de: https://go.drugbank.com/drugs/DB00955	<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter</i> sp., <i>Proteus</i> sp., (índol-positivo e índol-negativo), incluyendo <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. morgani</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Neisseria gonorrhoea</i> . La netilmicina también es activa in vitro contra cepas de <i>Hemophilus influenzae</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp. y contra estafilococos productores y no productores de penicilinasa, incluidas las cepas resistentes a la meticilina. Algunas cepas de <i>Providencia</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp., y <i>Aeromonas</i> sp. Tomado de: https://go.drugbank.com/drugs/DB00955
Farmacología		Características químicas	
Toxicidad en humanos	Reacciones gastrointestinales [371].	Peso molecular (Da)	389.4
Toxicidad en animales	Toxicidad aguda en ratas: 2.0963 LD50, mol kg ⁻¹ Tomado de: https://go.drugbank.com/drugs/DB00955	Hidrógenos aceptores	7
		Hidrógenos donadores	4
		Enlaces rotativos	5
Eliminación		Número de anillos	3

	Aproximadamente el 94 % de la dosis se absorbe, y un 60 % -70 % se excreta en la orina sin cambios en la estructura [124].	Enlaces covalentes	1
		Solubilidad en agua	0.149
Metabolismo	No hay evidencia de transformación metabólica. Se excreta sin cambios en la orina [371].	Superficie polar (Å²)	132.96

A partir de esta información y de acuerdo con los criterios de selección se seleccionaron 16 antibióticos para el estudio (Tabla 7).

Tabla 7. Antibióticos de amplio espectro seleccionados para el estudio.

Clase de Antibiótico	Antibiótico seleccionado	PM (Da)	Uso
Aminoglicósidos	netilmicina (NET)	475.6	Humanos
	tobramicina (TM)	467.5	
Oxazolidinonas	linezolid (LZD)	337.4	
β-lactámicos y cefalosporinas 1,2,3,4 y 5 generación	cefazolina (CZ)	454.50	Humano y Animal
	cefradina (RAD)	349.40	
	cefuroxima (CXM)	424.40	
Fenicoles	tiamfenicol (TP)	356.20	
fosfomicinas	fosfomicina (FOS)	138.06	
Lincosamidas	clindamicina (CM)	425.0	
	lincomicina (LIN)	406.5	
Quinolonas y Fluoroquinolonas	moxifloxacina (MXF)	401.4	
	levofloxacina (LVX)	361.4	
Sulfonamidas	Trimetroprim (SXT)	290.32	
	sulfisoxazol (FIS)	270.30	
	sulfanilamida (SA)	172.21	
tetraciclinas	tetraciclina (TE)	444.4	

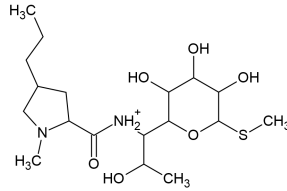
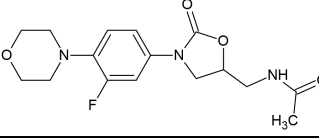
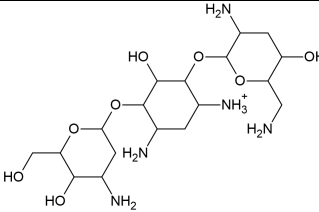
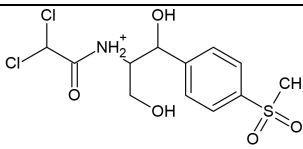
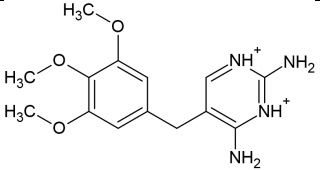
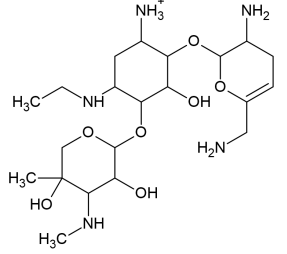
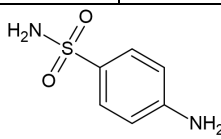
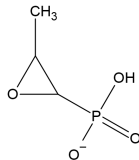
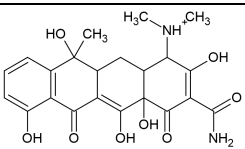
5.5.

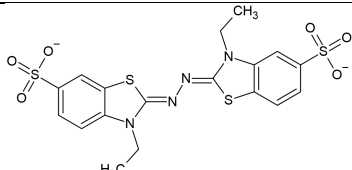
Preparación de ligandos

Se realizó el ajuste de la protonación a pH 3.0 y 7.0 de cada antibiótico teniendo en cuenta la los valores de pKa. La **Tabla 8** muestra los valores de pKa y las cargas de los grupos ionizables.

Tabla 8. Carga de los ligandos seleccionados a pH 3.0 y 7.0.

Ligando	Valor pKa		Estado de protonación		Referencia
	NH	COO	pH 3.0	pH 7.0	
cefazolina (CZ)	10.87	2.84			[372]
cefradina (BAN)	7.3	2.6			https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cephadrine
cefuroxima (CXM)	10.6	2.90			[373]
clindamicina (CM)	7.79	-			[374]
levofloxacina (LVX)	6.1	8.12			[375]
moxifloxacina (MXF)	6.2	9.14			[376]
sulfisoxazol (FIS)	1.5 5.0	-			https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sulfisoxazole

lincomicina (LIN)	7.8	-		[377]
linezolid (LZD)	1.8	-		[378]
tobramicina (TM)	10.6	2.90		[379]
tiamfenicol (TP)	11.05	-		[380]
trimetoprim (SXT)	3.20 7.10	-		[381]
netilmicina (NET)	6.5	-		[379]
sulfanilamida (SA)	10.58	-		https://chemaxon.com/
fosfomicina (FOS)	-	7.82, 1.25		https://chemaxon.com/
tetraciclina (TE)	9.4	3.3 7.3		[382]

ABTS	1.5	-		[383]
------	-----	---	--	-------

5.6. Acoplamiento molecular de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B con los ligandos

5.6.1. Identificación de los residuos que hacen parte del bolsillo de unión al sustrato

El programa FSite determinó que los aminoácidos que hacen parte del bolsillo más cercano al centro activo del modelo GILCC 1 son Leu³⁰⁰, Asn³⁰¹, Leu³⁰⁵, Ala⁴¹⁰, Gln²⁴², Ile²³⁶, Arg⁴²³, Tyr²⁴⁴, Glu³⁰², Phe²³⁹, Ser⁴²⁷ y Gln²³⁷ (**Figura 9**). Además, se determinó que el bolsillo de GILCC 1 tiene una superficie de 202.430 Å. Los aminoácidos que hacen parte del bolsillo más cercano al centro activo del modelo POXA 1B son Ile³⁹⁶, Pro³⁹⁵, Ile⁴⁵³, Asp²⁰⁵, Ser²⁰³, Cys²⁰⁴, Tyr¹¹⁶, Asp⁴⁵⁴ y Leu⁴⁵⁷ (**Figura 9.1**) y la superficie del bolsillo es de 197.716 Å; con esta información se construyó un Grid con dimensiones de 26 x 26 x 28 Å para cada modelo.

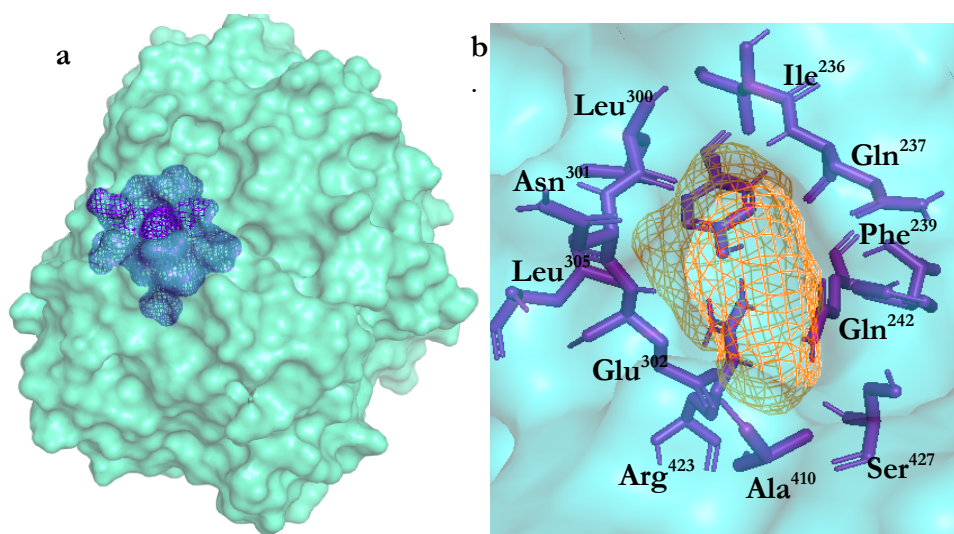


Figura 9. Bolsillo del centro activo del modelo 3D de GILCC 1 **a.** Bolsillo más cercano al centro activo. **b.** Los aminoácidos Leu³⁰⁰, Asn³⁰¹, Leu³⁰⁵, Ala⁴¹⁰, Gln²⁴², Ile²³⁶, Arg⁴²³, Tyr²⁴⁴, Glu³⁰², Phe²³⁹, Ser⁴²⁷ y Gln²³⁷ hacen parte del bolsillo del centro activo del modelo 3D de GILCC 1.

a.

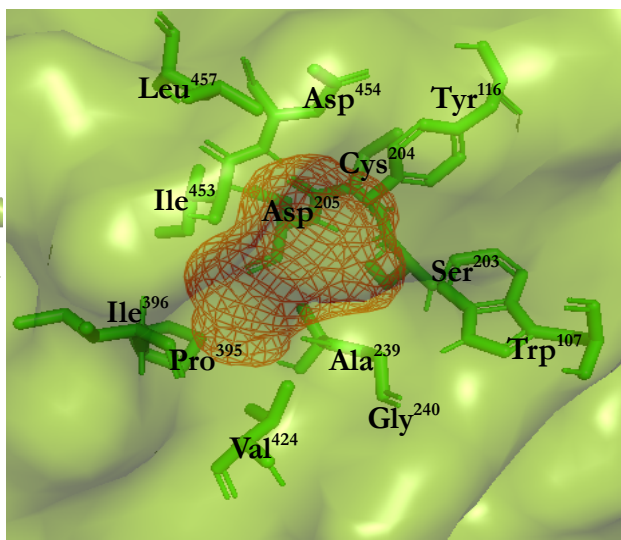
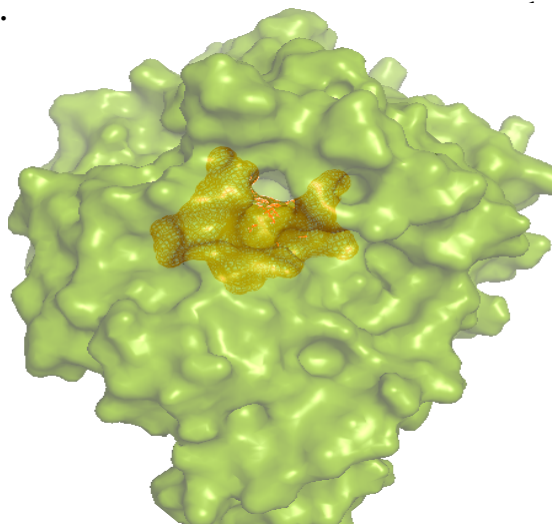


Figura 9.1. Bolsillo del centro activo del modelo 3D de POXA 1B **a.** Bolsillo más cercano al centro activo. **b.** Los aminoácidos Ile³⁹⁶, Pro³⁹⁵, Ile⁴⁵³, Asp²⁰⁵, Ser²⁰³, Cys²⁰⁴, Tyr¹¹⁶, Asp⁴⁵⁴, Val⁴²⁴, Gly²⁴⁰, Ala²³⁹, Asp⁴⁵⁴, Trp¹⁰⁷ y Leu⁴⁵⁷ hacen parte del bolsillo del centro activo del modelo 3D de POXA 1B.

5.6.2. Resultados del acoplamiento molecular con los modelos 3D de GILCC 1 a pH 3.0 y 7.0, y POXA 1B a pH 3.0.

La **Tabla 9** muestra los resultados de energía libre de unión de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B con los 16 antibióticos seleccionados.

Tabla 9. Energía de afinidad (ΔG , Kcal mol⁻¹) de los modelos 3D de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B con los antibióticos.

Ligandos	Energía de libre de Gibbs (ΔG , Kcal mol ⁻¹)		
	GILCC 1		POXA 1B
	pH 3.0	pH 7.0	pH 3.0
ABTS	-7.6	-6.7	-6.8
tetraciclina (TE)	-7.4	-7.6	-6.4
netilmicina (NET)	-6.0	-5.8	-5.7
tobramicina (TM)	-6.3	-5.6	-5.7
cefazolina (CZ)	-7.2	-6.2	-6.8
cedradina (RAD)	-7.5	-6.3	-6.0
cefuroxima (CXM)	-7.5	-7.2	-6.2
tiamfenicol (TP)	-6.5	-6.4	-5.4
fosfomicina (FOS)	-4.7	-4.0	-3.8

clindamicina (CM)	-6.7	-5.4	-5.7
lincomicina (LIN)	-6.5	-5.8	-5.2
moxifloxacina (MXF)	-7.1	-6.9	-6.0
levofloxacina (LVX)	-8.2	-7.1	-6.3
trimetoprim (SXT)	-6.6	-6.6	-5.8
sulfisoxazol (FIS)	-7.5	-7.0	-5.9
sulfanilamida (SA)	-5.6	-5.3	-4.5

5.6.3 Comparación del ABTS una vez acoplado con los receptores vs. el complejo cristalizado del ABTS con la lacasa de *Bacillus subtilis* (3ZDW)

En la **Figura 10** se observan las diferencias entre la conformación del ABTS unido al bolsillo de la lacasa de *Bacillus subtilis* (3ZDW) (complejo cristalizado), comparadas con la conformación del ABTS unido a los bolsillos enzimáticos de los modelos 3D de GILCC 1 a pH 3.0 y 7.0, y POXA 1B a pH 3.0 (**Figuras 10 y 10.1**), respectivamente. Se obtuvo un valor de RMSD de 2.8 y 2.6 Å, para GILCC 1 y POXA 1B a pH 3.0 y un valor de RMSD de 4.2 Å para GILCC 1 a pH 7.0.

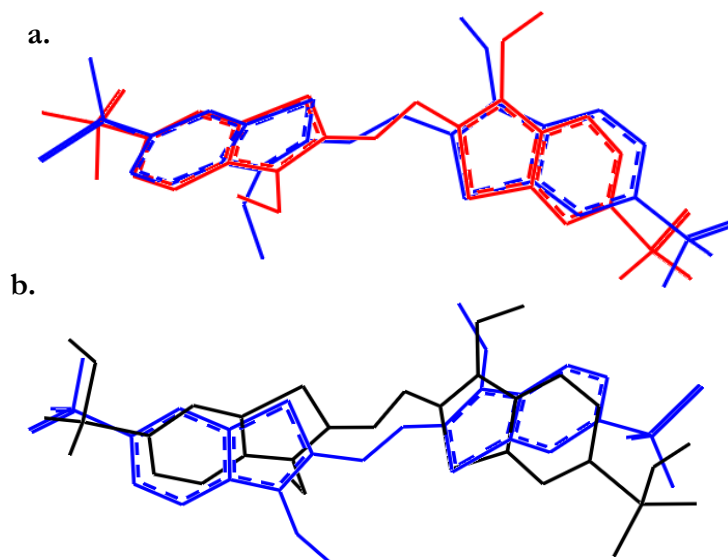


Figura 10. Conformación del ABTS cristalizado vs. la conformación del ABTS acoplado a los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B Se muestran las diferencias en la conformación del ABTS una vez unido al bolsillo de la lacasa de *Bacillus subtilis* co-cristalizada con ABTS a pH 5.5 ± 0.2 (3ZDW) (color azul) y la conformación adoptada del ABTS al unirse a los modelos **a.** GILCC 1 (color rojo) (RMSD de 2.8 Å) y **b.** POXA 1B (color negro) (RMSD de 2.6 Å) a pH 3.0.

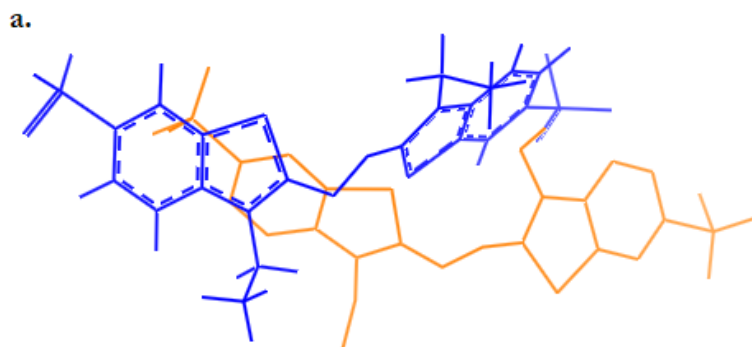


Figura 10.1. Conformación del ABTS cristalizado vs. la conformación del ABTS acoplado al modelo 3D de GILCC 1 a pH 7.0. Diferencias en la conformación del ABTS una vez unido al bolsillo de la lacasa de *Bacillus subtilis* co-cristalizada con ABTS a $\text{pH } 5.5 \pm 0.2$ (3ZDW) (color azul) y la conformación adoptada del ABTS al unirse al modelo GILCC 1 (color naranja) (RMSD de 4.2 \AA) a pH 7.0.

5.7. Interacciones de los complejos enzima-ligando

En las **Figuras 11-28** se observan los ligandos acoplados a los bolsillos de las enzimas GILCC 1 y POXA 1B, así como las interacciones generadas entre los ligandos y los residuos de aminoácidos de cada enzima.

5.7.1. Acoplamiento molecular de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B con el ABTS

En la interacción entre el ABTS y el modelo 3D de GILCC 1 a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Ile²³⁶, Ala⁴³², Leu³⁰⁰, Leu³⁰⁵, Ile²³⁸, Tyr²⁴⁴, Phe²³⁹ y Ala⁴¹⁰. Los aminoácidos polares Thr⁴³⁰, Gln²³⁷, Asn³⁰¹, Ser⁴²⁷, Ser⁴⁰⁹ y Gln²⁴² también interactuaron con el ligando. Además, los aminoácidos Gln²³⁷ y Tyr²⁴⁴ formaron enlaces de hidrógeno con el grupo sulfonato del ABTS a una distancia de 2.44 y 2.38 \AA , respectivamente (**Figura 11, Tabla 8**).

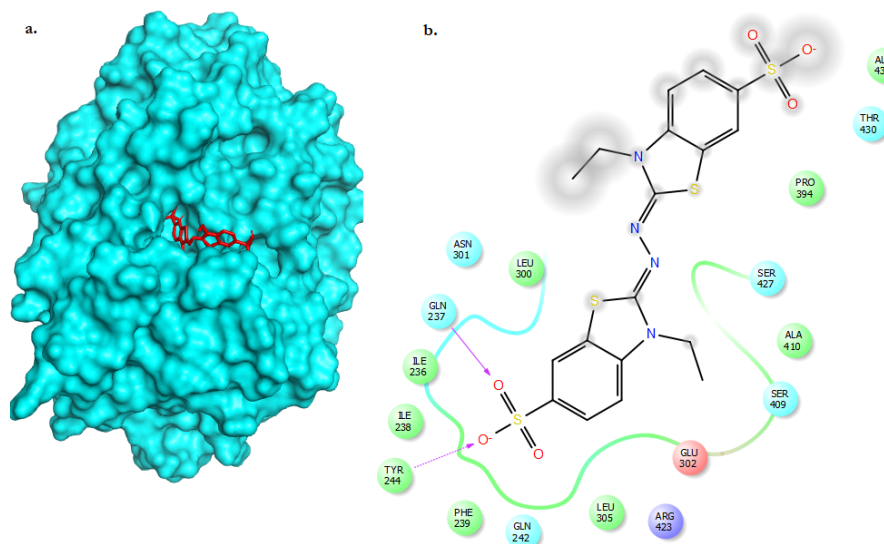


Figura 11. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y el ABTS a pH 3.0. **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el ABTS y el modelo 3D de GILCC 1 a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Ile²³⁶, Ala⁴³², Leu³⁰⁰, Leu³⁰⁵, Ile²³⁸, Tyr²⁴⁴, Phe²³⁹ y Ala⁴¹⁰.

En la interacción entre el ABTS y el modelo 3D de GILCC 1 a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe¹⁶², Pro²⁰⁷ Ile⁴⁵⁵ Ala³⁹³, Pro³⁹⁴, Ala⁴³³, Phe²⁶⁵ y Pro¹⁶³. Los aminoácidos polares Asn²⁰⁸ y Ser²⁶⁴ también interactuaron con el ligando. Además, los aminoácidos His⁴⁵⁸ y Thr⁴³⁰ formaron enlaces de hidrógeno con los oxígenos del grupo sulfonato del ABTS a una distancia de 2.43 y 2.27 Å respectivamente (**Figura 11.1, Tabla 8**).

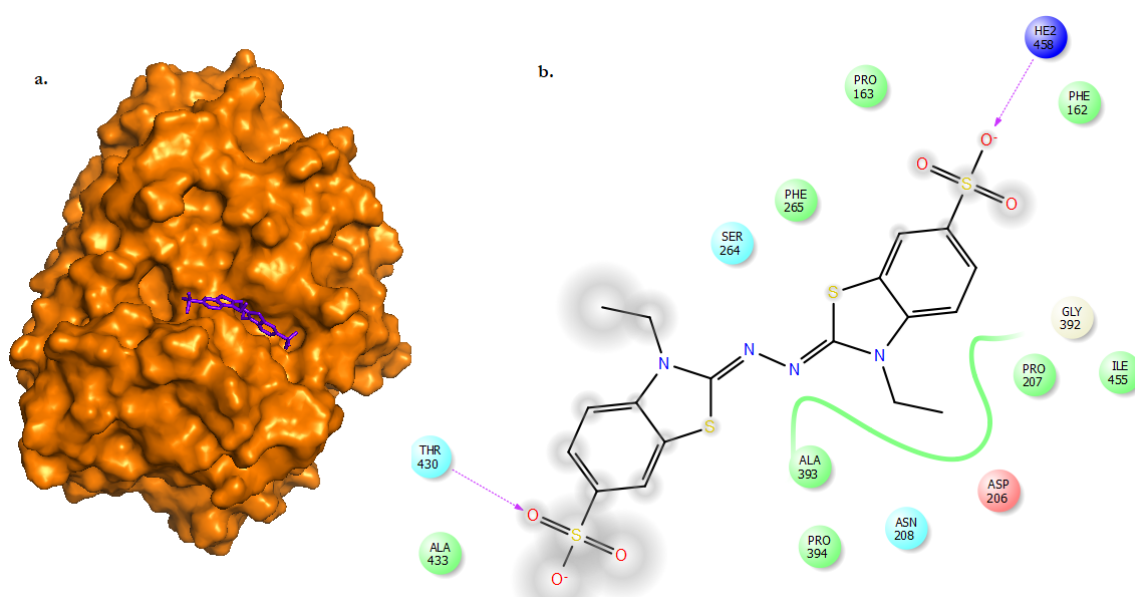


Figura 11.1. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y el ABTS a pH 7.0. **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el ABTS y el modelo 3D de GILCC 1 a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe¹⁶², Pro²⁰⁷ Ile⁴⁵⁵ Ala³⁹³, Pro³⁹⁴, Ala⁴³³, Phe²⁶⁵ y Pro¹⁶³.

En las interacciones entre el ABTS y el modelo 3D de POXA 1B a pH 3.0, participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁵, Pro³⁹³, Phe²³⁸, Ile⁴⁵³, Val¹⁶², Phe³³⁸ y Ala³⁹¹. También, se presentaron interacciones con los aminoácidos polares Ser²⁰⁶, Asn²⁰⁷, Asn²⁶³, His¹⁶⁴, Ser²⁶⁴ y Gln²³⁶. Además, se observan interacciones con los aminoácidos pertenecientes al centro activo como la histidina His³⁹⁴ y la histidina His⁴⁵⁶. El aminoácido Gly³⁹² formó un puente de hidrógeno con uno de los oxígenos del sulfonato del ABTS, con una distancia de 2.39 Å (**Figura 11.2, Tabla 8**).

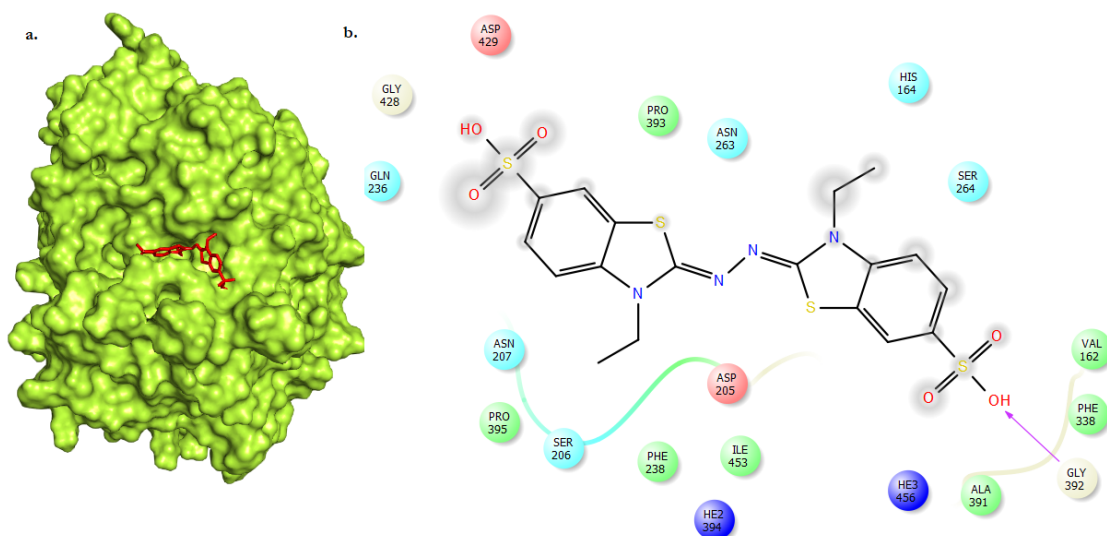


Figura 11.2. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y el ABTS a pH 3.0. **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el ABTS y el modelo 3D de POXA 1B a pH 3.0, participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁵, Pro³⁹³, Phe²³⁸, Ile⁴⁵³, Val¹⁶², Phe³³⁸ y Ala³⁹¹.

5.7.2. Acoplamiento molecular de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B con la tetraciclina (TE).

En las interacciones entre la tetraciclina (TE) y el modelo 3D de GILCC 1 a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Ala⁴³³, Ala⁴¹⁰, Tyr²⁴⁴, Leu³⁰⁰, Ile²³⁶, Leu²⁹⁹, Phe²³⁹ y Ile²³⁸. También, se presentaron interacciones con los aminoácidos polares Ser⁴²⁷, Ser⁴⁰⁹, Thr⁴³⁰, Gln²⁴², Gln²³⁷ y Asn³⁰¹. El aminoácido hidrofóbico Ala⁴¹⁰ formó un enlace de hidrógeno con un grupo hidroxilo (OH) de la tetraciclina (TE) con una distancia de 2.17 Å, mientras que el aminoácido Glu³⁰², cargado positivamente, formó un puente de sal con el grupo NH⁺ del ligando con una distancia de 2.15 Å (Figura 12, Tabla 8).

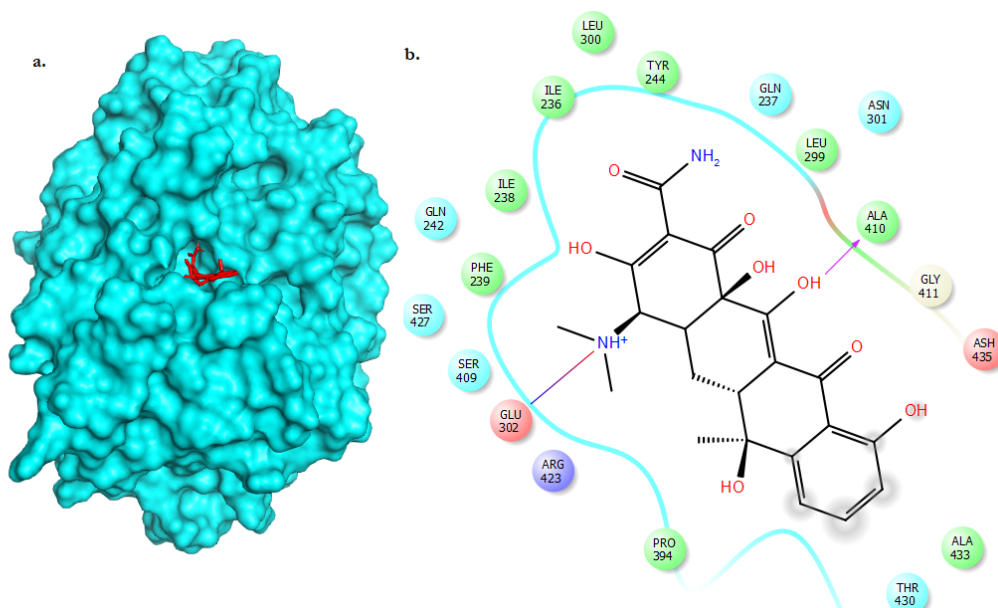


Figura 12. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y tetraciclina (TE) a pH 3.0. **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre la tetraciclina (TE) y el modelo 3D de GILCC 1 a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Ala⁴³³, Ala⁴¹⁰, Tyr²⁴⁴, Leu³⁰⁰, Ile²³⁶, Leu²⁹⁹, Phe²³⁹ y Ile²³⁸.

En las interacciones entre la tetraciclina (TE) y el modelo 3D de GILCC 1 a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵⁵, Pro¹⁶³, Leu¹⁶⁴, Phe³³², Pro³⁹¹, Phe¹⁶², Phe²⁶⁵, Ala³⁹³ y Pro³⁹⁴. El aminoácido hidrofóbico Phe²⁶⁵ formó una interacción de tipo pi-cación con el grupo NH⁺ del ligando. El aminoácido Asp²⁰⁶ cargado positivamente, también interactuó con el ligando (**Figura 12.1, Tabla 8**).

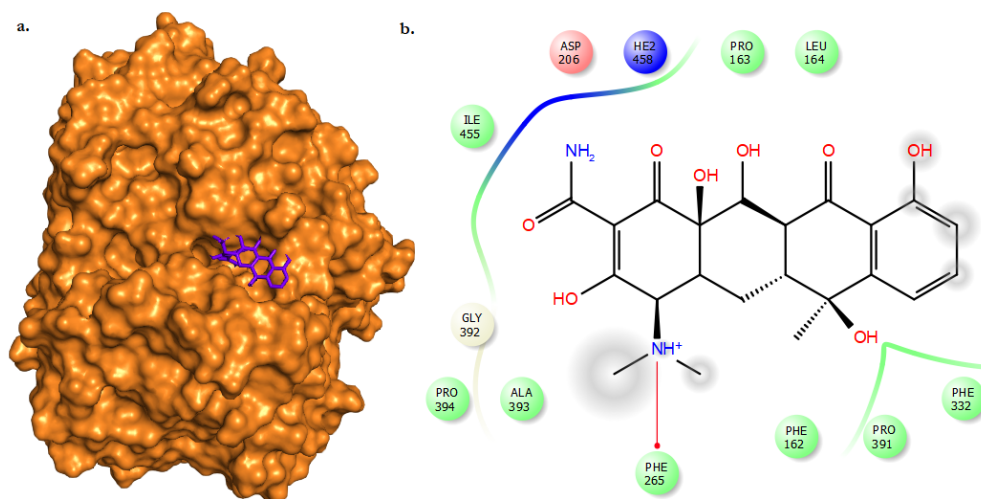


Figura 12.1. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la tetraciclina (TE) a pH 7.0. **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre la tetraciclina (TE) y el

modelo 3D de GILCC 1 a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵⁵, Pro¹⁶³, Leu¹⁶⁴, Phe³³², Pro³⁹¹, Phe¹⁶², Phe²⁶⁵, Ala³⁹³ y Pro³⁹⁴.

En las interacciones entre tetraciclina (TE) y el modelo 3D de POXA 1B a pH 3.0, participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹³, Val¹⁶², Phe³³¹, Phe³³⁸, Ala³⁹¹, Phe³⁹⁰, Val³⁸⁹ y Pro¹⁶³. Los aminoácidos polares Asn²⁶³, Ser²⁶⁴ y His¹⁶⁴ también interactuaron con el ligando. La histidina del centro activo HE3⁴⁵⁶ formó un puente de hidrógeno con un grupo hidroxilo (OH) del ligando con una distancia de 2.23 Å y el aminoácido Phe³³¹ formó una interacción de tipo “*stacking*” π - π con el anillo aromático del antibiótico (Figura 12.2, Tabla 8).

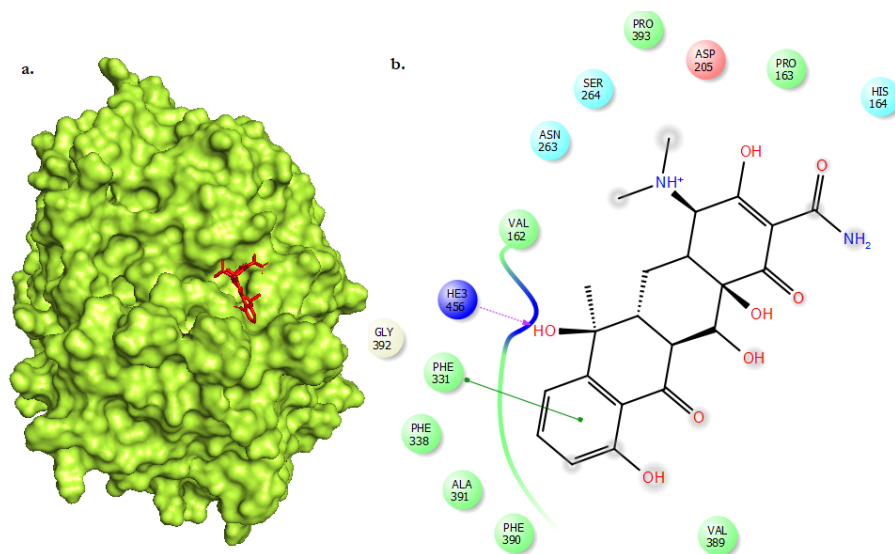


Figura 12.2. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y la tetraciclina (TE) a pH 3.0 a. Bolsillo al que se une el ligando. b. En las interacciones entre tetraciclina (TE) y el modelo 3D de POXA 1B participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹³, Val¹⁶², Phe³³¹, Phe³³⁸, Ala³⁹¹, Phe³⁹⁰, Val³⁸⁹ y Pro¹⁶³.

5.7.3. Acoplamiento molecular de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B con los aminoglicósidos seleccionados.

En las interacciones entre netilmicina (NET) y el modelo 3D de GILCC 1 a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Phe²⁶⁵, Leu²⁹⁹, Ala⁴¹⁰ y Phe²³⁹. También, se presentaron interacciones con aminoácidos polares como Thr⁴³⁰, Gln²⁴², Gln²³⁷, Ser⁴²⁷, Asn³⁰¹, Ser⁴⁰⁹, Asn²⁰⁸ y Ser²⁶⁴. Se pudo observar la formación de un puente de sal entre el aminoácido Glu302 con carga positiva y el grupo amino (N^+H_3) del antibiótico. Además, el aminoácido Ser⁴⁰⁹ formó un puente de hidrógeno con el grupo amino del ligando (con una distancia de 2.18 Å) y el aminoácido Ala⁴¹⁰ formó dos puentes de hidrógeno con los grupos amino de los anillos marcados como 1 y 2 con distancias de 2.03 y 2.52 Å, respectivamente (Figura 13, Tabla 8).

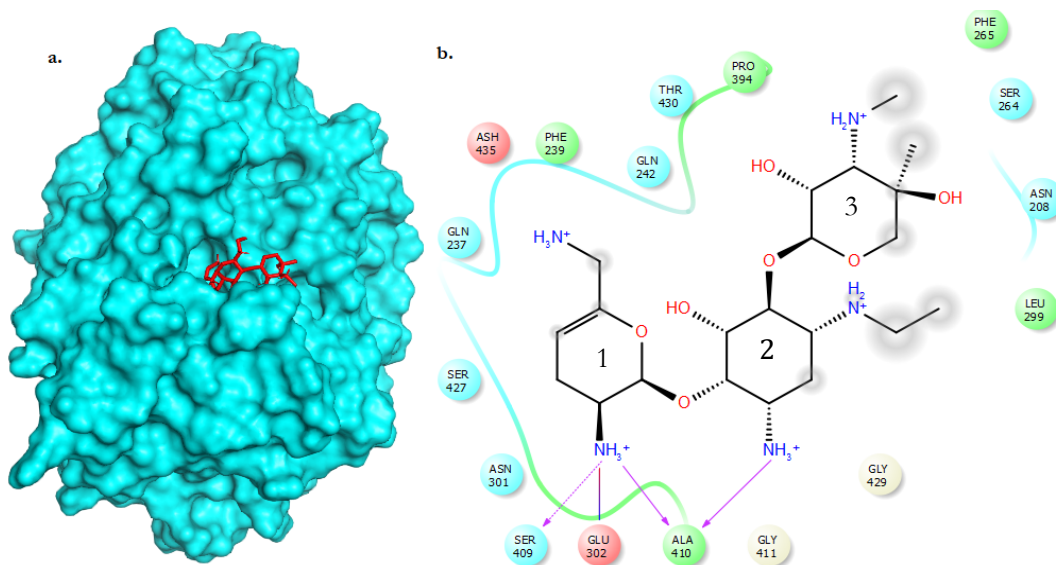


Figura 13. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la netilmicina (NET) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre netilmicina (NET) y el modelo 3D de GILCC 1 a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Phe²⁶⁵, Leu²⁹⁹, Ala⁴¹⁰ y Phe²³⁹.

En las interacciones entre la netilmicina (NET) y el modelo 3D de GILCC 1 a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵⁵ Pro¹⁶³, Leu¹⁶⁴, Phe¹⁶², Ala³⁹³, Pro⁴³¹, Val³⁸⁸, Pro³⁹¹, Ala³⁹⁰ y Pro³⁹⁴. El aminoácido hidrofóbico Phe²⁶⁵ interactuó con el grupo amino (NH⁺) del ligando mediante una interacción de tipo pi-cación, también, el aminoácido Asp²⁰⁶ cargado positivamente, formó un puente de sal con ese mismo grupo amino (a una distancia de 2.51 Å). Además, los aminoácidos Gly³⁹² y Ala³⁹³ formaron puentes de hidrógeno con el oxígeno de uno de los anillos de la netilmicina (NET) con distancias de 2.13 y 2.91 Å, respectivamente, mientras que el aminoácido polar Thr³⁸⁷ formó un puente de hidrógeno con uno de los grupos amino (N⁺H₃) con una distancia de 2.11 Å (Figura 13.1, Tabla 8).

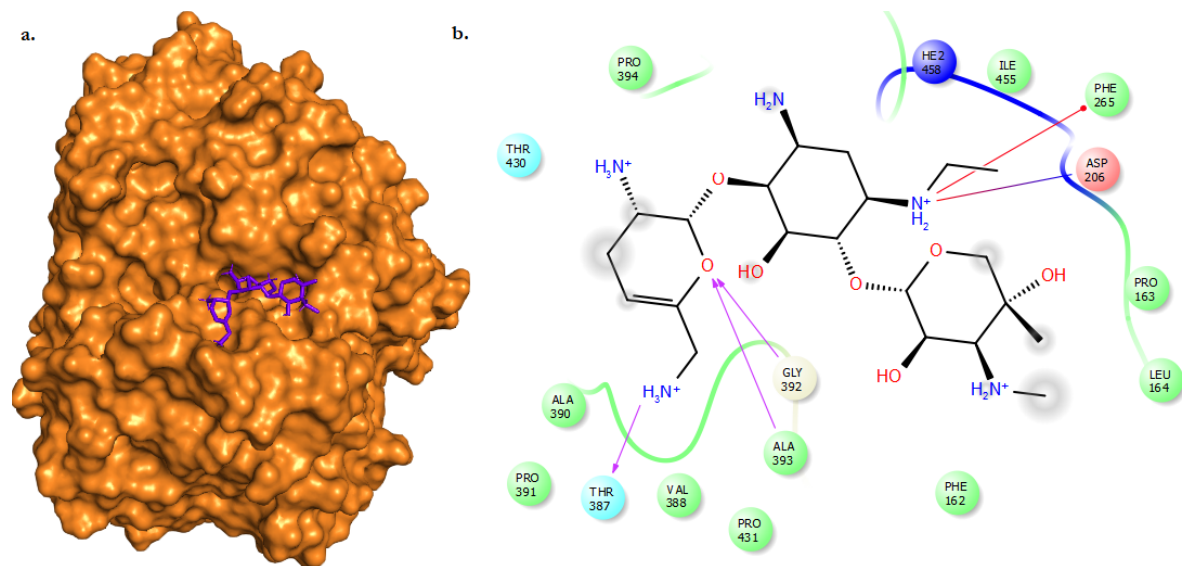


Figura 13.1. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la netilmicina (NET) a pH 7.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre la netilmicina (NET) y el modelo 3D de GILCC 1 a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵⁵ Pro¹⁶³, Leu¹⁶⁴, Phe¹⁶², Ala³⁹³, Pro⁴³¹, Val³⁸⁸, Pro³⁹¹, Ala³⁹⁰ y Pro³⁹⁴.

En las interacciones entre el modelo 3D de GILCC 1 y la tobramicina (TM) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Ala⁴³², Leu²⁹⁹, Ala⁴¹⁰, Val⁴²⁶, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁶, Ile²³⁸ y Phe²³⁹. También, se presentaron interacciones con los aminoácidos polares Thr⁴³⁰, Asn³⁰¹, Ser⁴⁰⁹, Ser⁴²⁷, Gln²⁴² y Gln²³⁷. El aminoácido Gln²⁴² formó un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo (OH) del antibiótico, mientras que, los aminoácidos Asn³⁰¹, Ala⁴¹⁰, Glu³⁰², Gln²⁴² y Gln²³⁷, formaron puentes de hidrógeno con los grupos amino (NH₃N⁺) del antibiótico con distancias de 2.22, 2.07, 2.01, 2.18, 2.04 y 2.74 Å, respectivamente (**Figura 13.2, Tabla 8**).

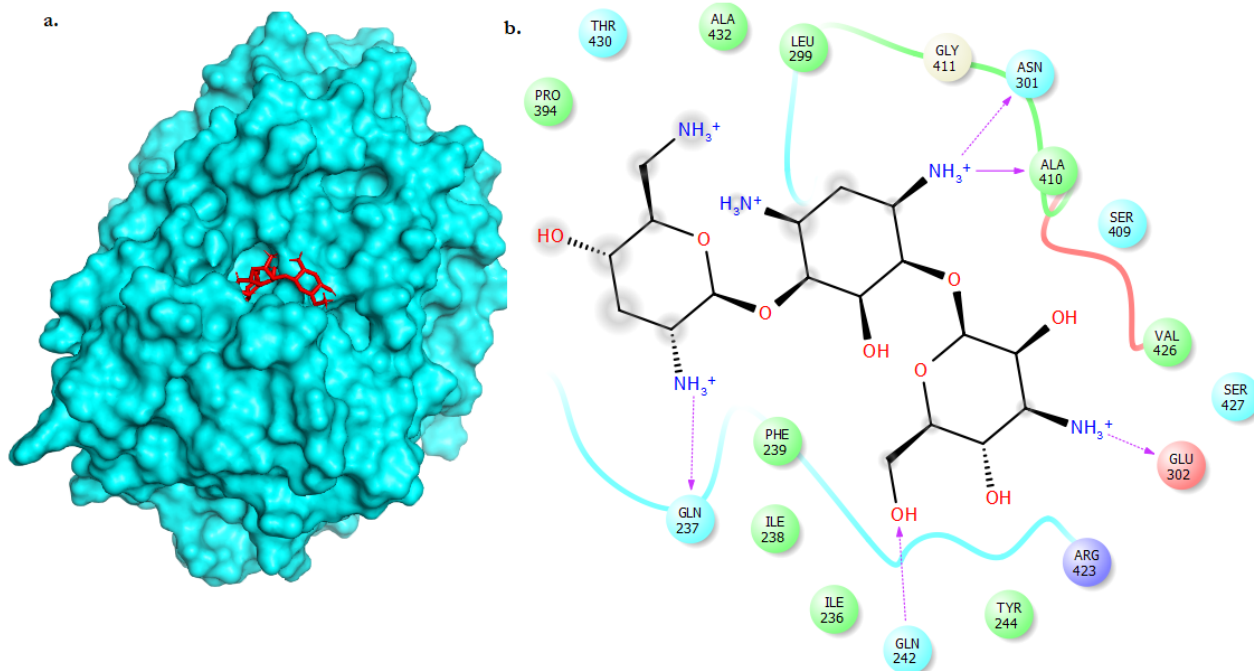


Figura 13.2. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la tobramicina (TM) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo 3D de GILCC 1 y la tobramicina (TM) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Ala⁴³², Leu²⁹⁹, Ala⁴¹⁰, Val⁴²⁶, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁶, Ile²³⁸ y Phe²³⁹.

En las interacciones entre el modelo 3D de GILCC 1 y la tobramicina (TM) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Val³⁸⁸, Pro³⁹¹, Pro⁴³¹, Ala³⁹³, Phe²⁶⁵, Leu¹⁶⁴, Pro¹⁶³, Leu¹⁶⁴, Phe¹⁶², Ile⁴⁵⁵, Pro²⁰⁷ y Pro³⁹⁴. También, se presentaron interacciones con los aminoácidos polares Thr⁴³⁰ y Ser²⁶⁴. El aminoácido Gly³⁹² formó un puente de hidrógeno con el grupo amino y el grupo hidroxilo del ligando con distancias de 2.75 y 2.32 Å, respectivamente, mientras que el aminoácido Asp²⁰⁶, cargado positivamente formó un puente de sal con el grupo amino (N₃H⁺) (**Figura 13.3, Tabla 8**).

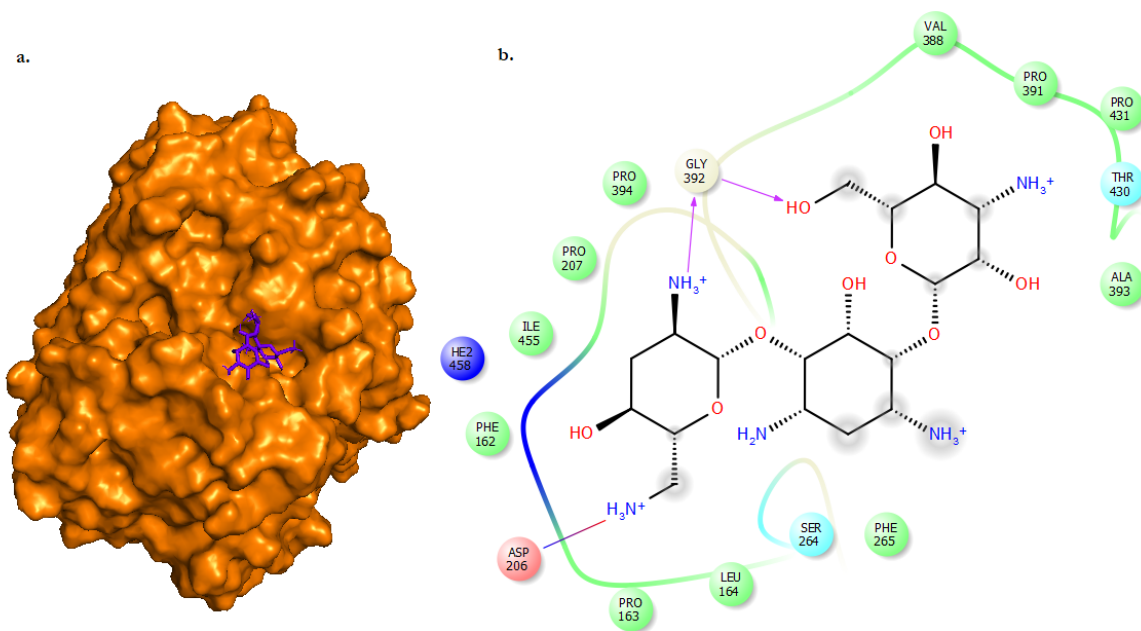


Figura 13.3. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y la tobramicina (TM) a pH 7.0 a. Bolsillo al que se une el ligando. b. En las interacciones entre el modelo 3D de GILCC 1 y la tobramicina (TM) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Val³⁸⁸, Pro³⁹¹, Pro⁴³¹, Ala³⁹³, Phe²⁶⁵, Leu¹⁶⁴, Pro¹⁶³, Leu¹⁶⁴, Phe¹⁶², Ile⁴⁵⁵, Pro²⁰⁷ y Pro³⁹⁴.

En las interacciones entre el modelo 3D de POXA 1B y netilmicina (NET) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵³, Val¹⁶², Pro¹⁶³, Pro³⁹³, Phe³³⁸ y Ala³⁹¹. Los aminoácidos polares His¹⁶⁴, Thr¹⁶⁰, Ser²⁶⁴ y Asn²⁶³, al igual que el aminoácido del centro activo HE3, también interactuaron con el ligando. Los aminoácidos His¹⁶⁴, Val¹⁶², Pro¹⁶³ y Ser²⁶⁴ formaron puentes de hidrógeno con los diferentes grupos amino del antibiótico con distancias de 2.17, 2.26, 2.41 y 2.01 Å, respectivamente, además, ocurrió una interacción tipo Pi-cación entre el aminoácido His¹⁶⁴ y el grupo amino (H₃N⁺) del ligando (Figura 14, Tabla 8).

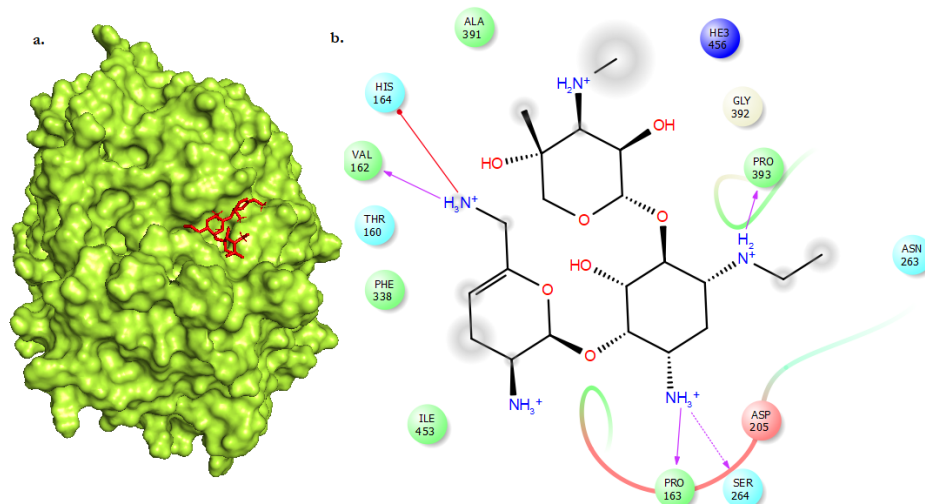


Figura 14. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y netilmicina (NET) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo 3D de POXA 1B y netilmicina (NET) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵³, Val¹⁶², Pro¹⁶³, Pro³⁹³, Phe³³⁸ y Ala³⁹¹.

En las interacciones entre el modelo 3D de POXA 1B y tobramicina (TM) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Val³⁸⁹, Phe³⁹⁰, Ala³⁹¹, Phe³³¹, Phe³³⁸, Val¹⁶², Ile⁴⁵³ y Pro¹⁶³. Algunos aminoácidos polares como la Ser²⁶⁴, Asn²⁶³ y la His¹⁶⁴ también interactuaron con el ligando. La Pro¹⁶³ formó un enlace de hidrógeno con los grupos amino (H₃N⁺) e hidroxilo (OH) del antibiótico con distancias de 2.72 y 2.21 Å, respectivamente. Igualmente, el aminoácido Val³⁸⁹ formó un enlace de hidrógeno con el grupo amino (H₃N⁺) de uno de los anillos del antibiótico con una distancia de 2.24 Å. Los aminoácidos del centro activo HE3⁴⁵⁶ y HE2³⁹⁴ también interactuaron con el ligando (**Figura 14.1, Tabla 8**).

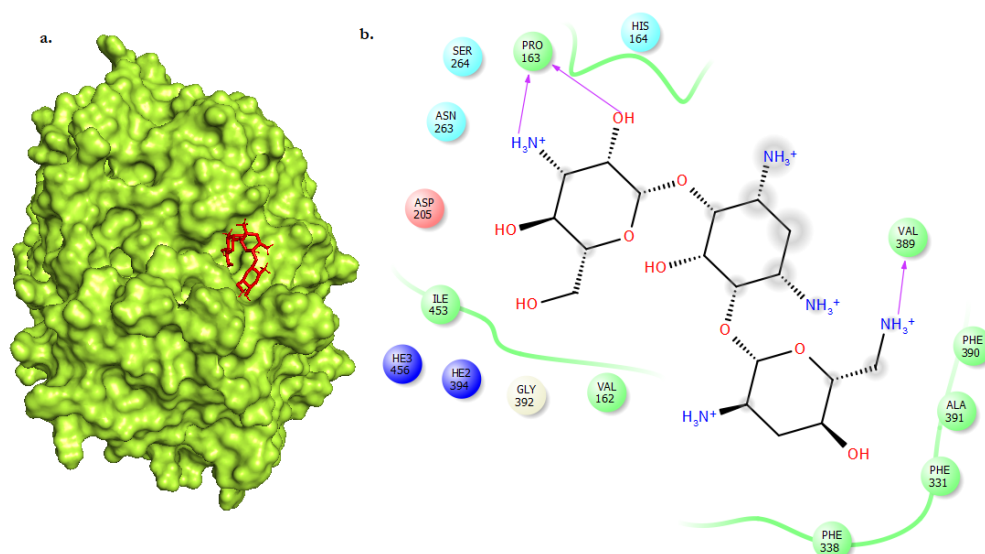


Figura 14.1. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y tobramicina (TM) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo 3D de POXA 1B y tobramicina (TM) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Val³⁸⁹, Phe³⁹⁰, Ala³⁹¹, Phe³³¹, Phe³³⁸, Val¹⁶², Ile⁴⁵³ y Pro¹⁶³.

5.7.4. Acoplamiento molecular de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B con las oxazolidinonas seleccionadas

En la interacción entre el modelo 3D de GILCC 1 y el linezolid (LZD) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe²³⁹, Pro³⁹⁴, Ala⁴³³, Ala⁴¹⁰, Leu²⁹⁹, Leu³⁰⁵, Ile²³⁶, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁸ y Leu³⁰⁰.

También, los aminoácidos polares Gln²⁴², Gln²³⁷, Asn³⁰¹, Ser⁴²⁷ y Thr⁴³⁰ del modelo interactuaron con el ligando. El aminoácido Leu³⁰⁰ formó un puente de hidrógeno con el grupo amino (NH) del antibiótico con una distancia de 2.39 Å, mientras que el aminoácido Gln²³⁷ formó un puente de hidrógeno con un grupo hidroxilo (OH) con una distancia de 2.30 Å. El aminoácido Arg⁴²³, con carga negativa, también formó un puente de hidrógeno con el oxígeno de uno de los anillos del ligando con una distancia de 2.72 Å (**Figura 15, Tabla 8**).

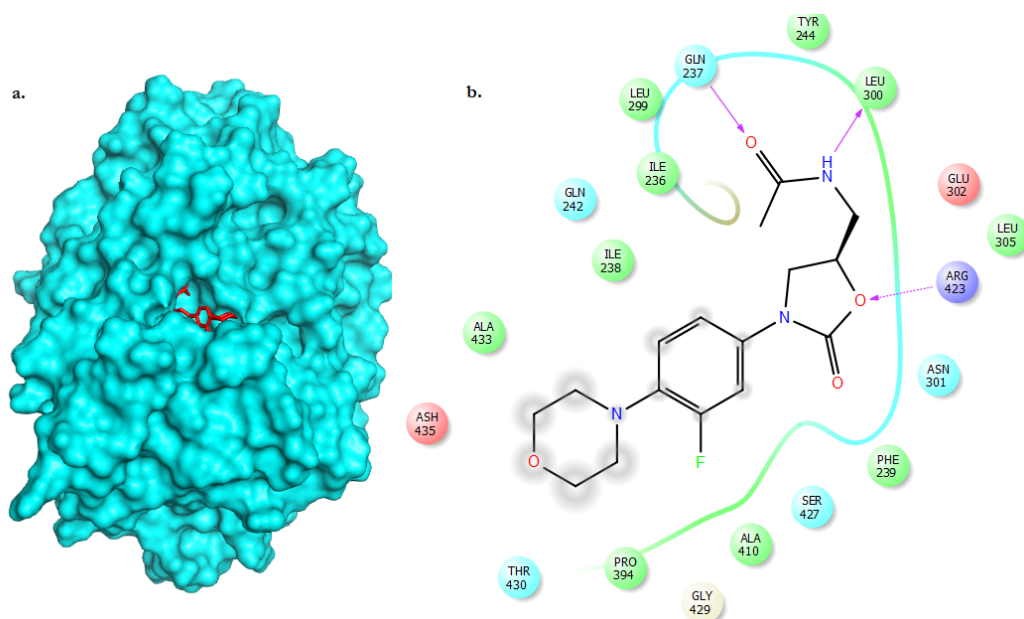


Figura 15. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y el linezolid (LZD) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo 3D de GILCC 1 y el linezolid (LZD) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe²³⁹, Pro³⁹⁴, Ala⁴³³, Ala⁴¹⁰, Leu²⁹⁹, Leu³⁰⁵, Ile²³⁶, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁸ y Leu³⁰⁰.

En la interacción entre el modelo 3D de GILCC 1 y linezolid (LZD) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵⁵, Ala³⁹³, Phe³³⁷, Phe³³², Pro³⁹¹, Phe¹⁶² y Phe²⁶⁵. La histidina del centro activo HE2⁴⁵⁸ formó un puente de hidrógeno con el oxígeno de uno de los anillos del ligando con una distancia de 2.31 Å. El aminoácido cargado positivamente Asp²⁰⁶ y la glicina Gly³⁹² también interactuaron con el ligando (**Figura 15.1, Tabla 8**).

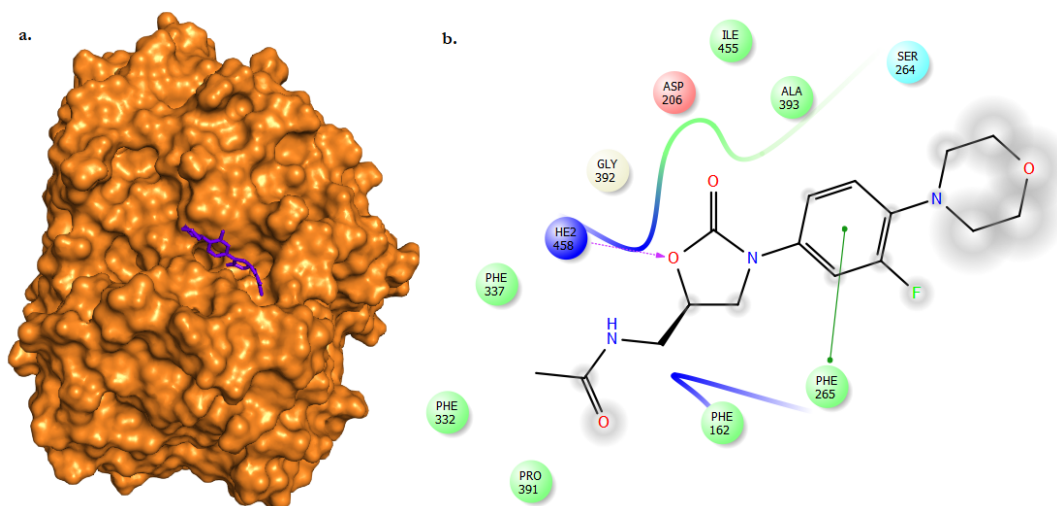


Figura 15.1. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y linezolid (LZD) a pH 7.0. **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo 3D de GILCC 1 y linezolid (LZD) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵⁵, Ala³⁹³, Phe³³⁷, Phe³³², Pro³⁹¹, Phe¹⁶² y Phe²⁶⁵.

En la interacción entre el modelo 3D de POXA 1B y linezolid (LZD) a pH 3.0, participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe²³⁸, Ala⁴⁰⁹ y Pro³⁹³. Los aminoácidos polares Ser⁴²⁶, His³⁰⁰, Ser⁴⁰⁸, Gln²³⁶, Asn²⁶³ y Asn²⁰⁷ interactuaron con el ligando, al igual que los aminoácidos con carga positiva Glu³⁰¹ y Asp⁴²⁹. El aminoácido del centro activo HE2³⁹⁴ también interactuó con el antibiótico. No se observó la formación de puentes de hidrógeno (**Figura 16, Tabla 8**).

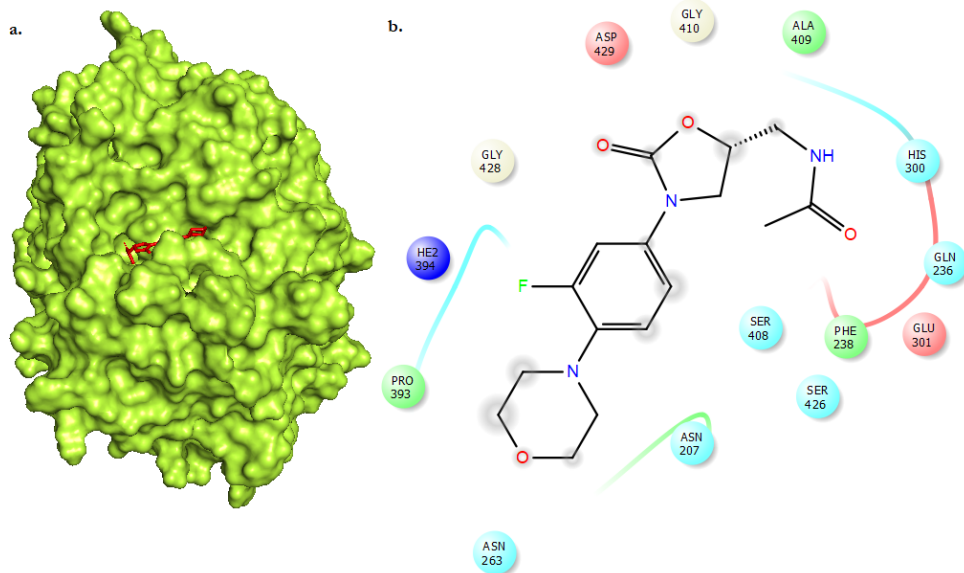


Figura 16. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y linezolid (LZD) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo 3D de POXA 1B y linezolid (LZD) a pH 3.0, participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe²³⁸, Ala⁴⁰⁹ y Pro³⁹³.

5.7.5. Acoplamiento molecular de los modelos 3D de lacasas GILCC 1 y POXA 1B con las cefalosporinas seleccionadas

En la interacción entre el modelo 3D de GILCC 1 y la cefazolina (CZ) a pH 3.0, participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Leu²⁹⁹, Ala⁴¹⁰, Phe²³⁹, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁶ y Leu³⁰⁰. También, los aminoácidos polares Thr⁴³⁰, Gln²³⁷, Asn³⁰¹, Ser⁴⁰⁹, Ser⁴²⁷, Gln²⁴² y Asn²⁰⁸ interactuaron con el ligando. Los aminoácidos Asn²⁰⁸ y Tyr²⁴⁴ formaron puentes de hidrógeno con los grupos aminos (NH) del antibiótico con una distancia de 2.37 y 2.36 Å, respectivamente (Figura 17, Tabla 8).

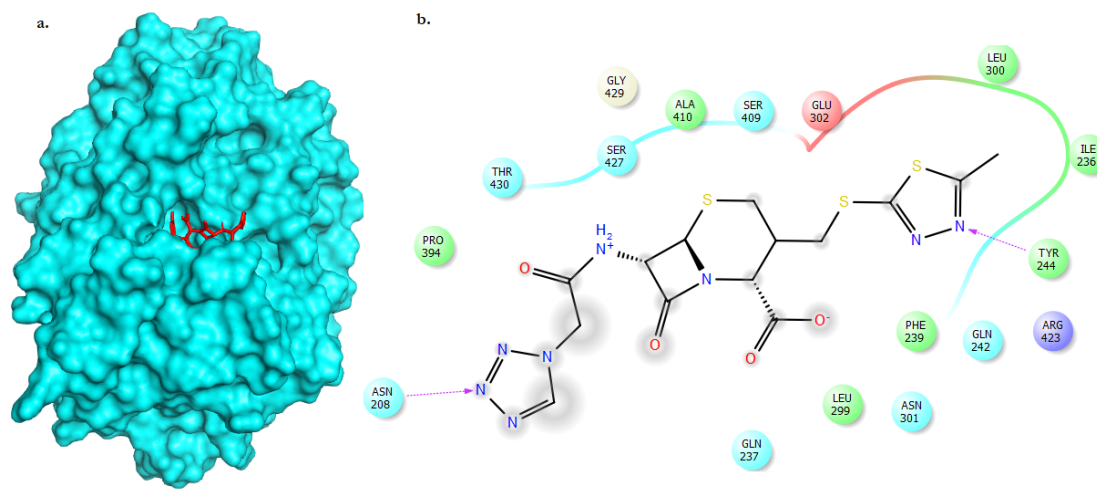


Figura 17. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y cefazolina (CZ) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo 3D de GILCC 1 y la cefazolina (CZ) a pH 3.0, participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Leu²⁹⁹, Ala⁴¹⁰, Phe²³⁹, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁶ y Leu³⁰⁰.

En la interacción entre el modelo 3D de GILCC 1 y la cefazolina (CZ) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe³³², Phe¹⁶², Phe³³⁷, Pro¹⁶³, Phe²⁶⁵, Ala³⁹³, Pro⁴³¹, Val³⁸⁸, Ala³⁹⁰, Pro³⁹¹ y Phe²³⁷. También, los aminoácidos polares Thr⁴³⁰ y Thr³⁸⁷ interactuaron con el ligando. El aminoácido Ala³⁹³ formó un puente de hidrógeno con el grupo amino (NH) del antibiótico con una distancia de 2.37 Å (Figura 17.1, Tabla 8).

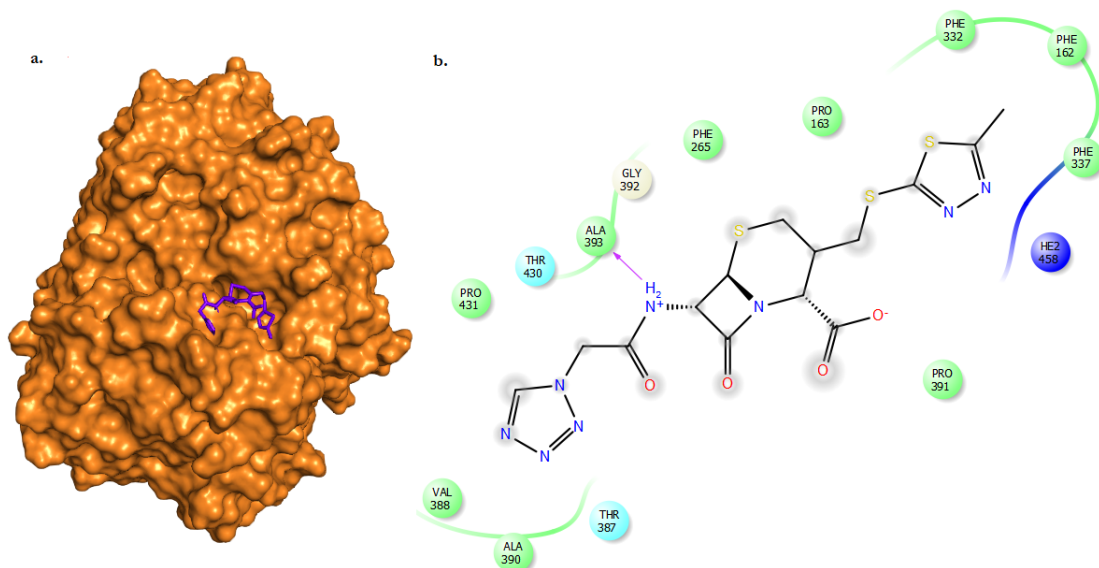


Figura 17.1. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y cefazolina (CZ) a pH 7.0. **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo 3D de GILCC 1 y la cefazolina (CZ) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe³³², Phe¹⁶², Phe³³⁷, Pro¹⁶³, Phe²⁶⁵, Ala³⁹³, Pro⁴³¹ Val³⁸⁸, Ala³⁹⁰, Pro³⁹¹ y Phe²³⁷.

En la interacción entre el modelo 3D de GILCC 1 y cefradina (RAD) pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Leu²⁹⁹, Ile²³⁶, Leu³⁰⁰, Tyr²⁴⁴, Leu³⁰⁵, Phe²³⁹, Ala⁴¹⁰ y Pro³⁹⁴. Los aminoácidos polares Asn³⁰¹, Gln²³⁷, Ser⁴²⁷, Gln²⁴², y Thr⁴³⁰ también interactuaron con el antibiótico. Los aminoácidos Ser⁴²⁷ y Arg⁴²³ formaron un puente de hidrógeno con los grupos hidroxilo (OH) del ligando con una distancia de 2.13 y 2.06 Å, respectivamente (Figura 17.2, Tabla 8).

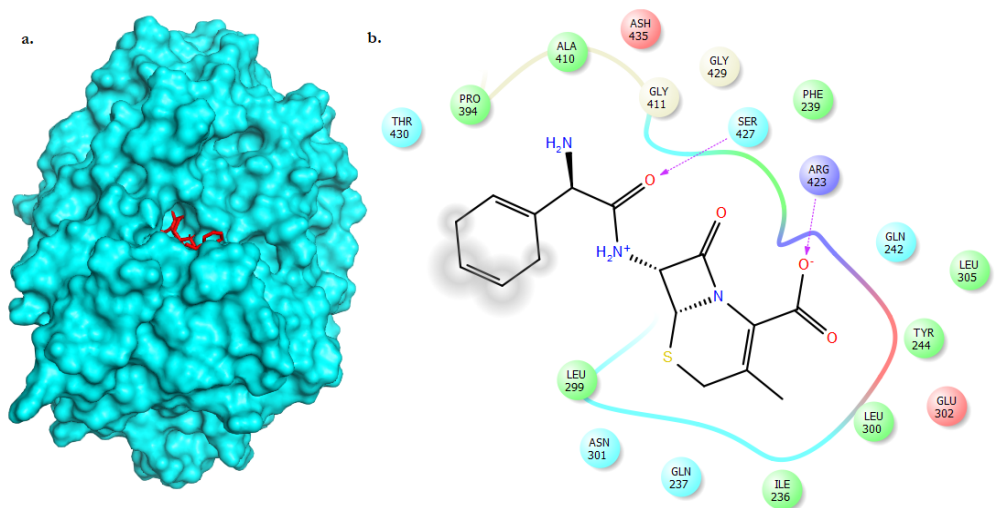


Figura 17.2. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y cefradina (RAD) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo 3D de GILCC 1 y

cefradina (RAD) pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Leu²⁹⁹, Ile²³⁶, Leu³⁰⁰, Tyr²⁴⁴, Leu³⁰⁵, Phe²³⁹, Ala⁴¹⁰ y Pro³⁹⁴.

En la interacción entre el modelo 3D de GILCC 1 y la cefradina (RAD) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe²⁶⁵, Phe¹⁶², Phe³³², Pro³⁹¹, Phe³³⁷, Leu¹⁶⁴ y Pro¹⁶³. La histidina del centro activo HE2⁴⁵⁸ y la prolina Pro¹⁶³ formaron puentes de hidrógeno con el oxígeno y el grupo amino del ligando respectivamente con distancias de 2.41 y 2.17 Å, respectivamente. La glicina Gly³⁹² también interactuó con el ligando (Figura 17.3, Tabla 8).

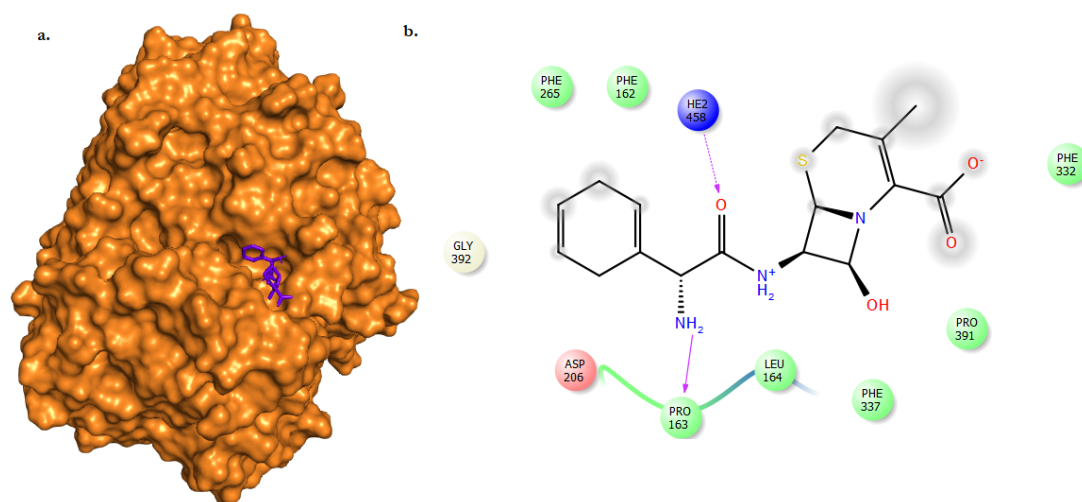


Figura 17.3. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y cefradina (RAD) a pH 7.0 a. Bolsillo al que se une el ligando. b. En la interacción entre el modelo 3D de GILCC 1 y la cefradina (RAD) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe²⁶⁵, Phe¹⁶², Phe³³², Pro³⁹¹, Phe³³⁷, Leu¹⁶⁴ y Pro¹⁶³.

En la interacción entre el modelo GILCC 1 y cefuroxima (CXM) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Leu³⁰⁵, Ile²³⁶, Leu³⁰⁰, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁸, Val⁴²⁶, Phe²³⁹, Ala⁴¹⁰. Los aminoácidos polares Thr⁴³⁰, Asn³⁰¹, Gln²³⁷, Gln²⁴², Ser⁴⁰⁹ y Ser⁴²⁷ también interactuaron con el ligando. El aminoácido Ash⁴³⁵ cargado positivamente y los aminoácidos polares Gln²³⁷ y Ser⁴²⁷ formaron puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo (OH) del antibiótico con distancias de 2.24, 2.43, 2.73 y 2.55 Å, respectivamente (Figura 17.4, Tabla 8).

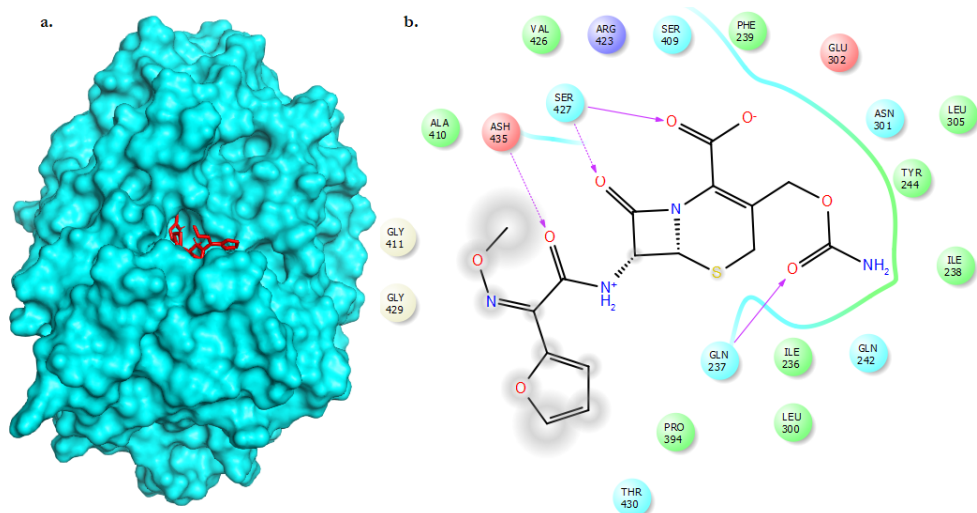


Figura 17.4. Acoplamiento molecular entre el modelo la enzima GILCC 1 y cefuroxima (CXM) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo GILCC 1 y cefuroxima (CXM) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Leu³⁰⁵, Ile²³⁶, Leu³⁰⁰, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁸, Val⁴²⁶, Phe²³⁹, Ala⁴¹⁰.

En la interacción entre el modelo GILCC 1 y la cefuroxima (CXM) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹¹, Phe³³⁷, Phe³³², Phe²⁶⁵, Ala³⁹³, Pro²⁰⁷, Pro³⁹⁶, Phe²³⁹, Pro³⁹⁴, Ile⁴⁵⁵, Leu¹⁶⁴, Pro¹⁶³ y Phe¹⁶². Los aminoácidos polares Asn²⁰⁸ y Ser²⁶⁴ al igual que el aminoácido Asp²⁰⁶ cargado positivamente, y las histidinas del centro activo HE2⁴⁵⁸ y HE3³⁹⁵ interactuaron con la cefuroxima (CXM). Los aminoácidos Asn²⁰⁸ y Pro³⁹⁴ formaron puentes de hidrógeno con el grupo hidroxilo y el grupo amino, con una distancia de 2.38 y 2.25 Å, respectivamente (Figura 17.5, Tabla 8).

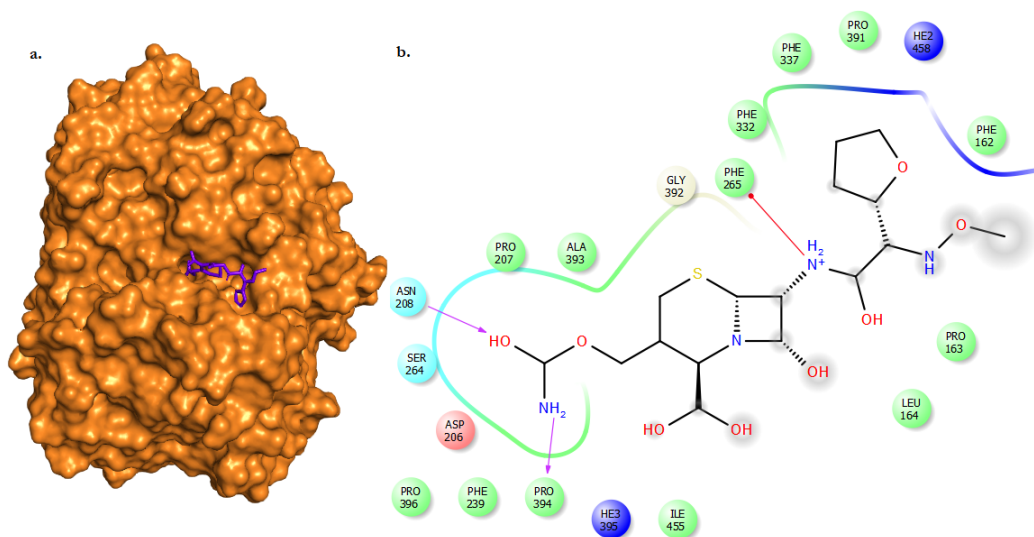


Figura 17.5. Acoplamiento molecular entre el modelo la enzima GILCC 1 y cefuroxima (CXM) a pH 7.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo GILCC

1 y la cefuroxima (CXM) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹¹, Phe³³⁷, Phe³³², Phe²⁶⁵, Ala³⁹³, Pro²⁰⁷, Pro³⁹⁶, Phe²³⁹, Pro³⁹⁴, Ile⁴⁵⁵, Leu¹⁶⁴, Pro¹⁶³ y Phe¹⁶².

En la interacción entre el modelo 3D de POXA 1B y cefazolina (CZ) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe³³⁸, Ala³⁹¹, Phe³³¹, Val¹⁶², Ile⁴⁵³, Pro³⁹³, Phe²³⁸ y Pro³⁹⁵. También los aminoácidos polares Ser²⁶⁴, Asn²⁶³, Asn²⁰⁷ y Ser⁴²⁶ interactuaron con el antibiótico. El aminoácido Asn²⁶³ formó un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo (OH) del ligando y el aminoácido Pro³⁹³ formó un puente de hidrógeno con el grupo amino (H₂N⁺) del antibiótico con distancias de 2.20 y 2.21 Å, respectivamente. Además, el aminoácido Phe²³⁸ formó una interacción de tipo “stacking” π-π con el anillo aromático de la cefazolina (CZ) (**Figura 18, Tabla 8**).

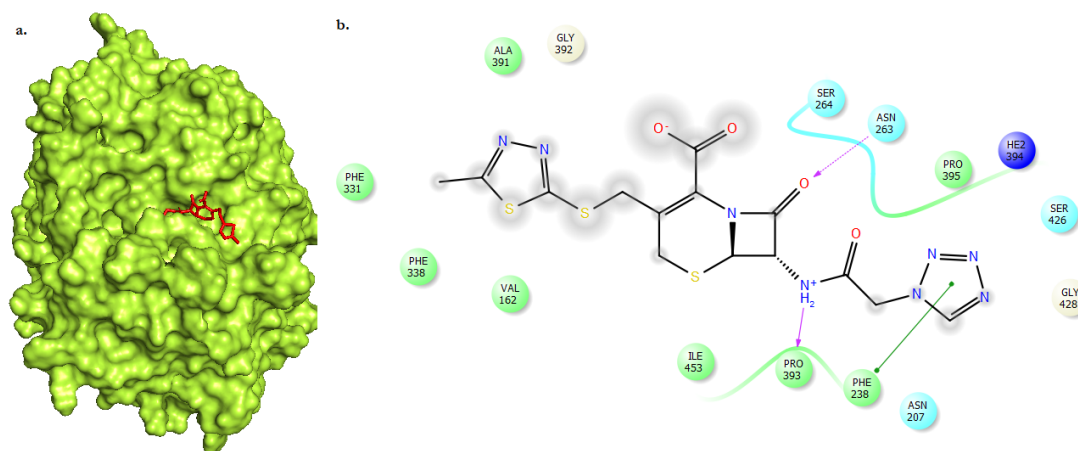


Figura 18. Acoplamiento molecular entre el modelo la enzima POXA 1B y cefazolina (CZ) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo 3D de POXA 1B y cefazolina (CZ) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe³³⁸, Ala³⁹¹, Phe³³¹, Val¹⁶², Ile⁴⁵³, Pro³⁹³, Phe²³⁸ y Pro³⁹⁵.

En la interacción entre el modelo 3D de POXA 1B y cefradina (RAD) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ala³⁹¹, Phe³³¹, Pro¹⁶³, Phe³³⁸, Val¹⁶² y Ile¹⁵³. También, los aminoácidos polares His¹⁶⁴, Ser²⁶⁴ y Asn²⁶³ interactuaron con el ligando. El aminoácido del centro activo HE3⁴⁵⁶, y los aminoácidos Gly³⁹² y Asn²⁶³ formaron un puente de hidrógeno con los grupos hidroxilo (OH) del antibiótico con distancias de 2.93 1.90, 2.50 Å, respectivamente (**Figura 18.1, Tabla 8**).

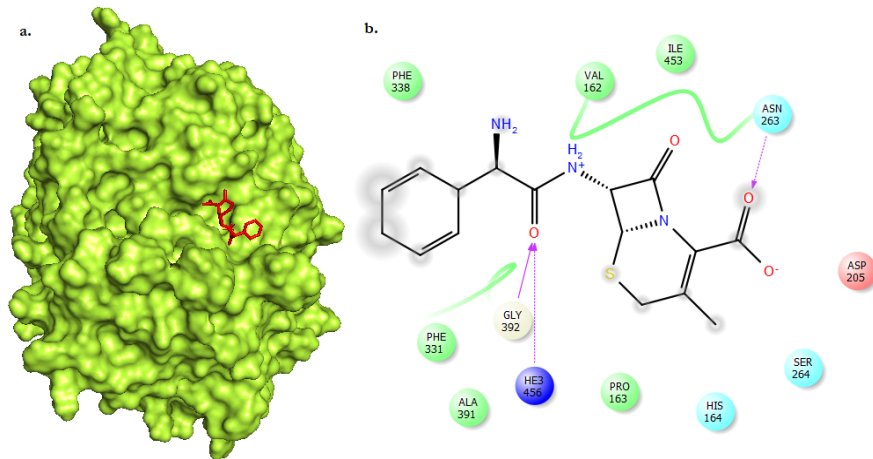


Figura 18.1. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y cefradina (RAD) a pH 3.0. **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo 3D de POXA 1B y cefradina (RAD) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ala³⁹¹, Phe³³¹, Pro¹⁶³, Phe³³⁸, Val¹⁶² y Ile¹⁵³.

En la interacción entre el modelo POXA 1B y cefuroxima (CXM) pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹³, Ala³⁹¹, Phe³³¹, Val³⁸⁹, Phe³⁹⁰, Phe³³⁸, Val¹⁶², Ile⁴⁵³ y Pro³⁹⁵. Los aminoácidos polares Asn²⁶³, Ser²⁶⁴ y Asn²⁰⁷ también interactuaron con el ligando. El aminoácido del centro activo HE3⁴⁵⁶, al igual que los aminoácidos Gly³⁹² y Asn²⁶³ formaron un puente de hidrógeno con los grupos hidroxilo (OH) del ligando con distancias de 2.15, 2.78 y 2.51 Å, respectivamente, mientras que, el aminoácido Pro³⁹³ formó un puente de hidrógeno con el grupo amino (H₂N⁺) de la cefuroxima (CXM) con una distancia de 2.61 Å (**Figura 18.2, Tabla 8**).

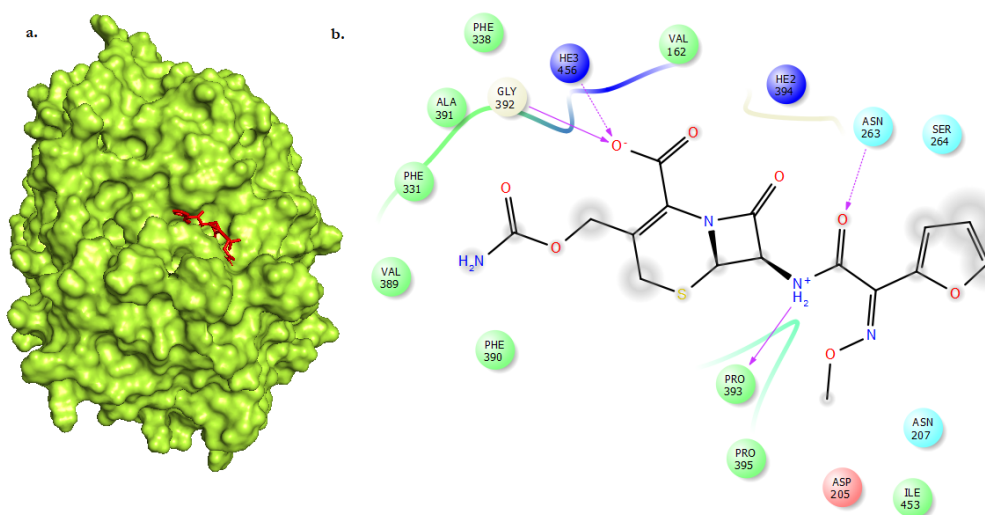


Figura 18.2. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y cefuroxima (CXM) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo POXA 1B y cefuroxima (CXM) pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹³, Ala³⁹¹, Phe³³¹, Val³⁸⁹, Phe³⁹⁰, Phe³³⁸, Val¹⁶², Ile⁴⁵³ y Pro³⁹⁵.

5.7.5. Acoplamiento molecular de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B con tiamfenicol (TP)

La interacción entre el modelo GILCC 1 y tiamfenicol (TP) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Val⁴²⁶, Val⁴²⁵, Phe²³⁹, Tyr²⁴⁴, Ala⁴¹⁰, Pro³⁹⁴ y Ala⁴³³. Los aminoácidos polares Ser⁴²⁷, Gln²⁴², Gln²³⁷, Thr⁴³⁰ y Ser⁴⁰⁹ también interactuaron con el ligando. El aminoácido Ash⁴³⁵, con carga positiva, formó un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo (OH) del antibiótico con una distancia de 2.43 Å, mientras que el aminoácido Glu³⁰², también con carga positiva, formó un puente de sal con el grupo amino (H₂N⁺) del tiamfenicol (TP) (**Figura 19, Tabla 8**).

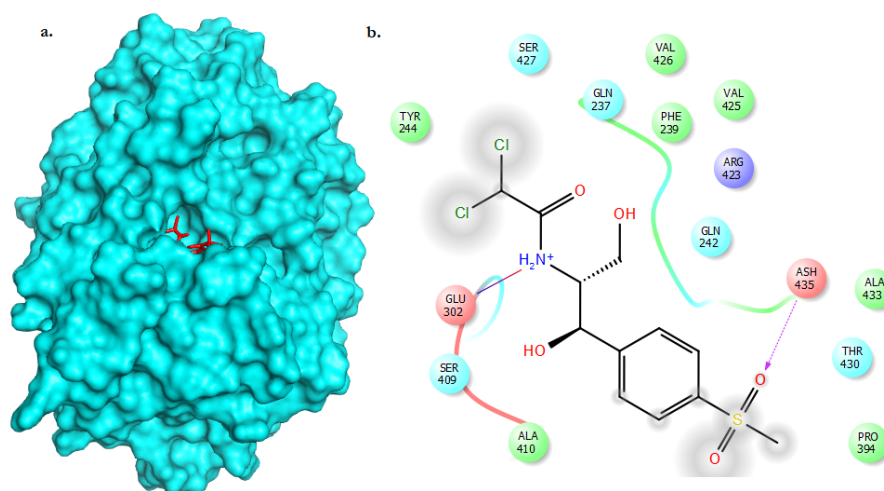


Figura 19. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC1 y tiamfenicol (TP) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** La interacción entre el modelo GILCC 1 y tiamfenicol (TP) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Val⁴²⁶, Val⁴²⁵, Phe²³⁹, Tyr²⁴⁴, Ala⁴¹⁰, Pro³⁹⁴ y Ala⁴³³.

En la interacción entre el modelo GILCC 1 y el tiamfenicol (TP) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe¹⁶², Pro³⁹¹, Leu¹⁶⁴, Phe²⁶⁵ y Pro¹⁶³. El aminoácido polar Ser²⁶⁴ y el aminoácido con carga positiva Asp²⁰⁶ también interactuaron con el ligando. El aminoácido Phe²⁶⁵ formó una interacción de tipo “*stacking*” π - π con uno de los anillos del tiamfenicol (TP) (**Figura 19.1, Tabla 8**).

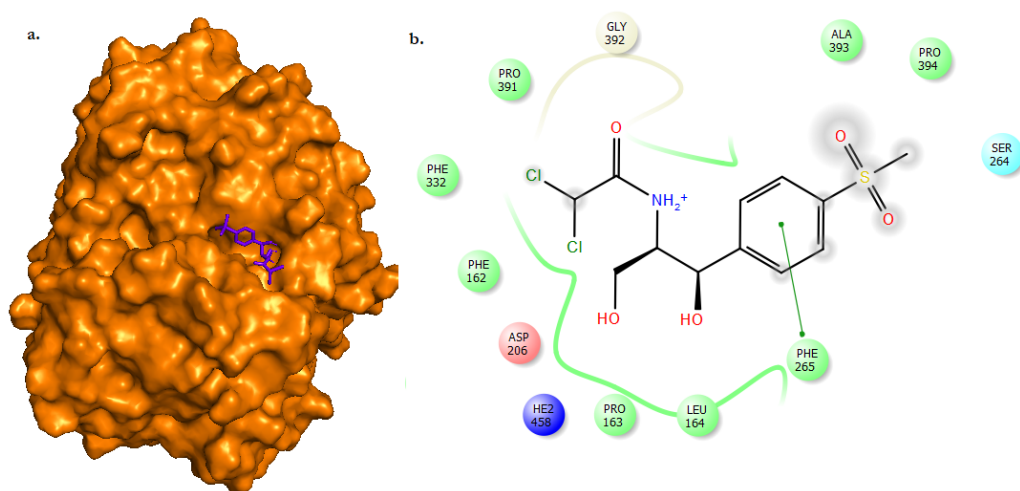


Figura 19.1. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y tiamfenicol (TP) a pH 7.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo GILCC 1 y el tiamfenicol (TP) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe¹⁶², Pro³⁹¹, Leu¹⁶⁴, Phe²⁶⁵ y Pro¹⁶³.

En la interacción entre el modelo POXA 1B y tiamfenicol (TP) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe²³⁸, Pro³⁹³, Ile⁴⁵³, Val¹⁶², Phe³³⁸ y Ala³⁹¹. Los aminoácidos polares Ser²⁶⁴ y Asn²⁶³ también interactuaron con el ligando. El aminoácido del centro activo HE3⁴⁵⁶, al igual que el aminoácido Gly³⁹² formaron un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo (OH) del tiamfenicol (TP) con distancias de 2.29 y 2.31 Å, respectivamente, mientras que el aminoácido Pro³⁹³ formó un puente de hidrógeno con el grupo amino (H₂N⁺) con una distancia de 2.31 Å (**Figura 20, Tabla 8**).

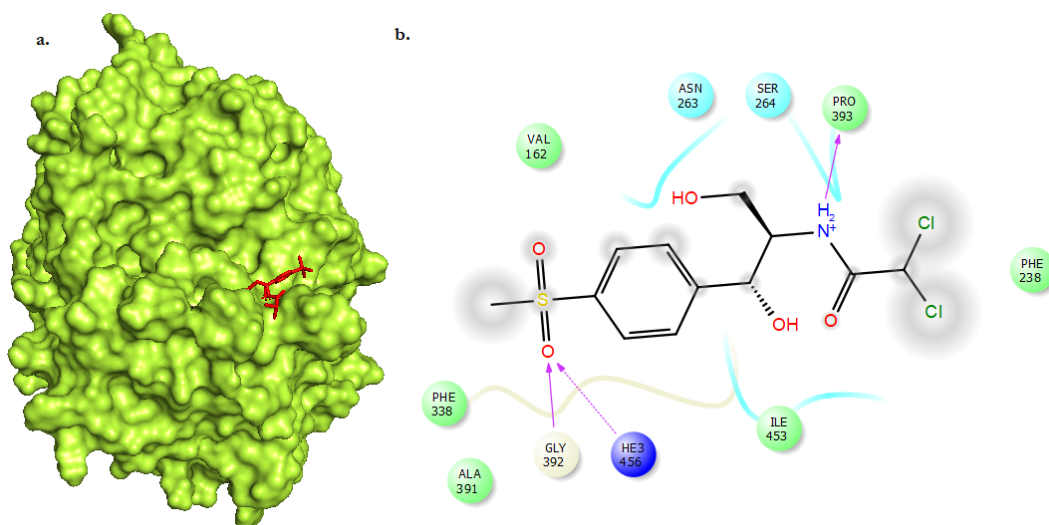


Figura 20. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y tiamfenicol (TP) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo POXA 1B y el tiamfenicol (TP) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe²³⁸, Pro³⁹³, Ile⁴⁵³, Val¹⁶², Phe³³⁸ y Ala³⁹¹.

5.7.6. Acoplamiento molecular de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B con fosfomicina (FOS).

En la interacción entre el modelo GILCC 1 y fosfomicina (FOS) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile²³⁸, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁶, Leu³⁰⁰, Leu³⁰⁵ y Phe²³⁹. Los aminoácidos polares Ser⁴⁰⁹, Ser⁴²⁷, Asn³⁰¹, Gln²³⁷ y Gln²⁴² también interactuaron con el ligando. El aminoácido Arg⁴²³ cargado negativamente y el aminoácido polar Gln²⁴² formaron un puente de hidrógeno con los grupos hidroxilo (OH) del antibiótico con distancias de 2.16 y 2.03 Å, respectivamente (**Figura 21, Tabla 8**).

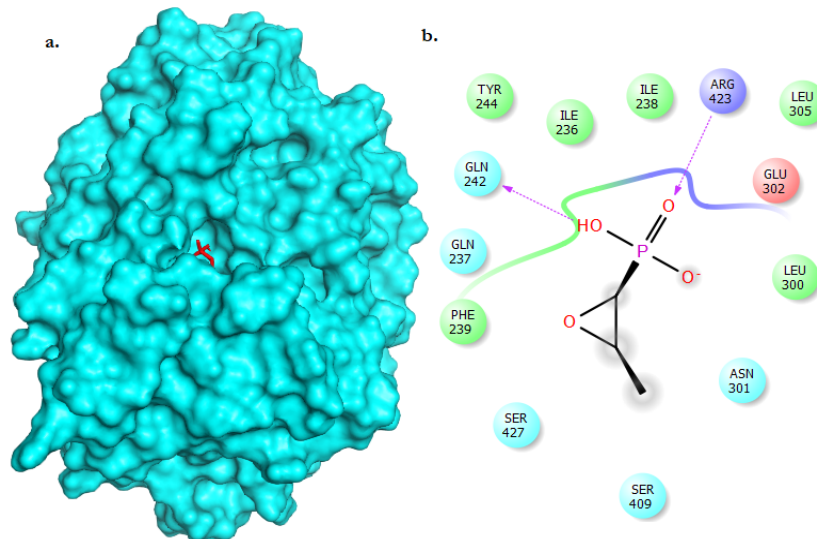


Figura 21. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y fosfomicina (FOS) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo GILCC 1 y fosfomicina (FOS) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile²³⁸, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁶, Leu³⁰⁰, Leu³⁰⁵ y Phe²³⁹.

En la interacción entre el modelo GILCC 1 y fosfomicina (FOS) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵⁵, Pro¹⁶³, Phe²⁶⁵, y Phe¹⁶². La glicina Gly³⁹², el aminoácido con carga positiva Asp²⁰⁶ y la histidina del centro activo HE2⁴⁵⁸ también interactuaron con el ligando (**Figura 21.1, Tabla 8**).

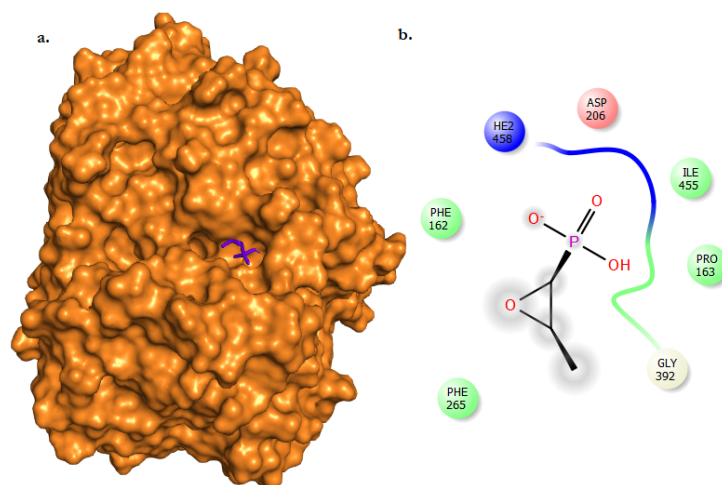


Figura 21.1. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y fosfomicina (FOS) a pH 7.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo GILCC 1 y la fosfomicina (FOS) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵⁵, Pro¹⁶³, Phe²⁶⁵, y Phe¹⁶².

En la interacción entre el modelo 3D de POXA 1B y fosfomicina (FOS) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵³, Pro³⁹³, Pro¹⁶³ y Val¹⁶². Los aminoácidos polares His¹⁶⁴, Ser²⁶⁴ y Asn²⁶³, al igual que el aminoácido del centro activo HE3⁴⁵⁶ también interactuaron con el ligando. Los aminoácidos Pro¹⁶³ y Asn²⁶³ formaron puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo (OH) de la fosfomicina (FOS) con distancias de 2.13 y 2.09 Å, respectivamente (**Figura 22, Tabla 8**).

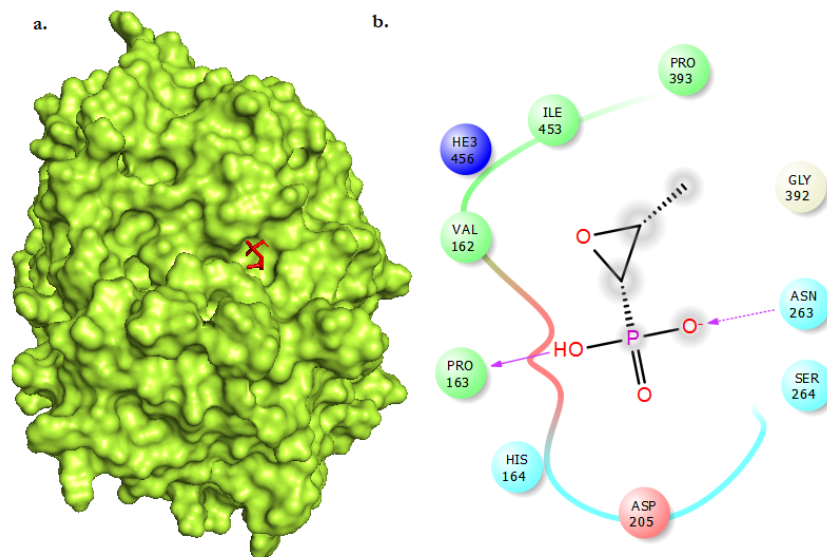


Figura 22. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y fosfomicina (FOS) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo 3D de POXA 1B y la fosfomicina (FOS) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵³, Pro³⁹³, Pro¹⁶³ y Val¹⁶².

5.7.7. Acoplamiento molecular de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B con las lincosamidas seleccionadas

En la interacción entre el modelo GILCC 1 y clindamicina (CM) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe²³⁹, Pro³⁹⁴, Leu³⁰⁰, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁶, Ala⁴¹⁰ y Leu²⁹⁹. Los aminoácidos polares Thr⁴³⁰, Asn³⁰¹, Ser⁴⁰⁹, Ser⁴²⁷, Gln²⁴² y Gln²³⁷ también interactuaron con el ligando. No se formaron puentes de hidrógeno entre los aminoácidos del modelo y el ligando (Figura 23, Tabla 8).

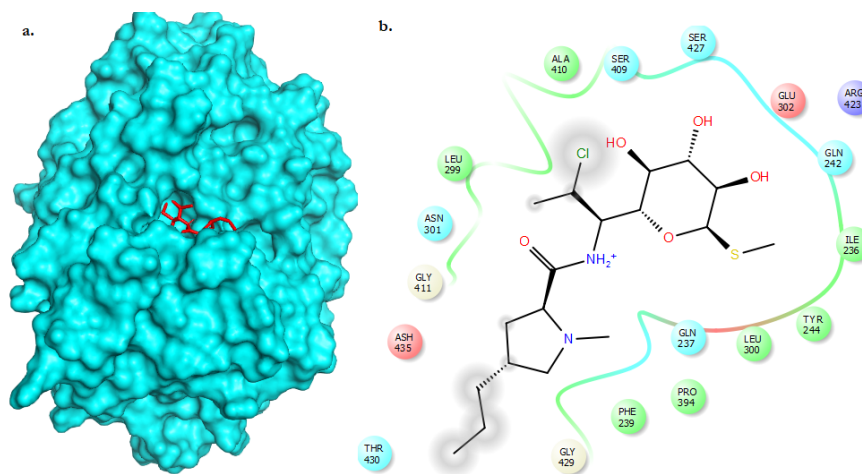


Figura 23. Acoplamiento molecular entre el modelo la enzima GILCC 1 y clindamicina (CM) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En la interacción entre el modelo GILCC

1 y la clindamicina (CM) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe²³⁹, Pro³⁹⁴, Leu³⁰⁰, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁶, Ala⁴¹⁰ y Leu²⁹⁹.

En la interacción entre el modelo GILCC 1 y la clindamicina (CM) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro¹⁶³, Leu¹⁶⁴, Phe¹⁶², Phe³³⁷, Phe³³², Pro³⁹¹, Phe²⁶⁵, Ala³⁹³ y Pro³⁹⁴. El aminoácido polar Ser²⁶⁴, la glicina Gly392 y la histidina del centro activo HE2⁴⁵⁸ también interactuaron con el antibiótico. El aminoácido Phe²⁶⁵ formó una interacción de tipo Pi-cación con el grupo amino del ligando (H₂N⁺) (**Figura 23.1, Tabla 8**).

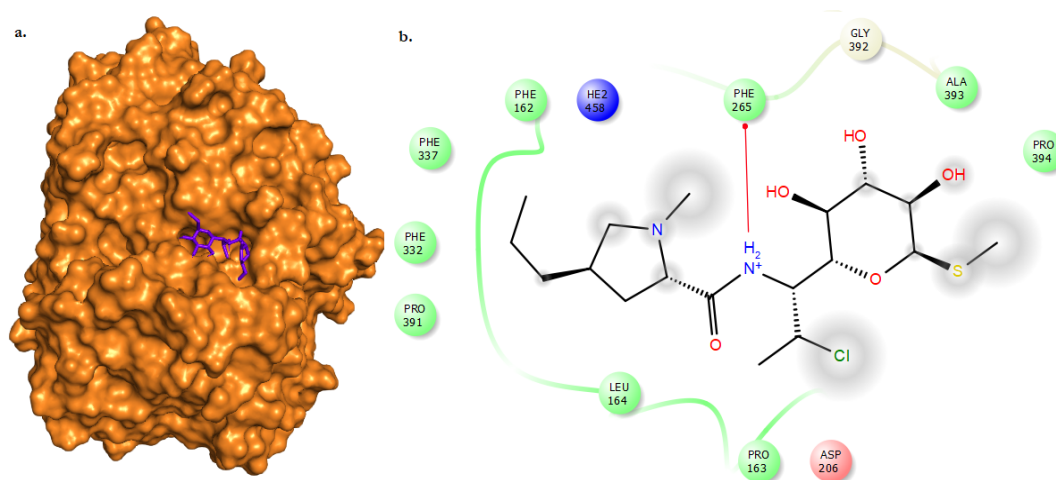


Figura 23.1. Acoplamiento molecular entre el modelo la enzima GILCC 1 y clindamicina (CM) a a pH 7.0 a. Bolsillo al que se une el ligando. b. En la interacción entre el modelo GILCC 1 y la clindamicina (CM) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro¹⁶³, Leu¹⁶⁴, Phe¹⁶², Phe³³⁷, Phe³³², Pro³⁹¹, Phe²⁶⁵, Ala³⁹³ y Pro³⁹⁴.

En las interacciones entre el modelo 3D de GILCC 1 y lincomicina (LIN) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Phe²³⁹, Ile²³⁶, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁸, Leu³⁰⁰, Leu³⁰⁵ y Ala⁴¹⁰. Los aminoácidos polares Thr⁴³⁰, Gln²³⁷, Asn³⁰¹, Ser⁴⁰⁹, Gln²⁴² y Ser⁴²⁷ también interactuaron con el antibiótico. El aminoácido Glu³⁰² con carga positiva, al igual que el aminoácido polar Gln²³⁷, formaron un puente de hidrógeno con uno de los grupos hidroxilo del ligando (OH) con distancias de 2.18 y 2.30 Å, respectivamente, mientras que, el aminoácido Ala⁴¹⁰ formó un puente de hidrógeno con un grupo amino (H₂N⁺) del antibiótico con una distancia de 2.45 Å, respectivamente (**Figura 23.2, Tabla 8**).

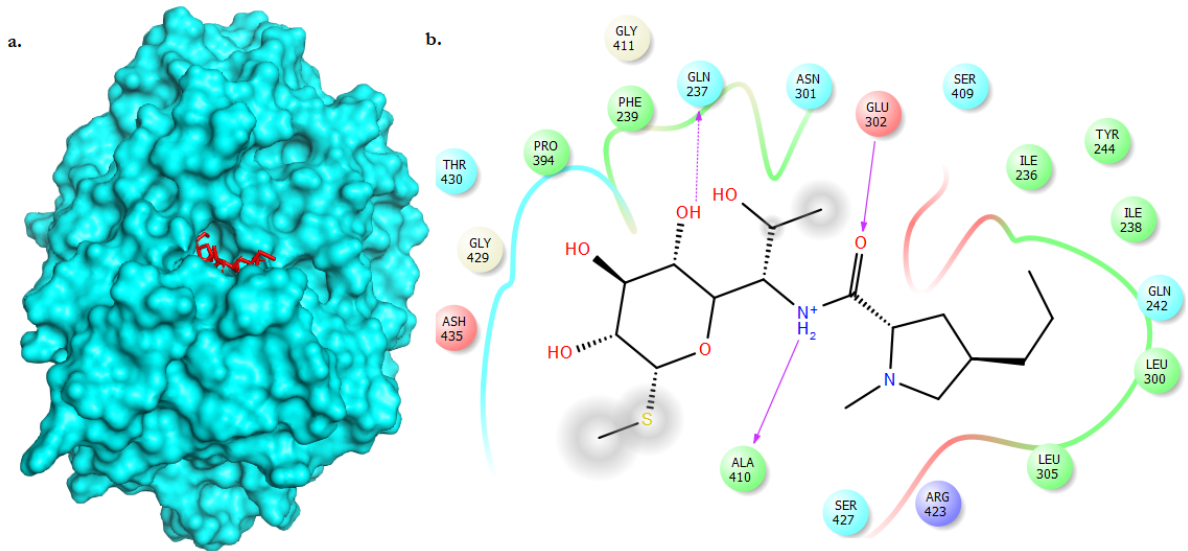


Figura 23.2. Acoplamiento molecular entre el modelo la enzima GILCC 1 y lincomicina (LIN) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo 3D de GILCC 1 y la lincomicina (LIN) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Phe²³⁹, Ile²³⁶, Tyr²⁴⁴, Ile²³⁸, Leu³⁰⁰, Leu³⁰⁵ y Ala⁴¹⁰.

En las interacciones entre el modelo 3D de GILCC 1 y la lincomicina (LIN) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe³³⁷, Phe³³², Pro³⁹¹, Ile⁴⁵⁵, Pro¹⁶³, Leu¹⁶⁴, Phe²⁶⁵, Phe¹⁶² y Pro¹⁶⁰. Los aminoácidos HE2⁴⁵⁸, Pro¹⁶³ y Phe¹⁶² formaron puentes de hidrógeno con los grupos OH del antibiótico con una distancia de 2.17, 2.71 y 2.50 Å, respectivamente (Figura 23.3, Tabla 8).

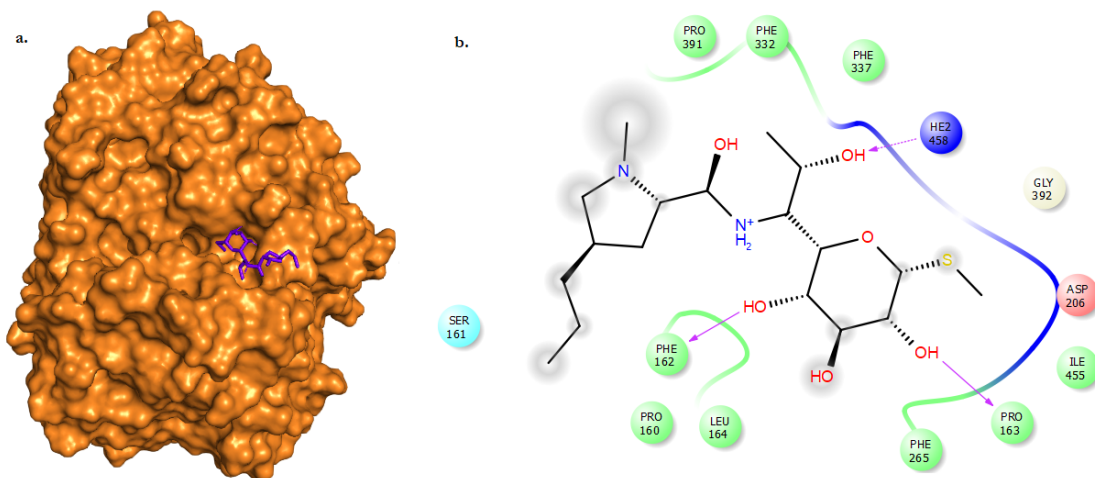


Figura 23.3. Acoplamiento molecular entre el modelo la enzima GILCC 1 y lincomicina (LIN) a pH 7.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo 3D de GILCC 1 y la lincomicina (LIN) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe³³⁷, Phe³³², Pro³⁹¹, Ile⁴⁵⁵, Pro¹⁶³, Leu¹⁶⁴, Phe²⁶⁵, Phe¹⁶² y Pro¹⁶⁰.

En las interacciones entre el modelo POXA 1B y clindamicina (CM) a pH 3.0 participaron entre los aminoácidos Pro³⁹³, Phe²³⁸, Pro³⁹⁵, Ile⁴⁵³, Val¹⁶² y Pro¹⁶³. Los aminoácidos polares Asn²⁰⁷, Ser²⁶⁴ y Asn²⁶³, al igual que el aminoácido del centro activo HE2³⁹⁴ también interactuaron con el ligando. Además, el aminoácido Asp²⁰⁵ con carga positiva, formó un puente de hidrógeno con un grupo hidroxilo (OH) de clindamicina (CM) con una distancia de 2.71 Å (**Figura 24, Tabla 8**).

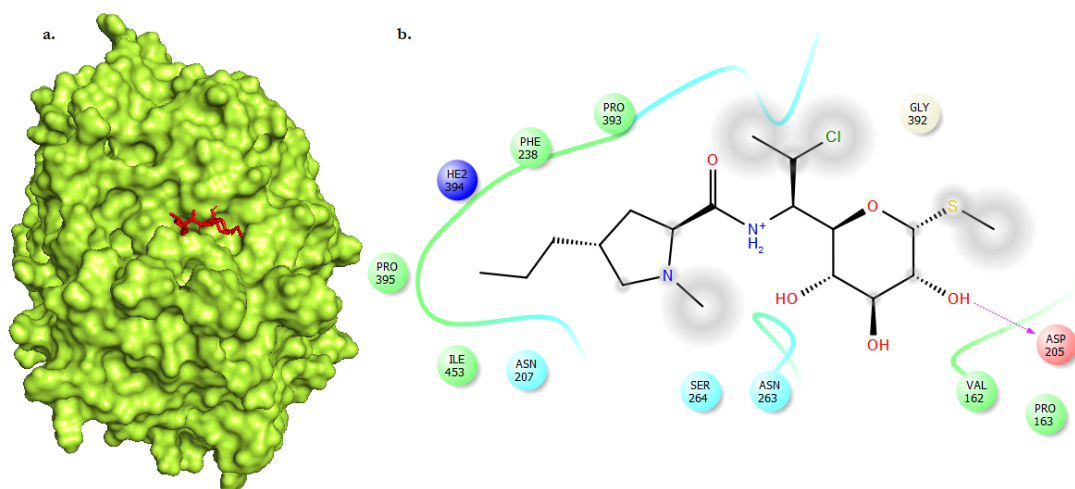


Figura 24. Acoplamiento molecular entre la enzima POXA 1B y clindamicina (CM) a pH 3.0 a. Bolsillo al que se une el ligando. b. En las interacciones entre el modelo POXA 1B y clindamicina (CM) a pH 3.0 participaron entre los aminoácidos Pro³⁹³, Phe²³⁸, Pro³⁹⁵, Ile⁴⁵³, Val¹⁶² y Pro¹⁶³.

En las interacciones entre el modelo 3D de POXA 1B y lincomicina (LIN) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹³, Ile⁴⁵³, Val¹⁶², Phe³³⁸, Phe³³¹ y Pro¹⁶³. Los aminoácidos polares Ser²⁶⁴, Asn²⁶³ y His¹⁶⁴ también interactuaron con el ligando. El aminoácido Pro¹⁶³, al igual que la Asn²⁶³ formaron puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo (OH) del antibiótico con distancias de 2.69 y 2.75 Å, respectivamente (**Figura 24.1, Tabla 8**).

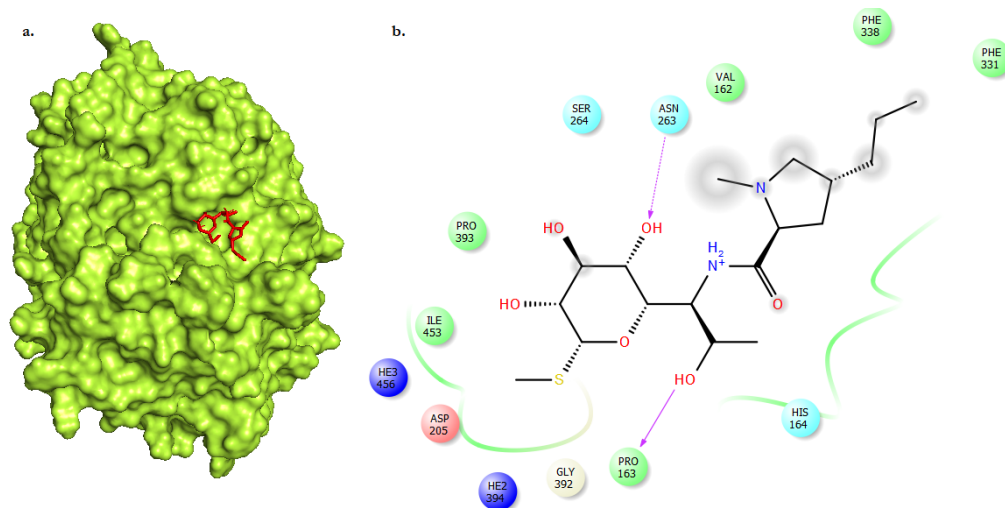


Figura 24.1. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y lincomicina (LIN) a pH 3.0. **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo 3D de POXA 1B y lincomicina (LIN) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹³, Ile⁴⁵³, Val¹⁶², Phe³³⁸, Phe³³⁸ y Pro¹⁶³.

5.7.8. Acoplamiento molecular de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B las fluoroquinolonas seleccionadas

En las interacciones entre el modelo GILCC 1 y la moxifloxacina (MXF) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Leu³⁰⁰, Leu³⁰⁵, Ile²³⁸, Ile²³⁶, Tyr⁴²⁴⁴, Phe²³⁹, Leu²⁹⁹, Ala⁴³³ y Ala⁴¹⁰. Los aminoácidos polares Ser⁴⁰⁹, Ser⁴²⁷, Gln²⁴², Gln²³⁷ y Thr⁴³⁰ también interactuaron con el ligando. El aminoácido Gln²³⁷ formó un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo, con una distancia de 1.95 Å y un puente de hidrógeno con el oxígeno de uno de los anillos del ligando con una distancia de 2.27 Å. El aminoácido Tyr²⁴⁴ también formó un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo del antibiótico con una distancia de 1.84 Å (Figura 25, Tabla 8).

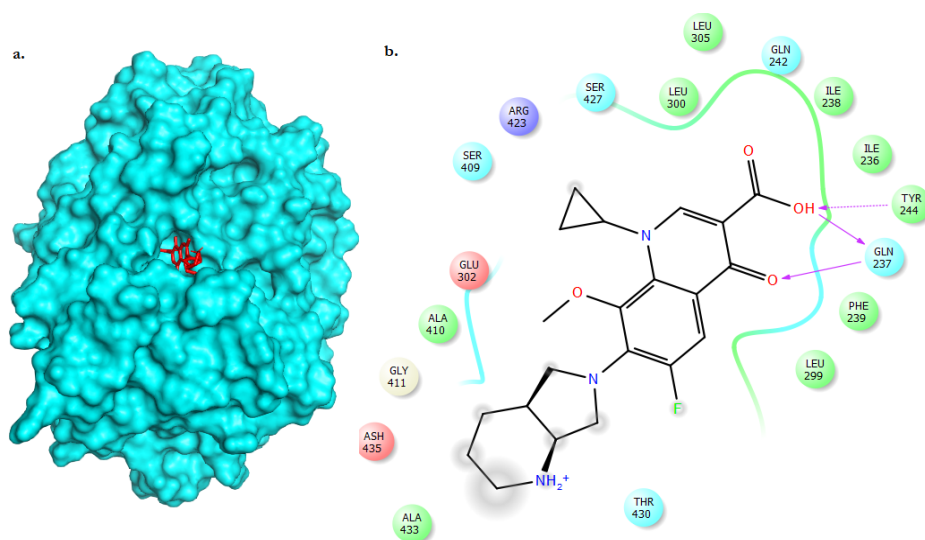


Figura 25. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y moxifloxacina (MXF) a pH 3.0. **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo GILCC 1 y la moxifloxacina (MXF) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Leu³⁰⁰, Leu³⁰⁵, Ile²³⁸, Ile²³⁶, Tyr⁴²⁴⁴, Phe²³⁹, Leu²⁹⁹, Ala⁴³³ y Ala⁴¹⁰.

En las interacciones entre el modelo GILCC 1 y la moxifloxacina (MXF) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe¹⁶², Ile⁴⁵⁵, Ala³⁹³, Pro³⁹⁴, Pro³⁹¹, Phe³³² y Phe²⁶⁵. Los aminoácidos polares Ser²⁶⁴ y Asn²⁰⁸, también interactuaron con el ligando. El aminoácido Asp²⁰⁶ con carga positiva, la glicina Gly³⁹² y la histidina del centro activo HE2⁴⁵⁸ también interactuaron con el antibiótico (Figura 25.1, Tabla 8).

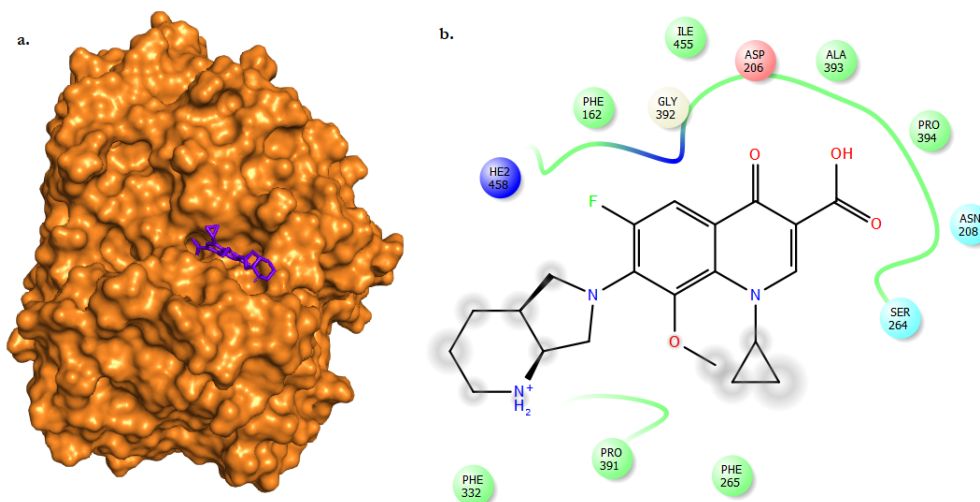


Figura 25.1. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y moxifloxacina (MXF) a pH 7.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo GILCC 1 y la moxifloxacina (MXF) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe¹⁶², Ile⁴⁵⁵, Ala³⁹³, Pro³⁹⁴, Pro³⁹¹, Phe³³² y Phe²⁶⁵.

En las interacciones entre el modelo GILCC 1 y la levofloxacin (LVX) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Leu²⁹⁹, Tyr²⁴⁴, Leu³⁰⁵, Leu³⁰⁰, Ile²³⁶, Ile²³⁸, Phe²³⁹, Ala⁴¹⁰ y Ala⁴³³. Los aminoácidos polares Thr⁴³⁰, Ser⁴⁰⁹, Ser⁴²⁷, Gln²⁴², Gln²³⁷ también interactuaron con el ligando. El aminoácido Gln²⁴² y Gln²³⁷ formaron un puente de hidrógeno con los grupos hidroxilo (OH) del antibiótico con distancias de 2.12 y 2.53 Å, respectivamente (Figura 25.2, Tabla 8).

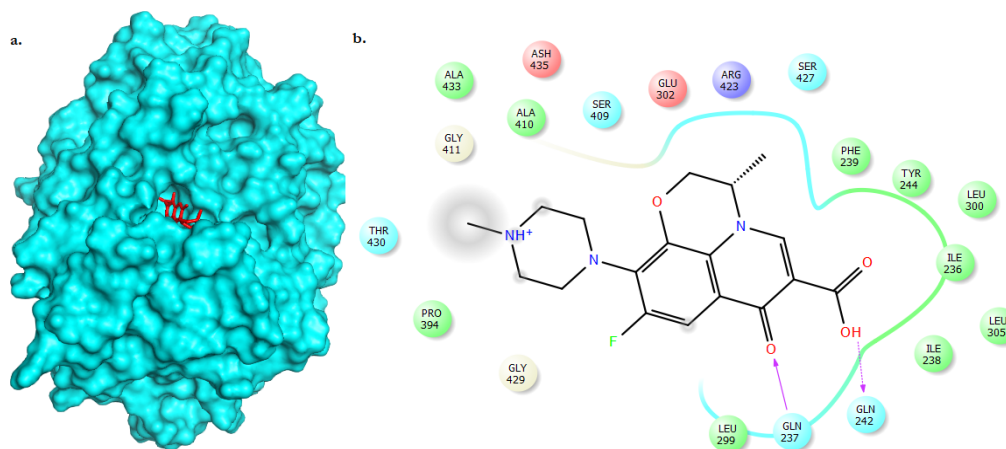


Figura 25.2. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y levofloxacina (LVX) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo GILCC 1 y la levofloxacina (LVX) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Leu²⁹⁹, Tyr²⁴⁴, Leu³⁰⁵, Leu³⁰⁰, Ile²³⁶, Ile²³⁸, Phe²³⁹, Ala⁴¹⁰ y Ala⁴³³.

En las interacciones entre el modelo GILCC 1 y la levofloxacin (LVX) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Ala³⁹³, Ile⁴⁵⁵, Phe⁴⁵⁷, Phe²⁶⁵, Phe¹⁶² y Leu¹⁶⁴. La glicina Gly³⁹², el

aminoácido con carga positiva Asp²⁰⁶ y la histidina del centro activo HE2⁴⁵⁸, también interactuaron con el ligando. El aminoácido Phe²⁶⁵ formó una interacción de tipo “stacking” π - π con uno de los anillos del antibiótico (**Figura 25.3, Tabla 8**).

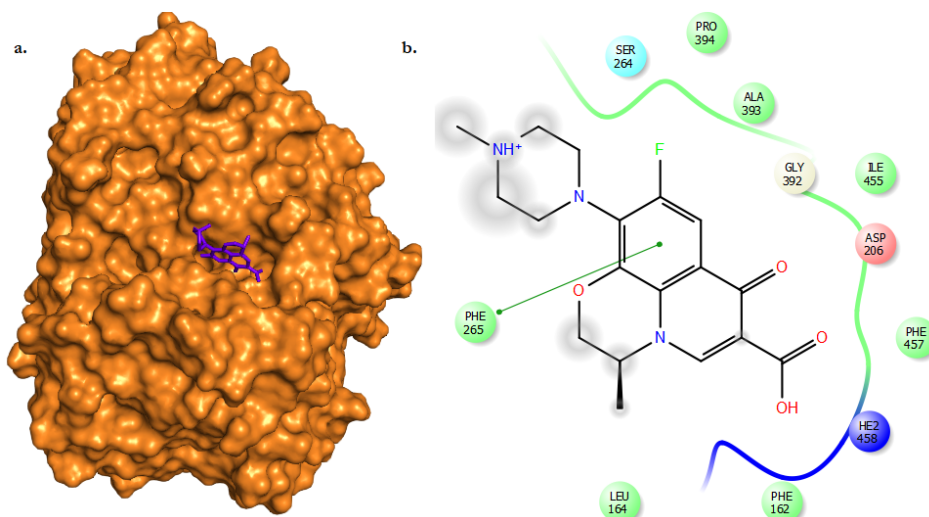


Figura 25.3. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y levofloxacin (LVX) a pH 7.0. **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo GILCC 1 y la levofloxacin (LVX) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴, Ala³⁹³, Ile⁴⁵⁵, Phe⁴⁵⁷, Phe²⁶⁵, Phe¹⁶² y Leu¹⁶⁴.

En las interacciones entre el modelo 3D de POXA 1B y la moxifloxacin (MXF) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe³³¹, Phe³⁹⁰, Ala³⁹¹, Pro³⁹¹, Phe³³⁸, Val¹⁶², Ile⁴⁵³ y Pro¹⁶³. Los aminoácidos polares Asn²⁶³, Ser²⁶⁴ y His¹⁶⁴, al igual que el aminoácido del centro activo HE3⁴⁵⁶ también interactuaron con el antibiótico. El aminoácido Asn²⁶³ formó un puente de hidrógeno con un grupo hidroxilo (OH) del ligando con una distancia de 2.81 Å (**Figura 26 Tabla 8**).

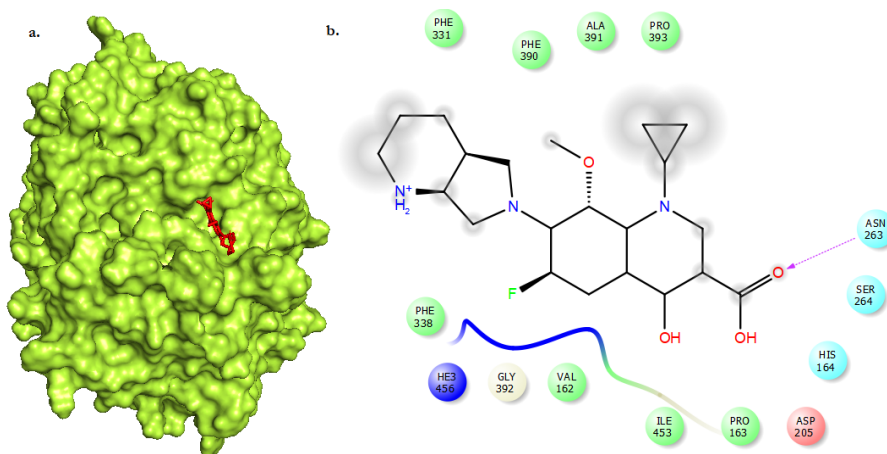


Figura 26. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y moxifloxacina (MXF) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo 3D de POXA 1B y la moxifloxacina (MXF) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe³³¹, Phe³⁹⁰, Ala³⁹¹, Pro³⁹¹, Phe³³⁸, Val¹⁶², Ile⁴⁵³ y Pro¹⁶³.

En las interacciones entre el modelo POXA 1B y levofloxacin (LVX) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe³⁹⁰, Phe³³⁸, Ala³⁹¹, Val¹⁶², Ile⁴⁵³ y Pro¹⁶³. Los aminoácidos polares Ser²⁰⁶, Asn²⁶³, Ser²⁶⁴ y His¹⁶⁴ también interactuaron con el antibiótico. El aminoácido Phe³³¹ formó una interacción de tipo Pi catión con un grupo amino (HN⁺) del ligando (**Figura 26.1, Tabla 8**).

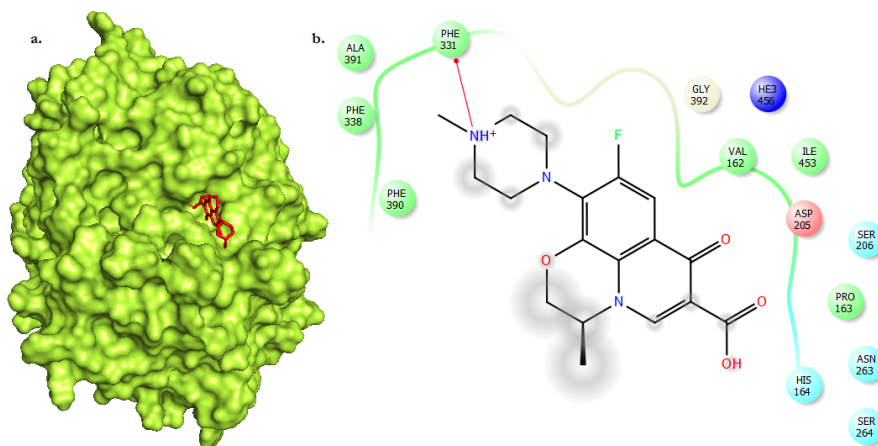


Figura 26.1. Acoplamiento molecular entre el modelo la enzima POXA 1B y levofloxacin (LVX) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo POXA 1B y levofloxacin (LVX) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe³⁹⁰, Phe³³⁸, Ala³⁹¹, Val¹⁶², Ile⁴⁵³ y Pro¹⁶³.

5.7.9. Acoplamiento molecular de los modelos 3D de GILCC1 y POXA 1B con las sulfonamidas seleccionadas.

En las interacciones entre el modelo GILCC 1 y trimetoprim (SXT) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe²³⁹, Ile²³⁶, Leu²⁹⁹, Leu³⁰⁰, Leu³⁰⁵, Tyr²⁴⁴, Pro³⁹⁴ y Ala⁴¹⁰. Los aminoácidos polares Gln²³⁷, Gln²⁴², Ser⁴²⁷, Thr⁴³⁰ y Asn³⁰¹ también interactuaron con el ligando. El aminoácido Glu³⁰², con carga positiva y el aminoácido hidrofóbico Tyr²⁴⁴, formaron puentes de hidrógeno con los grupos amino del antibiótico, HN⁺ y H₂N con distancias de 2.54 y 2.39 Å, respectivamente (Figura 27, Tabla 8).

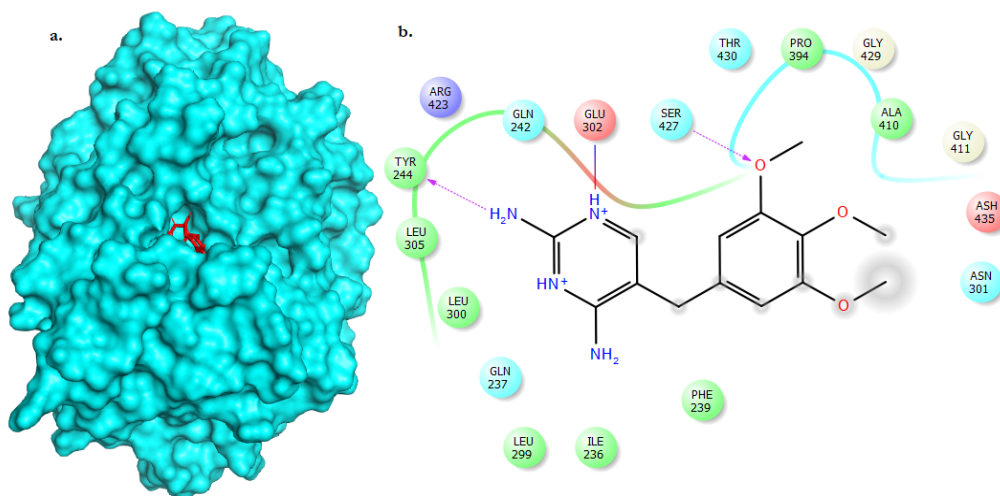


Figura 27. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y el trimetoprim (SXT) a pH 3.0 a. Bolsillo al que se une el ligando. b. En las interacciones entre el modelo GILCC 1 y trimetoprim (SXT) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe²³⁹, Ile²³⁶, Leu²⁹⁹, Leu³⁰⁰, Leu³⁰⁵, Tyr²⁴⁴, Pro³⁹⁴ y Ala⁴¹⁰.

En las interacciones entre el modelo GILCC 1 y el trimetoprim (SXT) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe¹⁶², Pro¹⁶³, Pro³⁹⁶, Pro²⁰⁷, Ile⁴⁵⁵, Phe²³⁹, Pro³⁹⁴, Phe²⁶⁵ y Leu¹⁶⁴. Los aminoácidos polares Ser²⁶⁴ y Asn²⁰⁸ también interactuaron con el ligando. Además, el aminoácido Asp²⁰⁶ con carga positiva, la glicina Gly³⁹² y la histidina del centro activo HE2⁴⁵⁸ también interactuaron con el ligando. El aminoácido Phe²⁶⁵ formó una interacción de tipo “*stacking*” π - π con uno de los anillos del antibiótico (Figura 27.1, Tabla 8).

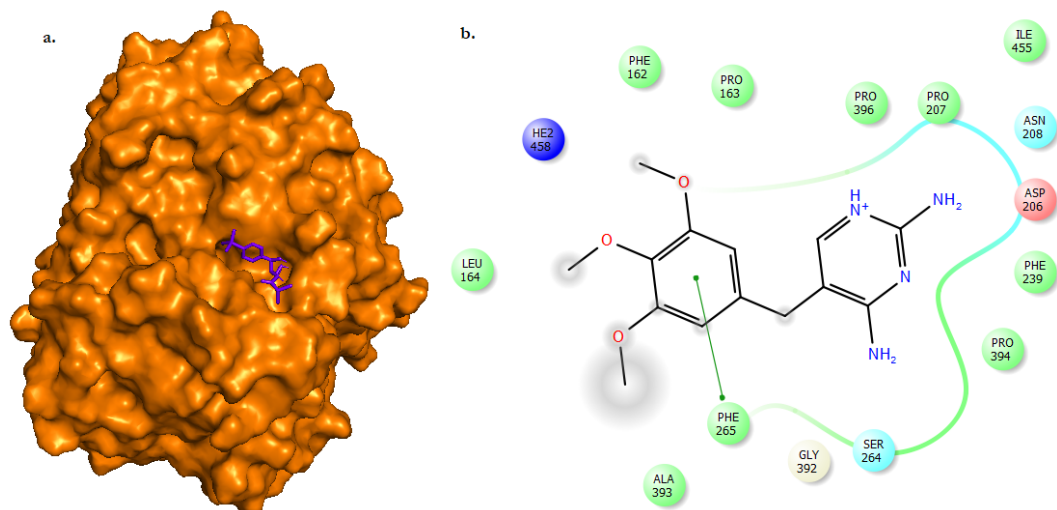


Figura 27.1. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y trimetoprim (SXT) a pH 7.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo GILCC 1 y el trimetoprim (SXT) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe¹⁶², Pro¹⁶³, Pro³⁹⁶, Pro²⁰⁷, Ile⁴⁵⁵, Phe²³⁹, Pro³⁹⁴, Phe²⁶⁵ y Leu¹⁶⁴.

Las interacciones entre el modelo de GILCC 1 y el sulfisoxazol (FIS) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile²³⁶, Leu³⁰⁰, Leu²⁹⁹, Phe²³⁹, Ala⁴³³, Ala⁴¹⁰ y Tyr²⁴⁴. Los aminoácidos polares Gln²⁴², Asn³⁰¹, Thr⁴³⁰, Ser⁴²⁷, Ser⁴⁰⁹ y Gln²³⁷ también interactuaron con el ligando. El aminoácido Glu³⁰², con carga positiva, formó un puente de hidrógeno con el oxígeno, mientras que el aminoácido Tyr²⁴⁴, formó un puente de hidrógeno con el nitrógeno de uno de los anillos del ligando con distancias de 2.29 y 2.16 Å, respectivamente (**Figura 27.2, Tabla 8**).

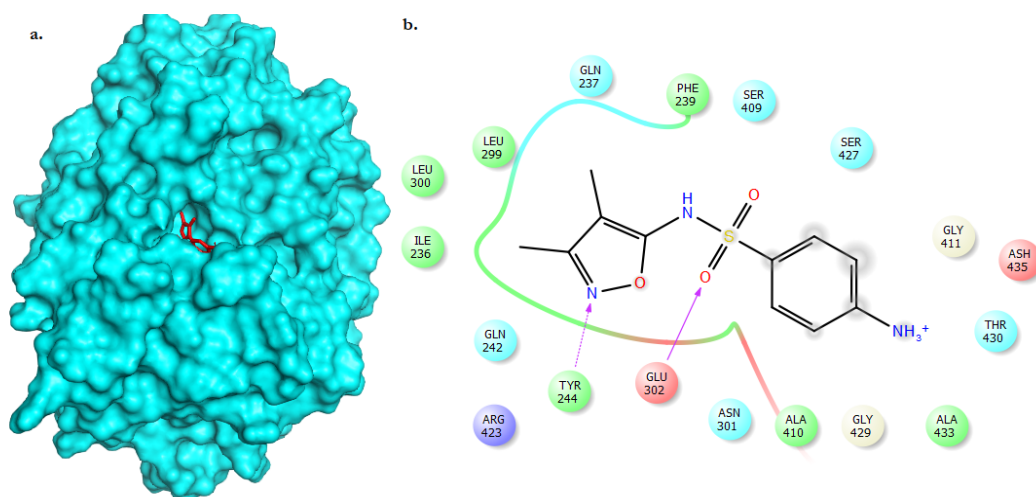


Figura 27.2. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y sulfisoxazol (FIS) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** Las interacciones entre el modelo de GILCC 1 y el sulfisoxazol (FIS) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile²³⁶, Leu³⁰⁰, Leu²⁹⁹, Phe²³⁹, Ala⁴³³, Ala⁴¹⁰ y Tyr²⁴⁴.

En las interacciones entre el modelo de GILCC 1 y el sulfisoxazol (FIS) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe³³², Pro³⁹¹, Phe¹⁶², Phe³³⁷, Ile⁴⁵⁵, Phe²⁶⁵, Pro¹⁶³ y Leu¹⁶⁴. El aminoácido Asp²⁰⁶ con carga positiva, la glicina Gly³⁹² y la histidina del centro activo HE2⁴⁵⁸ también interactuaron con el ligando. El aminoácido Phe²⁶⁵ formó una interacción de tipo “*stacking*” π - π con uno de los anillos del antibiótico (**Figura 27.3, Tabla 8**).

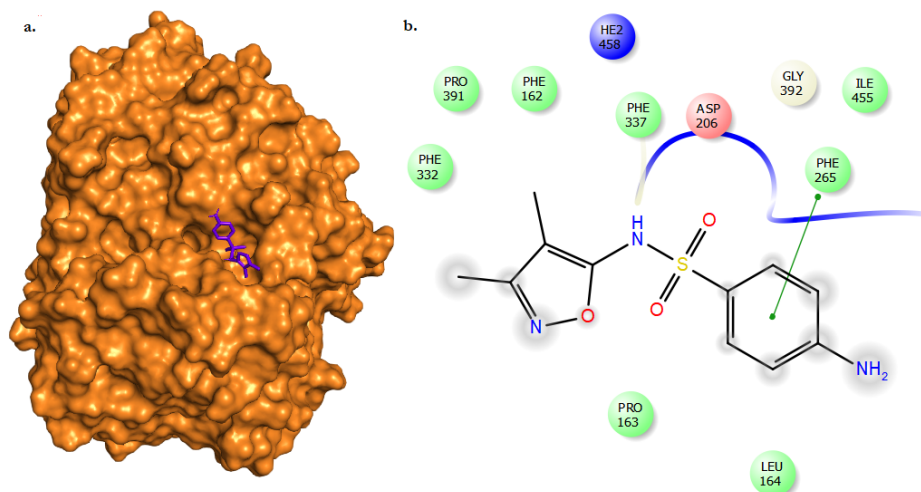


Figura 27.3. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y sulfisoxazol (FIS) a pH 7.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo de GILCC 1 y el sulfisoxazol (FIS) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe³³², Pro³⁹¹, Phe¹⁶², Phe³³⁷, Ile⁴⁵⁵, Phe²⁶⁵, Pro¹⁶³ y Leu¹⁶⁴.

En las interacciones entre el modelo de GILCC 1 y sulfinalamida (SA) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ala⁴¹⁰, Leu³⁰⁵, Leu³⁰⁰, Ile²³⁶, Leu²⁹⁹, Ile²³⁸ y Tyr²⁴⁴. Los aminoácidos polares Gln²³⁷, Gln²⁴², Ser⁴²⁷, Ser⁴⁰⁹ y Asn³⁰¹ también interactuaron con el ligando. Los aminoácidos polares Gln²³⁷, Ser⁴⁰⁹ y Tyr²⁴⁴ formaron puentes de hidrógeno con los grupos amino del antibiótico (HN₂) con distancias de 2.18, 2.19 y 2.27 Å respectivamente, mientras que, el aminoácido polar Gln²⁴² formó un puente de hidrógeno con uno de los oxígenos de la Sulfinalamida (SA) con una distancia de 2.32 Å (**Figura 27.4, Tabla 8**).

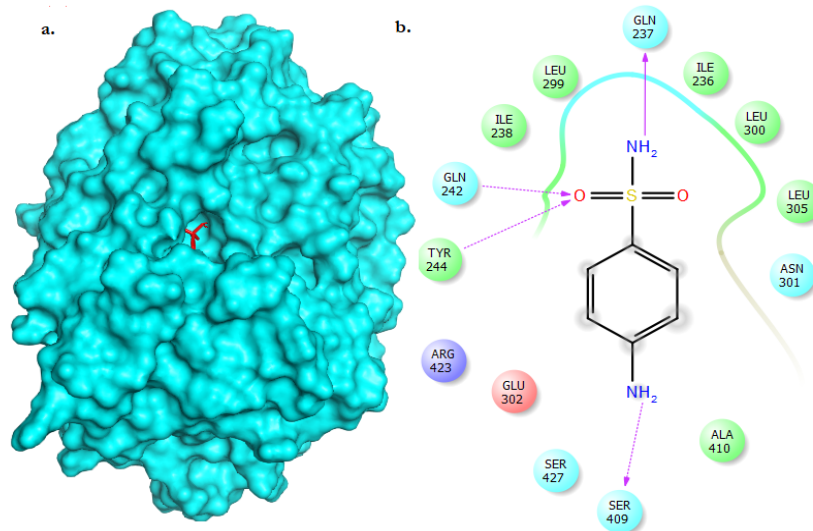


Figura 27.4. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y sulfinalamida (SA) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo de GILCC 1 y sulfinalamida (SA) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ala⁴¹⁰, Leu³⁰⁵, Leu³⁰⁰, Ile²³⁶, Leu²⁹⁹, Ile²³⁸ y Tyr²⁴⁴.

En las interacciones entre el modelo de GILCC 1 y sulfinalamida (SA) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe¹⁶², Pro¹⁶³, Phe⁴⁵⁷, Ile⁴⁵⁵, Ala³⁹³, Pro³⁹⁴ y Phe²⁶⁵. El aminoácido polar Ser²⁶⁴ y el aminoácido con carga positiva Asp²⁰⁶ también interactuaron con el ligando. La prolina Pro¹⁶³ y la alanina Ala³⁹³ formaron puentes de hidrógeno con los grupos amino del antibiótico con distancias de 2.14 y 2.26 Å, respectivamente, mientras que la histidina del centro activo HE2⁴⁵⁸ formó un puente de hidrógeno con el oxígeno a una distancia de 2.45 Å. El aminoácido Phe²⁶⁵ formó una interacción de tipo “*stacking*” π - π con uno de los anillos del antibiótico (**Figura 27.5**, **Tabla 8**).

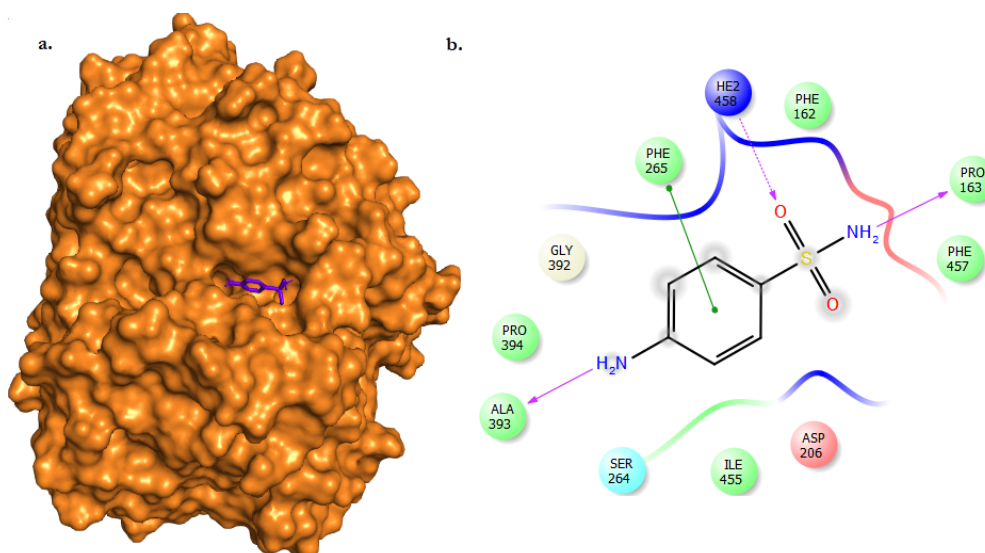


Figura 27.5. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de GILCC 1 y sulfinalamida (SA) a pH 7.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo de GILCC 1 y sulfinalamida (SA) a pH 7.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Phe¹⁶², Pro¹⁶³, Phe⁴⁵⁷, Ile⁴⁵⁵, Ala³⁹³, Pro³⁹⁴ y Phe²⁶⁵.

En las interacciones entre el modelo POXA 1B y trimetoprim (SXT) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵³, Pro³⁹³, Val¹⁶², Pro¹⁶³, Phe²³⁸ y Pro³⁹⁵. Los aminoácidos polares His¹⁶⁴, Ser²⁶⁴, Asn²⁰⁷, Asn²⁶³ y Gln²³⁶ también interactuaron con el antibiótico. El aminoácido Pro³⁹³ formó un puente de hidrógeno con el grupo amino (H₂N) del ligando con una distancia de 2.75 Å (Figura 28, Tabla 8).

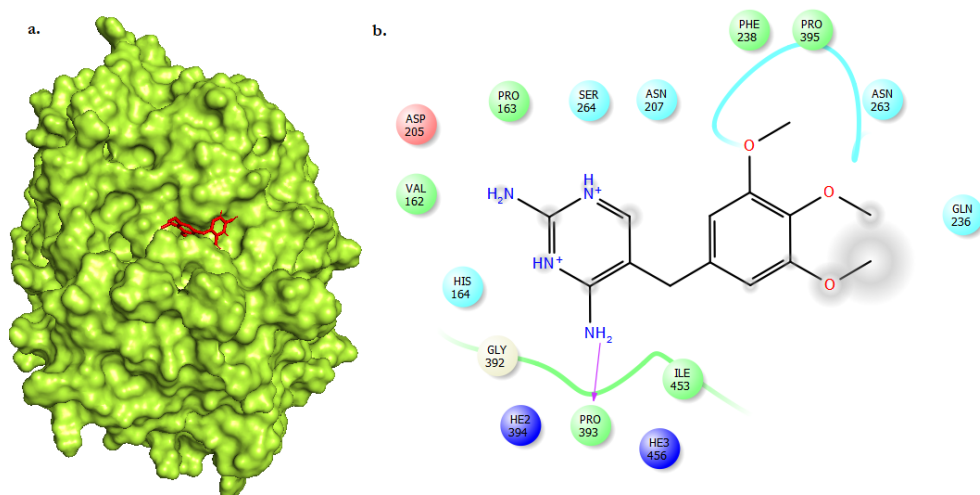


Figura 28. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y trimetoprim (SXT) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo POXA 1B y trimetoprim (SXT) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Ile⁴⁵³, Pro³⁹³, Val¹⁶², Pro¹⁶³, Phe²³⁸ y Pro³⁹⁵.

En las interacciones entre el modelo de POXA 1B y sulfisoxazol (FIS) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Val¹⁶², Pro¹⁶³, Pro³⁹³ y Phe²³⁸. Los aminoácidos polares His¹⁶⁴, Asn²⁶³, Ser²⁶⁴, Gln²³⁶ y Asn²⁰⁷ también interactuaron con el ligando. El aminoácido Asn²⁶³ formó un puente de hidrógeno con un oxígeno del antibiótico con una distancia de 2.68 Å (Figura 28.1, Tabla 8).

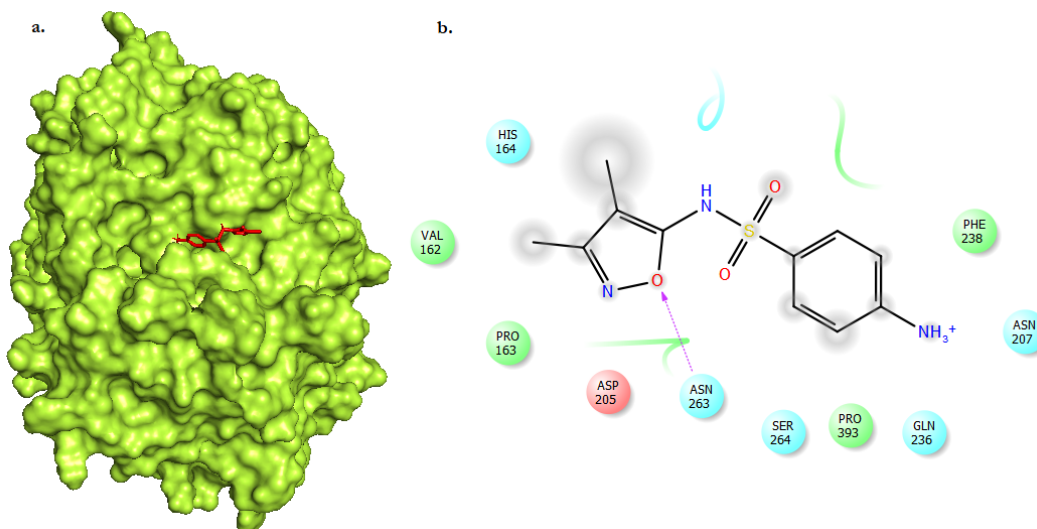


Figura 28.1. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y sulfisoxazol (FIS) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo de POXA 1B y sulfisoxazol (FIS) a pH 3.0 participaron los aminoácidos hidrofóbicos Val¹⁶², Pro¹⁶³, Pro³⁹³ y Phe²³⁸.

En las interacciones entre el modelo POXA 1B y sulfinalamida (SA) a pH 3.0 participaron los aminoácidos Pro³⁹³, Phe²³⁸, Ile⁴⁵³ y Pro³⁹⁵. Los aminoácidos polares Asn²⁶³, Asn²⁰⁷, Ser²⁰⁶, Gln²³⁶ y Ser⁴²⁶ también interactuaron con el ligando. El aminoácido Phe²³⁸ presentó una interacción tipo “*stacking*” π - π con el anillo aromático del antibiótico (**Figura 28.2, Tabla 8**).

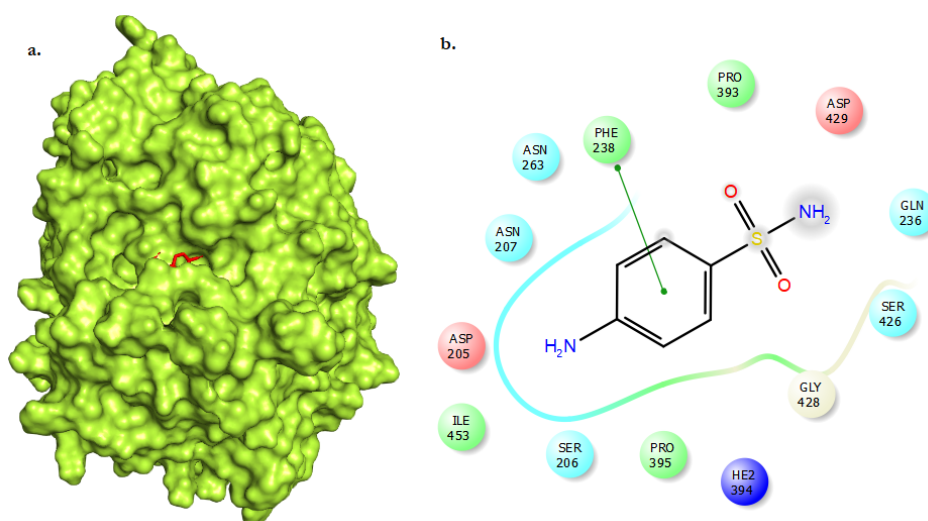


Figura 28.2. Acoplamiento molecular entre el modelo 3D de POXA 1B y sulfinalamida (SA) a pH 3.0 **a.** Bolsillo al que se une el ligando. **b.** En las interacciones entre el modelo POXA 1B y sulfinalamida (SA) a pH 3.0 participaron los aminoácidos Pro³⁹³, Phe²³⁸, Ile⁴⁵³ y Pro³⁹⁵.

5.8. Simulaciones de la dinámica molecular GILCC 1-ligandos y POXA 1B-ligandos

Para el análisis por dinámica molecular se escogieron los complejos con los valores más bajos de energía libre de Gibbs a pH 3.0 (mayor afinidad), (GILCC 1-cefuroxima, GILCC 1-levofloxacina, GILCC 1-cefradina, POXA 1B-cefazolina, POXA 1B-levofloxacina y POXA 1B-linezolid). Los resultados de dinámica molecular para GILCC 1, mostraron que el ABTS, la Tetraciclina (TE), la cefuroxima (CXM), la levofloxacina (LVX) y la cefradina (BAN) permanecieron unidos al bolsillo de la enzima durante toda la trayectoria (200 ns); sin embargo, el antibiótico sulfisoxazol (SFX) salió del bolsillo. La **Figura 29** muestra el valor del RMSD a lo largo de la trayectoria (200 ns) para GILCC 1 y cada antibiótico.

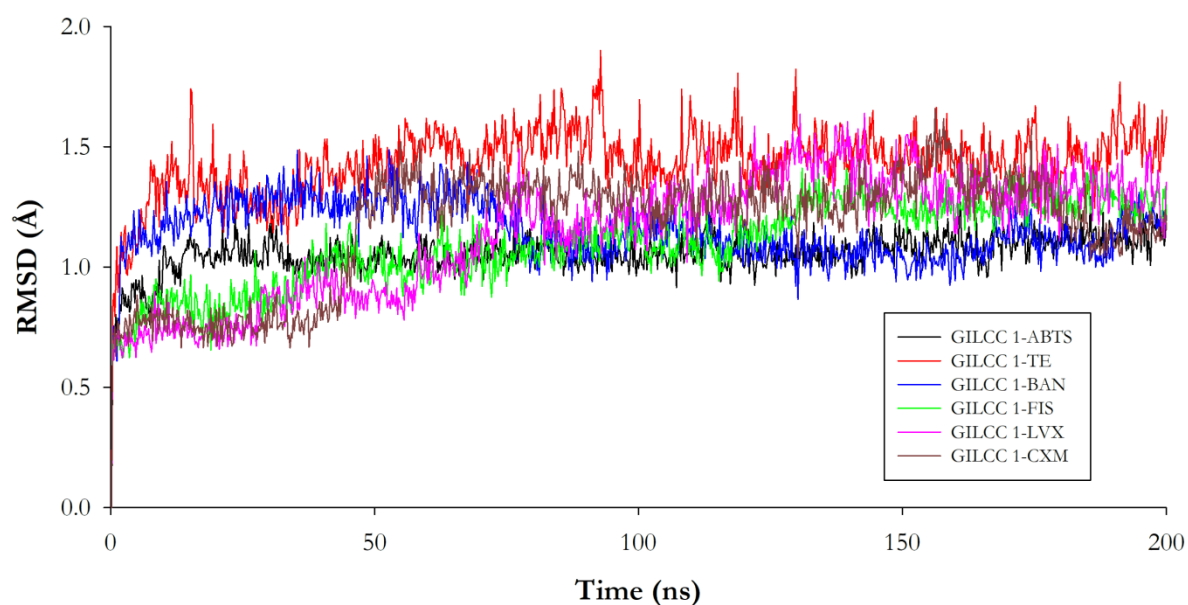


Figura 29. Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de los complejos GILCC 1-ligandos. Se muestran los valores de RMSD para cada complejo a lo largo de la trayectoria (200 ns). En negro GILCC 1-ABTS, en rojo GILCC 1-tetraciclina (TE), en azul GILCC 1-cefradina (BAN), en verde GILCC 1-sulfisoxazol (FIS), en morado GILCC 1-levofloxacina (LVX) y en café GILCC 1-cefuroxima (CXM).

Por otra parte, los resultados de la dinámica para POXA 1B mostraron que el ABTS, la tetraciclina (TE), la levofloxacina (LVX) y el linezolid (LDZ), se salieron del bolsillo de la enzima; mientras que, la cefazolina (CZ) permaneció en el bolsillo a lo largo de toda la trayectoria (200 ns). La **Figura 30** muestra el valor del RMSD a lo largo de la trayectoria (200 ns) para POXA 1B y cada antibiótico.

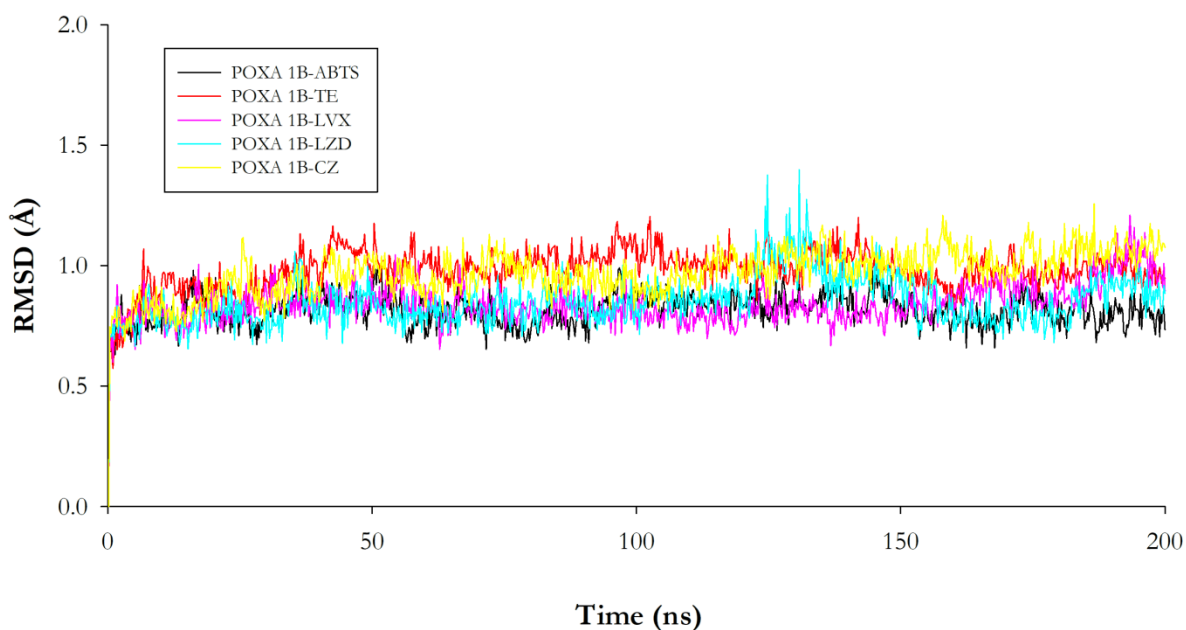


Figura 30. Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de los complejos POXA 1B-ligandos. Se muestran los valores de RMSD para cada complejo a lo largo de la trayectoria (200 ns). En negro POXA 1B-ABTS, en rojo POXA 1B-tetraciclina (TE), en morado POXA 1B-levofloxacina (LVX), en azul POXA 1B-linezolid (LZD) y en amarillo POXA 1B-cefazolina (CZ).

Las **Figuras 31 y 32** muestran los valores de la fluctuación cuadrática media (RMSF) de GILCC 1 y POXA 1B respectivamente con los ligandos acoplados. En la interacción entre el modelo 3D de GILCC 1 y el ABTS, la tetraciclina (TE), la cefradina (BAN), el sulfisoxazol (FIS), la cefuroxima (CFX) y la levofloxacina (LVX), los aminoácidos Gln³⁶⁰, Ala³⁶² Pro⁴³¹ y Ala⁴³² presentaron las mayores fluctuaciones; los residuos próximos a estos aminoácidos generaron regiones fluctuantes.

En el complejo GILCC 1-ABTS los residuos con mayor fluctuación fueron Val³⁸⁸, Phe²⁷⁰, Thr³⁸⁷ y Gly³³⁴, con valores de RMSF de 2.1513, 2.2185, 2.2895 y 2.4860 Å, respectivamente. En el complejo GILCC 1-cefradina (BAN) los aminoácidos con mayores fluctuaciones fueron Leu³⁵⁶, Ser³⁵⁷ y Gly³⁵⁸ superando los 6 Å. Sin embargo, la región Gly²⁶⁶ - Ile²⁶⁹ también presentó valores de fluctuación superiores a los 3.7 Å. En el complejo GILCC 1-levofloxacina (LVX), los residuos con mayor fluctuación fueron Gln²⁹³, Gln²⁹⁴ Thr²⁹⁵, Ala¹⁵⁶ y Pro¹⁶⁰; los aminoácidos próximos a estos residuos generaron regiones fluctuantes.

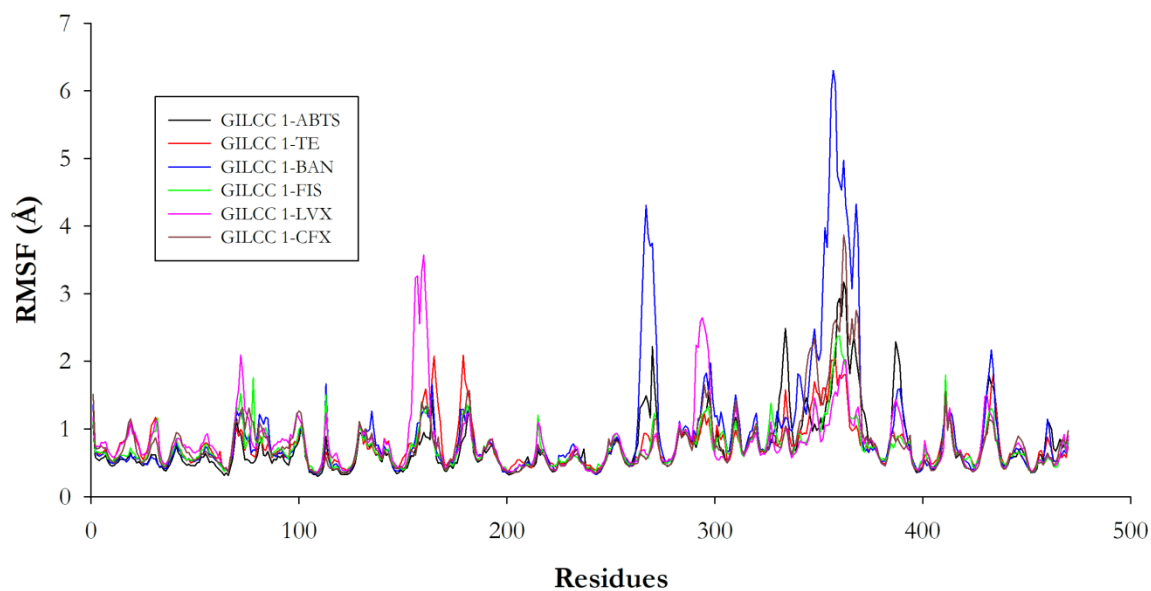


Figura 31. Fluctuación cuadrática media (RMSF) de los complejos GILCC 1-ligando. Se muestran los valores del RMSF de cada residuo a lo largo de la trayectoria. En negro GILCC 1-ABTS, en rojo GILCC 1-tetraciclina (TE), en azul GILCC 1-cefradina (BAN), en verde GILCC 1-sulfisoxazole (FIS), en morado GILCC 1-levofloxacin (LVX) y en café GILCC 1-cefuroxima (CFX).

En la interacción entre el modelo 3D de POXA 1B-ABTS, -tetraciclina (TE), -levofloxacin (LVX), -linezolid (LZD) y -cefazolina (CZ), las regiones Leu¹⁵⁹ - Val¹⁶² y Ser²⁶⁴ - Gly²⁶⁵ presentaron altas fluctuaciones.

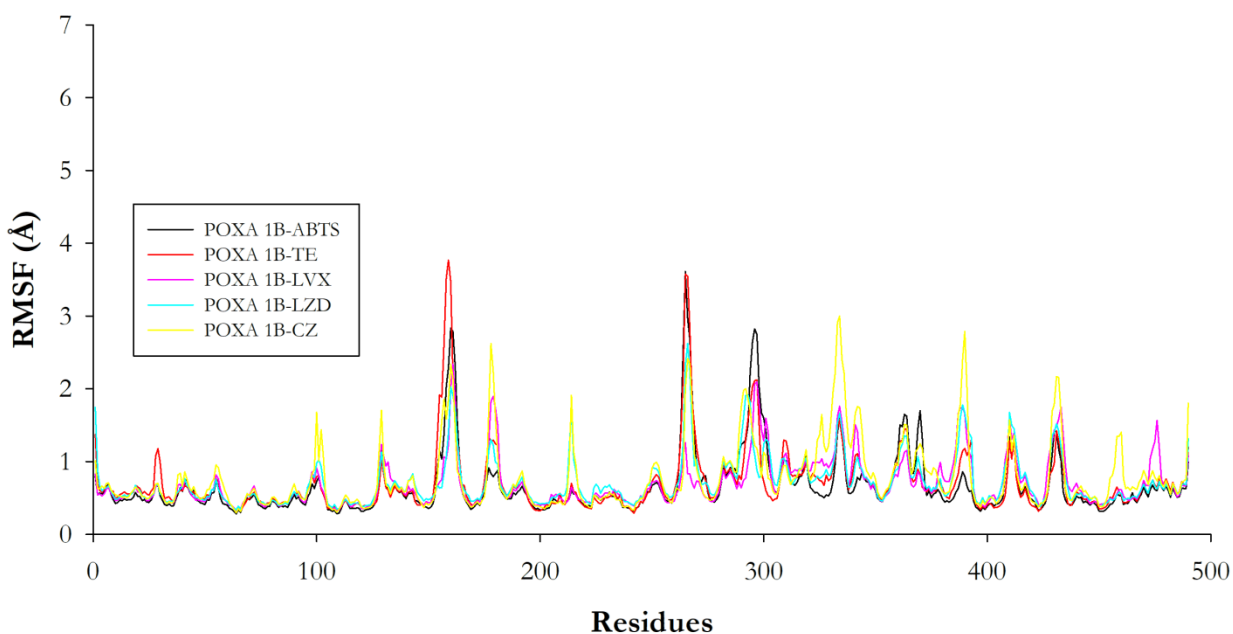


Figura 32. Fluctuación cuadrática media (RMSF) de los complejos POXA 1B-ligando. Se muestran los valores del RMSF de cada residuo a lo largo de la trayectoria. En negro POXA 1B-ABTS, en rojo POXA 1B-tetraciclina (TE), en morado POXA 1B-levofloxacina (LVX), en azul POXA 1B -linezolid (LZD) y en amarillo POXA 1B-cefazolina (CZ).

5.9 Resultados de los análisis de Dinámica molecular - área de superficie con solvatación generalizada (MMGBSA)

La **Tabla 10** muestra los resultados del análisis de MMGBSA para los ligandos que permanecieron en los bolsillos de GILCC 1 y POXA 1B, el tiempo de permanencia del ligando en el bolsillo, la distancia entre los ligandos y las zonas de alta fluctuación.

Tabla 10. Resultados del análisis de MMGBSA de los complejos GILCC 1-ligando y el tiempo de permanencia de los ligandos en el bolsillo.

Ligandos	GILCC 1		
	MMGBSA (ΔG) Kcal mol ⁻¹	Tiempo de permanencia del ligando en el bolsillo (ns)	Distancia entre la zona fluctuante y el ligando (Å)
ABTS	-20.417	200	5.31
tetraciclina (TE)	-33.231		5.75
levofloxacin (LVX)	-31.433		6.59
cefradina (BAN)	-27.318		7.20
cefuroxima (CFX)	-21.309		7.56
sulfisoxazol (FIS)	-	4	8.10

Tabla 11. Resultados del análisis de MMGBSA de los complejos POXA 1B-ligando y el tiempo de permanencia de los ligandos en el bolsillo.

Ligando	MMGBSA (ΔG) Kcal mol ⁻¹	Tiempo de permanencia del ligando en el bolsillo (ns)	Distancia entre la zona fluctuante y el ligando (Å)
ABTS	-	64	3.52
tetraciclina (TE)	-	7.4	4.85
Lecofloxacin (LVX)	-	40.2	3.94
linezolid (LZD)	-	19.6	6.33
cefazolina (CZ)	-32.212	200	3.98

6. Discusión

6.1 Modelado, validación y parametrización del centro activo del modelo 3D de la enzima GILCC 1

El molde seleccionado (2qt6) presentó un alto porcentaje de identidad (60 %), según [Baxevanis et al., \(2012\)](#) las secuencias homólogas que comparten más del 40 % de identidad, tienen una similitud funcional [\[384\]](#). Además, el valor del QMEAN del modelo GILCC 1 fue cercano a 1 (0.89), indicando una estructura estable y de alta calidad [\[385, 386\]](#).

El gráfico de Ramachandran ([Figura 6a](#)) mostró que la conformación del modelo generado es energéticamente válida; dependiendo del valor de los ángulos se puede predecir la estructura secundaria de la proteína. En el modelo 3D de GILCC 1 la mayoría de los aminoácidos se encuentran en zonas favorecidas (87.6 %); geometría que es altamente favorecida en estructuras proteicas reales, ya que evita la colisión entre átomos [\[387\]](#). También, el gráfico de Ramachandran mostró que la mayoría de aminoácidos se encuentran en regiones con plegamiento de tipo hoja beta, seguido por una conformación alfa hélice; lo que coincide con las características estructurales reportadas para las lacasas de hongos [\[388\]](#). Por otra parte, el análisis mostró 4 Gly en zonas no permitidas, debido a que este aminoácido es el más sencillo estructuralmente (el radical es un H), por lo que puede adoptar conformaciones poco frecuentes que no son permitidas para el resto de aminoácidos (debido a la conformación estérica y a la carga de los radicales de los residuos adyacentes y cercanos) [\[22\]](#).

El Z-Score global (1.26) del modelo generado en PROVE estuvo dentro de los límites normales para estructuras resueltas con una resolución entre 1.5 y 2.0 Å ([Figura 6b](#)); por otra parte el Z-score de los átomos individuales cercano a cero (0.345), indicó que el modelo es de alta calidad, con un volumen atómico similar al de lacasas nativas registradas en el Protein Data Bank (PDB) [\[389\]](#).

ERRAT arrojó un factor de calidad global (94.03 %) demostrando una alta estabilidad del modelo 3D de GILCC 1 con relación a la interacción no enlazante entre átomos. Las regiones señaladas en rojo y amarillo ([Figura 6c](#)) muestran las zonas de discrepancia entre el modelo 3D de GILCC 1 y la estructura cristalizada de otras lacasas de hongos, reportadas en el Protein Data Bank PDB [\[390\]](#); sin embargo, estas zonas no generaron inconvenientes en el modelado ya que posteriormente se pudo optimizar la estructura de la enzima y parametrizar el centro activo.

Finalmente verify3D (**Figura 6d**) demostró la alta compatibilidad (97.19 % de los aminoácidos presentaron valores superiores a 0.2) entre la estructura primaria y la estructura 3D del modelo, confirmando nuevamente la alta calidad y la estabilidad del modelo 3D generado para GILCC 1 [391], mostrando calidad, estabilidad y confiabilidad para estudios computacionales.

Los resultados de la parametrización del centro activo de los modelos GILCC 1 y POXA 1B (**Figuras 7 y 7.1**) fueron coherentes con las distancias atómicas reportadas experimentalmente en otras lacasas, por ejemplo, la distancia entre el nitrógeno ϵ de la His⁴⁵⁸ que coordina el cobre tipo 1 fue de 1.879 y 1.832 Å para GILCC 1 y POXA 1B a pH 3.0, respectivamente (**Tabla 4**). Algunos autores han planteado que, a mayor distancia entre el CuT1 y la His axial, mayor es el potencial de oxidorreducción, pues confiere flexibilidad y movimiento a la histidina permitiendo su correcta posición para llevar a cabo la transferencia de electrones; sin embargo, se ha demostrado que existen otros factores que influyen en el potencial redox, como la naturaleza de los ligandos que coordinan los cobres, su geometría y la presencia de aminoácidos hidrofóbicos cercanos al sitio activo. Por ejemplo, la presencia de los aminoácidos Phe⁴⁵⁷ y Ile⁴⁵⁵ en GILCC 1, rodeados por varias Phe (aminoácidos hidrofóbicos), contribuyen al alto potencial de oxidorreducción [392].

Por otra parte, las distancias entre los cobres T3 α y β de los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B de 3.64 y 3.76 Å, respectivamente) son coherentes con el estado reducido; donde las distancias entre átomos son mayores comparado con el estado oxidado y por tanto la estructura es más estable [393]. Otros autores han reportado distancias de 4.09, 4.07, 4.64, 3.86, y 4.14 Å entre los cobres T3 α y β , para las lacasas cristalizadas 2QT6a, 2QT6b, 1GSK, 1GW0b, 1KYAb y 1W6W, respectivamente [392].

Los resultados de la parametrización del CuT1 de POXA 1B a pH 7.0 sugieren que a pH diferente del óptimo, los enlaces de hidrógeno y los puentes de sal de las proteínas son afectados y se altera la estructura y la función de la misma; Ardila-Leal et.al., (2019) determinaron experimentalmente que el pH óptimo de la lacasa rPOXA 1B al oxidar el ABTS fue de 4.0 ± 0.2 con una actividad enzimática relativa superior al 95 %, mientras que a $\text{pH} < 3.0 \pm 0.2$ (actividad relativa $< 80\%$) y $> 5.0 \pm 0.2$ (actividad relativa $< 90\%$) la lacasa era menos estable; a $\text{pH} 7.0 \pm 0.2$ la lacasa disminuyó su actividad enzimática relativa a 67.7 % [32].

6.2. Dinámica molecular de las enzimas sin ligando

6.2.1 Dinámica molecular del modelo 3D de GILCC 1

Los resultados de dinámica molecular (**Figura 8a**) del modelo GILCC 1 a pH 3.0 ± 0.2 demostraron la alta estabilidad de la estructura a lo largo de la trayectoria (200 ns) bajo las condiciones de temperatura, volumen y presión evaluadas (RMSD $< 2 \text{ \AA}$). Además, los valores de la fluctuación cuadrática media (RMSF) para GILCC 1 (**Figuras 8.1 y 8.2**) indicaron que las regiones conformadas entre los aminoácidos Leu³⁵⁶ y Gln³⁶³ y los aminoácidos Pro⁴³¹ y Gly⁴³⁴ son zonas de alta fluctuación (valores de RMSF entre 2.1867 y 3.9256 \AA). Estos resultados pueden explicarse por la presencia de aminoácidos como Gly, Ser, Ala, Thr y Leu, que por su estructura, confieren una alta flexibilidad a la proteína [394]. Sin embargo, la fluctuación de las regiones Leu³⁵⁶ - Gln³⁶³ y Pro⁴³¹ - Gly⁴³⁴ no causan inestabilidad en los complejos al estar alejada del bolsillo de unión ($> 10 \text{ \AA}$) (**Anexo 1**). La estabilidad en el sitio activo de la enzima podría favorecer la transferencia de electrones, pues a mayor rigidez del sitio activo mayor estabilidad cinética [33, 395].

6.3 Comparación del ABTS una vez acoplado con los receptores vs. el complejo cristalizado del ABTS con la lacasa de *Bacillus subtilis* (3ZDW)

Los valores de RMSD mostraron que existe gran diferencia entre las conformaciones del ABTS adoptadas en los complejos evaluados al compararlas con el complejo lacasa-ABTS cristalizado (3ZDW) (**Figura 10 y 10.1**), lo que se debe a las diferencias topológicas del bolsillo catalítico. Los bolsillos de las lacasas son diferentes, tanto en tamaño como en el tipo de residuos de aminoácidos y existen diferencias considerables entre los residuos conservados de las lacasas bacterinas vs. las lacasas de hongos [2, 22].

6.4 Análisis de las interacciones de los complejos enzima-ligando

Los resultados de las energías de unión (**Tabla 9**) muestran mayor afinidad entre el modelo 3D de GILCC 1 y los ligandos, comparados con el modelo 3D de la lacasa de POXA 1B; experimentalmente, varios autores han demostrado que las lacasas de *Ganoderma lucidum* presentan una mayor afinidad por algunos sustratos, como el ABTS, en comparación con otras lacasas de hongos [396, 397].

Los resultados experimentales obtenidos por Morales-Alvarez et al. (2017) mostraron que la degradación de colorantes usando GILCC 1 fue 4.4 veces mayor que la degradación obtenida con

POXA 1B [38]. Sin embargo, [Rivera-Hoyos, et al., \(2015\)](#), encontraron que POXA 1B presentó mayor afinidad por el ABTS que GILCC 1, lo que sugiere que no necesariamente a mayor afinidad mayor degradación. Esta diferencia entre los resultados puede explicarse por las estructuras químicas de los ligandos evaluados, Verde Malaquita y Cristal Violeta en [Morales-Alvarez et al., \(2017\)](#) y ABTS en [Rivera-Hoyos, et al., \(2015\)](#); a pesar de que las lacasas comparten residuos altamente conservados, la especificidad por los sustratos pueden variar considerablemente [398]. También, es posible que la concentración de iones de los buffers utilizados en la medición de actividad enzimática, interfieran en la actividad lacasa, ya que los iones al interactuar con el centro activo de las enzimas pueden modificar la carga y/o la estructura tridimensional; cambios en el centro activo que terminan afectando la afinidad de la enzima por el sustrato aumentando el valor de K_M y afectando la velocidad de reacción enzimática (V_{max}), debido a que los iones pueden competir por el sitio de unión del sustrato [399, 400].

GILCC 1 presentó una mayor afinidad por los ligandos a pH 3.0, lo que coincide con resultados previos del grupo de investigación que mostraron que el pH óptimo para la actividad lacasa de la enzima GILCC 1 utilizando ABTS fue $\text{pH } 3.0 \pm 0.2$. La variación en el pH puede modificar las interacciones electrostáticas entre los grupos funcionales de la lacasa o del ligando [400, 401].

Con la simulación de acoplamiento molecular se obtuvieron 10 conformaciones diferentes para cada ligando ([Tabla 9](#)) y los mejores complejos de unión para cada modelo de lacasa-sustrato se seleccionaron teniendo en cuenta la mayor afinidad y la menor la distancia al CuT1, conocido como el sitio de unión y oxidación del sustrato; en condiciones reales, esta cercanía puede favorecer la degradación del sustrato, al aumentar el coeficiente catalítico de la reacción [393, 402]. La His de transferencia, que coordina el CuT1 (His⁴⁵⁸ y His⁴⁵⁶ para GILCC 1 y POXA 1B, respectivamente) es esencial para dar inicio a la degradación del sustrato, ya que transfiere los electrones al CuT1; algunos estudios han reportado que se requiere una distancia menor a 5 Å entre el sustrato y la His axial que coordina el cobre CuT1 para lograr una degradación eficiente [403]. Incluso, algunos autores sugieren que el grupo donador de electrones del sustrato debe estar cerca de la His⁴⁵⁸ y que la tasa de transferencia de electrones disminuye exponencialmente al aumentar la distancia entre los orbitales donantes del sustrato y los orbitales aceptores de la histidina [404].

En las interacciones con GILCC 1, ningún ligando interactuó directamente con la histidina His⁴⁵⁸ al encontrarse a más de 5 Å de los ligandos; sin embargo, es posible que la transferencia de electrones ocurra por medio de una cadena de residuos de aminoácidos. La ruta de la transferencia de electrones puede variar entre lacasas; sin embargo, aminoácidos como la His³⁹⁵ y la Phe²³⁹ pueden actuar como grupos redox auxiliares facilitando la transferencia de electrones desde el sustrato hacia el centro activo de la lacasa [405].

En POXA 1B se observó que los ligandos se encontraban a menos de 4 Å de distancia de la His⁴⁵⁶ que coordina el CuT1; los complejos entre POXA 1B-tetraciclina (TE), POXA 1B-tiamfenicol y POXA 1B-cefuroxima (CXM) formaron un puente de hidrógeno directamente con la His⁴⁵⁶ (con distancias de 2.23, 2.29 y 2.15 Å, respectivamente) lo que facilitaría la transferencia de electrones; siendo posible que los grupos OH de estos antibióticos actúen como donadores de electrones [404].

Por otra parte, los puentes de hidrógeno formados entre los modelos 3D de GILCC 1 y POXA 1B con los antibióticos ofrecen estabilidad a los complejos, al mantener el ligando en el bolsillo catalítico de la enzima. En la interacción con GILCC 1 algunos antibióticos formaron entre 3 y 4 enlaces de hidrógeno cefuroxima (CXM), lincomicina (LIN), linezolid (LZD), moxifloxacina (MXF), netilmicina (NET), sulfinalamida (SA) y tobramicina (TM) y con POXA 1B, cefradina (BAN), cefuroxima (CXM), netilmicina (NET), tiamfenicol (TP) y tobramicina (TM); algunos estudios sugieren que al haber mayor cantidad de enlaces de hidrógeno entre la enzima y el ligando, la fuerza de unión entre las moléculas es mayor, lo que facilitaría la transferencia de electrones [406]. La presencia de los grupos ionizables en los antibióticos facilitó estas interacciones.

Los aminoácidos implicados en los enlaces de hidrógeno se consideran residuos clave para la interacción de la lacasa con los ligandos [407]. Por ejemplo, en este estudio los aminoácidos Ser⁴²⁷, Glu³⁰², Ala⁴¹⁰, Gln²³⁷, Tyr²⁴⁴ y Gln²⁴² de GILCC 1 se consideran residuos claves en la interacción con los antibióticos.

En POXA 1B, los aminoácidos His⁴⁵⁶, Asp²⁰⁶ y Phe²³⁸ son claves en la transferencia de electrones. El Asp²⁰⁶ está implicado en la unión del sustrato. Autore, et al., (2009) demostraron que una mutación en el Asp²⁰⁶ de una lacasa de *Pleurotus ostreatus* causó una disminución en las propiedades

catalíticas y en la estabilidad del sistema [408]. Este aminoácido del bolsillo de unión estuvo presente en la interacción entre POXA 1B y todos los ligandos (**Figuras 11-28**), además, formó un puente de hidrógeno con la clindamicina (CM) (**Figura 24**), esta interacción reduciría la distancia de la transferencia de electrones entre el sustrato y la His⁴⁵⁶. Además, este aminoácido es altamente conservado en las lacasas y determina la dependencia de la actividad enzimática del pH. En las interacciones con POXA 1B a pH 3.0 este aminoácido cargado positivamente es capaz de atraer grupos OH de los ligandos [404, 409].

Por otra parte, las interacciones tipo “*stacking*” π - π entre los aminoácidos Phe³³¹ y Phe²³⁸ de POXA 1B y algunos ligandos han sido reportadas por otros autores [404, 410]. Las interacciones tipo “*stacking*” con la Phe³³¹ y la Phe²³⁸ facilitarían la adaptación y estabilización de los antibióticos a las lacasas, favoreciendo la transferencia de electrones. Además, estas interacciones pueden aumentar la afinidad entre los antibióticos y las lacasas [411].

Por otra parte, en las **Figuras 9 y 9.1** se observa los diferentes residuos que hacen parte del bolsillo enzimático para GILCC 1 y POXA 1B, estos aminoácidos que rodean los átomos de cobre y su organización son esenciales y determinantes para la actividad catalítica del sitio activo, ya que puede influir en la afinidad y el potencial redox de las enzimas [412]. Es posible que el tamaño de los bolsillos influya en la interacción con el ligando; el bolsillo de GILCC 1 es más grande (202.430 Å) que el de POXA 1B (196.716 Å). Además, GILCC 1 presenta una hendidura en su bolsillo, conformada en su mayoría por aminoácidos hidrofóbicos, lo que coincide con lo reportado; el bolsillo de unión de las lacasas está formado principalmente por aminoácidos hidrofóbicos que impiden la proximidad del agua al ion metálico y facilitan la interacción de los sustratos hidrofóbicos con el centro activo de la enzima. Además, esta hendidura en GILCC 1 ofrece una mayor estabilidad al evitar el contacto del ligando con el solvente [22, 404]. Algunos autores sugieren que la estructura del bolsillo de unión del sustrato influye en gran medida en la capacidad de oxidación de las lacasas [413].

En las **Figuras 11-27** se observa que los ligandos se acoplaron en la parte más profunda del bolsillo de GILCC 1 conformada por aproximadamente 12 aminoácidos que formaron interacciones con los ligandos, favorecidas por la presencia de grupos ionizables en los antibióticos [414].

La estabilidad que confiere la topología del bolsillo de GILCC 1 podría favorecer la transferencia de electrones para que se lleve a cabo la reacción catalítica; Takur et al., (2022), demostraron que el bolsillo de unión del sustrato es más amplio y hendido en las lacasas con un potencial de oxidoreducción alto y medio, mientras que, en las lacasas con bajo potencial de oxidoreducción el bolsillo de unión del sustrato es más pequeño [415]. Estas diferencias topológicas en los bolsillos pueden influir en las conformaciones que adoptan los ligandos unidos a GILCC 1 *versus* POXA 1B y en la cantidad de aminoácidos que interactúan.

Por ejemplo, en la interacción con la tetraciclina (TE) a pH 3.0, 17 aminoácidos del bolsillo de GILCC 1 formaron interacciones con el ligando; el proceso de acoplamiento de la tetraciclina (TE) al bolsillo de GILCC 1 fue favorecido por las diferentes interacciones de van der Waals, un puente de sal y un enlace de hidrógeno entre los aminoácidos y el antibiótico (Figura 12). Mientras que, en POXA 1B sólo 7 aminoácidos forman interacciones con el antibiótico (Figura 12.2b), lo que, bajo condiciones experimentales, disminuiría la estabilidad del sistema y por tanto, la transferencia de electrones para que se lleve a cabo la reacción. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la transferencia de electrones entre POXA 1B y la tetraciclina (TE) pueda ser favorecida en presencia de un compuesto mediador [22, 404].

Además, existe coherencia entre los aminoácidos reportados en otros estudios [404, 416-418] y los aminoácidos reportados en este, por ejemplo, los aminoácidos hidrofóbicos Pro³⁹⁴ y Phe²³⁹, para el modelo 3D de GILCC 1 y Pro³⁹⁵ y Phe³³⁸ para el modelo 3D de POXA 1B, interactuaron con varios de los ligandos evaluados. Chen et al., (2015) reportaron estos mismos aminoácidos en la interacción entre la lacasa 1GYC de *Trametes versicolor* y la lignina, específicamente con el ácido sináptico y demostraron que, las interacciones hidrofóbicas son las más importantes para la unión del complejo lacasa-lignina [404, 416].

Varios autores han reportado los mismos aminoácidos del bolsillo de unión observados en este estudio para GILCC 1 y POXA 1B, como partícipes en la interacción de diferentes lacasas con diversos sustratos. Por ejemplo, Mo et al., (2022) reportaron que los aminoácidos Gln²³⁷, Gln²⁴², Ala⁴¹⁰, Glu³⁰², Phe²³⁹ y Leu³⁰⁰ de la lacasa de *Trametes versicolor* interactuaron con el compuesto nonilfenol [419]. Daneshamouz et al., (2022) demostraron que el compuesto sulfato de indoxilo interactuó con los aminoácidos Pro³⁹⁴, Gln²³⁷, Phe²³⁹, Ala⁴¹⁰, Leu³⁰⁰, Tyr²⁴⁴, Glu³⁰², y Gly⁴²⁹, de la lacasa de *Trametes versicolor* [418]. Aricov et al., (2022) reportaron que el ABTS interactuó con los

aminoácidos Phe²³⁹, Pro³⁹⁴, Gln²⁴², Tyr²⁴⁴, Arg⁴²³ y Gln²³⁷ [420] y el compuesto rojo de metilo interactuó con los aminoácidos Ala⁴¹⁰, Ser⁴⁰⁹, Ser⁴²⁷, Gln²³⁷ de una lacasa de *Trametes versicolor* [417, 418, 420]; estos resultados son coherentes con los resultados encontrados en este estudio.

6.5 Análisis de dinámica molecular de los modelos 3D GILCC 1 y POXA 1B con los antibióticos seleccionados

La estabilidad que pueden conferir las interacciones y la topología del bolsillo de GILCC 1 fue confirmada con los análisis de dinámica molecular; el ABTS, la tetraciclina (TE), la levofloxacina (LVX) la cefuroxima (CXM) y la cefradina (BAN) permanecieron en el bolsillo de la enzima GILCC 1 a lo largo de toda la trayectoria (200 ns). Los resultados del RMSD indican que la conformación de la proteína permanece estable al interactuar con el ABTS, la tetraciclina (TE), la levofloxacina (LVX) y la cefuroxima (CXM) (valores de RMSD < 2 Å) (Figura 29).

Además, los resultados de la fluctuación cuadrática media (RMSF) de GILCC 1 (Figura 31) muestran algunas zonas de alta fluctuación, que corresponden a las regiones reportadas al evaluar la enzima sin ligandos (Figura 8.1). Como se menciona anteriormente, es posible que estas fluctuaciones no afecten la estabilidad de los complejos GILCC 1-ligando, al encontrarse lejos del bolsillo de unión permitiendo la permanencia de los ligandos en el bolsillo, lo que podría favorecer la transferencia de electrones en los complejos. El único ligando que se sale del bolsillo de GILCC 1 fue el sulfisoxazol (FIS) a pesar de que los valores de RMSD y RMSF (Figuras 29 y 31), respectivamente muestran que la conformación de los aminoácidos del centro activo es estable durante toda la trayectoria (200 ns) y las fluctuaciones reportadas en las zonas Leu³⁵⁶ - Gln³⁶³ y Pro⁴³¹ - Gly⁴³⁴ se encuentran alejadas del bolsillo de unión.

Los complejos GILCC 1-ABTS, GILCC 1-cefradina (BAN), GILCC 1-cefuroxima (CFX), GILCC 1-Levofloxacina y GILCC 1-tetraciclina (TE) obtuvieron un valor de MMGBSA negativo, indicando que las interacciones presentadas en el sistema son energéticamente favorables y más estables respecto a la enzima y el antibiótico separados (Tabla 10). Estos resultados pueden explicarse por las interacciones entre GILCC 1 con los antibióticos; los puentes de hidrógeno, las interacciones electrostáticas y las fuerzas de van der Waals que estabilizan el complejo y reducen la energía libre de Gibbs. Además, un ΔG negativo indica una alta afinidad entre el modelo y el antibiótico. En los complejos GILCC 1-ABTS, GILCC 1-cefuroxima y GILCC 1-cefradina las interacciones electrostáticas y de van der Waals contribuyeron en mayor medida a la estabilidad de los complejos. Estos resultados son coherentes con el acoplamiento molecular, en las Figuras 11-28

se observan las interacciones electroestáticas entre los modelos 3D de las lacasas y los antibióticos; estas interacciones favorecieron la permanencia de los ligandos en los bolsillos. Mientras que, en los complejos GILCC 1- levofloxacin y GILCC 1-tetraciclina (TE) la interacción con el solvente tuvo la mayor contribución a la estabilidad del sistema, ya que dentro de los análisis de MMGBSA se incluye la energía de solvatación y para estos complejos, la energía de solvatación fue el valor más negativo .

Estos resultados de MMGBSA sugieren que las interacciones entre los complejos GILCC 1-ABTS, GILCC 1-cefradina (BAN), GILCC 1-cefuroxima (CFX), GILCC 1-levofloxina y GILCC 1-tetraciclina (TE) fueron favorables y estables, lo que propicia la transferencia de electrones para dar inicio a un proceso de degradación.

Por otra parte, los resultados de la dinámica molecular de los complejos POXA 1B-ligando **(Figuras 11-28)** muestran que los aminoácidos Val¹⁶² y Ser²⁶⁴ (residuos con altas fluctuaciones) se encontraban a menos de 6 Å del bolsillo de unión de la proteína, lo que podría afectar la estabilidad del complejo [421], generando que los ligandos tetraciclina (TE), levofloxacin (LVX) y linezolid (LZ) salgan del bolsillo de POXA 1B a los 7.4, 40.2 y 19.5 ns de la trayectoria (200 ns), respectivamente. Además, es posible que la topología del bolsillo de POXA 1B permita un mayor contacto entre el solvente y el ligando, lo que debilitaría las interacciones y ocasionaría la salida de los ligandos del bolsillo. Es posible que menor tiempo de interacción enzima-ligando influya sobre la transferencia de electrones y sobre la degradación o transformación del ligando.

La Val¹⁶² y la Ser²⁶⁴ de POXA 1B interactúan con el ABTS y se encuentran a una distancia de sólo 2.71 y 3.03 Å del ligando respectivamente **(Anexo 2)**, lo que explicaría la salida de este ligando del bolsillo de POXA 1B. Es posible que los residuos de alta fluctuación causen la salida del resto de los ligandos del bolsillo; los aminoácidos Val¹⁶² y Ser²⁶⁴ también interactúan con la tetraciclina (TE) y se encuentran a una distancia de sólo 2.89 y 2.98 Å respectivamente **(Anexo 3)**. Lo mismo sucede con la levofloxacin (LVX), pues se encontraba a sólo 2.66 y 2.77 Å de los aminoácidos Val¹⁶² y Ser²⁶⁴ respectivamente.

Por el contrario, la cefazolina (CZ) se encuentra a más de 5 Å de los aminoácidos Val¹⁶² y Ser²⁶⁴ en POXA 1B, es posible que a esta distancia las fluctuaciones no afecten la estabilidad del ligando, además, la cefazolina (CZ) obtuvo un valor de afinidad igual al del ABTS (-6.8 kcal mol⁻¹), lo que

explicaría la permanencia de este ligando en el bolsillo. También, fue posible observar el comportamiento de las interacciones a lo largo de la dinámica molecular; los puentes de hidrógeno formados entre los aminoácidos Pro³⁹³ y Asn²⁶³ no se rompieron durante la trayectoria. El resultado del MM-GSA del complejo POXA 1B-cefazolina (CZ) confirmó la estabilidad del sistema; el complejo obtuvo un ΔG negativo (-32.212 Kcal mol⁻¹), mostrando la estabilidad del sistema, siendo las interacciones electrostáticas las que más contribuyeron en la estabilidad. Por tanto, podría predecirse que a pH 3.0 la transferencia de electrones entre POXA 1B y la cefazolina (CZ) sería favorecida para llevar a cabo una reacción enzimática.

7. Conclusiones

En este estudio se observó que los aminoácidos claves en la interacción GILCC 1-ligandos fueron Pro³⁹⁴, Ser⁴²⁷, Glu³⁰², Ala⁴¹⁰, Gln²³⁷, Tyr²⁴⁴ y Gln²⁴². A pesar de que los sustratos se encontraban a más de 5 Å del CuT1, se sugiere que la transferencia de electrones en GILCC 1 puede ocurrir por medio de aminoácidos como la His³⁹⁵ y la Phe²³⁹. GILCC 1 presentó alta afinidad por la tetraciclina (GILCC 1-TE; ΔG -7.5 Kcal mol⁻¹), levofloxacin (GILCC 1-LVX; ΔG -8.2 Kcal mol⁻¹), cefuroxima (GILCC 1-CXM; ΔG -7.5 Kcal mol⁻¹), cefradina (GILCC 1-BAN; ΔG -7.5 Kcal mol⁻¹) y sulfisoxazol (GILCC 1-FIS; ΔG -7.8 Kcal mol⁻¹) sugiriendo mayor probabilidad de degradación. El acoplamiento de los ligandos en la hendidura del bolsillo del modelo 3D de GILCC 1 a pH 3.0 favoreció la estabilidad de los complejos enzima-ligando; los ligandos evaluados permanecieron en el bolsillo de la enzima durante toda la trayectoria, a excepción del complejo GILCC 1-sulfisoxazol (FIS), ya que el ligando salió del bolsillo catalítico a los 4.0 ns. Los cálculos del MMGBSA indicaron que el complejo GILCC 1-TE fue el más estable durante la dinámica molecular (-33.231 Kcal mol⁻¹), seguido por los complejos GILCC 1-LVX (-31.433 Kcal mol⁻¹), GILCC 1-BAN (-27.318 Kcal mol⁻¹) y GILCC 1-CXM (-21.309 Kcal mol⁻¹). Las interacciones electrostáticas y de van der Waals contribuyeron en mayor medida a la estabilidad los sistemas. Estos resultados sugieren promisoriamente que GILCC 1 podría degradar los antibióticos tetraciclina (TE), levofloxacin (LVX), cefuroxima (CXM) y cefradina (BAN) a pH 3.0.

En el modelo 3D de POXA 1B los aminoácidos claves en las interacciones con los ligandos fueron His⁴⁵⁶, His³⁹⁴, Pro³⁹³, Asp²⁰⁶ y Phe²³⁸. La cercanía de las His³⁹⁴ y His⁴⁵⁶ a los ligandos, podría favorecer la transferencia de electrones. POXA 1B tuvo alta afinidad a pH 3.0 con tetraciclina (POXA 1B-TE; ΔG -6.4 Kcal mol⁻¹), levofloxacin (POXA 1B-LVX; ΔG - 6.3 Kcal mol⁻¹), linezolid (POXA

1B-LZD; ΔG -6.3 Kcal mol⁻¹) y cefazolina (POXA 1B-CZ; ΔG -6.8 Kcal mol⁻¹) indicando una alta estabilidad en los complejos. Las altas fluctuaciones de los aminoácidos Val¹⁶² y Ser²⁶⁴ del bolsillo de unión de POXA 1B, podrían ser responsables de la salida de los antibióticos del bolsillo catalítico de la enzima (tetraciclina (TE), salida a los 7.4 ns; levofloxacin (LVX), salida a los 40.2 ns; linezolid (LDZ), salida a los 19.6 ns). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que POXA 1B pueda degradar estos antibióticos con la presencia de un mediador como el ABTS.

El complejo POXA 1B-cefazolina (CZ) presentó una alta afinidad y fue estable (RMSD <2 Å) durante toda la trayectoria (200 ns), (MMGBSA -32.212 Kcal mol⁻¹); lo que sugiere una mayor probabilidad de degradación. Estos resultados, sugieren que POXA 1B puede degradar tetraciclina (TE), levofloxacin (LVX), cefazolina (CZ) y linezolid (LZD) a pH 3.0.

Finalmente, la estabilidad de los complejos formados con GILCC 1 y POXA 1B, bajo las condiciones computacionales evaluadas favorecieron la transferencia de electrones, lo que sugirió la posible degradación. Sin embargo, las condiciones y los resultados experimentales podrían variar bajo la influencia de todos los demás componentes de los efluentes contaminados con antibióticos que sean tratados con estas enzimas. Este estudio sirve de complemento para los estudios experimentales que son complejos y costosos, como la cristalización de proteínas. Por ejemplo, en este estudio se identificaron características estructurales de las enzimas y regiones altamente fluctuantes que, a futuro, podrían ser mutadas para incrementar la estabilidad. Este estudio es un acercamiento al comportamiento molecular de las lacasas GILCC 1 y POXA 1B en la posible degradación de 16 antibióticos de diferentes clases y con diferentes usos.

8. Recomendaciones

Validar experimentalmente la degradación de los mismos ligandos del estudio con las lacasas rGILCC 1 y rPOXA 1B a pH 3.0 y 7.0 ± 0.2 en presencia de un mediador; así como enfrentar las mismas a aguas residuales con presencia de antibióticos.

A través de mutagénesis dirigida a las regiones de alta fluctuación cercanas al bolsillo del centro activo de POXA 1B se podría evaluar como se comporta la degradación de los antibióticos.

9. Referencias

1. Hakulinen, N.; Rouvinen, J. Three-dimensional structures of laccases. *CMLS* **2015**, *72*, 857-868.
2. Dwivedi, U.N.; Singh, P.; Pandey, V.P.; Kumar, A. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J Mol Catal B Enz* **2011**, *68*, 117–128.
3. Rivera-Hoyos, C.M.; Morales-Álvarez, E.D.; Poutou-Piñales, R.A.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Rodríguez-Vázquez, R.; Delgado-Boada, J.M. Fungal laccases. *Fung Biol Rev* **2013**, *27*, 67-82.
4. Shradha; Shekher, R.; Sehgal, S.; Kamthania, M.; Kumar, A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enz Res* **2011**, 2011, Article ID 217861.
5. Christopher, L.P.; Yao, B.; Ji, Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Front Ener Res* **2014**, *2*, article 12.
6. Falade, A.O.; Nwodo, U.U.; Iweriebor, B.C.; Green, E.; Mabinya, L.V.; Okoh, A.I. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiol Open* **2017**, *6*, e00394.
7. Wesenberg, D.; Kyriakides, I.; Agathos, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv* **2003**, *22*, 161–187.
8. Kong, W.; Fu, X.; Wang, L.; Alhujaily, A.; Zhang, J.; Ma, F.; Zhang, X.; Yu, H. A novel and efficient fungal delignification strategy based on versatile peroxidase for lignocellulose bioconversion. *Biotechnol Biofuels* **2017**, *10*, 218.
9. Rodríguez Couto, S.; Toca Herrera, J.L. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Adv* **2006**, *24*, 500-513.
10. Forgacs, E.; Cserháti, T.; Oros, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environ Int* **2004**, *30*, 953-971.
11. Majeau, J.-A.; Brar, S.K.; Tyagi, R.D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Biores Technol* **2010**, *101*, 2331–2350.
12. Ardila-Leal, L.D.; Poutou-Piñales, R.A.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Quevedo-Hidalgo, B.E. A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases. *Molecules* **2021**, *26*, article 3813.
13. Piscitelli, A.; Pezzella, C.; Giardina, P.; Faraco, V.; Sannia, G. Heterologous laccase production and its role in industrial applications *Bioeng Bugs* **2010**, *1*, 252-262.
14. Bronikowski, A.; Hagedoorn, P.L.; Koschorreck, K.; Urlacher, V.B. Expression of a new laccase from *Moniliophthora roreri* at high levels in *Pichia pastoris* and its potential application in micropollutant degradation. *AMB Exp* **2017**, *7*, 73.
15. Antosová, Z.; Sychrová, H. Yeast Hosts for the production of recombinant laccases: A review. *Mol Biotechnol* **2016**, *58*, 93–116.
16. Kurtzman, C.P. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **2005**, *55*, 973-976.
17. Yamada, Y.; Matsuda, M.; Maeda, K.; Mikata, K. The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (Saccharomycetaceae). *Biosci Biotechnol Biochem* **1995**, *59*, 439-44.
18. Valli, M.; Tatto, N.E.; Peymann, A.; Gruber, C.; Landes, N.; Ekker, H.; Thallinger, G.G.; Mattanovich, D.; Gasser, B.; Graf, A.B. Curation of the genome annotation of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) CBS7435 from gene level to protein function. *FEMS Yeast Res* **2016**, *16*, fow051.
19. De Schutter, K.; Lin, Y.-C.; Tiels, P.; Van Hecke, A.; Glinka, S.; Weber-Lehmann, J.; Rouze, P.; Van de Peer, Y.; Callewaert, N. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 561-569.
20. Naumov, G.; Naumova, E.S.; Tyurin, o.v.; Kozlov, D.G. *Komagataella kurtzmanii* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* based on multigene sequence analysis. *Antonie van Leeuwenboek* **2013**, *104*, 339–347.

21. Li, P.; Anumanthan, A.; Gao, X.G.; Ilangovan, K.; Suzara, V.V.; Düzgüneş, N.; Renugopalakrishnan, V. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. **2007**, 142, 105-124.
22. Rivera-Hoyos, C.M.; Morales-Álvarez, E.D.; Poveda-Cuevas, S.A.; Reyes-Guzmán, E.A.; Poutou-Piñales, R.A.; Reyes-Montaño, E.A.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Rodríguez-Vázquez, R.; Cardozo-Bernal, Á.M. Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccases synthetic genes *GILCC1* from *Ganoderma lucidum* and *POXA 1B* from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*. *Plos One* **2015**, 10, e0116524.
23. Pimentel, N.; Rodríguez-López, A.; Díaz, S.; Losada, J.C.; Díaz, D.; Espejo-Mojica, Á.J.; Ramírez, A.M.; Cardona, C.; Ruiz, F.; Poutou-Piñales, R.A.; Cordoba-Ruiz, H.A.; Alméciga-Díaz, C.J.; Barrera-Avellaneda, L.A. Production and characterization of a human lysosomal recombinant iduronate-2-sulfatase produced in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem* **2018**, 65, 655-664.
24. Espejo-Mojica, A.J.; Alméciga-Díaz, C.J.; Rodríguez, A.; Mosquera, Á.; Díaz, D.; Beltran, L.; Díaz, S.; Pimentel, N.; Moreno, J.; Sánchez, J.; Sánchez, O.F.; Córdoba, H.; Poutou-Piñales, R.A.; Barrera, L.A. Human recombinant lysosomal enzymes produced in microorganisms. *Mol Genet. Metab* **2015**, 116, 13-23.
25. Córdoba-Ruiz, H.A.; Poutou-Piñales, R.A.; Echeverri-Peña, O.Y.; Algecira-Enciso, N.A.; Landázuri, P.; Sáenz, H.; Barrera-Avellaneda, L.A. Laboratory scale production of the human recombinant iduronate 2-sulfate sulfatase-Like from *Pichia pastoris*. *Afr J Biotechnol* **2009**, 8, 1786-1792.
26. Landázuri, P.; Poutou-Piñales, R.A.; Acero-Godoy, J.; Córdoba-Ruiz, H.A.; Echeverri-Peña, O.Y.; Sáenz, H.; Delgado-Boada, J.M.; Barrera-Avellaneda, L.A. Cloning and shake flask expression of hrIDS-Like in *Pichia pastoris*. *Afr J Biotechnol* **2009**, 8, 2871-2877.
27. Poutou, R.A.; Córdoba, H.; Quevedo, B.E.; Landázuri, P.; Echeverri, O.Y.; Sáenz, H.; Vanegas, A.; Acero, J.; González, A.; Herrera, J.; Algesira, N.; Caicedo, L.; Barrera, L.A. Expresión de iduronato 2-sulfato sulfatasa humana recombinante (IDShr) en *Pichia pastoris*. *Univ Sci* **2005**, 10, 75-96.
28. Córdoba, H.; Algecira, N.; Poutou, R.A.; Barrera, L.A. *Pichia pastoris* una alternativa para la producción de glicoproteínas humanas de uso terapéutico. Estrategias de fermentación. *Rev Col Biotecnol* **2003**, 5, 73-84.
29. Morales-Álvarez, E.D.; Rivera-Hoyos, C.M.; Cardozo-Bernal, Á.M.; Poutou-Piñales, R.A.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Díaz-Rincón, D.J.; Rodríguez-López, A.; Alméciga-Díaz, C.J.; Cuervo-Patiño, C.L. Plackett-Burman Design for rGILCC1 laccase activity enhancement in *Pichia pastoris*: Concentrated enzyme kinetic characterization. *Enz Res* **2017**, 2017, Article ID 5947581.
30. Ardila-Leal, L.D.; Poutou-Piñales, R.A.; Morales-Álvarez, E.D.; Rivera-Hoyos, C.M.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Quevedo-Hidalgo, B.E.; Pérez-Flórez, A. Methanol addition after glucose depletion improves rPOXA 1B production under the *pGap* in *P. pastoris* X33. Breaking the habit. *SN Appl Sci* **2021**, 3, article 103.
31. Ardila-Leal, L.D.; Alvarado-Ramírez, M.F.; Gutierrez-Rojas, I.S.; Poutou-Piñales, R.A.; Quevedo-Hidalgo, B.E.; Pedroza-Rodríguez, A.M. Low-cost media statistical design for laccase rPOXA 1B production in *P. pastoris*. *Heliyon* **2020**, 6, e03852.
32. Ardila-Leal, L.D.; Albarracín-Pardo, D.A.; Rivera-Hoyos, C.M.; Morales, E.D.; Poutou-Piñales, R.A.; Cardozo-Bernal, A.M.; Quevedo-Hidalgo, B.E.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Díaz-Rincón, D.J.; Rodríguez-Lopez, A.; Alméciga-Díaz, C.J.; Cuervo-Patiño, C.L. Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*. *3Biotech* **2019**, 9, Article: 447.
33. Ardila-Leal, L.D.; Monterey-Gutiérrez, P.A.; Poutou-Piñales, R.A.; Quevedo-Hidalgo, B.E.; Galindo, J.F.; Pedroza-Rodríguez, A.M. Recombinant laccase rPOXA 1B real-time and accelerated stability studies supported by molecular dynamics. *BMC Biotechnol* **2021**, 21, Article 37.
34. Ardila-Leal, L.D.; Hernández-Rojas, V.; Céspedes-Bernal, D.N.; Mateus-Maldonado, J.F.; Rivera-Hoyos, C.M.; Pedroza-Camacho, L.D.; Poutou-Piñales, R.A.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Pérez-Florez, A.; Quevedo-Hidalgo, B.E. Tertiary treatment (*Chlorella* sp.) of a mixed effluent from two secondary treatments (immobilized recombinant *P. pastoris* and rPOXA 1B concentrate) of coloured laboratory wastewater (CLWW). *3Biotech* **2020**, 10, Article: 233.
35. Morales-Álvarez, E.D.; Rivera-Hoyos, C.M.; Poveda-Cuevas, S.A.; Reyes-Guzmán, E.A.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Reyes-Montaño, E.A.; Poutou-Piñales, R.A. Malachite Green and Crystal Violet

- decolorization by *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus* supernatant and by rGILCC1 and rPOXA 1B concentrates: Molecular docking analysis. *Appl Biochem Biotechnol* **2018**, 184, 794-805.
36. Rivera-Hoyos, C.M.; Morales-Álvarez, E.D.; Abelló-Esparza, J.; Buitrago-Pérez, D.F.; Martínez-Aldana, N.; Salcedo-Reyes, J.C.; Poutou-Piñales, R.A.; Pedroza-Rodríguez, A.M. Detoxification of pulping black liquor with *Pleurotus ostreatus* or recombinant *Pichia pastoris* followed by CuO/TiO₂/visible photocatalysis. *Sci Rep* **2018**, 8, 3503.
 37. Gómez-Méndez, L.D.; Moreno-Bayona, D.A.; Poutou-Piñales, R.A.; Salcedo-Reyes, J.C.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Vargas, A.; Bogoya, J.M. Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*. *Plos One* **2018**, 13, e0203786.
 38. Morales-Álvarez, E.D.; Rivera-Hoyos, C.M.; Chaparro-Núñez, L.E.; Daza, C.E.; Poutou-Piñales, R.A.; Pedroza-Rodríguez, A.M. Decolorization and detoxification of Malachite Green by *Ganoderma lucidum*: key operating parameters and adsorption studies. *J Environ Eng* **2017**, 143, 04016093.
 39. Morales-Álvarez, E.D.; Rivera-Hoyos, C.M.; González-Ogliastri, N.; Rodríguez-Vázquez, R.; Poutou-Piñales, R.A.; Daza, C.E.; Pedroza-Rodríguez, A.M. Partial removal and detoxification of Malachite Green and Crystal Violet from laboratory artificially contaminated water by *Pleurotus ostreatus*. *Univ Sci* **2016**, 21, 259-285.
 40. Gonzalez Pena, O.I.; Lopez Zavala, M.A.; Cabral Ruelas, H. Pharmaceuticals market, consumption trends and disease incidence are not driving the pharmaceutical research on water and wastewater. *Int J Environ Res Public Health* **2021**, 18, 2532.
 41. Grabarczyk, L.; Mulkiewicz, E.; Stolte, S.; Puckowski, A.; Pazda, M.; Stepnowski, P.; Bialk-Bielinska, A. Ecotoxicity screening evaluation of selected pharmaceuticals and their transformation products towards various organisms. *Environ Sci Pollut Res Int* **2020**, 27, 26103-26114.
 42. Checa Artos, M.; Sosa del Castillo, D.; Ruiz Barzola, O.; Barcos-Arias, M. Presencia de productos farmacéuticos en el agua y su impacto en el ambiente. *Bionature* **2021**, 6, 1618-1627.
 43. Silbergeld, E.K.; Graham, J.; Price, L.B. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu Rev Public Health* **2008**, 29, 151-69.
 44. U.S. Food and Drug Administration (FDA), *Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals*; U.S. Food and Drug Administration (FDA), Washington, DC: 2019; p. 49. 2019. p. 49.
 45. Sarmah, A.K.; Meyer, M.T.; Boxall, A.B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosph* **2006**, 65, 725-59.
 46. Osei Sekyere, J. Antibiotic Types and Handling Practices in Disease Management among Pig Farms in Ashanti Region, Ghana. *J Vet Med* **2014**, 2014, 531952.
 47. Ferrari, B.t.; Paxéus, N.; Giudice, R.L.; Pollio, A.; Garric, J. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicol Env Safe* **2003**, 55, 359-370.
 48. Arenas, N.E.; Moreno-Melo, V. Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. *Infect* **2018**, 22, 110-119.
 49. Mobarki, N.; Almerabi, B.; Hattan, A. Antibiotic resistance crisis. *Int J Med Devel Count* **2019**, 561-564.
 50. Szymańska, U.; Wiergowski, M.; Soltyszewski, I.; Kuzemko, J.; Wiergowska, G.; Woźniak, M.K. Presence of antibiotics in the aquatic environment in Europe and their analytical monitoring: Recent trends and perspectives. *Microchem J* **2019**, 147, 729-740.
 51. Bedner, M.; Maccrhan, W.A. Transformation of acetaminophen by chlorination produces the toxicants 1,4-Benzoquinone and N-Acetyl-p-benzoquinone Imine. *Environ Sci Technol* **2006**, 40, 516-522.
 52. Dror, R.O.; Dirks, R.M.; Grossman, J.P.; Xu, H.; Shaw, D.E. Biomolecular simulation: a computational microscope for molecular biology. *Annu Rev Biophys* **2012**, 41, 429-452.
 53. Mayer, A.M.; Staples, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **2002**, 60, 551-565.
 54. Dittmer, N.T.; Suderman, R.J.; Jiang, H.; Zhu, Y.-C.; Gorman, M.J.; Kramer, K.J.; Kanost, M.R. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and

- developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Ins. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, 34, 29-41.
55. Upadhyay, P.; Shrivastava, R.; Agrawal, P.K. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3Biotech* **2016**, 6, 15.
 56. Arregui, L.; Ayala, M.; Gómez-Gil, X.; Gutiérrez-Soto, G.; Hernández-Luna, C.E.; Herrera de los Santos, M.; Levin, L.; Rojo-Domínguez, A.; Romero-Martínez, D.; Saparrat, M.C.N.; Trujillo-Roldán, M.A.; Valdez-Cruz, N.A. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. **2019**, 18, 200.
 57. Quintero D, J.C.; Feijoo C, G.; Lema R, J.M. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos Basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. **2006**, 13, 61-67.
 58. Brown, D.M.; Grunden, A.M.; Pawlak, J.J. Statistical optimization of black liquor-containing media for growth and lactic acid production by *Paenibacillus glucanolyticus* SLM1. *Biores Technol Rep* **2021**, 13, 100629.
 59. Ji, X.; Yuan, S.; Ji, H.; Tian, Z.; Chen, J. Quantification of the microdeformation degree of fast-growing poplar wood during prehydrolysis and its relationship with subsequent pulping. **2020**, 154, 112744.
 60. Morya, R.; Kumar, M.; Tyagi, I.; Kumar Pandey, A.; Park, J.; Raj, T.; Sirohi, R.; Kumar, V.; Kim, S.H. Recent advances in black liquor valorization. *Bioresour Technol* **2022**, IN PRESS, 126916.
 61. Feldman, D.; Kowbel, D.J.; Glass, N.L.; Yarden, O.; Hadar, Y. A role for small secreted proteins (SSPs) in a saprophytic fungal lifestyle: Ligninolytic enzyme regulation in *Pleurotus ostreatus*. *Sci Rep* **2017**, 7, 14553.
 62. Dewi, R.S.; Ilyas, M.; Sari, A.A. Ligninolytic enzyme immobilization from *Pleurotus ostreatus* for dye and batik wastewater decolorization. *Indonesian J Sci Educ* **2019**, 8, 220-229.
 63. Youn, H.-D.; Chil Hah, Y.; Kang, S.-O. Role of lactase in lignin degradation by white-rot fungi. **1995**, 132, 183-188.
 64. Eggert, C.; Temp, U.; Eriksson, K.-E.L. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* **1996**, 62,
 65. Nakamura, K.; Goa, N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell Mol. Life Sci.* **2005**, 62, 2050–2066.
 66. Claus, H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron.* **2004**, 35, 93-96.
 67. Giardina, P.; Faraco, V.; Pezzella, C.; Piscitelli, A.; Vanhulle, S.; Sannia, G. Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci* **2010**, 67, 369-385.
 68. Palmieri, G.; Cennamo, G.; Faraco, V.; Amoresano, A.; Sannia, G.; Giardina, P. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enz Microb Technol* **2003**, 33, 220–230.
 69. Savinova, O.S.; Moiseenko, K.V.; Vavilova, E.A.; Tyazhelova, T.V.; Vasina, D.V. Properties of two laccases from the *Trametes hirsuta* 072 multigene family: Twins with different faces. **2017**, 142, 183-190.
 70. Zhuo, R.; Zhang, J.; Yu, H.; Ma, F.; Zhang, X. The roles of *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 laccase isoenzymes in decolorization of synthetic dyes and the transformation pathways. *Chemosphere* **2019**, 234, 733-745.
 71. Rodgers, C.J.; Blanford, C.F.; Giddens, S.R.; Skamnioti, P.; Armstrong, F.A.; Gurr, S.J. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends in Biotechnol* **2010**, 28, 63-72.
 72. Leonowicz, A.; Cho, N.; Luterek, J.; Wilkolazka, A.; Wojtas-Wasilewska, M.; Matuszewska, A.; Hofrichter, M.; Wesenberg, D.; Rogalski, J. Fungal laccase: Properties and activity on lignin. **2001**, 41, 185-227.
 73. Zhukhlistova, N.E.; Zhukova, Y.N.; Lyashenko, A.V.; Zaitsev, V.N.; Mikhailov, A.M. Three-dimensional organization of three-domain copper oxidases: a review. *Crystal Rep* **2008**, 53, 92-109.
 74. Widsten, P.; Kandelbauer, A. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enz Microb Technol* **2008**, 42, 293–307.
 75. Kunamneni, A.; Camarero, S.; García-Burgos, C.; Plou, F.J.; Ballesteros, A.; Alcalde, M. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microb Cell Fact* **2008**, 7, 32.

76. Simões, M.F.; Maiorano, A.E.; Gomes dos Santos, J.; Peixoto, L.; Brambilla de Souza, R.F.; Oliveira Neto, A.; Guerreiro Brito, A.; Angélica Ottoni, C. Microbial fuel cell-induced production of fungal laccase to degrade the anthraquinone dye Remazol Brilliant Blue R. *2019*, *17*, 1413-1420.
77. Fernández, J.A.; Henao, L.M.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Quevedo-Hidalgo, B. Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. *Rev Colomb Biotechnol* **2009**, *XI*, 59-72.
78. Wlizio, K.; Polak, J.; Jarosz-Wilkolazka, A.; Pogni, R.; Petricci, E. Novel textile dye obtained through transformation of 2-amino-3-methoxybenzoic acid by free and immobilised laccase from a *Pleurotus ostreatus* strain. *Enz Microb Technol* **2020**, *132*, 109398.
79. Rossner, A.; Snyder, S.A.; Knappe, D.R. Removal of emerging contaminants of concern by alternative adsorbents. *Water Res* **2009**, *43*, 3787-96.
80. Al-Rifai, J.H.; Gabelish, C.L.; Schafer, A.I. Occurrence of pharmaceutically active and non-steroidal estrogenic compounds in three different wastewater recycling schemes in Australia. *Chemosphere* **2007**, *69*, 803-15.
81. Quesada-Peñate, I.; Carine, J.L.; Ulises-Javier, J.H.; Anne-Marie, W.; Henri, D. Sonolysis of levodopa and paracetamol in aqueous solutions. *Ultrason Sonochem* **2009**, *16*, 610-616.
82. Waesterhoff, P.; Yoon, Y.; Snyder, S.; Wert, E. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environ Sci Technol* **2005**, *39*, 6649-6663.
83. Sánchez-Obrero, G.; Mayén, M.; Rodríguez Mellado, J.M.; Rodríguez-Amaro, R. Electrocatalytic oxidation of acetaminophen on a PVC/TTF-TCNQ composite electrode modified by gold nanoparticles: Application as an amperometric sensor. *Int J Electrochem Sci* **2011**, *6*, 2001-2011.
84. Sundararaman, S.; Aravind Kumar, J.; Deivasigamani, P.; Devarajan, Y. Emerging pharma residue contaminants: Occurrence, monitoring, risk and fate assessment - A challenge to water resource management. *Sci Total Environ* **2022**, *825*, 153897.
85. Zhang, C.; You, S.; Zhang, J.; Qi, W.; Su, R.; He, Z. An effective in-situ method for laccase immobilization: Excellent activity, effective antibiotic removal rate and low potential ecological risk for degradation products. *Bioresour Technol* **2020**, *308*, 123271.
86. Becker, D.; Varela Della Giustina, S.; Rodriguez-Mozaz, S.; Schoevaart, R.; Barcelo, D.; de Cazes, M.; Belleville, M.P.; Sanchez-Marcano, J.; de Gunzburg, J.; Couillerot, O.; Volker, J.; Oehlmann, J.; Wagner, M. Removal of antibiotics in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccase - Degradation of compounds does not always eliminate toxicity. *Bioresour Technol* **2016**, *219*, 500-509.
87. Navada, K.K.; Kulal, A. Enzymatic degradation of chloramphenicol by laccase from *Trametes hirsuta* and comparison among mediators. *Int Biodet Biodegrad* **2019**, *138*, 63-69.
88. Kelbert, M.; Pereira, C.S.; Daronch, N.A.; Cesca, K.; Michels, C.; de Oliveira, D.; Soares, H.M. Laccase as an efficacious approach to remove anticancer drugs: A study of doxorubicin degradation, kinetic parameters, and toxicity assessment. *J Hazard Mater* **2021**, *409*, 124520.
89. Naghdi, M.; Taheran, M.; Brar, S.K.; Kermanshahi-Pour, A.; Verma, M.; Surampalli, R.Y. Immobilized laccase on oxygen functionalized nanobiochars through mineral acids treatment for removal of carbamazepine. **2017**, 584-585, 393-401.
90. Masjoudi, M.; Gologli, M.; Ghobadi Nejad, Z.; Sadeghzadeh, S.; Borghei, S.M. Pharmaceuticals removal by immobilized laccase on polyvinylidene fluoride nanocomposite with multi-walled carbon nanotubes. *Chemosphere* **2021**, *263*, 128043.
91. Tran, N.H.; Urase, T.; Kusakabe, O. Biodegradation characteristics of pharmaceutical substances by whole fungal culture *Trametes versicolor* and its laccase. *J Water Environ Technol* **2010**, *8*, 125-140.
92. Poutou, R.A.; Sánchez, L.; Díaz, K.; Máttar, S. Mecanismos de resistencia a los antibióticos beta-lactámicos. *Med UIS* **1999**, *13*, 172-177.
93. Denyer, S.P.; Hodges, N.A.; Gorman, S.P. *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology*. 2004, Massachusetts, USA: Blackwell Science, Inc.
94. European Centre for Disease Prevention and Control (ecdc), *Antimicrobial consumption in the EU/EEA. Annual epidemiological report for 2019*. 2019: Stockholm, Sweden: p. 25.
95. Clinical and Laboratory Standards Institute, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (CLSI M100-S17)*. 2007, Clinical and Laboratory Standards Institute: Malvern, USA. p. 182.

96. World Health Organization (WHO), *WHO Report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation*. 2018, World Health Organization (WHO): Geneva, Switzerland. p. 127.
97. World Health Organization, W. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. 6th Revision 2018. 2018.
98. Forge, A.; Schacht, J. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurootol* **2000**, *5*, 3-22.
99. Vigliarolo, L.O.; Di Pinto, P.M.; Suárez, M.C.; Lopardo, H.A.; Viegas Caetano, J.A. Antibióticos: clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia, ed. Lopardo, H.A. 2020, Buenos Aires, Argentina: EDULP. 191.
100. Suarez, C.; Gudiol, F. [Beta-lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2009**, *27*, 116-29.
101. El-Gamal, M.I.; Brahim, I.; Hisham, N.; Aladdin, R.; Mohammed, H.; Bahaaeldin, A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem* **2017**, *131*, 185-195.
102. El-Shaboury, S.R.; Saleh, G.A.; Mohamed, F.A.; Rageh, A.H. Analysis of cephalosporin antibiotics. *J Pharm Biomed Anal* **2007**, *45*, 1-19.
103. Brewer, N.S.; Hellinger, W.C. The Monobactams. *Mayo Clin Proc* **1991**, *66*, 1152-1157.
104. García-Quetglas, E.; Azanza, J.R.; Sadaba, B.; Gil-Aldea, I. Farmacología de antimicrobianos utilizados en el tratamiento de las infecciones graves por bacterias Grampositivas. *Rev Esp Quimioterap* **2003**, *16*, 277-288.
105. Burdette, S.D.; Trotman, R. Tedizolid: The First Once-Daily Oxazolidinone Class Antibiotic. *Clin Infect Dis* **2015**, *61*, 1315-21.
106. Calvo, J.; Martínez-Martínez, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2009**, *27*, 44-52.
107. Flamm, R.K.; Farrell, D.J.; Rhomberg, P.R.; Scangarella-Oman, N.E.; Sader, H.S. Gepotidacin (GSK2140944) In Vitro Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**, *61*, e00468-17.
108. Cholo, M.C.; Steel, H.C.; Fourie, P.B.; Germishuizen, W.A.; Anderson, R. Clofazimine: current status and future prospects. *J Antimicrob Chemother* **2012**, *67*, 290-8.
109. García-Rodríguez, J.A.; Gutiérrez Zufiaurre, N.; Muñoz Bellido, L.J. Ácido fusídico. *Rev Esp Quimioterap* **2003**, *16*, 161-171.
110. Chopra, I.; Roberts, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **2001**, *65*, 232-260
111. Qian, H.; Li, J.; Pan, X.; Sun, Z.; Ye, C.; Jin, G.; Fu, Z. Effects of streptomycin on growth of algae *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Environ Toxicol* **2012**, *27*, 229-37.
112. Wollenberger, L.; Halling-Sorensen, B.; Kusk, K.O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosph* **2000**, *40*, 723-730.
113. Liljebjelke, K.A.; Hofacre, C.L.; White, D.G.; Ayers, S.; Lee, M.D.; Maurer, J.J. Diversity of Antimicrobial Resistance Phenotypes in Salmonella Isolated from Commercial Poultry Farms. *Front Vet Sci* **2017**, *4*, 96.
114. Luczkiewicz, A.; Jankowska, K.; Fudala-Ksiazek, S.; Olanczuk-Neyman, K. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Res* **2010**, *44*, 5089-97.
115. Avent, M.L.; Rogers, B.A.; Cheng, A.C.; Paterson, D.L. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. *Intern Med J* **2011**, *41*, 441-9.
116. Turnidge, J. Pharmacodynamics and dosing of aminoglycosides. *Infect Dis Clin North Amer* **2003**, *17*, 503-528.
117. Duarte, J.L.d.S.; Solano, A.M.S.; Arguelho, M.L.P.M.; Tonholo, J.; Martínez-Huitle, C.A.; Zanta, C.L.d.P.e.S. Evaluation of treatment of effluents contaminated with rifampicin by Fenton, electrochemical and associated processes. *J Water Proc Eng* **2018**, *22*, 250-257.
118. World Health Organization (WHO), *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report: early implementation 2016-2017*. 2017, World Health Organization, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.: Geneva. p. 164 p.
119. Havelkova, B.; Beklova, M.; Kovacova, V.; Hlavkova, D.; Pikula, J. Ecotoxicity of selected antibiotics for organisms of aquatic and terrestrial ecosystems. *Neuroendocrinol Lett* **2016**, *37*, 38-44.

120. Ranjbar, R.; Sami, M. Genetic Investigation of Beta-Lactam Associated Antibiotic Resistance Among Escherichia Coli Strains Isolated from Water Sources. *Open Microbiol J* **2017**, *11*, 203-210.
121. Hoelle, J.; Johnson, J.R.; Johnston, B.D.; Kinkle, B.; Boczek, L.; Ryu, H.; Hayes, S. Survey of US wastewater for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Water Health* **2019**, *17*, 219-226.
122. Yilmaz, C.; Ozcengiz, G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. *Biochem Pharmacol* **2017**, *133*, 43-62.
123. Das, N.; Madhavan, J.; Selvi, A.; Das, D. An overview of cephalosporin antibiotics as emerging contaminants: a serious environmental concern. *3 Biotech* **2019**, *9*, 231.
124. Barriere, S.L. Pharmacology and Pharmacokinetics of Cefprozil. *Clin Infect Dis* **1992**, *14*, S184-S188.
125. Selvi, A.; Salam, J.A.; Das, N. Biodegradation of cefdinir by a novel yeast strain, Ustilago sp. SMN03 isolated from pharmaceutical wastewater. *World J Microbiol Biotechnol* **2014**, *30*, 2839-50.
126. Yu, X.; Tang, X.; Zuo, J.; Zhang, M.; Chen, L.; Li, Z. Distribution and persistence of cephalosporins in cephalosporin producing wastewater using SPE and UPLC-MS/MS method. *Sci Total Environ* **2016**, *569-570*, 23-30.
127. Bruyndonckx, R.; Adriaenssens, N.; Hens, N.; Versporten, A.; Monnet, D.L.; Molenberghs, G.; Goossens, H.; Weist, K.; Coenen, S.; ESAC-Net study group Consumption of penicillins in the community, European Union/European Economic Area, 1997-2017. *J Antimicrob Chemother* **2021**, *76*, ii14-ii21.
128. Bodey, G.P.; Nance, J. Amoxicillin: In Vitro and Pharmacological Studies. *Antimicrob Age Chemother* **1972**, *1*, 358-362.
129. Ighalo, J.O.; Igwegbe, C.A.; Aniagor, C.O.; Oba, S.N. A review of methods for the removal of penicillins from water. *J Water Prv Eng* **2021**, *39*, 101886.
130. Arslan-Alaton, I.; Caglayan, A.E. Toxicity and biodegradability assessment of raw and ozonated procaine penicillin G formulation effluent. *Ecotoxicol Environ Saf* **2006**, *63*, 131-40.
131. Szekeres, E.; Baricz, A.; Chiriac, C.M.; Farkas, A.; Opris, O.; Soran, M.L.; Andrei, A.S.; Rudi, K.; Balcazar, J.L.; Dragos, N.; Coman, C. Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. *Environ Pollut* **2017**, *225*, 304-315.
132. Felis, E.; Kalka, J.; Sochacki, A.; Kowalska, K.; Bajkacz, S.; Harnisz, M.; Korzeniewska, E. Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment - occurrence and environmental implications. *Eur J Pharmacol* **2020**, *866*, 172813.
133. McGuinness, W.A.; Malachowa, N.; DeLeo, F.R. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med* **2017**, *90*, 269-281.
134. Stein, G.E.; Babinchak, T. Tigecycline: an update. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *75*, 331-6.
135. El-Azazy, M.; El-Shafie, A.S.; Al-Meer, S.; Al-Saad, K.A. Eco-structured Adsorptive Removal of Tigecycline from Wastewater: Date Pits' Biochar versus the Magnetic Biochar. *Nanomater* **2020**, *11*, 30.
136. Zurfluh, K.; Poirel, L.; Nordmann, P.; Nuësch-Inderbinnen, M.; chler, H.H.; Stephan, R. Occurrence of the plasmid-borne mcr-1 colistin resistance gene in extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in river water and imported vegetable samples in Switzerland. *Antimicrob Age Chemother* **2016**, *60*, 2594-2595.
137. Hembach, N.; Schmid, F.; Alexander, J.; Hiller, C.; Rogall, E.T.; Schwartz, T. Occurrence of the mcr-1 Colistin Resistance Gene and other Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Microbial Populations at Different Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany. *Front Microbiol* **2017**, *8*, 1282.
138. Song, X.; Turiel, E.; He, L.; Martín-Esteban, A. Synthesis of Molecularly Imprinted Polymers for the Selective Extraction of Polymyxins from Environmental Water Samples. *Polym* **2020**, *12*, 131.
139. Hirsch, R.; Ternes, T.; Haberer, K.; Kratz, K.-L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Tot Environ* **1999**, *225*, 109-118.
140. Managaki, S.; Murata, A.; Takada, H.; Tuyen, B.C.; Chiem, N.H. Distribution of Macrolides, Sulfonamides, and Trimethoprim in Tropical Waters: Ubiquitous Occurrence of Veterinary Antibiotics in the Mekong Delta. *Environ Sci Technol* **2007**, *41*, 8004-8010.

141. Almeida, L.M.; Gaca, A.; Bispo, P.M.; Lebreton, F.; Saavedra, J.T.; Silva, R.A.; Basilio-Junior, I.D.; Zorzi, F.M.; Filsner, P.H.; Moreno, A.M.; Gilmore, M.S. Coexistence of the Oxazolidinone Resistance-Associated Genes *cf*r and *optrA* in *Enterococcus faecalis* From a Healthy Piglet in Brazil. *Front Public Health* **2020**, *8*, 518.
142. Zhou, Y.; Li, J.; Schwarz, S.; Zhang, S.; Tao, J.; Fan, R.; Walsh, T.R.; Wu, C.; Wang, Y. Mobile oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in chicken *Clostridium perfringens*. *J Antimicrob Chemother* **2020**, *75*, 3067-3069.
143. Timm, A.; Abendschon, P.; Tolgyesi, L.; Horn, H.; Borowska, E. Solar-mediated degradation of linezolid and tedizolid under simulated environmental conditions: Kinetics, transformation and toxicity. *Chemosph* **2020**, *241*, 125111.
144. Shaw, K.J.; Barbachyn, M.R. The oxazolidinones: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci* **2011**, *1241*, 48-70.
145. World Health Organization (WHO), *Model List of Essential Medicines – 22nd List*. 2021, World Health Organization Geneva. p. 66p.
146. Merazi, Y.; Hammadi, K.; Fedoul, F.F. An investigation of the practices of veterinarians and breeders in the prevalence of antibiotic resistance in poultry farms in Algeria. *Revue Nature et Technologie* **2021**, *13*, 14-33.
147. Keating, G.M. Fosfomycin trometamol: a review of its use as a single-dose oral treatment for patients with acute lower urinary tract infections and pregnant women with asymptomatic bacteriuria. *Drugs* **2013**, *73*, 1951-66.
148. Takahata, S.; Ida, T.; Hiraishi, T.; Sakakibara, S.; Maebashi, K.; Terada, S.; Muratani, T.; Matsumoto, T.; Nakahama, C.; Tomono, K. Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* **2010**, *35*, 333-7.
149. Falagas, M.E.; Athanasaki, F.; Voulgaris, G.L.; Triarides, N.A.; Vardakas, K.Z. Resistance to fosfomycin: Mechanisms, Frequency and Clinical Consequences. *Int J Antimicrob Agents* **2019**, *53*, 22-28.
150. Zeng, P.; Xie, X.; Song, Y.; Liu, R.; Zhu, C.; Galarneau, A.; Pic, J.S. Ion chromatography as highly suitable method for rapid and accurate determination of antibiotic fosfomycin in pharmaceutical wastewater. *Water Sci Technol* **2014**, *69*, 2014-22.
151. Golet, E.M.; Xifra, i.; Siegrist, H.; Alder, A.C.; Giger, W. Environmental exposure Assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Env Sci Technol* **2003**, *37*, 3243-3249.
152. Zhang, Z.; Cheng, H. Recent Development in Sample Preparation and Analytical Techniques for Determination of Quinolone Residues in Food Products. *Crit Rev Anal Chem* **2017**, *47*, 223-250.
153. Castrignano, E.; Kannan, A.M.; Proctor, K.; Petrie, B.; Hodgen, S.; Feil, E.J.; Lewis, S.E.; Lopardo, L.; Camacho-Munoz, D.; Rice, J.; Cartwright, N.; Barden, R.; Kasprzyk-Hordern, B. (Fluoro)quinolones and quinolone resistance genes in the aquatic environment: A river catchment perspective. *Water Res* **2020**, *182*, 116015.
154. Kergaravat, S.V.; Hernandez, S.R.; Gagneten, A.M. Second-, third- and fourth-generation quinolones: Ecotoxicity effects on *Daphnia* and *Ceriodaphnia* species. *Chemosph* **2021**, *262*, 127823.
155. Pham, T.D.M.; Ziora, Z.M.; Blaskovich, M.A.T. Quinolone antibiotics. *Med Chem Comm* **2019**, *10*, 1719-1739.
156. Schwarz, S.; Kehrenberg, C.; Doublet, B.; Cloeckaert, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev* **2004**, *28*, 519-542.
157. Oliveira Toledo, S.L.; Silveira Silva, R.M.; Rodrigues dos Santos, I.C.; Lima, W.G.; Rodrigues Ferreira, L.G.; Paiva, M.C. Domestic wastewater treatment plants as sources of macrolide-lincosamide-streptogramin B- and penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. *Rev Colomb Cien Quím-Farm* **2020**, *49*, 267-279.
158. Guo, X.; Yan, Z.; Zhang, Y.; Xu, W.; Kong, D.; Shan, Z.; Wang, N. Behavior of antibiotic resistance genes under extremely high-level antibiotic selection pressures in pharmaceutical wastewater treatment plants. *Sci Total Environ* **2018**, *612*, 119-128.
159. Dadashi, M.; Hajikhani, B.; Darban-Sarokhalil, D.; van Belkum, A.; Goudarzi, M. Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist* **2020**, *20*, 238-247.
160. Holdiness, M.R. Clinical pharmacokinetics of clofazimine: A review. **1989**, *16*, 74-85.

161. Williamson, D.A.; Monecke, S.; Heffernan, H.; Ritchie, S.R.; Roberts, S.A.; Upton, A.; Thomas, M.G.; Fraser, J.D. High usage of topical fusidic acid and rapid clonal expansion of fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus*: a cautionary tale. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *59*, 1451-4.
162. Hruska, K.; Franek, M. Sulfonamides in the environment: a review and a case report. *Veterinárni Medicína* **2012**, *57*, 1-35.
163. Vila-Costa, M.; Gioia, R.; Acena, J.; Perez, S.; Casamayor, E.O.; Dachs, J. Degradation of sulfonamides as a microbial resistance mechanism. *Water Res* **2017**, *115*, 309-317.
164. Scholar, E., *Tetracycline*, in *X Pharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Dowd, F.J.; Murrin, L.C.; Ralevic, V.; Scholar, E.M.; Summers, R.J.; Tew, K.D.; Wecker, L., Editors. 2008, Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands. p. 1-4.
165. Pulicharla, R.; Brar, S.K.; Rouissi, T.; Auger, S.; Drogui, P.; Verma, M.; Surampalli, R.Y. Degradation of chlortetracycline in wastewater sludge by ultrasonication, Fenton oxidation, and ferro-sonication. *Ultrason Sonochem* **2017**, *34*, 332-342.
166. Xu, L.; Zhang, H.; Xiong, P.; Zhu, Q.; Liao, C.; Jiang, G. Occurrence, fate, and risk assessment of typical tetracycline antibiotics in the aquatic environment: A review. *Sci Total Environ* **2021**, *753*, 141975.
167. Page, S.W.; Gautier, P. Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev Sci Tech* **2012**, *31*, 145-188.
168. El Parlamento Europeo; Europea, C.d.I.U., *Reglamento (UE) 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo de 11 de diciembre de 2018*. 2019, El Parlamento Europeo: España. p. 125.
169. Organization, W.H., *Initiative to estimate the global burden of foodborne diseases: Fourth formal meeting of the Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group (FERG): sharing new results, making future plans, and preparing ground for the countries*. 2014, World Health Organization: Geneva. p. 108.
170. Destro, M.T.; Ribeiro, V.B., *Foodborne zoonoses*, in *Encyclopedia of Meat Sciences*, Devine, C.; Dikeman, M., Editors. 2014, Academic Press p. 17-21.
171. Gebeyehu, D.T. Antibiotic Resistance Development in Animal Production: A Cross-Sectional Study. *Vet Med: Res Rep* **2021**, *12*, 101-108.
172. Kraemer, S.A.; Ramachandran, A.; Perron, G.G. Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. *Microorg* **2019**, *7*, 180.
173. Checcucci, A.; Trevisi, P.; Luise, D.; Modesto, M.; Blasioli, S.; Braschi, I.; Mattarelli, P. Exploring the Animal Waste Resistome: The Spread of Antimicrobial Resistance Genes Through the Use of Livestock Manure. *Front Microbiol* **2020**, *11*, 1416.
174. Domenech, E.; Jimenez -Belenguier, A.; Amoros, J.A.; Ferrus, M.A.; Escriche, I. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain. *Food Cont* **2015**, *47*, 120-125.
175. Sallam, K.I.; Mohammed, M.A.; Hassan, M.A.; Tamura, T. Prevalence, molecular identification and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* serovars isolated from retail beef products in Mansoura, Egypt. *Food Cont* **2014**, *38*, 209-214.
176. Abd-Elghany, S.M.; Sallam, K.I.; Abd-Elkhalek, A.; Tamura, T. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. *Epidemiol Infect* **2015**, *143*, 997-1003.
177. Nguyen, D.T.A.; Kanki, M.; Nguyen, P.D.; Le, H.T.; Ngo, P.T.; Tran, D.N.M.; Le, N.H.; Van Dang, C.; Kawai, T.; Kawahara, R.; Yonogi, S.; Hirai, Y.; Jinnai, M.; Yamasaki, S.; Kumeda, Y.; Yamamoto, Y. Prevalence, antibiotic resistance, and extended-spectrum and AmpC β -lactamase productivity of *Salmonella* isolates from raw meat and seafood samples in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *236*, 115-122.
178. Ayala-Romero, C.; Ballen-Parada, C.; Rico-Gaitán, M.; Chamorro-Tobar, I.; Zambrano-Moreno, D.; Poutou-Piñales, R.; Carrascal-Camacho, A. Prevalence of *Salmonella* spp., in mesenteric pig's ganglia at Colombian benefit plants. *Rev MVZ Córdoba* **2018**, *23*, 6474-6486.
179. Löfström, C.; Hansen, T.; Maurischat, S.; Malorny, B., *Salmonella: Salmonellosis*, in *Encyclopedia of Food and Health*, Caballero, B.; Finglas, P.; Toldra, F., Editors. 2015, Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands. p. 701-705.
180. Sánchez-Vargas, F.M.; Abu-El-Haija, M.A.; Gómez-Duarte, O.G. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med. Infect. Dis.* **2011**, *9*, 263-277.

181. Rincón-Gamboa, S.M.; Poutou-Piñales, R.A.; Carrascal-Camacho, A.K. Antimicrobial resistance of Non-Typhoid *Salmonella* in meat and meat products *Foods* **2021**, *10*, article 1731.
182. de Jong, A.; Bywater, R.; Butty, P.; Deroover, E.; Godinho, K.; Klein, U.; Marion, H.; Simjee, S.; Smets, K.; Thomas, V.; Vallé, M.; Wheadon, A. A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J Antimicrob Chemother* **2009**, *63*, 733-744.
183. Antunes, P.; Mourão, J.; Campos, J.; Peixe, L. Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clin Microbiol Infect* **2016**, *22*, 110-121.
184. Marquis, H.; Drevets, D.A.; Bronze, M.S.; Kathariou, S.; Golos, T.G.; Iruretagoyena, J.I., *Pathogenesis of Listeria monocytogenes in Humans*, in *Human Emerging and Re-emerging Infections: Viral and Parasitic Infections*, Singh, S.K., Editor. 2015. p. 749-772.
185. Torres, K.J.; Sierra, S.C.; Poutou, R.A.; Vera, H.; Carrascal, A.K.; Mercado, M. Incidencia y diagnóstico de *Listeria monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la industria de alimentos. *Rev UDCA Act Divulg Cient* **2004**, *7*, 25-57.
186. Torres, K.J.; Sierra, S.C.; Poutou, R.A.; Carrascal, A.K.; Mercado, M. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Rev MVZ-Córdoba* **2005**, *10*, 511-543.
187. Belalcazar, M.E.; Poutou, R.A.; Torres, K.J.; Gallegos, J.M.; Torres, O.; Carrascal, A.K. *Listeria monocytogenes* y listeriosis animal. *Rev UDCA Act Inv Cient* **2005**, *8*, 3-16.
188. Ruiz-Bolivar, Z.; Neuque-Rico, M.C.; Poutou-Piñales, R.A.; Carrascal-Camacho, A.K.; Máttar-Velilla, S. Antimicrobial susceptibility of *L. monocytogenes* food-isolates from different cities of Colombia. *Foodborne Path Dis* **2011**, *8*, 913-919.
189. Allen, K.J.; Walecka-Zacharska, E.; Chen, J.C.; Kosek-Paszowska, K.; Devlieghere, F.; Van Meervenue, E.; Osek, J.; Wiczorek, K.; Bania, J. *Listeria monocytogenes* – An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. *Food Microbiol* **2016**, *54*, 178-189.
190. Sekyere, J.O. Antibiotic types and handling practices in disease management among pig farms in Ashanti Region, Ghana. *J Vet Med* **2014**, *2014*, 531952.
191. Tenover, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* **2006**, *34*, s3-s10.
192. Morejón García, M. Betalactamasas de espectro extendido. *Rev Cubana Med* **2013**, *52*, 272-280.
193. Sanseverino, I.; Navarro Cuenca, A.; Loos, R.; Marinov, D.; Lettieri, T., *State of the art on the contribution of water to antimicrobial resistance*, EUR 29592, in *Publications Office of the European Union*. 2018: Luxembourg, ISBN 978-92-79-98478-5, doi:10.2760/771124, JRC114775. p. 110 p.
194. Grohmann, E.; Muth, G.; Espinosa, M. Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **2003**, *67*, 277-301.
195. Poutou, R.A.; Mattar, S., *Genética Molecular Bacteriana*, in *Bacteriología Clínica: Estudio Etiológico de las Enfermedades Infecciosas de Origen Bacteriano*, Florián, S.M.V.y.A.M., Editor. 2002, Editorial: Universidad de Córdoba Vicerrectoría de Investigación y Extensiones. Asociación Colombiana de Infectología (ACIN). Córdoba.
196. Arutyunov, D.; Frost, L.S. F conjugation: back to the beginning. *Plasmid* **2013**, *70*, 18-32.
197. Kohler, V.; Keller, W.; Grohmann, E. Regulation of Gram-Positive Conjugation. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1134.
198. Taylor, P.; Reeder, R. Antibiotic use on crops in low and middle-income countries based on recommendations made by agricultural advisors. *CABI Agric Biosci* **2020**, *1*, 1.
199. Luo, Y.; Xu, L.; Rysz, M.; Wang, Y.; Zhang, H.; Alvarez, P.J. Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the Haihe River Basin, China. *Environ Sci Technol* **2011**, *45*, 1827-33.
200. Ramírez, G.D.; Vélez, G.; Rondón, I.S. Determinación de residuos de antibióticos y tiempo de retiro en leche proveniente del municipio de Cartago (Valle del Cauca). *Rev Col Cienc Anim* **2012**, *5*, 25-31.
201. Xu, D.; Xiao, Y.; Pan, H.; Mei, Y. Toxic effects of tetracycline and its degradation products on freshwater green algae. *Ecotoxicol Environ Saf* **2019**, *174*, 43-47.
202. Song, Y.; Han, Z.; Song, K.; Zhen, T. Antibiotic Consumption Trends in China: Evidence From Six-Year Surveillance Sales Records in Shandong Province. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 491.

203. Anh, H.Q.; Le, T.P.Q.; Da Le, N.; Lu, X.X.; Duong, T.T.; Garnier, J.; Rochelle-Newall, E.; Zhang, S.; Oh, N.H.; Oeurng, C.; Ekkawatpanit, C.; Nguyen, T.D.; Nguyen, Q.T.; Nguyen, T.D.; Nguyen, T.N.; Tran, T.L.; Kunisue, T.; Tanoue, R.; Takahashi, S.; Minh, T.B.; Le, H.T.; Pham, T.N.M.; Nguyen, T.A.H. Antibiotics in surface water of East and Southeast Asian countries: A focused review on contamination status, pollution sources, potential risks, and future perspectives. *Sci Total Environ* **2021**, *764*, 142865.
204. Centers for Disease Control and Prevention, C., *Antibiotic Use in the United States, 2021 Update: Progress and Opportunities*, US Department of Health and Human Services, C., Editor. 2021: Atlanta, GA. p. 26 p.
205. Instituto Nacional de Salud (INS), *Consumo de antibióticos en el ámbito hospitalario, Colombia, 2017*, Gómez Rubio, A.; Equipo Funcional, I.; Grupo de Transmisibles; Subdirección de Prevención, V.y.C.e.S.P.; Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública, Editors. 2017. p. 16 p.
206. Pallares, C.J.; Martínez, E. Implementación de un programa de uso regulado de antibióticos en 2 unidades de cuidado intensivo medico-quirúrgico en un hospital universitario de tercer nivel en Colombia. *Infectio* **2012**, *16*, 192-198.
207. Villalobos, A.P.; Barrero, L.I.; Rivera, S.M.; Ovalle, M.V.; Valera, D. Vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud, resistencia bacteriana y consumo de antibióticos en hospitales de alta complejidad, Colombia, 2011. *Biomédica* **2013**, *34*, 67.
208. Diwan, V.; Tamhankar, A.J.; Khandal, R.K.; Sen, S.; Aggarwal, M.; Marothi, Y.; Iyer, R.V.; Sundblad-Tonderski, K.; Stålsby-Lundborg, C. Aesneatrcihb airtoiclteics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India. *BMC Public Health* **2010**, *10*, 414.
209. Lacorte, S.; Gomez-Canela, C.; Calas-Blanchard, C. Pharmaceutical residues in senior residences wastewaters: High loads, emerging risks. *Molecules* **2021**, *26*, 5047.
210. Lacorte, S.; Luis, S.; Gomez-Canela, C.; Sala-Comorera, T.; Courtier, A.; Roig, B.; Oliveira-Brett, A.M.; Joannis-Cassan, C.; Aragones, J.I.; Poggio, L.; Noguer, T.; Lima, L.; Barata, C.; Calas-Blanchard, C. Pharmaceuticals released from senior residences: occurrence and risk evaluation. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2018**, *25*, 6095-6106.
211. Anh, H.Q.; Le, T.P.Q.; Da Le, N.; Lu, X.X.; Duong, T.T.; Garnier, J.; Rochelle-Newall, E.; Zhang, S.; Oh, N.H.; Oeurng, C.; Ekkawatpanit, C.; Nguyen, T.D.; Nguyen, Q.T.; Nguyen, T.D.; Nguyen, T.N.; Tran, T.L.; Kunisue, T.; Tanoue, R.; Takahashi, S.; Minh, T.B.; Le, H.T.; Pham, T.N.M.; Nguyen, T.A.H. Antibiotics in surface water of East and Southeast Asian countries: A focused review on contamination status, pollution sources, potential risks, and future perspectives. *Sci Total Environ* **2021**, *764*, 142865.
212. World Health Organization (WHO), *WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption. 2016 - 2018 Early implementation*. 2016. p. 128.
213. Li, S.; Shi, W.; Li, H.; Xu, N.; Zhang, R.; Chen, X.; Sun, W.; Wen, D.; He, S.; Pan, J.; He, Z.; Fan, Y. Antibiotics in water and sediments of rivers and coastal area of Zhuhai City, Pearl River estuary, south China. *Sci Total Environ* **2018**, *636*, 1009-1019.
214. Yang, S.; Carlson, K.H. Solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and waste water matrices. *J Chromatogr A* **2004**, *1038*, 141-155.
215. Lien, L.T.; Hoa, N.Q.; Chuc, N.T.; Thoa, N.T.; Phuc, H.D.; Diwan, V.; Dat, N.T.; Tamhankar, A.J.; Lundborg, C.S. Antibiotics in wastewater of a rural and an urban hospital before and after wastewater treatment, and the relationship with antibiotic use-A one year study from Vietnam. *Int J Environ Res Public Health* **2016**, *13*, 588.
216. Serna-Galvis, E.; Martínez-Mena, Y.L.; Porras, J.; Torres-Palma, R.A. Antibióticos de alto consumo en Colombia, excreción en orina y presencia en aguas residuales – una revisión bibliográfica. *Ing Compet* **2021**, *24*, e30711267.
217. Deak, D.; Outtersson, K.; Powers, J.H.; Kesselheim, A.S. Progress in the Fight Against Multidrug-Resistant Bacteria? A Review of U.S. Food and Drug Administration-Approved Antibiotics, 2010-2015. *Ann Intern Med* **2016**, *165*, 363-72.
218. Andrei, S.; Droc, G.; Stefan, G. FDA approved antibacterial drugs: 2018-2019. *Discov* **2019**, *7*, e102.

219. Malenfant, J.H.; Brewer, T.F. Rifampicin Mono-Resistant Tuberculosis-A Review of an Uncommon But Growing Challenge for Global Tuberculosis Control. *Open Forum Infect. Dis.* **2021**, *8*, ofab018.
220. Donoghue, D.J. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? *Poult Sci* **2003**, *82*, 618-621.
221. Treiber, F.M.; Beranek-Knauer, H. Antimicrobial Residues in Food from Animal Origin-A Review of the Literature Focusing on Products Collected in Stores and Markets Worldwide. *Antibiot* **2021**, *10*, 534.
222. Wang, C.; Liu, X.; Yang, Y.; Wang, Z. Antibiotic and antibiotic resistance genes in freshwater aquaculture ponds in China: A meta-analysis and assessment. *J Clean Prod* **2021**, *329*, 129719.
223. Oliveri Conti, G.; Copat, C.; Wang, Z.; D'Agati, P.; Cristaldi, A.; Ferrante, M. Determination of illegal antimicrobials in aquaculture feed and fish: An ELISA study. *Food Cont* **2015**, *50*, 937-941.
224. Zhang, Y.; Lu, J.; Yan, Y.; Liu, J.; Wang, M. Antibiotic residues in cattle and sheep meat and human exposure assessment in southern Xinjiang, China. **2021**, *9*, 6152-6161.
225. Sheridan, R.; Mirabile, J.; Hafler, K. Determination of six illegal antibiotics in chicken jerky dog treats. *J Agric Food Chem* **2014**, *62*, 3690-6.
226. García, J.F.; Diez, M.J.; Sahagun, A.M.; Diez, R.; Sierra, M.; García, J.J.; Fernandez, M.N. The Online Sale of Antibiotics for Veterinary Use. *Anim* **2020**, *10*, 503.
227. Ministerio de Salud y Protección Social, *Resolución 1382. Por la cual se establecen los límites máximos para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, destinados al consumo humano*. 2013. p. URL Disponible en: <https://www.invima.gov.co/normatividad-sp-510373846/alimentos/resoluciones-alimentos/resoluciones-2013/3075-resolucion-1382-del-2-mayo-2013.html>.
228. Instituto Colombiano Agropecuario, I., *Resolución 1966. Por lo cual se reglamenta el uso de productos o sustancias antimicrobianas como promotores de crecimiento o mejoradores de la eficiencia alimenticia*. 1984, Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). p. 2.
229. Pan, M.; Chu, L.M. Adsorption and degradation of five selected antibiotics in agricultural soil. *Sci Total Environ* **2016**, *545-546*, 48-56.
230. Ezzariai, A.; Hafidi, M.; Khadra, A.; Aemig, Q.; El Fels, L.; Barret, M.; Merlina, G.; Patureau, D.; Pinelli, E. Human and veterinary antibiotics during composting of sludge or manure: Global perspectives on persistence, degradation, and resistance genes. *J Hazard Mater* **2018**, *359*, 465-481.
231. Cycon, M.; Mroziak, A.; Piotrowska-Seget, Z. Antibiotics in the Soil Environment-Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. *Front Microbiol* **2019**, *10*, 338.
232. Wu, S.; Hu, Y.H. A comprehensive review on catalysts for electrocatalytic and photoelectrocatalytic degradation of antibiotics. *Chem Eng J* **2021**, *409*, 127739.
233. Homem, V.; Santos, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices--a review. *J Env Manag* **2011**, *92*, 2304-2347.
234. Abdurahman, M.H.; Abdullah, A.Z.; Shoparwe, N.F. A comprehensive review on sonocatalytic, photocatalytic, and sonophotocatalytic processes for the degradation of antibiotics in water: Synergistic mechanism and degradation pathway. *Chem Eng J* **2021**, *413*, 127412.
235. Loftin, K.A.; Adams, C.D.; Meyer, M.T.; Surampalli, R. Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics. *J Environ Qual* **2008**, *37*, 378-386.
236. Calcio Gaudino, E.; Canova, E.; Liu, P.; Wu, Z.; Cravotto, G. Degradation of Antibiotics in Wastewater: New Advances in Cavitation Treatments. *Molecules* **2021**, *26*, 617.
237. Zeghioud, H.; Kamagate, M.; Coulibaly, L.S.; Rtimi, S.; Assadi, A.A. Photocatalytic degradation of binary and ternary mixtures of antibiotics: reactive species investigation in pilot scale. *Chem Eng Res Des* **2019**, *144*, 300-309.
238. Dorival-García, N.; Zafra-Gomez, A.; Navalón, A.; Gonzalez-Lopez, J.; Hontoria, E.; Vilchez, J.L. Removal and degradation characteristics of quinolone antibiotics in laboratory-scale activated sludge reactors under aerobic, nitrifying and anoxic conditions. *J Environ Manage* **2013**, *120*, 75-83.
239. Jiang, M.; Wang, L.; Ji, R. Biotic and abiotic degradation of four cephalosporin antibiotics in a lake surface water and sediment. *Chemosph* **2010**, *80*, 1399-405.

240. Braschi, I.; Blasioli, S.; Fellet, C.; Lorenzini, R.; Garelli, A.; Pori, M.; Giacomini, D. Persistence and degradation of new beta-lactam antibiotics in the soil and water environment. *Chemosph* **2013**, *93*, 152-159.
241. Lin, K.; Gan, J. Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosph* **2011**, *83*, 240-246.
242. Ahmad, F.; Zhu, D.; Sun, J. Environmental fate of tetracycline antibiotics: degradation pathway mechanisms, challenges, and perspectives. *Env Sci Eur* **2021**, *33*, 64.
243. Ruan, Y.; Kumar Awasthi, M.; Cai, L.; Lu, H.; Xu, X.; Li, W. Simultaneous aerobic denitrification and antibiotics degradation by strain *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* RAD-2. *Bioresource Technology* **2020**, *313*, 123609.
244. Zhang, Y.; Xu, J.; Zhong, Z.; Guo, C.; Li, L.; He, Y.; Fan, W.; Chen, Y. Degradation of sulfonamides antibiotics in lake water and sediment. *Env Sci Pollut Rese Int* **2013**, *20*, 2372-2380.
245. Nnenna, F.-P.; Lekiah, P.; Obemeata, O. Degradation of antibiotics by bacteria and fungi from the aquatic environment. *J Toxicol Environ Health Sci* **2011**, *30*, 275-285.
246. Alexy, R.; Kumpel, T.; Kummerer, K. Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test. *Chemosph* **2004**, *57*, 505-512.
247. Ho, Y.B.; Zakaria, M.P.; Latif, P.A.; Saari, N. Degradation of veterinary antibiotics and hormone during broiler manure composting. *Bioresource Technology* **2013**, *131*, 476-484.
248. Ji, Y.; Shi, Y.; Dong, W.; Wen, X.; Jiang, M.; Lu, J. Thermo-activated persulfate oxidation system for tetracycline antibiotics degradation in aqueous solution. *Chem Eng J* **2016**, *298*, 225-233.
249. Yin, R.; Guo, W.; Wang, H.; Du, J.; Zhou, X.; Wu, Q.; Zheng, H.; Chang, J.; Ren, N. Selective degradation of sulfonamide antibiotics by peroxymonosulfate alone: Direct oxidation and nonradical mechanisms. *Chem Eng J* **2018**, *334*, 2539-2546.
250. Lange, F.; Cornelissen, S.; Kubac, D.; Sein, M.M.; von Sonntag, J.; Hannich, C.B.; Golloch, A.; Heipieper, H.J.; Moder, M.; von Sonntag, C. Degradation of macrolide antibiotics by ozone: a mechanistic case study with clarithromycin. *Chemosph* **2006**, *65*, 17-23.
251. Pelalak, R.; Alizadeh, R.; Gharehabani, E.; Heidari, Z. Degradation of sulfonamide antibiotics using ozone-based advanced oxidation process: Experimental, modeling, transformation mechanism and DFT study. *Sci Total Environ* **2020**, *734*, 139446.
252. Wu, X.; Zhao, W.; Huang, Y.; Zhang, G. A mechanistic study of amorphous CoS_x cages as advanced oxidation catalysts for excellent peroxymonosulfate activation towards antibiotics degradation. *Chem Eng J* **2020**, *381*, 122768.
253. Guo, W.; Su, S.; Yi, C.; Ma, Z. Degradation of antibiotics amoxicillin by Co₃O₄-catalyzed peroxymonosulfate system. *Env Prog Sustaine Energ* **2013**, *32*, 193-197.
254. Calvete, M.J.F.; Piccirillo, G.; Vinagreiro, C.S.; Pereira, M.M. Hybrid materials for heterogeneous photocatalytic degradation of antibiotics. *Coordin Chem Rev* **2019**, *395*, 63-85.
255. Rokesh, K.; Sakar, M.; Do, T.O. Emerging Hybrid Nanocomposite Photocatalysts for the Degradation of Antibiotics: Insights into Their Designs and Mechanisms. *Nanomater* **2021**, *11*, 572.
256. Wang, J.; Zhuan, R. Degradation of antibiotics by advanced oxidation processes: An overview. *Sci Total Environ* **2020**, *701*, 135023.
257. Chen, D.; Li, B.; Pu, Q.; Chen, X.; Wen, G.; Li, Z. Preparation of Ag-AgVO₃/g-C₃N₄ composite photo-catalyst and degradation characteristics of antibiotics. *J Hazard Mater* **2019**, *373*, 303-312.
258. Wang, J.; Zhuan, R.; Chu, L. The occurrence, distribution and degradation of antibiotics by ionizing radiation: An overview. *Sci Total Environ* **2019**, *646*, 1385-1397.
259. He, X.; Mezyk, S.P.; Michael, I.; Fatta-Kassinos, D.; Dionysiou, D.D. Degradation kinetics and mechanism of beta-lactam antibiotics by the activation of H₂O₂ and Na₂S₂O₈ under UV-254nm irradiation. *J Hazard Mater* **2014**, *279*, 375-383.
260. Jeong, J.; Song, W.; Cooper, W.J.; Jung, J.; Greaves, J. Degradation of tetracycline antibiotics: Mechanisms and kinetic studies for advanced oxidation/reduction processes. *Chemosph* **2010**, *78*, 533-540.
261. Saidulu, D.; Gupta, B.; Gupta, A.K.; Ghosal, P.S. A review on occurrences, eco-toxic effects, and remediation of emerging contaminants from wastewater: Special emphasis on biological treatment based hybrid systems. *J Env Chem Eng* **2021**, *9*, 105282.

262. Li, D.; Shi, W. Recent developments in visible-light photocatalytic degradation of antibiotics. *Chin J Catal* **2016**, *37*, 792-799.
263. Elmolla, E.S.; Chaudhuri, M. Photocatalytic degradation of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution using UV/TiO₂ and UV/H₂O₂/TiO₂ photocatalysis. *Desal* **2010**, *252*, 46-52.
264. Elmolla, E.S.; Chaudhuri, M. Degradation of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution by the UV/ZnO photocatalytic process. *J Hazard Mater* **2010**, *173*, 445-449.
265. Zheng, X.; Xu, S.; Wang, Y.; Sun, X.; Gao, Y.; Gao, B. Enhanced degradation of ciprofloxacin by graphitized mesoporous carbon (GMC)-TiO₂ nanocomposite: Strong synergy of adsorption-photocatalysis and antibiotics degradation mechanism. *J Colloid Interface Sci* **2018**, *527*, 202-213.
266. Abellán, M.N.; Giménez, J.; Esplugas, S. Photocatalytic degradation of antibiotics: The case of sulfamethoxazole and trimethoprim. *Catal Today* **2009**, *144*, 131-136.
267. Ding, J.; Dai, Z.; Qin, F.; Zhao, H.; Zhao, S.; Chen, R. Z-scheme BiO_{1-x}Br/Bi₂O₂CO₃ photocatalyst with rich oxygen vacancy as electron mediator for highly efficient degradation of antibiotics. *Appl Catal B: Environ* **2017**, *205*, 281-291.
268. Wang, K.; Li, Y.; Zhang, G.; Li, J.; Wu, X. 0D Bi nanodots/2D Bi₃NbO₇ nanosheets heterojunctions for efficient visible light photocatalytic degradation of antibiotics: Enhanced molecular oxygen activation and mechanism insight. *Appl Catal B: Env* **2019**, *240*, 39-49.
269. Yan, W.; Yan, L.; Jing, C. Impact of doped metals on urea-derived g-C₃N₄ for photocatalytic degradation of antibiotics: Structure, photoactivity and degradation mechanisms. *Appl Catal B: Env* **2019**, *244*, 475-485.
270. Wang, A.; Zheng, Z.; Wang, H.; Chen, Y.; Luo, C.; Liang, D.; Hu, B.; Qiu, R.; Yan, K. 3D hierarchical H₂-reduced Mn-doped CeO₂ microflowers assembled from nanotubes as a high-performance Fenton-like photocatalyst for tetracycline antibiotics degradation. *Appl Catal B: Env* **2020**, *277*, 119171.
271. Shi, W.; Li, M.; Huang, X.; Ren, H.; Guo, F.; Tang, Y.; Lu, C. Construction of CuBi₂O₄/Bi₂MoO₆ p-n heterojunction with nanosheets-on-microrods structure for improved photocatalytic activity towards broad-spectrum antibiotics degradation. *Chem Eng J* **2020**, *394*, 125009.
272. Li, S.; Wang, C.; Liu, Y.; Xue, B.; Jiang, W.; Liu, Y.; Mo, L.; Chen, X. Photocatalytic degradation of antibiotics using a novel Ag/Ag₂S/Bi₂MoO₆ plasmonic p-n heterojunction photocatalyst: Mineralization activity, degradation pathways and boosted charge separation mechanism. *Chem Eng J* **2021**, *415*, 128991.
273. Che, H.; Che, G.; Jiang, E.; Liu, C.; Dong, H.; Li, C. A novel Z-Scheme CdS/Bi₃O₄Cl heterostructure for photocatalytic degradation of antibiotics: Mineralization activity, degradation pathways and mechanism insight. *J Taiwan Inst Chem Eng* **2018**, *91*, 224-234.
274. Li, H.; Li, T.; He, S.; Zhou, J.; Wang, T.; Zhu, L. Efficient degradation of antibiotics by non-thermal discharge plasma: Highlight the impacts of molecular structures and degradation pathways. *Chem Eng J* **2020**, *395*, 125091.
275. Magureanu, M.; Piroi, D.; Mandache, N.B.; David, V.; Medvedovici, A.; Bradu, C.; Parvulescu, V.I. Degradation of antibiotics in water by non-thermal plasma treatment. *Water Res* **2011**, *45*, 3407-3416.
276. Kim, K.-S.; Yang, C.-S.; Mok, Y.S. Degradation of veterinary antibiotics by dielectric barrier discharge plasma. *Chem Eng J* **2013**, *219*, 19-27.
277. Sarangapani, C.; Ziuzina, D.; Behan, P.; Boehm, D.; Gilmore, B.F.; Cullen, P.J.; Bourke, P. Degradation kinetics of cold plasma-treated antibiotics and their antimicrobial activity. *Sci Rep* **2019**, *9*, 3955.
278. Kong, D.; Liang, B.; Yun, H.; Cheng, H.; Ma, J.; Cui, M.; Wang, A.; Ren, N. Cathodic degradation of antibiotics: characterization and pathway analysis. *Water Res* **2015**, *72*, 281-292.
279. Lin, H.; Zhang, J.; Chen, H.; Wang, J.; Sun, W.; Zhang, X.; Yang, Y.; Wang, Q.; Ma, J. Effect of temperature on sulfonamide antibiotics degradation, and on antibiotic resistance determinants and hosts in animal manures. *Sci Total Environ* **2017**, *607-608*, 725-732.
280. Chakma, S.; Dikshit, P.K.; Galodiya, M.N.; Giri, A.S.; Moholkar, V.S. The role of ultrasound in enzymatic degradation mechanism. *J Taiwan Inst Chem Eng* **2020**, *107*, 54-71.

281. Adewuyi, Y.G. Sonochemistry in environmental remediation. 2. Heterogeneous sonophotocatalytic oxidation processes for the treatment of pollutants in water. *Environ Sci Technol* **2005**, 39, 8557-8570.
282. De Bel, E.; Dewulf, J.; Witte, B.D.; Van Langenhove, H.; Janssen, C. Influence of pH on the sonolysis of ciprofloxacin: Biodegradability, ecotoxicity and antibiotic activity of its degradation products. *Chemosphere* **2009**, 77, 291-295.
283. Liu, P.; Wu, Z.; Abramova, A.V.; Cravotto, G. Sonochemical processes for the degradation of antibiotics in aqueous solutions: A review. *Ultrason Sonochem* **2021**, 74, 105566.
284. Li, L.; Wei, D.; Wei, G.; Du, Y. Oxidation of cefazolin by potassium permanganate: Transformation products and plausible pathways. *Chemosphere* **2016**, 149, 279-85.
285. Konstantinou, I.K.; Albanis, T.A. TiO₂-assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: kinetic and mechanistic investigations. *Appl Catal B: Env* **2004**, 49, 1-14.
286. Fan, Y.; Zhou, Z.; Feng, Y.; Zhou, Y.; Wen, L.; Shih, K. Degradation mechanisms of ofloxacin and cefazolin using peroxymonosulfate activated by reduced graphene oxide-CoFe₂O₄ composites. *Chem Eng J* **2020**, 383, 123056.
287. Ghasemi, M.; Khataee, A.; Gholami, P.; Soltani, R.D.C.; Hassani, A.; Orooji, Y. In-situ electro-generation and activation of hydrogen peroxide using a CuFeNLDH-CNTs modified graphite cathode for degradation of cefazolin. *J Environ Manage* **2020**, 267, 110629.
288. Gurkan, Y.Y.; Turkten, N.; Hatipoglu, A.; Cinar, Z. Photocatalytic degradation of cefazolin over N-doped TiO₂ under UV and sunlight irradiation: Prediction of the reaction paths via conceptual DFT. *Chem Eng J* **2012**, 184, 113-124.
289. Chen, Y.; Tian, H.; Zhu, W.; Zhang, X.; Li, R.; Chen, C.; Huang, Y. L-Cysteine directing synthesis of BiOBr nanosheets for efficient cefazolin photodegradation: The pivotal role of thiol. *J Hazard Mater* **2021**, 414, 125544.
290. Gholami, P.; Dinpazhoh, L.; Khataee, A.; Hassani, A.; Bhatnagar, A. Facile hydrothermal synthesis of novel Fe-Cu layered double hydroxide/biochar nanocomposite with enhanced sonocatalytic activity for degradation of cefazolin sodium. *J Hazard Mater* **2020**, 381, 120742.
291. He, Z.; Zheng, W.; Li, M.; Liu, W.; Zhang, Y.; Wang, Y. Fe₂P/biocomposite derived from a phosphorus-containing biomass for levofloxacin removal through peroxymonosulfate activation. *Chem Eng J* **2022**, 427, 130928.
292. Liu, J.; Li, Z.; Wang, M.; Jin, C.; Kang, J.; Tang, Y.; Li, S. Eu₂O₃/Co₃O₄ nanosheets for levofloxacin removal via peroxymonosulfate activation: Performance, mechanism and degradation pathway. *Separat Pur Technol* **2021**, 274, 118666.
293. Xu, K.; Ben, W.; Ling, W.; Zhang, Y.; Qu, J.; Qiang, Z. Impact of humic acid on the degradation of levofloxacin by aqueous permanganate: Kinetics and mechanism. *Water Res* **2017**, 123, 67-74.
294. Zhou, Y.; Gao, Y.; Jiang, J.; Shen, Y.M.; Pang, S.Y.; Song, Y.; Guo, Q. A comparison study of levofloxacin degradation by peroxymonosulfate and permanganate: Kinetics, products and effect of quinone group. *J Hazard Mater* **2021**, 403, 123834.
295. Liang, J.; Hou, Y.; Zhu, H.; Xiong, J.; Huang, W.; Yu, Z.; Wang, S. Levofloxacin degradation performance and mechanism in the novel electro-Fenton system constructed with vanadium oxide electrodes under neutral pH. *Chem Eng J* **2022**, 433, 133574.
296. Zhang, Y.; Hua, S.; Sun, X.; Liu, Z.; Dang, Y.; Zhang, L.; Zhou, Y. A novel electrochemical cathode based on sea urchin-like NiO/Co₃O₄ composite inducing efficient Fenton-like process for levofloxacin degradation. *Appl Catal A* **2021**, 628, 118403.
297. Wang, A.; Chen, Z.; Zheng, Z.; Xu, H.; Wang, H.; Hu, K.; Yan, K. Remarkably enhanced sulfate radical-based photo-Fenton-like degradation of levofloxacin using the reduced mesoporous MnO@MnOx microspheres. *Chem Eng J* **2020**, 379, 122340.
298. Gong, Y.; Li, J.; Zhang, Y.; Zhang, M.; Tian, X.; Wang, A. Partial degradation of levofloxacin for biodegradability improvement by electro-Fenton process using an activated carbon fiber felt cathode. *J Hazard Mater* **2016**, 304, 320-8.
299. Hu, Z.; Ge, M.; Guo, C. Efficient removal of levofloxacin from different water matrices via simultaneous adsorption and photocatalysis using a magnetic Ag₃PO₄/rGO/CoFe₂O₄ catalyst. *Chemosphere* **2021**, 268, 128834.

300. Rong, F.; Xue, Y.; Tang, W.; Lu, Q.; Wei, M.; Guo, E.; Pang, Y. Visible-light-active 1D Ag-CoWO₄/CdWO₄ plasmonic photocatalysts boosting levofloxacin conversion. *J Taiwan Inst Chem Eng* **2022**, *133*, 104267.
301. Wei, H.; Hu, D.; Su, J.; Li, K. Intensification of levofloxacin sono-degradation in a US/H₂O₂ system with Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Chinese J Chem Eng* **2015**, *23*, 296-302.
302. Conde-Cid, M.; Fernandez-Calvino, D.; Novoa-Munoz, J.C.; Arias-Estevez, M.; Diaz-Ravina, M.; Fernandez-Sanjurjo, M.J.; Nunez-Delgado, A.; Alvarez-Rodriguez, E. Biotic and abiotic dissipation of tetracyclines using simulated sunlight and in the dark. *Sci Total Environ* **2018**, *635*, 1520-1529.
303. Norzaee, S.; Taghavi, M.; Djahed, B.; Kord Mostafapour, F. Degradation of Penicillin G by heat activated persulfate in aqueous solution. *J Environ Manage* **2018**, *215*, 316-323.
304. Zhu, L.; Santiago-Schubel, B.; Xiao, H.; Hollert, H.; Kueppers, S. Electrochemical oxidation of fluoroquinolone antibiotics: Mechanism, residual antibacterial activity and toxicity change. *Water Res* **2016**, *102*, 52-62.
305. Jiang, Y.; Ran, J.; Mao, K.; Yang, X.; Zhong, L.; Yang, C.; Feng, X.; Zhang, H. Recent progress in Fenton/Fenton-like reactions for the removal of antibiotics in aqueous environments. *Ecotoxicol Environ Saf* **2022**, *236*, 113464.
306. Yang, Y.; Kou, L.; Fan, Q.; Jiang, K.; Wang, J. Simultaneous recovery of phosphate and degradation of antibiotics by waste sludge-derived biochar. *Chemosphere* **2022**, *291*, 132832.
307. Al-Jubouri, S.M.; Al-Jendeel, H.A.; Rashid, S.A.; Al-Batty, S. Antibiotics adsorption from contaminated water by composites of ZSM-5 zeolite nanocrystals coated carbon. *J Water Proc Eng* **2022**, *47*, 102745.
308. Bekkali, C.E.; Bouyarmene, H.; Karbane, M.E.; Masse, S.; Saoiabi, A.; Coradin, T.; Laghzizil, A. Zinc oxide-hydroxyapatite nanocomposite photocatalysts for the degradation of ciprofloxacin and ofloxacin antibiotics. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects* **2018**, *539*, 364-370.
309. Felis, E.; Buta-Hubeny, M.; Zielinski, W.; Hubeny, J.; Harnisz, M.; Bajkacz, S.; Korzeniewska, E. Solar-light driven photodegradation of antimicrobials, their transformation by-products and antibiotic resistance determinants in treated wastewater. *Sci Total Environ* **2022**, *836*, 155447.
310. Zhang, W.; Liu, Y.; Li, C. Photocatalytic degradation of ofloxacin on Gd₂Ti₂O₇ supported on quartz spheres. *J Phys Chem Solids* **2018**, *118*, 144-149.
311. Pal, S.; Ahamed, Z.; Pal, P. Removal of antibiotics and pharmaceutically active compounds from water Environment: Experiments towards industrial scale up. *Separat Purif Technol* **2022**, *295*, 121249.
312. Langbehn, R.K.; Michels, C.; Soares, H.M. Antibiotics in wastewater: From its occurrence to the biological removal by environmentally conscious technologies. *Environ Pollut* **2021**, *275*, 116603.
313. Chaturvedi, P.; Giri, B.S.; Shukla, P.; Gupta, P. Recent advancement in remediation of synthetic organic antibiotics from environmental matrices: Challenges and perspective. *Bioresour Technol* **2021**, *319*, 124161.
314. Reis, A.C.; Kolvenbach, B.A.; Nunes, O.C.; Corvini, P.F.X. Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants - part I. *N Biotechnol* **2020**, *54*, 34-51.
315. Oberoi, A.S.; Jia, Y.; Zhang, H.; Khanal, S.K.; Lu, H. Insights into the Fate and Removal of Antibiotics in Engineered Biological Treatment Systems: A Critical Review. *Environ Sci Technol* **2019**, *53*, 7234-7264.
316. Zhou, W.; Zhang, W.; Cai, Y. Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review. *Chem Eng J* **2021**, *403*, 126272.
317. Bilal, M.; Ashraf, S.S.; Barcelo, D.; Iqbal, H.M.N. Biocatalytic degradation/redefining "removal" fate of pharmaceutically active compounds and antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ* **2019**, *691*, 1190-1211.
318. Park, H.; Choung, Y.-K. Degradation of Antibiotics (Tetracycline, Sulfathiazole, Ampicillin) Using Enzymes of Glutathion S-Transferase. *Human Ecol Risk Assess: An Int J* **2007**, *13*, 1147-1155.
319. Wen, X.; Jia, Y.; Li, J. Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*. *J Hazard Mater* **2010**, *177*, 924-928.

320. Wen, X.; Zeng, Z.; Du, C.; Huang, D.; Zeng, G.; Xiao, R.; Lai, C.; Xu, P.; Zhang, C.; Wan, J.; Hu, L.; Yin, L.; Zhou, C.; Deng, R. Immobilized laccase on bentonite-derived mesoporous materials for removal of tetracycline. *Chemosphere* **2019**, *222*, 865-871.
321. Tian, Q.; Dou, X.; Huang, L.; Wang, L.; Meng, D.; Zhai, L.; Shen, Y.; You, C.; Guan, Z.; Liao, X. Characterization of a robust cold-adapted and thermostable laccase from *Pycnoporus* sp. SYBC-L10 with a strong ability for the degradation of tetracycline and oxytetracycline by laccase-mediated oxidation. *J Hazard Mater* **2020**, *382*, 121084.
322. Copete-Pertuz, L.S.; Plácido, J.; Serna-Galvis, E.A.; Torres-Palma, R.A.; Mora, A. Elimination of Isoxazolyl-Penicillins antibiotics in waters by the ligninolytic native Colombian strain *Leptosphaerulina* sp. considerations on biodegradation process and antimicrobial activity removal. **2018**, *630*, 1195-1204.
323. Sun, X.; Leng, Y.; Wan, D.; Chang, F.; Huang, Y.; Li, Z.; Xiong, W.; Wang, J. Transformation of Tetracycline by Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Molecules* **2021**, *26*, 6803.
324. Weng, S.S.; Ku, K.L.; Lai, H.T. The implication of mediators for enhancement of laccase oxidation of sulfonamide antibiotics. *Bioresour Technol* **2012**, *113*, 259-64.
325. Yang, J.; Li, W.; Ng, T.B.; Deng, X.; Lin, J.; Ye, X. Laccases: production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. *Front Microbiol* **2017**, *8*, Article 832.
326. Najafabadipour, N.; Mojtabavi, S.; Jafari-Nodoushan, H.; Samadi, N.; Faramarzi, M.A. High efficiency of osmotically stable laccase for biotransformation and micro-detoxification of levofloxacin in the urea-containing solution: Catalytic performance and mechanism. *Colloids Surf B: Biointerf* **2021**, *207*, 112022.
327. Sutar, R.S.; Rathod, V.K. Ultrasound assisted Laccase catalyzed degradation of Ciprofloxacin hydrochloride. *J Ind Eng Chem* **2015**, *31*, 276-282.
328. Lara, A.R. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. **2011**, *10*, 209-223.
329. Suzuki, T.; Endo, K.; Ito, M.; Tsujibo, H.; Miyamoto, K.; Inamori, Y. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. **2003**, *67*, 2167-2175.
330. Poutou, R.A.; Quevedo, B.E.; Córdoba, H.; Sáenz, H.; Barrera, L.A. Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. *NOVA* **2005**, *3*, 75-87.
331. Rodgers, C.J.; Blanford, C.F.; Giddens, S.R.; Skamnioti, P.; Armstrong, F.A.; Gurr, S.J. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends Biotechnol* **2010**, *28*, 63-72.
332. Vite-Vallejo, O.; Palomares, L.A.; Dantán-González, E.; Ayala-Castro, H.G.; Martínez-Anaya, C.; Valderrama, B.; Folch-Mallol, J. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enz Microb Technol* **2009**, *45*, 233-239.
333. Poutou-Piñales, R.A.; Córdoba-Ruiz, H.A.; Barrera-Avellaneda, L.A.; Delgado-Boada, J.M. Carbon source feeding strategies for recombinant protein expression in *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*. *Afr J Biotechnol* **2010**, *9*, 2173-2184.
334. Serrano-Rivero, Y.; Marrero-Domínguez, K.; Fando-Calzada, R. *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. **2016**, *47*, 66-67.
335. Vogl, T.; Glieder, A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnol* **2013**, *30*, 385-404.
336. Shen, S.; Sulter, G.; Jeffries, T.W.; Cregg, J. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. **1998**, *216*, 93-102.
337. Zepeda, A.B.; Figueroa, C.A.; Pessoa, A.; Fariás, J.G. Free fatty acids reduce metabolic stress and favor a stable production of heterologous proteins in *Pichia pastoris*. **2018**, *49*, 856-864.
338. Stadlmayr, G.; Mecklenbräuker, A.; Rothmüller, M.; Maurer, M.; Sauer, M.; Mattanovich, D.; Gasser, B. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. **2010**, *150*, 519-529.
339. Sáenz-Suárez, H.; Chávez-Zobbel, A.; Lareo, L.R.; Oribio-Quinto, C.; Martínez-Mendoza, J. Predicción computacional de estructura terciaria de las proteínas humanas Hsp27, aB-cristalina y HspB8. *Univ Sci* **2011**, *16*, 15-28.

340. Zárate-Bonilla, L.J.; del Portillo, P.; Sáenz-Suárez, H.; Janneth, G.-S.; Barreto-Sampaio, G.E.; Poutou-Piñales, R.A.; Felipe Rey, A.; Rey, J.G. Computational modeling and preliminary *iroN*, *fepA*, *cirA* gene expression in *Salmonella* Enteritidis under iron deficiency induced conditions. *Poult. Sci.* **2014**, *93*, 221-230.
341. Sáenz-Suárez, H.; Rivera-Hoyos, C.; Morales-Álvarez, E.; Poutou-Piñales, R.; Sáenz-Moreno, J.; Pedroza-Rodríguez, A. Modelación computacional preliminar de la estructura 3D de dos lacasas fúngicas. *Salud Arte y Cuidado* **2014**, *7*, 5-16.
342. Sáenz-Suárez, H.; Poutou-Piñales, R.A.; González-Santos, J.; Barreto, G.E.; Prieto-Navarrera, L.P.; Sáenz-Moreno, J.A.; Landázuri, P.; Barrera-Avellaneda, L.A. Prediction of glycation sites: New insights from protein structural analysis. *Turk J Biol* **2016**, *40*, 12-25.
343. Niño-Gómez, D.C.; Rivera-Hoyos, C.M.; Morales-Álvarez, E.D.; Reyes-Montaño, E.A.; Vargas-Alejo, N.E.; Ramírez-Casallas, I.N.; Erkan Türkmen, K.; Sáenz-Suárez, H.; Sáenz-Moreno, J.A.; Poutou-Piñales, R.A.; González-Santos, J.; Arévalo-Galvis, A. “In silico” characterization of 3-phytase A and 3-phytase B from *Aspergillus niger*. *Enz Res* **2017**, 2017, Article ID 9746191.
344. Sáenz, H.; Lareo, L.; Poutou, R.A.; Sosa, C.; Barrera, L.A. Predicción computacional de la estructura terciaria de la iduronato 2-sulfato sulfatasa humana. *Bioméd* **2007**, *27*, 7-20.
345. Pagadala, N.S.; Syed, K.; Tuszyński, J. Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev* **2017**, *9*, 91-102.
346. Sarkar, S.; Banerjee, A.; Chakraborty, N.; Soren, K.; Chakraborty, P.; Bandopadhyay, R. Structural-functional analyses of textile dye degrading azoreductase, laccase and peroxidase: A comparative in silico study. *Elect J Biotechnol* **2020**, *43*, 48-54.
347. Singh, A.; Kumari, S.; Pal, T.K. In silico analysis for laccase-mediated bioremediation of the emerging pharmaceutical pollutants. *Int J Bioautom* **2015**, *19*, 423-432.
348. Yue, S.-Y. Distance-constrained molecular docking by simulated annealing. *Prot Eng* **1990**, *4*, 177-184.
349. Reva, B.A.; Finkelstein, A.V.; Skolnick, J. What is the probability of a chance prediction of a protein structure with an rmsd of 6 Å? *Fold Des* **1998**, *3*, 141-147.
350. Cárdenas-Moreno, Y.; Espinosa, L.A.; Vieyto, J.C.; González-Durruthy, M.; del Monte-Martinez, A.; Guerra-Rivera, G.; Sánchez López, M.I. Theoretical study on binding interactions of laccase-enzyme from *Ganoderma weberianum* with multiples ligand substrates with environmental impact. *Ann Prot Bioinf* **2019**, *3*, 001-009.
351. Gouzy-Olmos, M.; Cháves-Tequia, L.M.; Rojas-Fajardo, M.F.; Morales-Álvarez, E.D.; Rivera-Hoyos, C.M.; Poutou-Piñales, R.A.; González-Neira, E.M.; Reyes-Montaño, E.A.; Cardozo-Bernal, Á.M.; Gómez-Méndez, L.D.; Pedroza-Rodríguez, A.M. Statistical improvement of batch culture with immobilized *Pichia pastoris* cells for rPOXA 1B laccase production. *Am J Biochem Biotechnol* **2018**, *14*, 88-107.
352. Xu, G.; Wang, J.; Yin, Q.; Fang, W.; Xiao, Y.; Fang, Z. Expression of a thermo- and alkali-philic fungal laccase in *Pichia pastoris* and its application. **2019**, *154*, 16-24.
353. Huang, W.-T.; Tai, R.; Hseu, R.-S.; Huang, C.-T. Overexpression and characterization of a thermostable, pH-stable and organic solvent-tolerant *Ganoderma fornicatum* laccase in *Pichia pastoris*. **2011**, *46*, 1469-1474.
354. Li, Q.; Pei, J.; Zhao, L.; Xie, J.; Cao, F.; Wang, G. Overexpression and characterization of laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Microbiol* **2014**, *50*, 140-147.
355. Behrens, C.J.; Linke, D.; Allister, A.B.; Zelena, K.; Berger, R.G. Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from *Pleurotus pulmonarius* expressed in *Pichia pastoris*. **2017**, *137*, 34-42.
356. Avelar, M.; Olvera, C.; Aceves-Zamudio, D.; Folch, J.L.; Ayala, M. Recombinant expression of a laccase from *Corioliopsis gallica* in *Pichia pastoris* using a modified α -factor preproleader. **2017**, *136*, 14-19.
357. Liu, C.; Zhang, W.; Qu, M.; Pan, K.; Xianghui Zhao Heterologous expression of laccase from *Lentinula edodes* in *Pichia pastoris* and its application in degrading rape straw. **2020**, *11*, 1086.
358. Song, Q.; Deng, X.; Song, R.Q. Expression of *Pleurotus ostreatus* laccase gene in *Pichia pastoris* and its degradation of corn stover lignin. **2020**, *8*, pii: E601.
359. Li, P.; Merz, K.M. MCPB.py: A python based metal center parameter builder. **2016**, *56*, 599-604.

360. Case, D.A.; Belfon, K.; Ben-Shalom, I.Y.; Brozell, S.R.; Cerutti, D.S.; Cheatham, I., T.E. ; Cruzeiro, V.W.D.; Darden, T.A.; Duke, R.E.; Giambasu, G.; Gilson, M.K.; Gohlke, H.; Goetz, A.W.; Harris, R.; Izadi, S.; Izmailov, S.A.; Kasavajhala, K.; Kovalenko, A.; Krasny, R.; Kurtzman, T.; Lee, T.S.; LeGrand, S.; Li, P.; Lin, C.; Liu, J.; Luchko, T.; Luo, R.; Man, V.; Merz, K.M.; Miao, Y.; Mikhailovskii, O.; Monard, G.; Nguyen, H.; Onufriev, A.; Pan, F.; Pantano, S.; Qi, R.; Roe, D.R.; Roitberg, A.; Sagui, C.; Schott-Verdugo, S.; Shen, J.; Simmerling, C.L.; Skrynnikov, N.R.; Smith, J.; Swails, J.; Walker, R.C.; Wang, J.; Wilson, L.; Wolf, R.M.; Wu, X.; Xiong, Y.; Xue, Y.; York, D.M.; Kollman, P.A., *AMBER 2020*. 2020, University of California, San Francisco.
361. Ardila-Leal, L.D., *Producción a escala piloto (10L) y caracterización de un concentrado enzimático de rPOXA 1B para la remoción de colorantes*, in *Microbiology*. 2021, Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá, D.C., Colombia. p. 361.
362. Hanwell, M.D.; Curtis, D.E.; Lonie, D.C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G.R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* **2012**, *4*, 17.
363. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A.V.; Bloino, J.; Janesko, B.G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H.P.; Ortiz, J.V.; Izmaylov, A.F.; Sonnenberg, J.L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V.G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J.A., Jr.; Peralta, J.E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.J.; Heyd, J.J.; Brothers, E.N.; Kudin, K.N.; Staroverov, V.N.; Keith, T.A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.P.; Burant, J.C.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J.M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J.W.; Martin, R.L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J.B.; Fox, D.J., *Gaussian 16, revision A.03*. 2016, Gaussian Inc.: Wallingford CT, .
364. Maier, J.A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K.; Simmerling, C. ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3696-3713.
365. Ngan, C.H.; Hall, D.R.; Zerbe, B.; Grove, L.E.; Kozakov, D.; Vajda, S. FTSite: high accuracy detection of ligand binding sites on unbound protein structures. *Bioinform.* **2012**, *28*, 286-287.
366. DeLano, W.L., *The PyMOL molecular graphics system on World Wide Web*. <http://www.pymol.org>. 2002.
367. Schrodinger, L., *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1*. 2010.
368. Schrödinger, L.L.C., *The PyMOL Molecular Graphics System. Available at <http://www.pymol.org>*. 2000.
369. Machado, M.R.; Pantano, S. Split the Charge Difference in Two! A Rule of Thumb for Adding Proper Amounts of Ions in MD Simulations. *J Chem Theory Comput* **2020**, *16*, 1367-1372.
370. Mora-Gamboa, M.P.C.; Rincón-Gamboa, S.M.; Ardila-Leal, L.D.; Poutou-Piñales, R.A.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Quevedo-Hidalgo, B.E. Impact of Antibiotics as Waste, Physical, Chemical, and Enzymatical Degradation: Use of Laccases. *Molecules* **2022**, *27*, 4436.
371. *Editors*, in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Enna, S.J.; Bylund, D.B., Editors. 2008, Elsevier: New York. p. 16672.
372. Spaolozzi, M.P.; de Farias, M.B.; da Silva, M.G.C.; Vieira, M.G.A. Adsorption of cefazolin on organoclay: experimental design, characterization, and a complete batch study. *Environ Sci Pollut Res Int* **2022**, *29*, 70209-70227.
373. Panderi, I.; Malamos, Y.; Machairas, G.; Zaharaki, S. Investigation of the Retention Mechanism of Cephalosporins by Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Chromatograph* **2016**, *79*, 995-1002.
374. González-Ortiz, A.; Ramírez-García, J.J.; Solache-Ríos, M.J. Kinetic and Thermodynamic Behavior on the Sorption of Clindamycin from an Aqueous Medium by Modified Surface Zeolitic Tuffs. *Water Air Soil Pollut* **2018**, *229*, 340.
375. Ciobanu, G.; Harja, M. Studies on the sorption of levofloxacin from aqueous solutions onto nanohydroxyapatite. *Rev Roum Chim* **2018**, *63*, 593-601.

376. Lemaire, S.; Tulkens, P.M.; Van Bambeke, F. Contrasting effects of acidic pH on the extracellular and intracellular activities of the anti-gram-positive fluoroquinolones moxifloxacin and delafloxacin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**, *55*, 649-658.
377. Williams, C.F.; Watson, J.E.; Nelson, S.D.; Walker, C.W. Sorption/Desorption of lincomycin from three arid-region soils. *J Environ Qual* **2013**, *42*, 1460-5.
378. Kulkarni, R.M.; Hanagadakar, M.S.; Malladi, R.S.; Santhakumari, B.; Nandibewoor, S.T. Oxidation of linezolid by permanganate in acidic medium: Pd(II) catalysis, kinetics and pathways. *Progress React Kinet Mechan* **2016**, *41*, 245-257.
379. Alkhzem, A.H.; Woodman, T.J.; Blagbrough, I.S. Individual pK_a Values of Tobramycin, Kanamycin B, Amikacin, Sisomicin, and Netilmicin Determined by Multinuclear NMR Spectroscopy. *ACS Omega* **2020**, *5*, 21094-21103.
380. Teng, Y.; Wang, Z.; Huang, W.; She, Y. SERS detection of negatively charged molecules by interface-induced self-assembly of PDDA modified Ag nanoparticles. *Vibrat Spect* **2022**, *120*, 103381.
381. Wang, P.; He, Y.-L.; Huang, C.-H. Oxidation of Antibiotic Agent Trimethoprim by Chlorine Dioxide: Reaction Kinetics and Pathways. *J Env Eng* **2012**, *138*, 360-366.
382. Li, Y.; Wang, H.; Liu, X.; Zhao, G.; Sun, Y. Dissipation kinetics of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline residues in soil. *Environ Sci Pollut Res Int* **2016**, *23*, 13822-31.
383. Ilyasov, I.R.; Beloborodov, V.L.; Selivanova, I.A.; Terekhov, R.P. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 1131.
384. Baxevanis, A.D.; Davison, D.B.; Page, R.D.M.; Petsko, G.A.; Stein, L.D.; Stormo, G.D.; Yates, J. Preface. **2012**, *37*, iii-vi.
385. Biasini, M.; Bienert, S.; Waterhouse, A.; Arnold, K.; Studer, G.; Schmidt, T.; Kiefer, F.; Gallo Cassarino, T.; Bertoni, M.; Bordoli, L.; Schwede, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucl Acid Res* **2014**, *42*, W252-W258.
386. Benkert, P.; Kunzli, M.; Schwede, T. QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucl Acids Res* **2009**, *37*, W510-W514.
387. Hollingsworth, S.A.; Karplus, P.A. A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. *BioMol Concepts* **2010**, *1*, 271-283.
388. Ferrario, V.; Chernykh, A.; Fiorindo, F.; Kolomytseva, M.; Sinigoi, L.; Myasoedova, N.; Fattor, D.; Ebert, C.; Golovleva, L.; Gardossi, L. Investigating the role of conformational effects on laccase stability and hyperactivation under stress conditions. **2015**, *16*, 2365-2372.
389. Pontius, J.; Richelle, J.; Wodak, S.J. Deviations from Standard Atomic Volumes as a Quality Measure for Protein Crystal Structures. *J Mol Biol* **1996**, *264*, 121-136.
390. Colovos, C.; Yeates, T.O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Prot Sci* **1993**, *2*, 1511-1519.
391. Bowie, J.U.; Lüthy, R.; Eisenberg, D. A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure. *Sci* **1991**, *253*, 164-170.
392. Matera, I.; Gullotto, A.; Tilli, S.; Ferraroni, M.; Scozzafava, A.; Briganti, F. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate. *Inorg Chim Acta* **2008**, *361*, 4129-4137.
393. Jones, S.M.; Solomon, E.I. Electron Transfer and Reaction Mechanism of Laccases. *CMLS* **2015**, *72*, 869-883.
394. Huang, F.; Nau, W.M. A conformational flexibility scale for amino acids in peptides. *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42*, 2269-2272.
395. Xie, Y.; An, J.; Yang, G.; Wu, G.; Zhang, Y.; Cui, L.; Feng, Y. Enhanced Enzyme Kinetic Stability by Increasing Rigidity within the Active Site. *J Biol Chem* **2014**, *289*, 7994-8006.
396. Baldrian, P. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS. Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 215-242.
397. Perna, V.; Agger, J.W.; Andersen, M.L.; Holck, J.; Meyer, A.S. Laccase Induced Lignin Radical Formation Kinetics Evaluated by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *ACS Sustain Chem Eng* **2019**, *7*, 10425-10434.
398. Reiss, R.; Ihssen, J.; Richter, M.; Eichhorn, E.; Schilling, B.; Thony-Meyer, L. Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra. *Plos One* **2013**, *8*, e65633.

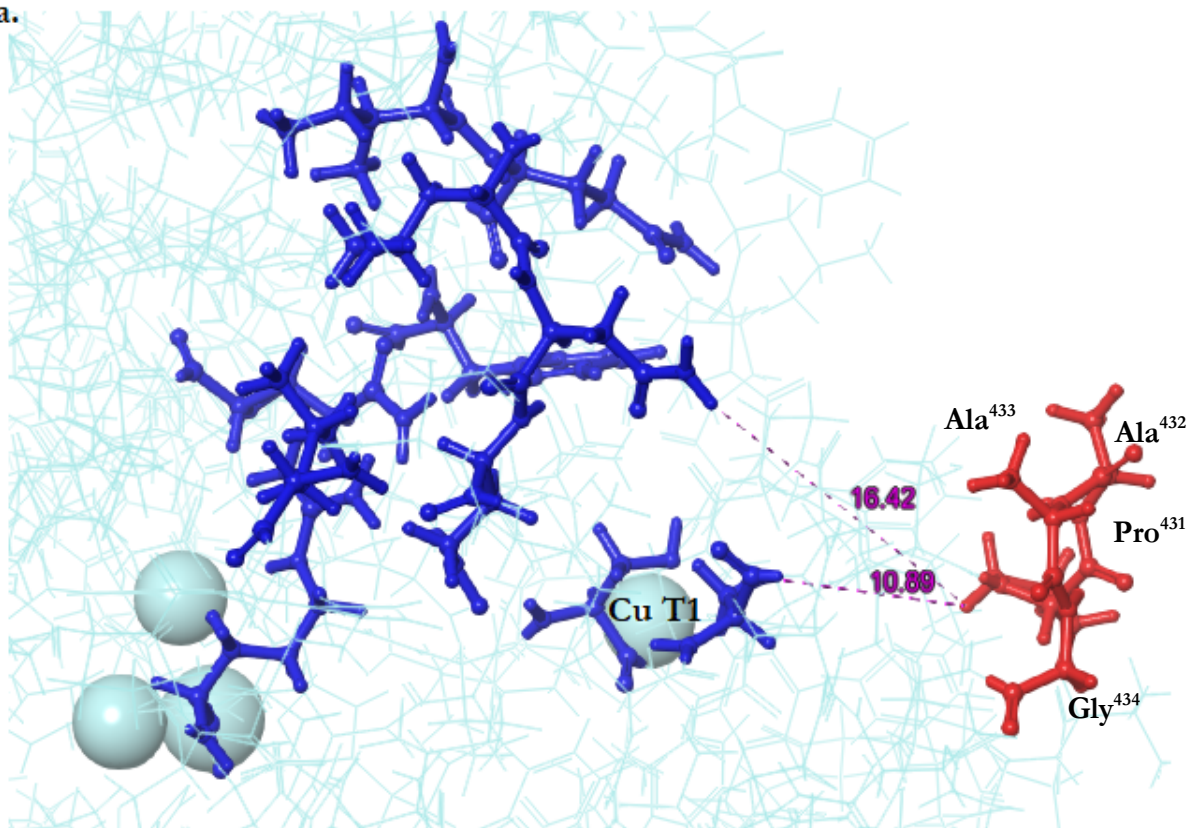
399. Harwardt, N.; Stripling, N.; Roth, S.; Liu, H.; Schwaneberg, U.; Spiess, A.C. Effects of ionic liquids on the reaction kinetics of a laccase–mediator system. *RSC Adv* **2014**, *4*, 17097-17104.
400. Mora-Gamboa, M.P.C.; Ferrucho-Calle, M.C.; Rojas-Ojeda, L.M.; Ardila-Leal, L.D.; Galindo, J.F.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Quevedo-Hidalgo, B.E.; Poutou-Piñales, R.A. Molecular dynamics support enzyme activity assay conditions statistical improvement for rGILCC 1 and rPOXA 1B laccases. *BioTechniques* **2023**, **EN PREPARACIÓN**,
401. Bhatt, P.; Bhatt, K.; Chen, W.J.; Huang, Y.; Xiao, Y.; Wu, S.; Lei, Q.; Zhong, J.; Zhu, X.; Chen, S. Bioremediation potential of laccase for catalysis of glyphosate, isoproturon, lignin, and parathion: Molecular docking, dynamics, and simulation. *J Hazard Mater* **2023**, *443*, 130319.
402. Mehra, R.; Meyer, A.S.; Kepp, K.P. Molecular dynamics derived life times of active substrate binding poses explain $K(M)$ of laccase mutants. *RSC Adv* **2018**, *8*, 36915-36926.
403. Zaccaria, M.; Dawson, W.; Russel Kish, D.; Reverberi, M.; Bonaccorsi di Patti, M.C.; Domin, M.; Cristiglio, V.; Chan, B.; Dellafiora, L.; Gabel, F.; Nakajima, T.; Genovese, L.; Momeni, B. Experimental-theoretical study of laccase as a detoxifier of aflatoxins. *Sci Rep* **2023**, *13*, 860.
404. Mehra, R.; Muschiol, J.; Meyer, A.S.; Kepp, K.P. A structural-chemical explanation of fungal laccase activity. **2018**, *8*, 17285.
405. Camarero, S.; Pardo, I.; Canas, A.I.; Molina, P.; Record, E.; Martinez, A.T.; Martinez, M.J.; Alcalde, M. Engineering platforms for directed evolution of Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol* **2012**, *78*, 1370-84.
406. Zahra, H.; Ambarsari, L.; Setyawati, I.; Gholam, G.M.; Wahyudi, S.T. Molecular Dynamic Study of *B. subtilis* Laccase Against POME Waste Components with Temperature Variations and Adjustment of Active Site Mutations. *Biointerf Res Appl Chem* **2023**, *13*, 509.
407. Liu, Y.; Mao, H.; Hu, C.; Tron, T.; Lin, J.; Wang, J.; Sun, B. Molecular docking studies and in vitro degradation of four aflatoxins (AFB1, AFB2, AFG1, and AFG2) by a recombinant laccase from *Saccharomyces cerevisiae*. **2020**, *85*, 1353-1360.
408. Autore, F.; Del Vecchio, C.; Fraternali, F.; Giardina, P.; Sannia, G.; Faraco, V. Molecular determinants of peculiar properties of a *Pleurotus ostreatus* laccase: Analysis by site-directed mutagenesis. *Enz Microb Technol* **2009**, *45*, 507-513.
409. Manzano-Nicolas, J.; Taboada-Rodriguez, A.; Teruel-Puche, J.A.; Marin-Iniesta, F.; Garcia-Molina, F.; Garcia-Canovas, F.; Tudela-Serrano, J.; Munoz-Munoz, J.L. Kinetic characterization of the oxidation of catecholamines and related compounds by laccase. *Int J Biol Macromol* **2020**, *164*, 1256-1266.
410. Himanshu; Chamoli, S.; Singh, A.; Kapoor, R.K.; Singh, S.; Singh, R.K.; Saini, J.K. Purification and characterization of laccase from *Ganoderma lucidum* and its application in decolorization of malachite green dye. *Biores Technol Rep* **2023**, *21*, 101368.
411. Ferreira de Freitas, R.; Schapira, M. A systematic analysis of atomic protein-ligand interactions in the PDB. *Medchemcomm* **2017**, *8*, 1970-1981.
412. Maestre-Reyna, M.; Liu, W.-C.; Jeng, W.-Y.; Lee, C.-C.; Hsu, C.-A.; Wen, T.-N.; Wang, A.H.-J.; Shyur, L.-F. Structural and Functional Roles of Glycosylation in Fungal Laccase from *Lentinus* sp. *Plos One* **2015**, *10*, e0120601.
413. Mot, A.C.; Silaghi-Dumitrescu, R. Laccases: complex architectures for one-electron oxidations. *Biochem* **2012**, *77*, 1395-407.
414. Chen, D.; Oezguen, N.; Urvil, P.; Ferguson, C.; Dann, S.M.; Savidge, T.C. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. *Sci Adv* **2016**, *2*, e1501240.
415. Takur, K.R.; Kohli, M.; Pande, K.; Malik, A.; Deshmukh, A.; Kayal, A.; Kommoju, P.R.; Kulkarni, N. In silico studies disclose the underlying link between binding affinity and redox potential in laccase isoforms. *J Biomol Struct Dyn* **2022**, 1-12.
416. Chen, M.; Zeng, G.; Lai, C.; Li, J.; Xu, P.; Wu, H. Molecular basis of laccase bound to lignin: insight from comparative studies on the interaction of *Trametes versicolor* laccase with various lignin model compounds. *RSC Adv* **2015**, *5*, 52307-52313.
417. Mo, D.; Zeng, G.; Yuan, X.; Chen, M.; Hu, L.; Li, H.; Wang, H.; Xu, P.; Lai, C.; Wan, J.; Zhang, C.; Cheng, M. Molecular docking simulation on the interactions of laccase from *Trametes versicolor* with nonylphenol and octylphenol isomers. *Bioprocess Biosyst Engineering* **2018**, *41*, 331-343.

418. Daneshamouz, S.; Saadati, S.; Abdelrasoul, A. Molecular docking study of biocompatible enzyme interactions for removal of indoxyl sulfate (IS), indole-3-acetic acid (IAA), and p-cresyl sulfate (PCS) protein bound uremic toxins. *Struct Chem* **2022**, *33*, 1133-1148.
419. Mo, D.; Zeng, G.; Yuan, X.; Chen, M.; Hu, L.; Li, H.; Wang, H.; Xu, P.; Lai, C.; Wan, J.; Zhang, C.; Cheng, M. Molecular docking simulation on the interactions of laccase from *Trametes versicolor* with nonylphenol and octylphenol isomers. *Biopro Biosys Eng* **2018**, *41*,
420. Aricov, L.; Raducan, A.; Gifu, I.C.; Alexandrescu, E.; Precupas, A.; Neculae, A.V.F.; Visan, R.M.; Morosan, A.; Leonties, A.R. The Immobilization of Laccase on Mixed Polymeric Microspheres for Methyl Red Decomposition. *Coatings* **2022**, *12*, 1965.
421. Elber, R.; Karplus, M. Enhanced sampling in molecular dynamics: use of the time-dependent hartree approximation for a simulation of carbon monoxide diffusion through myoglobin. *J Am Chem Soc* **1990**, *112*, 9161-9175.

10. Anexos

Anexo 1

a.



b.

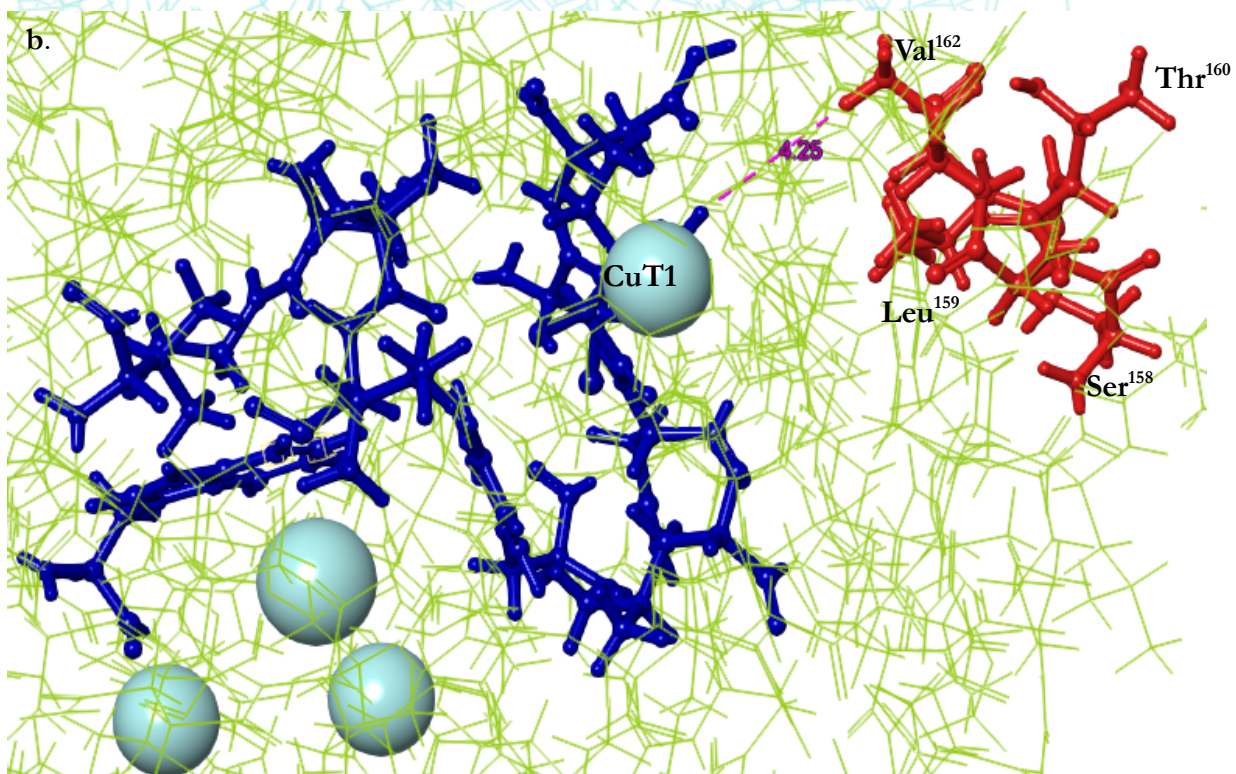


Figura 1. Distancia entre la zona de alta fluctuación (en color rojo) y el bolsillo de unión (en color azul) de la enzima **a.** GLCC1 y **b.** POXA 1B

Anexo 2.

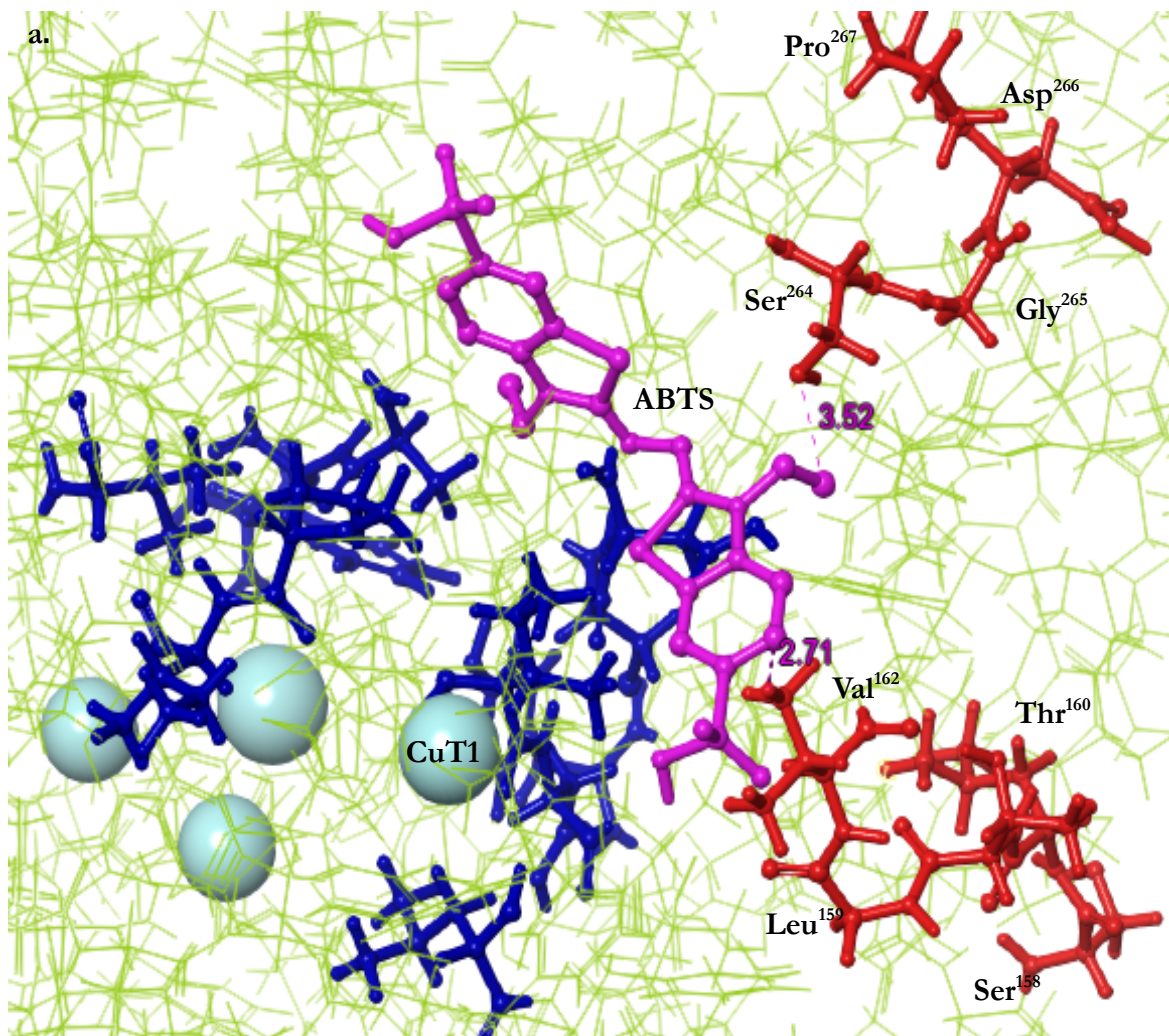


Figura 2. Distancia entre la zona de alta fluctuación (en color rojo), el ABTS (en color morado) y el bolsillo de unión (en color azul) de la enzima POXA 1B

Anexo 3.

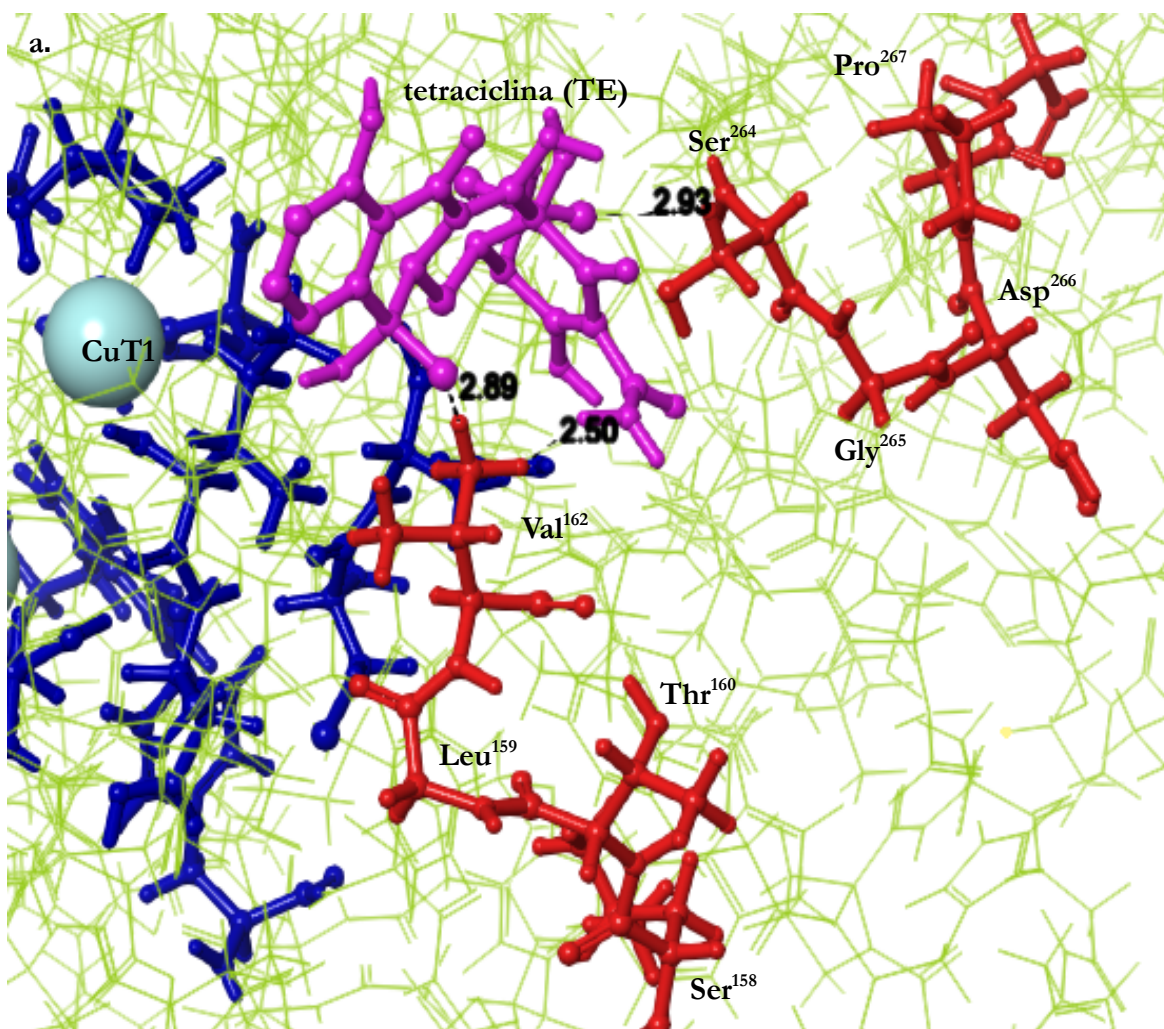


Figura 3. Distancia entre la zona de alta fluctuación (en color rojo), la tetraciclina (TE) (en color morado) y el bolsillo de unión (en color azul) de la enzima POXA 1B

11. Artículo