



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

**REMOCIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN MEDIO
ACUOSO POR MEDIO DE TÉCNICAS DE FITORREMEDIACIÓN,
UTILIZANDO LAS ESPECIES VETIVER (*Chrysopogon zizanioides*) Y
JACINTO DE AGUA (*Eichhornia crassipes*)**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Doctora en
Biociencias Aplicadas, Mención en Biotecnología.**

Presentado por:

MIRIAM MARICELA CHECA ARTOS

Guayaquil - Ecuador

2021

AGRADECIMIENTOS

En estos momentos se culmina un interesante proceso de mi vida donde la intervención de muchas personas ha sido importante, por eso deseo expresarles mi gratitud sincera por su colaboración para que el alcance de esta meta se hiciera realidad.

Al Director de esta Tesis Doctoral, Dr. Milton Barcos Arias por haberme dirigido en este camino con especial esmero, por sus siempre oportunas recomendaciones científicas y su apoyo moral para terminar con éxito este proceso.

A la Co Directora de esta Tesis Doctoral, Dra. Daynet Sosa del Castillo por su guía científica y por haber permitido la realización de esta Tesis en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Por su intermedio hago extensible mi agradecimiento a todo el personal del CIBE.

Asimismo, deseo dejar constancia de mi agradecimiento al Dr. Omar Ruiz Barzola por su aporte profesional y moral. Por las veces en que me motivó a seguir adelante, por la confianza y disponibilidad que tuvo desde siempre para guiarme con su amplia experiencia en el tratamiento estadístico de datos y resultados.

A la Dra. Patricia Manzano Santana por sus sugerencias y recomendaciones en pro de la mejora continua de mi trabajo.

A la Dra. María Eulalia Vanegas, Directora del Centro de Estudios Ambientales (CEA), de la Universidad de Cuenca, por permitirme utilizar los laboratorios y equipos para el análisis de muestras.

A la Dra. Mayra Vera Cabezas por sus sabios consejos, recomendaciones, su apoyo científico y moral en este trayecto de mi vida.

Al Dr. Efrén Santos Ordoñez, Coordinador del Programa Doctoral en Biociencias Aplicadas por su formidable gestión en la coordinación, lo que ha hecho posible la culminación exitosa del programa.

Agradezco a mis padres Miguel Ángel Checa Narváez y Luz María Artos Troya, quienes desde algún plano más elevado de consciencia recibirán mi homenaje y tengo la esperanza de que sonrían felices.

Agradezco también a mis hermanos y sobrinos porque son la mejor familia que la vida me pudo dar, por estar cerca a pesar de las distancias dándome ánimos siempre.

Finalmente, deseo agradecer con todo mi corazón a mi hija querida Maricela Anahí Suárez Checa por su amorosa presencia en mi vida, una fuente de motivación permanente sin duda alguna.

DEDICATORIA

A mi familia por su constante motivación y apoyo.

A mi hija por ser y estar brindándome generosamente su presencia, eres un alma grande Anahí.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

[Firma]

[Julie Nieto Wigby, PhD.]
DECANO O DELEGADO

[Firma]
Patricia Manzano Santana
Firmado digitalmente por Patricia Manzano Santana
Fecha: 2021.04.13 21:31:23 -05'00'

[Patricia Manzano Santana, PhD.]
MIEMBRO DEL TRIBUNAL ESPOL

[Firma]

Firmado electrónicamente por:
EFREN GERMAN SANTOS ORDONEZ

[Efrén Santos Ordóñez, PhD.]
MIEMBRO DEL TRIBUNAL ESPOL

[Firma]

Firmado electrónicamente por:
OMAR HONORIO RUIZ BARZOLA

[Omar Ruiz Barzola, PhD.]
MIEMBRO DEL TRIBUNAL ESPOL

[Firma]

Firmado electrónicamente por:
MARIA EULALIA VANEGAS PENA

[María Eulalia Vanegas, PhD.]
MIEMBRO DEL TRIBUNAL EXTERNO

[Firma ]

[Mayra Vera Cabezas, PhD.]
MIEMBRO DEL TRIBUNAL EXTERNO

[Firma  Firmado electrónicamente por:
**MILTON SENEN
BARCOS ARIAS**]

[Milton Barcos Arias, PhD.]
DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

[Firma  Firmado electrónicamente por:
**DAYNET SOSA]
DEL CASTILLO**

[Daynet Sosa del Castillo, PhD.]
CO DIRECTORA DE PROYECTO DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Miriam Maricela Checa Artos', written in a cursive style.

MIRIAM MARICELA CHECA ARTOS

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIA	4
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	5
DECLARACIÓN EXPRESA	7
ABREVIATURAS	15
RESUMEN.....	17
SUMMARY	20
CAPÍTULO 1.- MARCO TEÓRICO	23
1.1 ANTECEDENTES	23
1.1.1 Presencia de productos farmacéuticos en el ambiente y fuentes de contaminación ..	25
1.1.2 Los fármacos más utilizados en el Ecuador seleccionados para la investigación	31
1.1.3 Fitorremediación	38
1.1.3.1 Vetiver (Chrysopogon zizanioides)	41
1.1.3.2 Jacinto de agua (Eichhornia crassipes)	43
1.1.4 Mecanismos de absorción de compuestos orgánicos en las plantas	45
1.1.5 Justificación e hipótesis de la investigación	48
1.1.5 Objetivos	50
1.1.5.1 Objetivo general	50
1.1.5.2 Objetivos específicos	50
CAPÍTULO 2.- METODOLOGÍA	51
2.1 ESTRATEGIA Y FASES DE LA INVESTIGACIÓN	51
2.2 RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS ESPECIES VETIVER (Chrysopogon zizanioides) y JACINTO DE AGUA (Eichhornia crassipes)	53
2.3 DISEÑO DEL EXPERIMENTO	54
2.5 ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN RAÍCES Y TALLOS DE Chrysopogon zizanioides y Eichhornia crassipes	59

2.5.1	<i>Extracción de proteínas</i>	60
2.5.3	<i>Electroforesis SDS-PAGE</i>	62
2.6	ESTUDIO DEL PROCESO DE FITORREMEDIACIÓN A MAYOR ESCALA CON <i>C. zizanioides</i> y <i>E. crassipes</i>	63
2.7	ANÁLISIS DE DATOS	64
3.1	RESULTADOS	65
3.1.1	<i>Fitorremediación con la especie vetiver (<i>Chrysopogon zizanioides</i>) para cada fármaco de estudio</i>	65
3.1.1.1	<i>Modelo General</i>	65
3.1.2	<i>Fitorremediación con la especie jacinto de agua (<i>Eichhornia crassipes</i>) para cada fármaco de estudio</i>	71
3.1.2.1	<i>Modelo General</i>	71
3.1.3	<i>Fitorremediación con <i>Chrysopogon zizanioides</i> para mezcla de productos farmacéuticos</i>	77
3.1.3.1	<i>Mezcla de cinco productos farmacéuticos</i>	77
3.1.3.2	<i>Mezcla de dos productos farmacéuticos</i>	79
3.1.4	<i>Fitorremediación con <i>Eichhornia crassipes</i> para mezcla de productos farmacéuticos</i>	82
3.1.4.1	<i>Mezcla de cinco productos farmacéuticos</i>	82
3.1.4.2	<i>Mezcla de dos productos farmacéuticos</i>	85
3.1.5	<i>Estrés oxidativo de <i>Chrysopogon zizanioides</i> y <i>Eichhornia crassipes</i></i>	87
3.1.6	<i>Evaluación del proceso de fitorremediación a mayor escala en laboratorio</i>	91
3.1.6.1	<i>Ensayos con <i>Chrysopogon zizanioides</i> a mayor escala en laboratorio</i>	91
3.1.6.2	<i>Ensayos con <i>Eichhornia crassipes</i> a mayor escala en laboratorio</i>	94
3.1.6.3	<i>Ensayos con <i>Chrysopogon zizanioides</i> y <i>Eichhornia crassipes</i> a mayor escala en laboratorio</i>	97
3.2	DISCUSIÓN	101
3.2.1	<i>Remoción de fármacos con <i>Chrysopogon</i> en <i>zizanioides</i> en soluciones acuosas de cada uno de los productos farmacéuticos</i>	101
3.2.2	<i>Remoción de fármacos con <i>Chrysopogon zizanioides</i> de soluciones acuosas con mezclas de productos farmacéuticos</i>	105

3.2.3 <i>Remoción de fármacos con Eichhornia crassipes en soluciones acuosas de cada uno de los productos farmacéuticos.</i>	106
3.2.4 <i>Remoción de fármacos con Eichhornia crassipes de soluciones acuosas con mezclas de productos farmacéuticos</i>	112
3.3 <i>ESTRÉS OXIDATIVO DE Chrysopogon zizanioides y Eichhornia crassipes</i>	116
3.4 <i>PROCESO A MAYOR ESCALA CON Chrysopogon zizanioides y Eichhornia crassipes</i>	119
3.5 CONSIDERACIONES FINALES	121
CAPÍTULO 4.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	124
4.1 CONCLUSIONES	124
4.2 RECOMENDACIONES	127
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
LISTA DE PUBLICACIONES	148
PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS INTERNACIONALES	149
ANEXO 1	150
ANEXO 2	152

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Condiciones de experimentación con mezclas de fármacos.....	58
Tabla 2.- Modelo general de superficie de respuesta para cada uno de los fármacos de estudio con <i>Chrysopogon zizanioides</i>	66
Tabla 3.- Modelo general de superficie de respuesta para cada uno de los fármacos de estudio con <i>Eichhornia crassipes</i>	72
Tabla 4.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo factorial seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con <i>Chrysopogon zizanioides</i> y cinco fármacos.	77
Tabla 5.- Ajuste estadístico de parámetros, Desviación estándar (Std. Dev.), Media (Mean), Coeficiente de variación (C.V. %) con <i>Chrysopogon zizanioides</i> y cinco fármacos.....	78
Tabla 6.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo factorial seleccionado, la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con <i>Chrysopogon zizanioides</i> y dos fármacos.....	80
Tabla 7.- Ajuste estadístico de parámetros, Desviación estándar (Std. Dev.), Media (Mean), Coeficiente de variación (C.V. %) con <i>Chrysopogon zizanioides</i> y cinco fármacos.	80
Tabla 8.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo factorial seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con <i>Eichhornia crassipes</i> y cinco fármacos.	83
Tabla 9.- Ajuste estadístico de parámetros, Desviación estándar (Std. Dev.), Media (Mean), Coeficiente de variación (C.V. %) con <i>Eichhornia crassipes</i> y cinco fármacos.....	83
Tabla 10.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo factorial seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con <i>Eichhornia crassipes</i> y dos fármacos.....	85
Tabla 11.- Ajuste estadístico de parámetros, Desviación estándar (Std. Dev.), Media (Mean), Coeficiente de variación (C.V. %) con <i>Eichhornia crassipes</i> y dos fármacos.....	86
Tabla 12.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con <i>Chrysopogon zizanioides</i>	92
Tabla 13.- Tratamiento de la media de porcentajes de remoción con <i>Chrysopogon zizanioides</i>	94

Tabla 14.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con <i>Eichhornia crassipes</i> ...	95
Tabla 15.- Tratamiento de la media de porcentajes de remoción con <i>Eichhornia crassipes</i>	97
Tabla 16.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con <i>Chrysopogon zizanioides</i> y <i>Eichhornia crassipes</i>	98
Tabla 17.- Tratamiento de la media de porcentajes de remoción con <i>Chrysopogon zizanioides</i> y <i>Eichhornia crassipes</i>	100
Tabla 18.- Máximos porcentajes de remoción obtenidos considerando soluciones independientes de cada fármaco con las dos especies de estudio	110
Tabla 19.- Máximos porcentajes de remoción obtenidos considerando soluciones independientes y soluciones de cinco fármacos juntos (efecto sinérgico), con las dos especies de estudio.....	113
Tabla 20.- Características físico químicas de los fármacos de estudio.	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Estructura química del acetaminofén	33
Figura 2.- Estructura química del diclofenaco.	34
Figura 3.- Estructura química del ibuprofeno.	35
Figura 4.- Estructura química del sulfametoxazol.	36
Figura 5.- Estructura química de la ciprofloxacina.	37
Figura 6.- Estrategia experimental de la investigación realizada en la tesis doctoral.	51
Figura 7.- Esquema del diseño experimental con <i>Chrysopogon zizanioides</i>	55
Figura 8.- Esquema del diseño experimental con <i>Eichhornia crassipes</i>	56
Figura 11.- Resultados obtenidos con la técnica superficie de respuesta para la remoción con <i>Chrysopogon zizanioides</i> de los fármacos: A) sulfametoxazol, B) ciprofloxacina, C) ibuprofeno, D) diclofenaco y E) acetaminofén en medio acuoso.....	67
Figura 12.- Resultados obtenidos con la técnica superficie de respuesta para la remoción con <i>Eichhornia crassipes</i> de los fármacos A) sulfametoxazol, B) ciprofloxacina, C) ibuprofeno, D) diclofenaco y E) acetaminofén en medio.	73
Figura 13.- A) Gráfico de interacciones y B) codificación de factores para Fármaco (X1) y Tiempo (X2) con <i>C. zizanioides</i> y cinco fármacos.....	78
Figura 14.- A) Gráfico de interacciones y B) Codificación de factores para Fármaco (X1) y Tiempo (X2) con <i>C. zizanioides</i> y dos fármacos.....	81
Figura 15.- A) Gráfico de interacciones y B) Codificación de factores para Fármaco (X1) y Tiempo (X2) con <i>E. crassipes</i> y cinco fármacos.....	84
Figura 16.- A) Gráfico de interacciones y B) Codificación de factores Fármaco (X1) y Tiempo (X2) con <i>E. crassipes</i> y dos fármacos.	86
Figura 17.- Gel de extractos de proteínas obtenidos utilizando el método TCA-acetona de tallos y raíces de <i>Chrysopogon zizanioides</i>	89
Figura 18.- Gel de extractos de proteínas obtenidos utilizando el método TCA-acetona de tallos y raíces de <i>Eichhornia crassipes</i>	90
Figura 19.- Gráfica de caja del ANOVA para el porcentaje de remoción de ciprofloxacina por parte de <i>C. zizanioides</i> en función del tiempo.....	93
Figura 20.- Gráfica de caja del ANOVA para el porcentaje de remoción de ciprofloxacina por parte de <i>E. crassipes</i> en función del tiempo.	96

Figura 21.- Gráfica de caja del ANOVA para el porcentaje de remoción de ciprofloxacina por parte de <i>C. zizanioides</i> y <i>E. crassipes</i> en función del tiempo	99
Figura 9.- Curvas de calibración para A) ibuprofeno, B) acetaminofén, C) diclofenaco, D) sulfametaxazol y E) ciprofloxacina.	150
Figura 10.- Curvas de calibración para determinar ciprofloxacina por HPLC en muestras de agua con base en: A) Área y B) Altura.	152

ABREVIATURAS

AC = Acetaminofén

ANOVA = Análisis de varianza

AINE = Antiinflamatorio no esteroideo

C = Concentración

CE = Contaminantes emergentes

CFA = Compuestos farmacéuticamente activos

CIBE = Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador

CX = Ciprofloxacina

C.V. % = Coeficiente de variación

°C = Grado centígrado

DC = Diclofenaco

df = Grados de Libertad

ESPOL = Escuela Superior Politécnica del Litoral

g = Gramo

h = Hora

HPLC = Cromatografía Líquida de Alta Eficacia / High Performance Liquid Chromatography

IBU = Ibuprofeno

KDa = Kilodalton

L = Litro

mg = Miligramo

ml = Mililitro

PCP = Productos de cuidado personal

PFs = Productos farmacéuticos

PFC = Compuestos per fluorados

PPCPs = Productos farmacéuticos y de cuidado personal

PTAR = Planta de tratamiento de aguas residuales

ROS = Especies reactivas de oxígeno

SDS-PAGE = Acrónimo en inglés de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SMX = Sulfametaxazol

Std.Dev. = Desviación estándar

T = Tiempo

TTC = Tetraciclina

TSCF = Factor de concentración de la corriente de transpiración

UV vis = Ultravioleta visible

RESUMEN

Los productos farmacéuticos son compuestos químicos de gran interés que están incluidos dentro de los llamados contaminantes emergentes, debido a que se ha determinado su presencia frecuente en aguas superficiales, subterráneas y agua potable. Dada la absorción incompleta en el organismo humano, una cantidad significativa de estos fármacos se excretan y son liberados al ambiente a través de las aguas residuales. Actualmente, las plantas de tratamiento no realizan la remoción de estos contaminantes, por lo que se busca nuevas tecnologías como tratamiento terciario que puedan realizar la remoción de estos compuestos. En este sentido, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el potencial de remoción de las especies vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) y jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) de cinco productos farmacéuticos en medio acuoso que son comúnmente recetados y de venta libre, la ciprofloxacina, ibuprofeno, sulfametaxazol, diclofenaco y acetaminofén. Las especies fueron aclimatadas en invernadero, donde se llevó a cabo los experimentos en condiciones controladas de temperatura (25°C) y a un pH de 6,5.

Los experimentos se realizaron con dos litros de solución de cada fármaco individual a cuatro concentraciones 3, 6, 9, 12 mg/L y, se hizo la toma de muestras en cuatro tiempos diferentes (24, 48, 72 y 96 h para *E. crassipes*; 48, 96, 144 y 192 h para *C. zizanioides*). Se trabajó también con soluciones de dos y cinco fármacos juntos con 3 mg/L de concentración y con los mismos tiempos de toma de muestras. Para determinar el porcentaje de remoción de fármacos, el análisis de muestras se realizó con

espectrofotometría de UV-Visible. Asimismo, para estudiar el estrés oxidativo, se analizó la incidencia de la solución de ciprofloxacina a 3 mg/L en la expresión de proteínas, empleando la técnica de SDS-PAGE en los tallos y raíces de las dos especies, con una toma de muestras a las 6, 12 y 24 h. Adicionalmente, se estudió el comportamiento de las dos especies a mayor escala, en forma individual y en forma combinada, utilizando soluciones con un volumen de 20 litros de ciprofloxacina a 3 mg/L de concentración. Para el análisis de las muestras de este proceso, se utilizó Cromatografía Líquida de alta Eficacia o High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados con soluciones independientes de cada fármaco indican que, *C. zizanioides* removió 98,3% de la ciprofloxacina a una concentración de 3 mg/L en un tiempo de 149 h, seguido por ibuprofeno y diclofenaco con un porcentaje máximo de remoción de 73,33% y sulfametaxazol con 66,53%, obteniéndose el menor porcentaje de remoción para acetaminofén de 38,49% a las 192 h. En el caso de *E. crassipes* removió 95% de diclofenaco en soluciones acuosas con una concentración de 3 mg/L en un tiempo de 24 h, seguido de ciprofloxacina y acetaminofén con una remoción máxima de 91,18% y 71% a las 96 h, respectivamente. Mientras que los más bajos porcentajes de remoción se obtuvo para ibuprofeno y sulfametaxazol con 57,56% y 36% respectivamente. Para soluciones de los cinco fármacos juntos, con *C. zizanioides* se obtuvo de 85,2% a 99,7%, mientras que con *E. crassipes* se removió 93,3% a 99,7%. En los tratamientos con los dos antibióticos

sulfametaxazol y ciprofloxacina, *C. zizanioides* obtuvo una remoción de 90,7% a 99,9%. De forma similar, *E. crassipes* presentó una alta remoción de 99,6% a 99,9% de diclofenaco y ciprofloxacina.

Con respecto a los resultados relacionados al estrés oxidativo en las especies de estudio, los gels de electroforesis corridos con muestras extraídas de raíces y tallos de las plantas de *C. zizanioides*, demuestran un incremento general en la presencia de proteínas al nivel de los 56,2 kDa, luego de ser expuestos a una solución de ciprofloxacina por un tiempo de 24 h.

Los resultados obtenidos en el proceso implementado a mayor escala de 20 L de disolución de CX a 3 mg/L, se observa que *C. zizanioides* presentó remociones de 86,8 % a 88,2%, de forma similar, *E. crassipes* removió de 83% a 89%. El sistema *C. zizanioides* - *E. crassipes* alcanzó remociones de 87% a 89%.

Por lo expuesto, en este trabajo de investigación se demostró la capacidad de remoción de *C. zizanioides* y de *E. crassipes* de los cinco fármacos estudiados en medio acuoso en condiciones controladas, vislumbrando un gran potencial en el ámbito de la biotecnología ambiental para el tratamiento terciario de aguas residuales.

Palabras clave: Productos farmacéuticos, contaminantes emergentes, aguas residuales, vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), fitorremediación.

SUMMARY

Pharmaceutical products are chemical compounds of great interest that are included within the so-called emerging pollutants, due to the fact that their frequent presence in surface water, groundwater and drinking water has been determined. Given the incomplete absorption in the human body, a significant amount of these drugs are excreted and released into the environment through wastewater. Currently, treatment plants do not remove these pollutants, so new technologies are being sought as a tertiary treatment that can remove these compounds. In this sense, the objective of this research was to evaluate the removal potential of vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) and water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) species from five pharmaceutical products in aqueous medium that are commonly prescribed, such as ciprofloxacin, ibuprofen, sulfamethaxazole, diclofenac and acetaminophen. The species were acclimatized in a greenhouse, where the experiments were carried out under controlled temperature conditions (25°C) and at a pH of 6.5. The experiments were carried out with two liters of solution of each individual drug at four concentrations 3, 6, 9, 12 mg/L and, the samples were taken at four different times (24, 48, 72 and 96 h for *E. crassipes*; 48, 96, 144 and 192 h for *C. zizanioides*). We also worked with solutions of two and five drugs together with a 3 mg/L concentration and with the same sampling times. To determine the percentage of drug removal, the analysis of samples was performed with UV-Visible spectrophotometry. Likewise, to study oxidative stress, the incidence of ciprofloxacin solution at 3 mg/L in protein expression was analyzed, using the SDS-

PAGE technique in the stems and roots of the two species, with a sampling at 6, 12 and 24 h. Additionally, the behavior of the two species was studied on a larger scale, individually and in combination, using solutions with a volume of 20 liters of ciprofloxacin at 3 mg/L concentration. For the analysis of the samples from this process, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used.

The results obtained in the experiments carried out with independent solutions of each drug indicate that *C. zizanioides* removed 98.3% of the ciprofloxacin at a concentration of 3 mg/L in a time of 149 h, followed by ibuprofen and diclofenac with a maximum removal percentage of 73.33% and sulfamethaxazole with 66.53%, obtaining the lowest removal percentage for acetaminophen of 38.49% at 192 h. In the case of *E. crassipes*, it removed 95% of diclofenac aqueous solutions with a concentration of 3 mg/L in a time of 24 h, followed by ciprofloxacin and acetaminophen with a maximum removal of 91.18% and 71% at 96 h, respectively. While the lowest removal percentages were obtained for ibuprofen and sulfamethaxazole with 57.56% and 36% respectively. For solutions of the five drugs together, removal percentages of 85.2% to 99.7% were obtained with *C. zizanioides*, while with *E. crassipes* removal percentages of 93.3% to 99.7% were obtained. In the treatments with the two antibiotics sulfamethaxazole and ciprofloxacin, *C. zizanioides* obtained a clearance of 90.7% to 99.9%. Similarly, *E. crassipes* had a high removal of 99.6% to 99.9% of diclofenac and ciprofloxacin.

Regarding the results related to oxidative stress in the study species, the electrophoresis gels run with samples extracted from roots and stems of *C. zizanioides* plants, demonstrate a general increase in the presence of proteins at the level of 56,2 kDa, after being exposed to a ciprofloxacin solution for a time of 24 h.

The results obtained in the process implemented on a larger scale of 20 L of CX dissolution at 3 mg/L, it is observed that *C. zizanioides* presented a removal percentage of 86.8% to 88.2%, similarly, *E. crassipes* presented a removal rate of 83% to 89%.

The *C. zizanioides* - *E. crassipes* system achieved a removal rate of 87% to 89%.

Therefore, this research work demonstrated the ability to remove *C. zizanioides* and *E. crassipes* from the five drugs studied in an aqueous medium under controlled conditions, envisioning great potential in the field of environmental biotechnology for the treatment tertiary wastewater.

Keywords: Pharmaceutical products, emerging pollutants, wastewater, vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), phytoremediation.

CAPÍTULO 1.- MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES

Nuestra sociedad técnicamente desarrollada ha sido capaz de diseñar y producir una gran variedad de compuestos químicos, más de 300 mil químicos inventariados y regulados se usan actualmente en la industria, el hogar y la agricultura. Estos productos químicos incluyen aproximadamente 4000 productos farmacéuticos con una producción anual superior a cientos de toneladas, que se administran en todo el mundo como medicamentos recetados, medicamentos terapéuticos de venta libre y medicamentos veterinarios (Acuña et al., 2015; Majumder, Gupta, & Gupta, 2019).

Los ingresos económicos farmacéuticos mundiales han aumentado de 390.200 millones de dólares EE.UU. en 2001 a 1105.200 millones de dólares EE.UU. en 2016, lo que indica un aumento del consumo farmacéutico en 2,8 veces en los últimos 15 años (Majumder et al., 2019).

Los contaminantes emergentes (CE) son compuestos químicos que actualmente no están incluidos en las regulaciones de calidad del agua, sin embargo, presentan amenazas potenciales para los ecosistemas acuáticos, la salud y la seguridad humana. Abarcan un grupo diverso de compuestos que incluyen a productos farmacéuticos (PFs), drogas de abuso, productos de cuidado personal (PCP), esteroides y hormonas, tensioactivos, compuestos per fluorados (PFC), llama retardantes, aditivos industriales

y agentes aditivos de gasolina, así como sus productos de transformación, nanomateriales, 1,4-dioxano y subproductos de desinfección de piscinas (DBP) (Farré, Pérez, Kantiani, & Barceló, 2008; Ebele, Abou-Elwafa Abdallah, & Harrad, 2017; Hossain et al., 2018).

La presencia de compuestos farmacéuticamente activos (CFA) en el medio acuático se conoce desde mediados del siglo XX. Sin embargo, en los últimos años, con el advenimiento de nuevas tecnologías analíticas y después de minuciosos estudios sobre los impactos ecológicos de estos compuestos, su presencia se ha convertido en una preocupación emergente. Los productos farmacéuticos están diseñados para mejorar la salud humana y animal, sin embargo, inclusive los productos farmacéuticos más beneficiosos, en niveles traza y con una exposición prolongada, pueden tener efectos nocivos sobre la salud humana, la vida acuática y otros ecosistemas, debido a su pseudoresistencia y su actividad biológica (Majumder et al., 2019; D. Richardson & A. Ternes, 2014; Desbiolles, Malleret, Tiliacos, Wong-Wah-Chung, & Laffont-Schwob, 2018).

Los productos farmacéuticos (PFs) son contaminantes emergentes que en concentraciones muy bajas inducen efectos fisiológicos en seres humanos y potenciales efectos adversos en la vida silvestre acuática y terrestre. La mayoría de los productos farmacéuticos ingresan a los sistemas acuáticos después de la ingestión y posterior excreción como compuestos principales no metabolizados o como metabolitos, lo que ha llevado a que su presencia sea reportada en sistemas de tratamiento de aguas

residuales, aguas subterráneas, agua potable, aguas superficiales fluviales y marinas (Kermia, Fouial-Djebbar, & Trari, 2016; Ebele et al., 2017; Liu & Wong, 2013; Peña-Guzmán et al., 2019).

Los productos farmacéuticos se caracterizan por el uso extenso en medicina humana y veterinaria y están conformados por diversos grupos de compuestos como antibióticos, analgésicos, antiinflamatorios, antidepresivos, drogas de abuso, antidiabéticos, suplementos alimenticios, entre otros. La gran mayoría se excreta sin metabolizar después de su aplicación, llegando así a las aguas residuales (Peña-Guzmán et al., 2019; Gogoi et al., 2018).

El aumento de la prescripción y el uso de productos farmacéuticos y su posterior liberación en el medio ambiente ha suscitado preocupaciones sobre el destino de los compuestos principales, su ocurrencia incontrolada en el medio ambiente les permite convertirse en un tema muy importante para la salud humana y la integridad de los ecosistemas (Cui, 2016).

1.1.1 Presencia de productos farmacéuticos en el ambiente y fuentes de contaminación

Las principales fuentes de ingreso de productos farmacéuticos a los ecosistemas acuáticos constituyen las aguas residuales que recolectan aguas servidas, aguas

residuales industriales, efluentes hospitalarios y efluentes veterinarios no tratados adecuadamente previo a su descarga a lagos, lagunas, manantiales, ríos y mares (Ebele et al., 2017; Majumder et al., 2019).

En algunos estudios se detectó una amplia gama de antibióticos en algunas variedades de peces como el bagre amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*), (*Misgurnus anguillicaudatus*), gudgeon de boca superior (*Pseudorasbora parva*); en especies de crustáceos como el cangrejo (*Eriocheir sinensis*), el caracol del río (*Viviparus*), los camarones (*Macrobrachium nipponense*) y la langosta (*Palinuridae*); y en plantas acuáticas como *Hydrocharis dubia*, *Ceratophyllum demersum* y *Salvinia natans* recolectados en el lago Baiyangdian, China. Las concentraciones de antibióticos en los crustáceos fueron de 129, 253 y 1769 µg/kg, respectivamente (W. Li, Shi, Gao, Liu, & Cai, 2012).

Compuestos farmacéuticamente activos como carbamazepina, eritromicina, propranolol, roxitromicina, ibuprofeno y diclofenaco se detectaron en las muestras de sedimentos y aguas superficiales en el lago Taihu, China, con concentraciones que oscilaban entre 0,78 y 42,5 ng/L de peso seco y 8,74 a 118 ng/L, respectivamente (Xie et al., 2015).

Por otra parte, se informó que el nivel de contaminación y distribución de residuos farmacéuticos en el agua de mar costera y los efluentes de la planta de tratamiento de aguas residuales en el norte de Taiwán fueron considerables, de tal forma que la

concentración notificada de ketoprofeno, ibuprofeno, diclofenaco y ácido clofibrico en el afluente fue de 128 a 184 ng/L, 724 a 2200 ng/L, 152 a 185 ng/L, 104-109 ng/L, y en el efluente fue 68 a 128 ng/L, 552 a 1600 ng/L, 100 a 131 ng/L, y 95 a 102 ng/L, respectivamente (T.-H. Fang, Nan, Chin, & Feng, 2012).

La presencia de productos farmacéuticos en el ambiente acuático preocupa por su persistencia, la bioacumulación, la toxicidad y la creación de resistencia a antibióticos de muchos microorganismos, entre otras consecuencias aún no estudiadas en el ambiente acuático (Ebele et al., 2017).

Los productos farmacéuticos se consideran contaminantes pseudopersistentes y se han detectado más de 160 productos en bajas concentraciones del orden de ng/L y µg/L, en diferentes ambientes acuáticos hasta la fecha (Ebele et al., 2017). Una revisión realizada por (Desbiolles et al., 2018), ha demostrado que muchos productos farmacéuticos, incluyendo analgésicos, antibióticos, diuréticos, hormonas y antihistamínicos, están presentes en diferentes tipos de agua que fluyen hacia el Mar Mediterráneo, cuyos niveles de contaminación con medicamentos alcanzan cientos de ng/L en aguas residuales, mientras que los niveles en las aguas superficiales naturales están en el rango de decenas de ng/L.

Ciertos compuestos farmacéuticos pueden bioacumularse en peces y otras especies acuáticas. En este contexto, se ha encontrado que algunos fármacos producen impactos en la reproducción y cambios histopatológicos en el pez cebra (Yang, Ok, Kim, Kwon,

& Tsang, 2017). En otro estudio realizado en la Laguna del Mar Menor (España), se detectaron hasta 17 productos farmacéuticos en salmonete gris dorado (*Liza aurata*) y goby negro (*Gobius niger*) a concentraciones similares o inferiores a las reportadas en los peces del río Suquía (Argentina). Asimismo, las concentraciones de carbamazepina en peces del río Suquía (hasta 33 ng/gd.w) fueron similares a las reportadas en carpa común (*Cyprinus carpio*) del lago Taihu en China (Valdés, Amé, Bistoni, & Wunderlin, 2014; Llorca et al., 2017).

Una toxicidad dramática causada por el ganado expuesto al diclofenaco fue reportada desde Pakistán por la infortunada disminución de la población de buitres que se alimentaban de ellos. Concentraciones en el rango de 0,051 a 0,643 µg/g se encontraron en los riñones de 25 buitres que se encontraron muertos debido a una insuficiencia renal completa (Kalia, 2019).

Asimismo, varios estudios realizados en plantas han reportado la presencia de antibióticos y de sus metabolitos en cuatro tipos de hortalizas cultivadas comercialmente en el norte de España, como son hojas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), coliflores fluorescentes (*Brassica oleracea* L.) y semillas de habas (*Vicia faba* L.). Estos cultivos fueron regados con agua de un río que recibía descargas de aguas residuales. La ingesta prolongada de estos productos podría afectar negativamente a la salud (Tadić et al., 2021). También se ha notificado la presencia del antibiótico ciprofloxacina (hasta 795 µg/kg) en la planta acuática *Echinodorus amazonicus* en un microcosmos simulado (Kalia, 2019).

La presencia de estos contaminantes emergentes en el ciclo del agua se ha reportado en todo el mundo. Su detección ha suscitado preocupación, ya que se ha determinado su presencia en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, en aguas superficiales (ríos, manantiales, lagunas, lagos y mares), aguas subterráneas e incluso en sistemas de tratamiento de agua potable (Alidina et al., 2014; Gamarra, Godoi, de Vasconcelos, de Souza, & Ribas de Oliveira, 2015; Paíga et al., 2016; Batt, Furlong, Mash, Glassmeyer, & Kolpin, 2017; Balakrishna, Rath, Praveenkumarreddy, Guruge, & Subedi, 2017; W. Fang, Peng, Muir, Lin, & Zhang, 2019; Kibuye et al., 2019; Fekadu, Alemayehu, Dewil, & Van der Bruggen, 2019).

Según Voloshenko-Rossin et al (2015), las características de la calidad del agua y los contaminantes orgánicos emergentes fueron muestreados en Ecuador, a lo largo de los ríos San Pedro – Guayllabamba – Esmeraldas y sus principales afluentes en el verano de 2013. Los principales compuestos detectados fueron venlafaxina, carbamazepina, sulfametoxazol y benzoilcgonina. El estudio permitió relacionar el consumo de fármacos en una de las principales ciudades (Quito) de América Latina y permitió mostrar que el consumo de la mayoría de las drogas muestreadas (carbamazepina, venlafaxina, O-des metil venlafaxina, sulfametoxazol, etinilestradiol) estuvo por debajo de su nivel de consumo promedio en Europa, Israel y América del Norte.

Es importante mencionar que existen varios métodos analíticos que se utilizan para la detección, caracterización y separación de productos farmacéuticos en medios acuosos. Sin embargo, en la última década se ha notado la frecuente utilización de la

espectrofotometría UV vis (Kafle & Kafle, 2020) y la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) (Sankar, 2020).

La espectrofotometría ultravioleta visible o UV-VIS, es una de las técnicas de laboratorio más utilizadas. Consiste en la medida de la absorción de las radiaciones electromagnéticas en un intervalo espectral de 200 a 400 nm para la región ultravioleta y de 400 a 800 nm para la región visible (Kafle & Kafle, 2020). La ventaja de los equipos UV-Vis radica en su fácil manejo y que es muy portátil en comparación con HPLC y otros equipos (Y. Li et al., 2018).

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), es un tipo de cromatografía en columna que consiste en el paso de una mezcla de compuestos o analitos por la acción de una bomba, en un sistema disolvente conocido como fase móvil. La fase móvil pasa a través de una columna cromatográfica que contiene la fase estacionaria a un flujo especificado. La separación de los compuestos químicos ocurre por la interacción de estos con la fase móvil y la fase estacionaria. HPLC requiere de técnicos muy experimentados que sepan cómo operar el equipo, debido a su complejidad. La HPLC es una de las principales técnicas analíticas útiles entre todos los diferentes métodos cromatográficos. HPLC es una solución versátil y segura para el control de calidad de los componentes de los fármacos (Sankar, 2020).

Cabe indicar, que a veces la espectrofotetría ultravioleta visible o UV-VIS y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), se utilizan de forma complementaria para validar un experimento.

Es importante señalar, que a pesar de que muchos fármacos han sido hallados frecuentemente en diversos medios y que están generando afectaciones en los ecosistemas acuáticos, aún no se cuenta con la regulación ambiental necesaria en el ámbito global. En este contexto, La Unión Europa, Los Estados Unidos de América y Canadá lideran la inclusión de regulaciones para la vigilancia y control de productos farmacéuticos. Los países latinoamericanos no han trabajado todavía sobre normativa para el control de estos contaminantes en el agua (Caviedes, Diego., Delgado, 2017; Jose, Sandra Pinto, Kotian, Mathew Thomas, & Narayana Charyulu, 2020).

1.1.2 Los fármacos más utilizados en el Ecuador seleccionados para la investigación

Los fármacos seleccionados para esta investigación acetaminofén (analgésico), los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), diclofenaco e ibuprofeno y dos antibióticos sulfametoxazol y ciprofloxacina, son productos farmacéuticos de mucho interés por ser altamente recetados y también de venta libre en el Ecuador y en la mayoría de los países

del mundo, aumentando estas condiciones debido a la emergencia sanitaria que se enfrenta en el ámbito planetario, desde enero de 2020.

En varias investigaciones realizadas en todo el mundo, los fármacos de estudio acetaminofén, ibuprofeno, diclofenaco, sulfametaxazol y ciprofloxacina han sido detectados en aguas superficiales (Ebele et al., 2017; W. Fang et al., 2019; Paíga et al., 2016; Brausch, Connors, Brooks, & Rand, 2012; Lai, Lin, Tung, Lo, & Lin, 2016); en aguas subterráneas (Kibuye et al., 2019; Sharma et al., 2019; Sui et al., 2015; Jiang et al., 2018; W. Li et al., 2012); en aguas residuales (Fekadu et al., 2019; Gamarra et al., 2015; Balakrishna et al., 2017; Alidina et al., 2014; Shraim et al., 2017; Guerra, Kim, Shah, Alae, & Smyth, 2014; Semerjian, Shanableh, Semreen, & Samarai, 2018; Kwarciak-Kozłowska, 2019; Rivera-Jaimes et al., 2018; H. Lin et al., 2018; Kalia, 2019) y en agua potable (Batt et al., 2017; Rasheed, Bilal, Nabeel, Adeel, & Iqbal, 2019; Yang et al., 2017).

El acetaminofén (paracetamol), de fórmula química $C_8H_9NO_2$, también conocido

comúnmente como Tylenol, es el analgésico

que se toma con más frecuencia en todo el

mundo y la Organización Mundial de la

Salud (OMS) lo recomienda como terapia de

primera línea en condiciones de dolor.

También se utiliza por sus efectos

antipiréticos, que ayudan a reducir la fiebre.

(National Center for Biotechnology

Information, 2020).

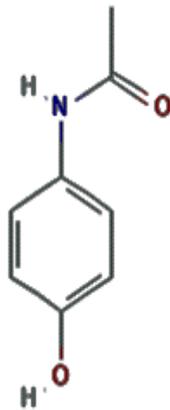


Figura 1.- Estructura química del acetaminofén.

El diclofenaco, cuya fórmula química es $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$, es un fármaco

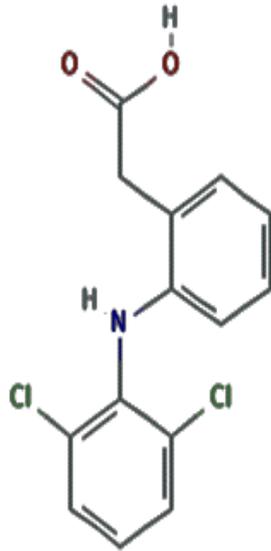
antiinflamatorio no esteroideo (AINE) de uso común para el tratamiento de formas

crónicas de artritis y dolor agudo, leve a moderado. El diclofenaco es un ácido mono

carboxílico que consta de ácido fenilacético que tiene un grupo (2,6-diclorofenil) amino

en la posición 2.

Tiene un papel como analgésico no narcótico, antipirético, inhibidor de EC 1.14.99.1

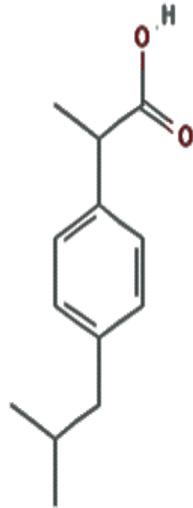


(prostaglandina-endoperóxido sintasa), xenobiótico, contaminante ambiental, fármaco alérgico y fármaco antiinflamatorio no esteroideo. Es un compuesto amino secundario, un aminoácido, un dicloro benceno, una amina aromática y un ácido mono carboxílico. Se deriva de un ácido fenilacético y una difenilamina (National Center for Biotechnology Information, 2020).

Figura 2.- Estructura química del diclofenaco.

El ibuprofeno de fórmula química $C_{13}H_{18}O_2$, es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE) de uso común que está disponible tanto con receta como sin receta. El ibuprofeno se considera uno de los AINE más seguros y, en general, se tolera bien, sin embargo, rara vez puede causar una lesión hepática aguda grave y clínicamente aparente.

El ibuprofeno es un ácido monocarboxílico que es ácido propiónico, en el que uno de

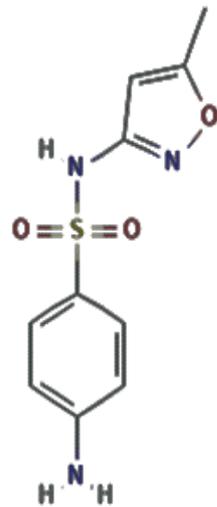


los hidrógenos en la posición 2 está sustituido por un grupo 4- (2-metilpropil) fenilo. Tiene un papel como fármaco antiinflamatorio no esteroideo, analgésico no narcótico, inhibidor de la ciclooxigenasa 2, inhibidor de la ciclooxigenasa 1, antipirético, xenobiótico, contaminante ambiental, eliminador de radicales y alérgeno de fármacos (National Center for Biotechnology Information, 2020).

Figura 3.- Estructura química del ibuprofeno.

El sulfametoxazol de fórmula química $C_{10}H_{11}N_3O_3S$, es un antibiótico bacteriostático de sulfonamida que se usa más comúnmente en combinación con trimetoprim como el fármaco Bactrim. El sulfametoxazol inhibe competitivamente la dihidropteroato sintasa evitando la formación de ácido dihidropteroico, un precursor del ácido fólico necesario para el crecimiento bacteriano. El sulfametoxazol es un compuesto de isoxazol (1,2-oxazol) que tiene un sustituyente metilo en la posición 5 y un grupo 4-aminobencenosulfonamido en la posición 3.

Tiene un papel como agente antibacteriano, agente antiinfeccioso, epítopo, inhibidor de EC 2.5.1.15 (dihidropteroato sintasa), agente antimicrobiano, inhibidor de P450, EC



1.1.1.153 [sepiapterina reductasa (L-eritro-7, Inhibidor de la formación de 8-dihidrobiopterina)], un contaminante ambiental, un xenobiótico y un alérgeno farmacológico. Es una sulfonamida, un miembro de isoxazoles, una anilina sustituida y un antibiótico sulfonamida (National Center for Biotechnology Information, 2020).

Figura 4.- Estructura química del sulfametoxazol.

La ciprofloxacina de fórmula química $C_{17}H_{18}FN_3O_3$, es un antibiótico fluoroquinolónico de segunda generación, con efectos bactericidas. Su modo de acción consiste en paralizar la replicación bacterial del ADN al unirse con la enzima ADN girasa, la cual se bloquea. La función de la ADN girasa es deshacer el superenrollamiento de la doble cadena de ADN, lo que permite que otras enzimas puedan realizar la replicación propiamente dicha, con esta acción las bacterias no pueden dividirse y mueren. Este antibiótico se usa ampliamente en el tratamiento de infecciones leves a moderadas del tracto urinario y respiratorio, causadas por

organismos susceptibles. La ciprofloxacina se ha relacionado con casos raros pero convincentes de lesión hepática que pueden ser graves e incluso fatales.

La ciprofloxacina es una quinolona que es quinolin-4 (1H)-ona que lleva sustituyentes

ciclopropilo, ácido carboxílico, flúor y piperazin-1-ilo en las posiciones 1, 3, 6 y 7, respectivamente. Tiene un papel como agente antiinfeccioso, inhibidor de la topoisomerasa IV, fármaco antibacteriano, inhibidor de EC 5.99.1.3 [ADN topoisomerasa (hidrolizante de ATP)], inhibidor de la síntesis de ADN, agente antimicrobiano, contaminante ambiental y xenobiótico (National Center for Biotechnology Information, 2020).

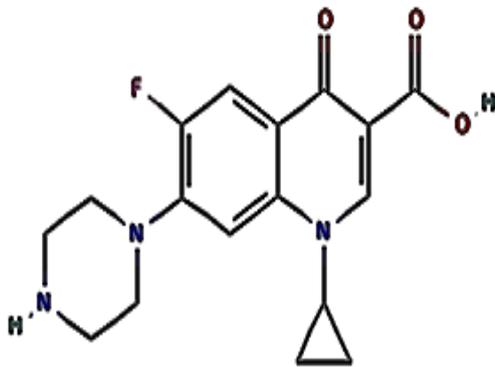


Figura 5.- Estructura química de la ciprofloxacina.

Es importante señalar que, por la gran importancia ambiental que representa la presencia de fármacos en el agua, en los últimos años se ha investigado sobre diferentes tratamientos aplicables a aguas residuales que contienen productos farmacéuticos, cuyo método principal es la tecnología fisicoquímica que incluye técnicas como la flotación, adsorción de carbón activado, procesos avanzados de oxidación, membrana de

separación, coagulación y sedimentación. Estas tecnologías a parte de sofisticadas son relativamente costosas (Wang et al., 2017).

Debido a que las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales ejercen una incompleta remoción de los productos farmacéuticos y sus metabolitos, en la última década varias investigaciones se han enfocado en experimentar con nuevas tecnologías para la remoción de antibióticos de aguas residuales, en las que se incluyen tratamientos biológicos, filtración por membrana, degradación electroquímica, procesos avanzados de oxidación y adsorción (Kwarciak-Kozłowska, 2019).

En este sentido, se necesita investigar alternativas de tratamiento de las aguas residuales de contaminantes emergentes y por lo tanto, de aguas residuales farmacéuticas que permitan obtener ventajas como el bajo costo, su amigabilidad con el ambiente y su potencial aceptación social (Su et al., 2015; Guo, Qi, & Liu, 2017), tal es el caso de la fitorremediación.

1.1.3 Fitorremediación

Con estos antecedentes, la fitorremediación es una alternativa sostenible prometedora, dado que utiliza mecanismos de las plantas para remediar ambientes contaminados, entre los que se puede mencionar la fitoextracción, rizofiltración, fitoestabilización, fitodegradación y fitovolatilización. Estos procesos contribuyen a la remediación,

desintoxicación, lixiviación, contención y estabilización de contaminantes en agua y suelos (Paz-Alberto & Sigua, 2013; Mishra & Maiti, 2017).

Los autores Montenegro, Pulido, & Calderón, 2019, clasifican cinco mecanismos de fitorremediación:

La fitoextracción es el mecanismo por el cual la planta toma los contaminantes por las raíces, los trasloca y acumula en las partes que se cosechan de la especie vegetal. La biomasa es descargada en contenedores o vertederos herméticos, lo cual permite remover metales pesados y otro tipo de compuestos orgánicos e inorgánicos. Las mejores especies vegetales para fitoextracción deben tener algunas características especiales como tolerancia a la concentración de contaminantes acumulados, rápido crecimiento y alta biomasa, acumulación de contaminantes aéreos y en las partes que se cosechan, deben ser fácil de cosechar y la posibilidad de cultivar la planta fotoextractora en el lugar contaminado.

La rizofiltración consiste en la toma y secuestro de los contaminantes a través de las raíces, las mismas que deben poseer una alta producción de biomasa, un área superficial amplia y tolerancia a altas concentraciones de contaminantes. Esta técnica es de bajo costo de implementación y mantenimiento, asimismo, es de fácil manejo, genera una baja tasa de residuos. Actúa como tamiz para atrapar sólidos en suspensión y sirve para biorremediar metales pesados como plomo, cromo, níquel, cadmio, cobre, vanadio y radio nucleótidos como estroncio, uranio y cesio, entre otros.

La fitoestabilización se basa en la transformación de contaminantes como los metales pesados en una especie química no tóxica, minimizando de esta forma el riesgo ambiental. Esta técnica puede servir para estabilizar contaminantes y prevenir las vías de exposición a través del agua. También facilita un sistema hidráulico que limita la lixiviación vertical de contaminantes en el agua subterránea y en la raíz reduce la movilidad por adsorción y fijación química de los contaminantes físicos y químicos.

Este método puede ser implementado como un control indirecto en suelos y cuerpos de aguas contaminados.

La fitodegradación o fitotransformación es el mecanismo por el cual las plantas son utilizadas para degradar contaminantes orgánicos por medio de procesos metabólicos asociados a las comunidades microbianas de las raíces. En estos procesos las plantas cuentan con enzimas que están en relación con la rizosfera, donde los microorganismos intervienen en la degradación y transformación de los contaminantes. Se han identificado enzimas en zonas de la rizosfera como nitro reductasa, laccasa, peroxidasa, dehalogenasa y nitritos. Esta tecnología puede utilizarse para la biorremediación de contaminantes orgánicos como solventes clorinados, herbicidas, insecticidas y diferentes compuestos orgánicos.

La fitovolatilización se fundamenta en el uso de las plantas para la absorción de metales tóxicos y transformarlos en menos tóxicos, volátiles, formados por el proceso de

transpiración de las especies vegetales. Se sabe que a través de esta técnica pueden ser volatilizados metales pesados como mercurio, arsénico y selenio.

En este contexto, las especies seleccionadas para la investigación son *Chrysopogon zizanioides*, llamada comúnmente vetiver, una planta perenne de la familia de las gramíneas, nativa de la India y *Eichhornia crassipes*, conocida como jacinto de agua, una planta acuática de la familia de las Pontederiaceae, originaria de América del sur.

La selección de las especies vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) y jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) para la presente investigación, se basó en el alto número de reportes científicos que denotan la efectividad que tienen estas especies removiendo diferentes tipos de contaminantes como metales pesados, algunos contaminantes orgánicos e inorgánicos persistentes, resaltando el hecho de que estas técnicas son económicamente rentables en comparación con otros métodos, ambientalmente amigables y socialmente aceptables (Paz-Alberto & Sigua, 2013; Suelee, Hasan, Kusin, Yusuff, & Ibrahim, 2017; Maharjan & Pradhanang, 2017).

1.1.3.1 Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*)

Partiendo de las características morfológicas, la especie *Chrysopogon zizanioides* es una planta perenne con un sistema de raíces profundas y de rápido crecimiento, en algunas aplicaciones, la profundidad del enraizamiento puede alcanzar los 3-4 m en el

primer año, posee una alta producción de biomasa, no tiene estolones ni rizomas. Este sistema de raíces profundas y tallos rígidos hace que esta planta sea extremadamente tolerante a la sequía y diversos tipos de clima. Se desarrollan nuevos brotes a partir de la corona subterránea, lo que hace que *C. zizanioides* sea resistente al fuego, las heladas, el tráfico y la fuerte presión del pastoreo (Truong & Tan Van, 2008; Mathew, Rosary, Sebastian, & Cherian, 2016).

Las características fisiológicas de *C. zizanioides*, implica la tolerancia a un amplio rango de pH del suelo, de 3.3 a 12.5; alto nivel de tolerancia a herbicidas y pesticidas, alta eficiencia en la absorción de metales pesados y de nutrientes como el fósforo y nitrógeno en aguas contaminadas. Asimismo, es altamente tolerante a variaciones climáticas extremas como sequías prolongadas, inundaciones, inmersión y temperatura extrema desde -14° C hasta + 55°C (Truong & Tan Van, 2008; Mathew et al., 2016).

El vetiver también se utilizó eficazmente como amortiguador vegetativo o especie de plantas de humedales debido a su extraordinarias características morfológicas y fisiológicas (Mathew et al., 2016).

Otra característica de *C. zizanioides* es que posee un régimen de transpiración muy alto, lo que es clave en la fitorremediación de aguas residuales. Por ejemplo, en un régimen promedio de 600mL/día x maceta, en un periodo de 60 días, *C. zizanioides* empleó 7,5 veces más agua que *Typha*. Asimismo, *C. zizanioides* posee vasos del xilema de gran diámetro y tiene el mayor régimen de uso de agua comparada con otras

plantas de humedal como *Iris pseudacorus*, *Typha* spp., *Schoenoplectus validus*, *Phragmites australis* (Mathew et al., 2016).

La composición química de la raíz de *C. zizanioides* es otro aspecto interesante, contiene aceite esencial de alta calidad compuesto principalmente por triciclovetiveno, α y β -isovetiveno, α y β vetiveno, valenceno, notcateno, α y β -vetispeno, bi y triciclovetivenoles, α 40 y β -vetivona, khusona, khusitona, khusimona, ácidos vetivénicos, zizanoico, epizizanoico, iso-valencénico, sesquiterpenos (khusimol e isokhusimol) (Chahal, Bhardwaj, Kaushal, & Sandhu, 2015).

1.1.3.2 Jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*)

La especie *Eichhornia crassipes* es una especie acuática que tiene unas características morfológicas especiales, de tal forma que presenta un rápido crecimiento, gran biomasa, sus raíces son muy densas y fibrosas, pudiendo alcanzar hasta 3 metros de longitud. Son muy resistentes y adaptables a medios acuosos contaminados y de fácil mantenimiento por su carácter flotante. Se ha reportado una alta tasa de multiplicación de esta especie, pues podría duplicarse en número en un periodo de siete días en condiciones de alta temperatura y humedad. Diferentes partes del jacinto de agua, como los tallos y las hojas, están hechas de tejidos llenos de aire, lo que permite que la planta flote sobre el agua. Tiene una distribución cosmopolita, más, se encuentra

principalmente en las regiones más cálidas del mundo (Gunnarsson & Petersen, 2007; Agunbiade, Olu-Owolabi, & Adebowale, 2009).

Las características fisiológicas de *Eichhornia crassipes* permiten su fácil adaptación a la química del agua, lo cual no afecta su rápido crecimiento y reproducción. La planta tiene un rápido crecimiento, gran biomasa, y tolerancia para muchos metales y metaloides como el arsénico, plata, cadmio, cromo, cobre, hierro, níquel, plomo y zinc, así también compuestos orgánicos como naftalina y fenol (Mishra & Maiti, 2017).

Eichhornia crassipes ha sido ampliamente estudiado en el laboratorio, a nivel piloto y a gran escala para la remoción de materia orgánica presente en las aguas residuales en comparación con otras plantas acuáticas. Aunque se sabe que *Eichhornia crassipes* es una planta persistente en todo el mundo, está siendo muy utilizada como un recurso principal para la gestión de residuos y el proceso agrícola. Tanto en el campo como los estudios en laboratorio han demostrado que el jacinto de agua es capaz de eliminar un gran número de contaminantes presentes en las aguas residuales porcinas, aguas residuales de la granja de patos y aguas residuales lácteas (Rezania et al., 2015).

Según un reporte de la literatura, la composición del material lignocelulósico que conforma el Jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) presentó 34,6%, 29,3% y 21,4% de celulosa, hemicelulosa y lignina, respectivamente (I, Ii, & I, 2018). Cabe indicar, que la referida composición química puede cambiar en función del piso altitudinal y de las variaciones del clima.

1.1.4 Mecanismos de absorción de compuestos orgánicos en las plantas

Los productos químicos orgánicos xenobióticos por ende los medicamentos pueden ser absorbidos por las raíces de las plantas, a través de las fases de vapor o agua del suelo. Se ha demostrado que la absorción por las raíces de las plantas de productos químicos orgánicos se da por un proceso pasivo, difusivo, con la excepción de algunos productos químicos similares a las hormonas y herbicidas de fenoxiácido, para lo cual hay alguna evidencia de captación activa. Experimentos que involucran la absorción de químicos no ionizados de la solución hidropónica a las raíces de las plantas han demostrado que el proceso de captación consta de dos componentes: (1) "Equilibrio" de la fase acuosa en la raíz de la planta con la concentración en la solución circundante; y 2) "Sorci3n" de la sustancia química en s3lidos de raíces lipofílicas. Además de las propiedades fisicoquímicas del contaminante, es probable que la composición de las raíces de las plantas influya en el comportamiento de absorción de las raíces (Orita & Doucette, 2012).

El factor de concentración de la corriente de transpiración (TSCF), la relación entre la concentración de compuestos en el xilema y la de la solución adyacente a las raíces se usa comúnmente para describir la capacidad relativa de un compuesto orgánico para ser transportado pasivamente desde la raíz hasta el brote. Existen reportes que relacionan el TSCF con el coeficiente de partición octanol/agua ($\log K_{ow}$) implicando

que la absorción significativa por la raíz y la transferencia a los brotes ocurre solo para compuestos que caen dentro de un intervalo de hidrofobicidad intermedio. Datos de laboratorio y de campo para compuestos relativamente solubles en agua tales como sulfolano, metil tert-butil éter (MTBE) y 1,4-dioxano sugieren que estas relaciones no son universalmente aplicables, especialmente para compuestos orgánicos no ionizables, altamente polares y solubles en agua. Estas relaciones sugieren una hidrofobicidad óptima para la absorción y translocación e infieren que compuestos que son altamente polares ($\log KOW < 1$) o son altamente lipofílicos ($\log KOW > 4$) no serán absorbidos significativamente por las plantas (Dettenmaier, Doucette, & Bugbee, 2009).

La acumulación de contaminantes en la rizosfera de las plantas se puede dar por varios procesos, entre ellos el denominado flujo de masas, que consiste en el movimiento del agua y los contaminantes de la solución hacia la raíz, debido a la pérdida de agua por la transpiración de la planta, lo cual crea una fuerza de succión por la diferencia de presión de agua entre el interior y exterior de la planta (McGrath, Zhao, & Lombi, 2002; Darrah, Jones, Kirk, & Roose, 2006). La absorción de agua por las raíces de las plantas depende de la naturaleza y las propiedades del sistema radicular, de las características y del estado hídrico del suelo, así como de las condiciones ambientales en general. La absorción de agua con transpiración baja puede ser de origen osmótico, mientras que en las plantas con transpiración alta es primordialmente un fenómeno pasivo.

En este sentido, en concordancia con los reportes antes mencionados, las raíces de *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes* como órgano primario de absorción, pueden absorber los fármacos de estudio, en un contexto muy dinámico que depende de la solubilidad, polaridad y los canales de absorción que las plantas activen en este proceso.

De acuerdo a lo reportado por Cui (2016), al tratarse de sustancias polares, poco solubles en agua y poco biodegradables, como es el caso de los productos farmacéuticos incluidos en este estudio, por su naturaleza orgánica, el mecanismo de absorción posiblemente sería el de fitoestabilización, el mismo que consiste en la absorción y acumulación de los contaminantes en las raíces, por captación pasiva a través de la vía apoplástica, esta vía consiste en el transporte de agua y minerales a través del apoplasto, que incluye las paredes celulares, el xilema y el espacio intercelular entre células de las raíces de las plantas (Pourrut, Shahid, Dumat, Winterton, & Pinelli, 2011).

Por todo lo expuesto, este proyecto de investigación contribuye con una técnica probada en el laboratorio para la remoción de los contaminantes emergentes acetaminofén, ciprofloxacina, diclofenaco, sulfametoxazol e ibuprofeno por medio de fitorremediación, utilizando las especies *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes*, lo que podría servir de base a mediano plazo para el desarrollo de sistemas de tratamiento de aguas residuales que eliminen estos contaminantes en el medio acuoso.

1.1.5 Justificación e hipótesis de la investigación

El agua es un recurso natural indispensable para la vida por lo que su conservación y el acceso al agua segura es un tema de interés local y global. La presencia de nuevos contaminantes en el agua denominados emergentes como los productos farmacéuticos, no están regulados en la legislación ecuatoriana y se desconoce su real peligrosidad.

Asimismo, el problema de contaminación de las fuentes de agua por CE es crucial, debido a su continuo volumen de introducción principalmente por descargas de aguas residuales.

Por otra parte, en el Ecuador se comercializa una alta cantidad de medicamentos comúnmente recetados y en modalidad de “venta libre”, lo que incrementa las concentraciones de estos compuestos en los ecosistemas dulce acuáticos y de agua salada, dado que se ha determinado su presencia en el ámbito mundial en sistemas de tratamiento de aguas residuales, aguas subterráneas, aguas superficiales fluviales, aguas marinas y agua potable.

Considerando que las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs) convencionales no están diseñadas para remover este tipo de contaminantes, es necesario investigar alternativas sostenibles de bajo costo y de alto nivel de remoción para contribuir en la solución de este problema ambiental.

En este contexto, la justificación básica de esta investigación es la evidencia de la falta de estudios sobre tecnologías como la fitorremediación de bajo costo y de amplio espectro que permitan la remoción de los CE y por ende de los productos farmacéuticos en aguas residuales.

Los aspectos fundamentales de esta investigación y sus resultados están en concordancia con el artículo 14 de la Constitución de la República del Ecuador que establece el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*.

Por lo expuesto, la presente investigación está orientada a contribuir con una técnica probada en el laboratorio para la remoción de los contaminantes emergentes acetaminofén, ciprofloxacina, diclofenaco, sulfametoxazol e ibuprofeno en medio acuoso por medio de fitorremediación, utilizando las especies vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) y jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), lo que podría servir de base a mediano plazo para el desarrollo de sistemas de tratamiento de aguas residuales que remuevan este tipo de contaminantes.

La hipótesis se centra en que “La fitorremediación con *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes* favorece en forma efectiva la remoción de los contaminantes emergentes acetaminofén, ciprofloxacina, diclofenaco, sulfametoxazol e ibuprofeno presentes en medio acuoso”.

1.1.5 Objetivos

1.1.5.1 Objetivo general

Evaluar los niveles de remoción de contaminantes emergentes acetaminofén, ciprofloxacina, diclofenaco, sulfametoxazol e ibuprofeno en medio acuoso con técnicas de fitorremediación utilizando las especies vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) y jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*).

1.1.5.2 Objetivos específicos

- Determinar los niveles de remoción de contaminantes emergentes en medio acuoso por fitorremediación con las especies vetiver y jacinto de agua bajo condiciones controladas.
- Analizar el grado de estrés oxidativo causado por los contaminantes emergentes en las especies vegetales estudiadas.
- Establecer la eficiencia de la fitorremediación a mayor escala en laboratorio considerando el mejor tratamiento resultante de la primera fase de la presente investigación.

CAPÍTULO 2.- METODOLOGÍA

2.1 ESTRATEGIA Y FASES DE LA INVESTIGACIÓN

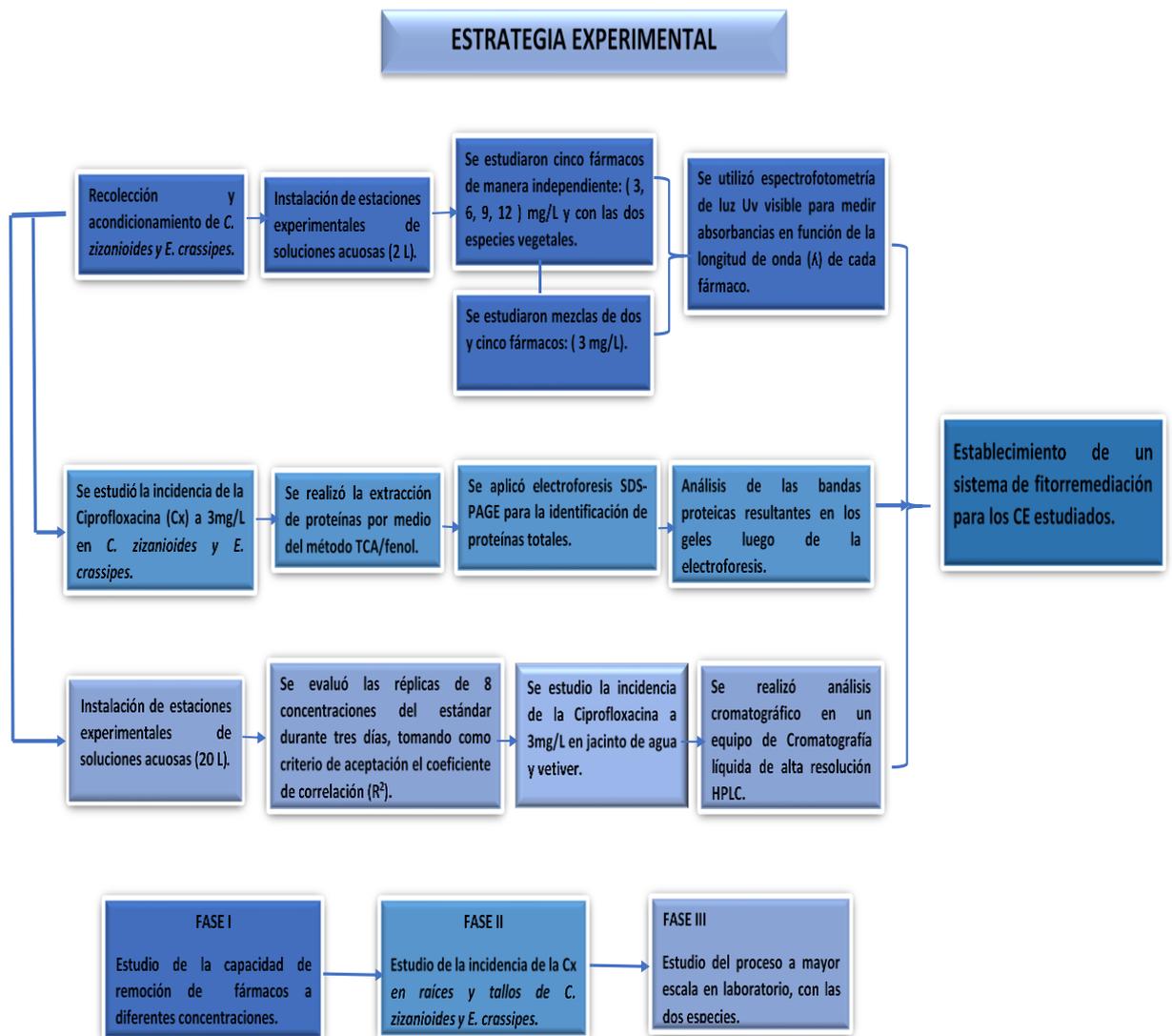


Figura 6.- Estrategia experimental de la investigación realizada en la tesis doctoral.

Como se puede visualizar en la figura 6, la estrategia experimental consta de tres fases, en la primera fase se abordó el estudio de la capacidad de remoción de fármacos a cuatro concentraciones diferentes por parte de las dos especies vegetales seleccionadas. Asimismo, se realizó ensayos con mezclas de dos y cinco fármacos con cada una de las plantas.

En la segunda fase de experimentos se investigó la incidencia de la ciprofloxacina en los tallos y raíces de *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes*, realizando ensayos en dirección a estudiar el estrés oxidativo de las especies vegetales mediante la extracción de proteínas utilizando geles de poliacrilamida al 12% y electroforesis SDS-PAGE.

En la tercera fase de experimentos se estudió el proceso a una mayor escala a nivel laboratorio. Se experimentó con las dos plantas en forma independiente y con un ambiente donde se combinó las dos especies, con la finalidad de establecer su capacidad de remoción del fármaco ciprofloxacina, por ser este el mejor tratamiento resultante de la primera fase de experimentos.

2.2 RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS ESPECIES VETIVER (*Chrysopogon zizanioides*) Y JACINTO DE AGUA (*Eichhornia crassipes*)

Las plántulas de la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), en estado fenológico inicial, fueron recolectadas y sembradas en un vivero de la ciudad de Milagro, provincia del Guayas, ubicado en las coordenadas UTM X: 656343; Y: 9764051, zona 17S a una altitud de 14 msnm. En el referido vivero, se mantuvo las plantas por un tiempo aproximado de dos meses y luego fueron llevadas al invernadero del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), en donde se las dispuso en terrenos aledaños al invernadero durante aproximadamente 30 días.

Las plántulas de la especie jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), fueron recolectadas de un estero ubicado en las coordenadas UTM X: 631489; Y: 9767838, zona 17S a una altitud de 14 msnm, en la vía Durán-Tambo, provincia del Guayas y transportadas hasta un pozo acondicionado en el invernadero del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), en donde se las dispuso durante aproximadamente 30 días.

Posteriormente, se realizó un lavado con agua a fondo para eliminar todo el suelo e impurezas de la zona radicular y se procedió a transferir las plantas a canastillas

rectangulares de 25 litros de capacidad para ser aclimatadas en agua durante 20 días, previo a su uso en los experimentos de fitorremediación de los cinco medicamentos utilizados en esta investigación. Este es un proceso adaptado en base a lo establecido por (Datta et al., 2013).

2.3 DISEÑO DEL EXPERIMENTO

En la primera fase de experimentos, se estudiaron cinco productos farmacéuticos de manera independiente: sulfametoxazol, ciprofloxacina, acetaminofén, ibuprofeno y diclofenaco, todos de la marca SIGMA-ALDRICH al 99,9% de pureza. De cada fármaco se prepararon soluciones acuosas utilizando metanol ultrapuro de la marca Merck a cuatro concentraciones: 3 mg/L, 6 mg/L, 9 mg/L, 12 mg/L. Para obtener la variable de respuesta, que es el porcentaje de remoción, en el caso de *Chrysopogon zizanioides*, se utilizaron 4 tiempos de muestreo 48, 96, 144 y 192 h, y para *Eichhornia crassipes*, los tiempos de muestreo fueron 24, 48, 72 y 96 h. Los tiempos establecidos para la toma de muestras son distintos, debido a que las características morfológicas y fisiológicas difieren entre las dos especies, principalmente en su velocidad de reproducción y su transpiración (Mishra & Maiti, 2017; Mishra & Maiti, 2017).

Para cada una de las especies de estudio, se realizó dos réplicas del experimento, es decir, se colocó dos unidades experimentales con un contenido de dos litros de solución

acuosa de cada fármaco y por cada concentración seleccionada para esta investigación, luego se introdujo las especies vegetales con un peso aproximado de 60 g. Los ensayos fueron mantenidos a una temperatura de 25°C y un pH de 6,5 durante todo el experimento. Una vez concluido el tiempo del ensayo se procedió a recolectar alícuotas de 2 ml de cada unidad experimental con una micropipeta. El volumen recolectado fue colocado en tubos eppendorf y almacenados a temperatura de refrigeración hasta su posterior análisis.

Se utilizó el diseño factorial 2^k , con $k = 2$, con dos puntos internos donde concentración (C) y tiempo (T) fueron los factores; los niveles considerados se indican en las figuras 7 y 8.

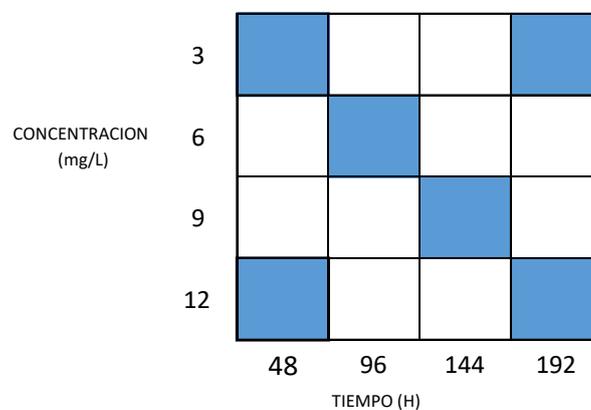


Figura 7.- Esquema del diseño experimental con *Chrysopogon zizanioides*

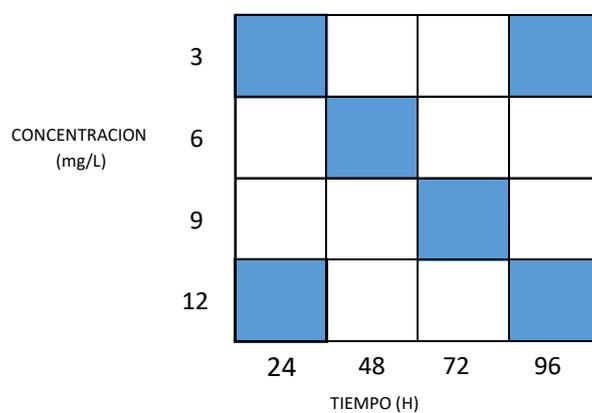


Figura 8.- Esquema del diseño experimental con *Eichhornia crassipes*

Con la finalidad de medir la variable de respuesta, porcentaje de remoción del producto farmacéutico, previamente se midió por triplicado la absorbancia de cada uno de los fármacos, utilizando la técnica de espectrofotometría de luz UV visible. En la determinación del porcentaje de remoción (%) de los compuestos de estudio, se aplicó la siguiente ecuación 1:

$$\% = \frac{\text{Concentración inicial} - \text{Concentración final}}{\text{Concentración inicial}} \times 100 \quad (1)$$

2.4 EXPERIMENTACIÓN CON *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes* PARA REMOCIÓN DE MEZCLAS DE FÁRMACOS

Se estudiaron soluciones de dos y cinco fármacos juntos a una concentración de 3 mg/L. En este sentido, para cada una de las especies vegetales de estudio, se colocaron tres estaciones experimentales con un contenido de dos litros de solución de la mezcla de fármacos correspondiente, luego se introdujo las especies vegetales con un peso aproximado de 60 g.

Como se puede observar en la tabla 1, en el caso de *Chrysopogon zizanioides*, se preparó soluciones de los cinco fármacos de estudio juntos y también una mezcla de dos antibióticos sulfametoxazol y ciprofloxacina, se utilizaron 4 tiempos de muestreo 48, 96, 144 y 192 h.

De igual manera, para *Eichhornia crassipes*, se preparó soluciones de los cinco fármacos de estudio juntos y también una mezcla de dos fármacos ciprofloxacina y diclofenaco, los tiempos de muestreo fueron 24, 48, 72 y 96 h.

Los ensayos fueron mantenidos dentro del ambiente de invernadero, a una temperatura de 25°C y un pH de 6,5 durante todo el tiempo del experimento.

Cabe mencionar que, para seleccionar la mezcla binaria de los fármacos, se consideró los dos compuestos que mejor absorción tuvieron en cada especie en la primera fase de experimentación. En este contexto, para *Chrysopogon zizanioides*, los antibióticos sulfametoxazol (SMX) y ciprofloxacina (CX) presentaron mayor porcentaje de remoción, mientras que para *Eichhornia crassipes*, el antibiótico ciprofloxacina (CX) y el AINE diclofenaco (DC) fueron removidos de mejor forma.

Tabla 1.- Condiciones de experimentación con mezclas de fármacos.

Tipo de soluciones	Concentración (mg/L)	pH	Temperatura (°C)	Especie	Tiempo de toma de muestra (H)
Mezcla de dos PFs (SMX, CX)	3	6,5	25	<i>Chrysopogon zizanioides</i>	48
Mezcla de cinco PFs (SMX, CX, IBU, AC, DC)					96
					144
					192
Mezcla de dos PFs (CX, DC)				<i>Eichhornia crassipes</i>	24
Mezcla de cinco PFs (SMX, CX, IBU, AC, DC)	48				
	72				
					96

Una vez concluido el tiempo del ensayo se procedió a recolectar con una micropipeta alícuotas de 2 ml de cada unidad experimental. El volumen recolectado fue colocado

en tubos eppendorf y almacenados a temperatura de refrigeración hasta su posterior análisis.

Se construyeron las curvas de calibración para cada fármaco con cinco concentraciones diferentes (1, 2, 3, 4, 5) mg/L, como se indica en el anexo 1, de esta manera se obtuvo una relación de calibración lineal, mediante el coeficiente de determinación R^2 , que para el caso de estudio es $R^2 > 0,995$.

La lectura y análisis de las muestras se llevó a cabo empleando Espectrofotometría UV vis, utilizando el programa VISIONlite para visualizar los espectrogramas, considerando las longitudes de onda de cada fármaco y la concentración inicial de 3 mg/L. Se calculó que porcentaje de esta concentración inicial ha sido removido a una hora específica utilizando la ecuación 1.

2.5 ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN RAÍCES Y TALLOS DE *Chrysopogon zizanioides* Y *Eichhornia crassipes*

Los ensayos para estudiar el estrés oxidativo de las especies vegetales se realizaron considerando el mejor tratamiento, resultado de la primera fase de experimentos. En este sentido se estudió el comportamiento de las especies vegetales al exponerlas a una solución de ciprofloxacina de 3 mg/L de concentración. El tiempo de toma de muestras

se realizó a 6, 12 y 24 h, luego de lo cual, se realizó la extracción de proteínas de tallos y raíces de cada una de las especies. Se utilizó el método de ácido tricloroacético-acetona (TCA-acetona) con una modificación realizada por el laboratorio de Biología Molecular de CIBE-ESPOL.

Para la visualización de las proteínas que mayor expresión presentan, se preparó geles de poliacrilamida al 12% y se aplicó electroforesis SDS-PAGE.

2.5.1 Extracción de proteínas

Previamente, se tomaron muestras de *C. zizanioides* y de *E. Crassipes* del experimento realizado en invernadero, luego se puso a congelar a -80°C , posteriormente se separó los tallos de las raíces, se cortó en pequeños pedazos cada parte de la planta y se puso a congelar a -80°C por 30 min, luego se procedió a triturarlas.

2.5.2 Método TCA/fenol (método modificado por BM-CIBE-ESPOL)

El primer paso fue realizar la extracción de proteínas por medio del método TCA/fenol, que ayuda a eliminar elementos no proteicos en la muestra, para dicho proceso se aplicó el siguiente protocolo:

Se transfirió la muestra a tubos de 2 ml y se agregó 500 ml de TCA10% acetona, luego de homogenizar se centrifugó 12000 revoluciones por min (rpm) durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se recuperó el pellet. Posteriormente se añadió al pellet 500 ml de acetona al 80%, se mezcló y se centrifugó nuevamente con las mismas especificaciones anteriores. Dado que las muestras tratadas estaban muy pigmentadas se repitió el lavado de acetona por dos veces.

Luego de los lavados con acetona se modificó el protocolo para volver a congelar las muestras (primero a -20 °C y luego con nitrógeno líquido) y triturarlas una vez más, para tratar de romper las muestras y aprovechar de mejor manera su contenido.

Para la siguiente etapa se llevaron las muestras recién trituradas a la campana extractora para añadir 500 µL de solución SDS Buffer, 75 µL de 2-mercaptoethanol, se homogenizó y luego se agregó 500 µL de fenol pH9 Sigma. Enseguida se mezcló, se dejó incubar por cinco min en frío y se centrifugó a 12000 rpm por diez min.

A continuación, se transfirió la parte fenólica a un nuevo tubo y se le agregó 500 µL de buffer de precipitación y se lo dejó reposar por 24 h a -20 °C. Luego se centrifugó nuevamente la muestra, se eliminó el sobrenadante y se recuperó el pellet para lavarlo con metanol al 100%, se mezcló y centrifugó durante diez min. Para finalizar, se recuperó el pellet, se lo lavó con acetona al 80%, se centrifugó nuevamente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar al aire libre.

2.5.3 Electroforesis SDS-PAGE

Una vez finalizada la extracción de proteínas, se procedió a realizar electroforesis que permitió la visualización de proteínas en los geles correspondientes. Para la elaboración de geles de poliacrilamida al 12% con las especificaciones estipuladas por el protocolo general perteneciente al área de Biología Molecular del CIBE-ESPOL. A continuación, se procedió a la preparación de muestras, de tal forma que se resuspendieron en 5 μL de buffer de solubilidad, se les colocó buffer de corrida 3x y se calentó por 5 min.

Una vez listas las muestras se procedió a preparar el sistema para la electroforesis, colocando los geles en el tanque de buffer y poniendo buffer de corrida 1x, posteriormente se colocó las muestras en los respectivos pocillos y se conectó el sistema a una fuente de poder, dejándolo correr a una potencia de 100 voltios por un tiempo aproximado de 3 h.

Una vez ha terminado de correr el gel se lo retiró del sistema, se descartó la sección de los pocillos y se colocó el gel en una caja Petri grande con Comassie Blue durante 20 min para que se tiña. Terminado este tiempo, se extrajo el Comassie Blue y se colocó ácido acético para eliminar el exceso de tinción del gel y de esta manera poder apreciar las bandas proteicas con claridad.

2.6 ESTUDIO DEL PROCESO DE FITORREMEDIACIÓN A MAYOR ESCALA CON *C. zizanioides* y *E. crassipes*

Con la finalidad de observar la incidencia de los resultados se decidió probar el proceso de remoción de fármacos en medio acuoso a una escala mayor, para lo cual se seleccionó el mejor tratamiento que resultó de la primera fase de experimentos.

En este contexto, se llevaron a cabo ensayos con *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes* por separado, luego en otro ensayo se combinó las dos especies. Se preparó por triplicado soluciones de ciprofloxacina con un volumen de 20 litros y con una concentración de 3 mg/L. El tiempo de toma de muestra en el caso de *C. zizanioides* fue de 48, 96, 144 y 192 h, mientras que para *E. crassipes*, el tiempo de toma de muestra fue de 24, 48, 72 y 96 h.

Para el análisis de las muestras, se utilizó cromatografía líquida de alta eficacia o High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Se preparó la solución stock 1:1000 (metanol ultra puro) ppm y se realizaron las distintas diluciones de 100, 80, 60, 40, 20, 10 (agua ultra pura) ppm, se filtró con (0.45 μm) y se trataron mediante ultrasonido a una frecuencia de 35 kHz para eliminar las burbujas de aire. Luego se preparó cinco soluciones de trabajo de ciprofloxacina estándar en el rango de 10 a 100 mg/L.

La linealidad del estándar de ciprofloxacina se evaluó realizando réplicas de 5 concentraciones 0.10, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg/L del estándar durante tres días

consecutivos, tomando como criterio de aceptación el coeficiente de determinación del modelo (R^2), como se visualiza en el anexo 2.

2.7 ANÁLISIS DE DATOS

En el caso del comportamiento de las especies de estudio al ser expuestas a soluciones de fármacos con cuatro concentraciones diferentes en forma independiente, el análisis estadístico de los datos que se empleó fue la técnica de superficies de respuesta, para encontrar los modelos que ayudaron a determinar tiempos y concentraciones óptimas, donde se maximizó la absorción de cada fármaco; así como, la obtención de las pendientes de crecimiento para determinar hacia donde se deberá buscar el óptimo, en los casos donde no se los encontró. Se utilizó el software estadístico R versión 3.6.0 y RStudio versión 1.1.453.

En el caso de la mezcla de fármacos y del proceso a mayor escala, para el procesamiento estadístico de datos y resultados, se utilizó el software Design Expert para caracterización de interacciones y codificación de factores. La comparación estadística de medias se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor-p de la prueba resultaba menor al nivel de significancia $\alpha=0,05$, con un intervalo de confianza del 95%.

CAPÍTULO 3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS

3.1.1 Fitorremediación con la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) para cada fármaco de estudio

3.1.1.1 Modelo General

El modelo general de la superficie de respuesta está representado por la ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 C + \beta_2 T + \beta_3 C^2 + \beta_4 T^2 + \beta_6 C * T + \varepsilon \quad (2)$$

Donde,

Y = Porcentaje de remoción

β_0 = Intercepto

β_i = Coeficientes del modelo

C = Concentración

T = Tiempo

ε = Error de estimación

La matriz resultante no permitió obtener un modelo polinómico de grado 2 para ambos factores a la vez, por lo que se desarrolló un modelo con forma cuadrática para un factor, mientras se mantuvo la linealidad en el otro factor.

C^2	T^2
$Y = b_0 + b_1C + b_2T + b_3C^2 + b_4T * C$ (3)	$Y = b_0 + b_1C + b_2T + b_3T^2 + b_4C * T$ (4)

Tabla 2.- Modelo general de superficie de respuesta para cada uno de los fármacos de estudio con *Chrysopogon zizanioides*.

FÁRMACO	C^2	T^2
SULFAMETOXAZOLE (SMX)	$Y = 97.34 - 23.24 C + 0.15 T + 1.36 C^2 - 0.0026 C * T$	$Y = 97.34 - 2.8704C - 1.1264 T - 0.0053T^2 - 0.0025C * T$
CIPROFLOXACINA (Cx)	$Y = 66.54 + 4.21 C + 0.078 T - 0.54 C^2 + 0.0069 C * T$	$Y = 66.54 + 3.95 C - 0.5885 T - 0.0021 T^2 - 0.0069 C * T$
ACETAMINOFEN (AC)	$Y = 26.79 - 8.89 C + 0.193 T + 0.684 C^2 - 0.0087 C * T$	$Y = 26.79 + 1.38 C - 0.4480 T + 0.0027 T^2 - 0.0087 C * T$
IBUPROFENO (IB)	$Y = 1.70 - 0.88 C + 0.35 T + 0.22 C^2 - 0.008 C * T$	$Y = 1.71 + 2.46 C + 0.15 T + 0.00087 T^2 - 0.008 C * T$
DICLOFENACO (DF)	$Y = 46.34 - 12.41 C + 0.058 T + 1.10 C^2 + 0.003 C * T$	$Y = 46,34 + 4.10 C - 0.97 T + 0.0043 T^2 + 0,003 C * T$

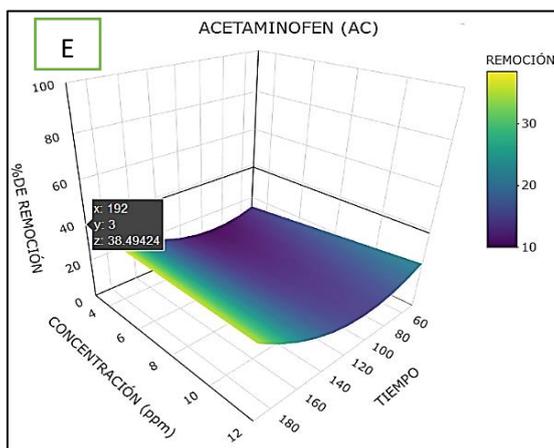
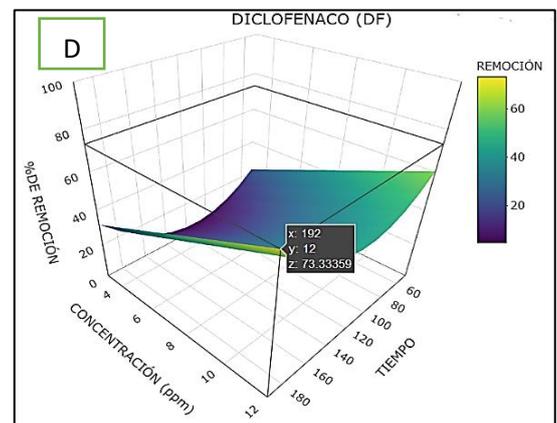
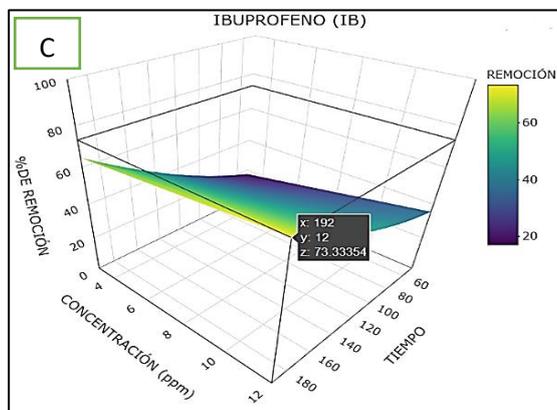
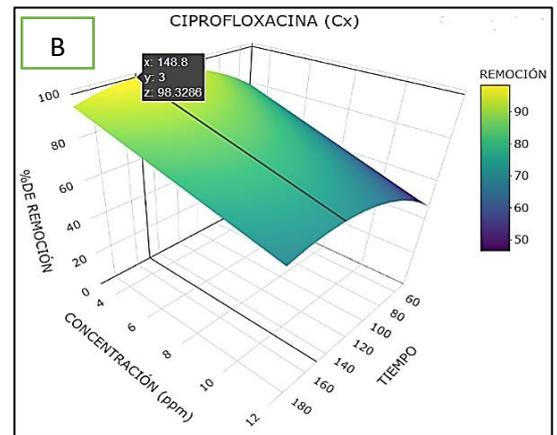
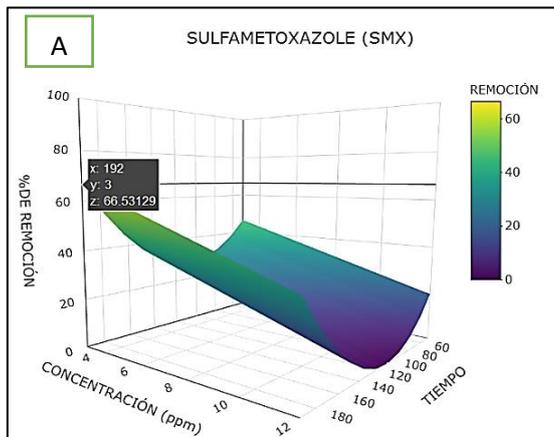


Figura 11.- Resultados obtenidos con la técnica superficie de respuesta para la remoción con *Chrysopogon zizanioides* de los fármacos: A) sulfametoxazol, B) ciprofloxacina, C) ibuprofeno, D) diclofenaco y E) acetaminofén en medio acuoso.

En el modelo obtenido para sulfametaxazol (Figura 11A), los coeficientes de las variables C, T, T² fueron significativos por lo que se pudo reducir el modelo para obtener más información eliminando el término no significativo, el cual resulta de la interacción entre las variables de concentración y tiempo, según la ecuación (5).

$$\% \text{ de remoción} = 97.34 - 2.8704 C - 1.1264 T + 0.0053 T^2 - 0.0025 C * T \quad (5)$$

En el rango estudiado, para el fármaco sulfametoxazol, se observa que inicia con un porcentaje de remoción de 46,52%, a una concentración de 3 mg/L en un tiempo de 48 h, dicho porcentaje presenta un descenso en las primeras 105 h; a partir de ese tiempo se observa que el porcentaje de remoción tiene un ascenso más pronunciado, alcanzando un máximo de remoción de 66,53%, a la concentración de 3 mg/L en un tiempo de 192 h; sin embargo, se observa que el óptimo aún está alejado de este rango y al analizar el ascenso más pronunciado, se visualiza que para encontrar el óptimo sería necesario reducir las concentraciones e incrementar el tiempo, se puede considerar también la posibilidad de encontrar el óptimo en la reducción de tiempo y de concentración.

En el caso de la ciprofloxacina (Figura 11B), el modelo responde de manera similar al del sulfametaxazol, donde tenemos la ecuación (6):

$$\% \text{ de remoción} = 66.54 - 3.95 C + 0.5885 T - 0.0021 T^2 + 0.0069 C * T \quad (6)$$

En el rango estudiado, para la ciprofloxacina se observa que el porcentaje de remoción parte con un 79,05%, en una concentración de en un tiempo de 3 mg/L, este porcentaje logra alcanzar un máximo de remoción de 98,32% a las 149 h. Al alcanzar este máximo, se produce el proceso inverso y el porcentaje de remoción comienza a reducirse, se observa que para alcanzar el óptimo es necesario reducir las concentraciones manteniendo el tiempo de 149 h.

En el modelo estudiado para el ibuprofeno (Figura 11C), los valores de las variables C, T, T² y C*T son significativos por lo que se presenta un modelo que obtiene la mayor información, acorde a la ecuación (7).

$$\% \text{ de remoción} = 1.71 + 2.46 C + 0.15 T + 0.00087 T^2 - 0.008 C * T \quad (7)$$

El ibuprofeno inicia con un porcentaje de remoción de 17,00%, a una concentración de 3 mg/L en un tiempo de 48 h, dicho porcentaje presenta un ascenso pronunciado alcanzando un máximo de remoción de 73,33%, a una concentración de 12 mg/L en un tiempo de 192 h; sin embargo, se observa que el óptimo aún está alejado de este rango y al analizar el ascenso más pronunciado, se observa que para encontrar el óptimo es necesario aumentar las concentraciones e incrementar el tiempo.

En el modelo estudiado para el diclofenaco (Figura 11D), los valores de la variable C, T y T² son significativos por lo que se puede reducir el modelo para obtener más información eliminando el término que no es significativo, el cual resulta de la

interacción entre las variables de concentración y tiempo, como se observa en la ecuación (8).

$$\% \text{ de remoción} = 46,34 + 4,10 C - 0,97 T + 0,0043 T^2 + 0,003 C * T \quad (8)$$

En el caso del diclofenaco se evidencia un inicio con un porcentaje de remoción de 28,18%, con una concentración de 3 mg/L en un tiempo de 48 h, dicho porcentaje presenta un descenso en las primeras 106 h; a partir de ese tiempo se observa que el porcentaje de remoción tiene un ascenso alcanzando un máximo de remoción de 73,33%, con una concentración de 12 mg/L en un tiempo de 192 h; sin embargo, se observa que el óptimo aún está alejado de este rango y al analizar el ascenso más pronunciado, vemos que para encontrar el óptimo sería necesario aumentar las concentraciones e incrementar el tiempo.

En el modelo estudiado para el acetaminofén (Figura 11E), se observa que este fármaco se comporta de manera similar a lo presentado en los otros fármacos, tal como lo muestra la ecuación (9):

$$\% \text{ de remoción} = 26,79 + 1,38 C - 0,4480 T + 0,0027 T^2 - 0,0087 C * T \quad (9)$$

El acetaminofén inicia con un porcentaje de remoción de 14,33%, a una concentración de 3 mg/L en un tiempo de 48 h, dicho porcentaje presenta un descenso lento en las primeras 91 h ; a partir de ese tiempo se observa que el porcentaje de

remoción tiene un ascenso alcanzando un máximo de remoción de 38,49%, con una concentración de 3 mg/L en un tiempo de 192 h; sin embargo, se observa que el óptimo aún está alejado de este rango y al analizar el ascenso más pronunciado, vemos que para encontrar el óptimo es necesario reducir las concentraciones e incrementar el tiempo. También se podría considerar la posibilidad de encontrar el óptimo reduciendo el tiempo y la concentración.

3.1.2 Fitorremediación con la especie jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) para cada fármaco de estudio

3.1.2.1 Modelo General

El modelo general de la superficie de respuesta es el mismo que está representado en la ecuación (2).

La matriz resultante no permitió obtener un modelo polinómico de grado 2 para ambos factores a la vez, por lo que se desarrolló un modelo con forma cuadrática para un factor, mientras se mantuvo la linealidad en el otro factor, conforme a las ecuaciones (3), (4).

Tabla 3.- Modelo general de superficie de respuesta para cada uno de los fármacos de estudio con *Eichhornia crassipes*.

FÁRMACO	C^2	T^2
SULFAMETOXAZOLE (SMX)	$Y = 44.24 - 3.07 C - 0.0142 T$ $+ 0.1542 C^2 - 0.0005 C$ $* T$	$Y = 44.24 - 0.7534 C - 0.3033 T$ $+ 0.0024 T^2 - 0.0005 C$ $* T$
CIPROFLOXACINA (Cx)	$Y = 94.35 - 1.2874C + 0.0029 T$ $+ 0.0228 C^2 + 0.0007C$ $* T$	$Y = 94.35 - 0.9461C - 0.0398 T$ $+ 0.0004 T^2 + 0.0007 C$ $* T$
ACETAMINOFEN (AC)	$Y = 83.06 - 8.8664 C + 0.1223 T$ $+ 0.6537 C^2 - 0.0104 C$ $* T$	$Y = 83.06 + 0.9396 C - 1.1035 T$ $+ 0.0102 T^2 - 0.0104 C$ $* T$
IBUPROFENO (IB)	$Y = -39.86 + 24.97 C - 0.0917 T$ $- 1.59 C^2 + 0.0111 C * T$	$Y = -39.86 + 1.0694 C + 2.8956 T$ $- 0.0249 T^2 + 0.0110 C$ $* T$
DICLOFENACO (DF)	$Y = 172.26 - 11.78 C - 2.3189 T$ $- 0.0640 C^2 + 0.1987 C$ $* T$	$Y = 172.26 - 12.74 C - 2.1989 T$ $- 0.0010 T^2 + 0.1987 C$ $* T$

En todos los casos se mantuvieron en la ecuación a los coeficientes de los efectos simples o de orden uno, los efectos cuadráticos y la interacción, aun cuando en algunas ocasiones no hayan resultado significativos. El motivo de mantenerlos fue el poder describir de mejor manera el fenómeno.

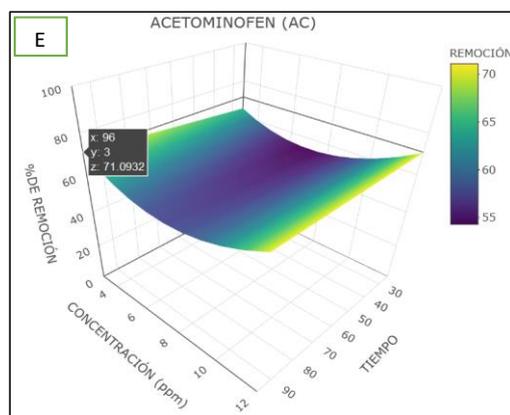
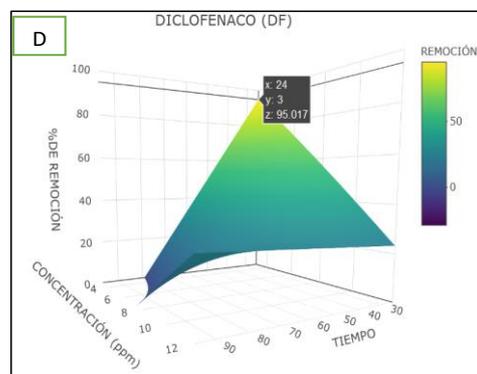
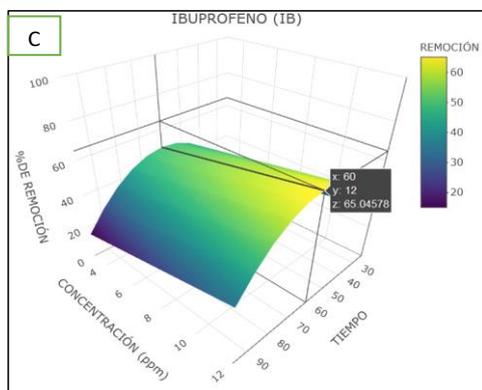
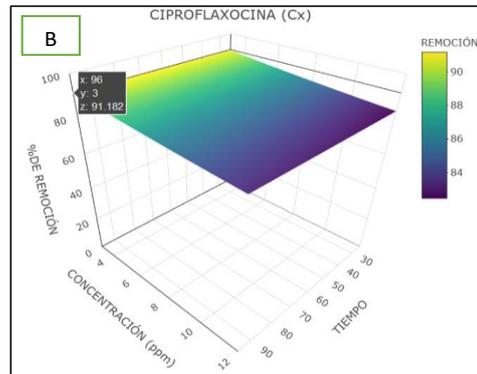
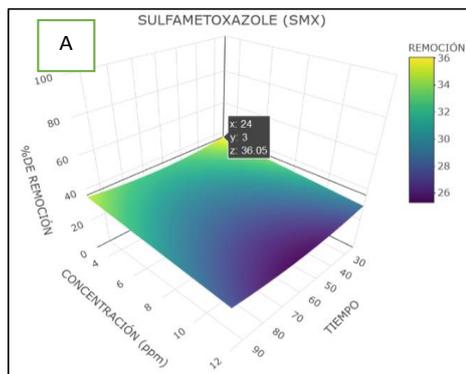


Figura 12.- Resultados obtenidos con la técnica superficie de respuesta para la remoción con *Eichhornia crassipes* de los fármacos A) sulfametoxazol, B) ciprofloxacina, C) ibuprofeno, D) diclofenaco y E) acetaminofén en medio.

En el modelo obtenido para sulfametaxazol (Figura 12A), los coeficientes de las variables C, T, T² no fueron significativos ver la ecuación (10).

$$\% \text{ de remoción} = 44.24 - 0.7534 C - 0.3033 T + 0.0024 T^2 - 0.0005 C * T \quad (10)$$

Si se examina el modelo considerando al tiempo como un factor cuadrático que le da curvatura al modelo, se presenta que el coeficiente de la interacción entre los factores de tiempo y concentración no es significativo, en comparación a los otros coeficientes.

En este escenario, *Eichhornia crassipes* fue menos eficiente que con el resto de fármacos de estudio, dado que se evidencia que los porcentajes más bajos de remoción de sulfametoxazol se presentan a medida que aumentan la concentración y más aún en el tiempo de aproximadamente 48 h y 72 h. Asimismo, se observa que el mayor porcentaje de remoción de 36,05% se da con la concentración más baja de 3 mg/L a las 24 h, este porcentaje de remoción es el más bajo en comparación con los restantes cuatro fármacos de estudio.

En el caso de la ciprofloxacina (Figura 12B), se visualiza que el modelo no presenta concavidad, dado que el coeficiente del término cuadrático es pequeño, de acuerdo con la ecuación (11).

$$\% \text{ de remoción} = 94.35 - 0.9461C - 0.0398 T + 0.0004 T^2 + 0.0007 C * T \quad (11)$$

El valor óptimo de remoción al 91,18% se da con una concentración de 3 mg/L y un tiempo de 96 h, lo que informa sobre la eficiencia de *Eichhornia crassipes* en la remoción de este fármaco en medio acuoso. Se puede observar que el porcentaje de remoción disminuye en relación con el aumento de la concentración.

En el modelo estudiado para el ibuprofeno (Figura 12C), se presenta un modelo que obtiene la mayor información, acorde a la ecuación (12).

$$\% \text{ de remoción} = -39.86 + 1.0694 C + 2.8956 T - 0.0249 T^2 + 0.0110 C * T \quad (12)$$

En este caso, se evidencia que el valor óptimo de porcentaje de remoción 65,04% se ha obtenido con una concentración de 12 mg/L en un tiempo de 60 h, estos resultados indican una eficiencia aceptable de *Eichhornia crassipes* en la remoción de este fármaco. A su vez, se observa que a mayor tiempo y a menor concentración se obtienen porcentajes de remoción bajos. Es decir, en el nivel de concentración más bajo se obtiene el porcentaje de remoción mínimo.

En el modelo estudiado para el diclofenaco (Figura 12D), los valores de la variable T, T² y C*T son significativos, ver la ecuación (13).

$$\% \text{ de remoción} = 172.26 - 12.74 C - 2.1989 T - 0.0010 T^2 + 0.1987 C * T \quad (13)$$

En este rango de estudio, se observa que el diclofenaco inicia con un porcentaje de remoción de 95,01%, con una concentración de 3 mg/L en un tiempo de 24 h, lo que señala una alta eficiencia de *Eichhornia crassipes* en la remoción de diclofenaco. Como se visualiza en la figura 12D, dicho porcentaje presenta un descenso pronunciado, es decir, a medida que aumenta el tiempo se produce el proceso inverso y el porcentaje de remoción comienza a reducirse. Mientras que, por el contrario, con una concentración de 12 mg/L, el porcentaje de remoción inicia de 23,32% y a medida que se aumenta el tiempo, el porcentaje de remoción va aumentando.

En las condiciones estudiadas para el acetaminofén (Figura 12E), los valores de las variables de la concentración y la interacción de este último con el tiempo no son significativos para el estudio, ver la ecuación (14).

$$\% \text{ de remoción} = 83.06 + 0.9396 C - 1.1035 T + 0.0102 T^2 - 0.0104 C * T \quad (14)$$

En el rango estudiado para el acetaminofén, se observa que existen dos casos, el primero muestra con una concentración de 3 mg/L y a medida que aumenta el tiempo se alcanza un porcentaje máximo de remoción de 71,09%. Para el segundo caso con una concentración de 12 mg/L y a medida que aumenta el tiempo se alcanza un máximo de remoción de 70,57%. Estos resultados indican una buena capacidad removedora de este fármaco por parte de *Eichhornia crassipes*. Adicionalmente, se observa que para

alcanzar el valor óptimo es necesario usar una concentración baja (3 mg/L) y aumentar el tiempo.

3.1.3 FITORREMEDIACIÓN CON *Chrysopogon zizanioides* PARA MEZCLA DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

3.1.3.1 Mezcla de cinco productos farmacéuticos

A continuación, en la tabla 4 se exponen los resultados del Análisis de varianza (ANOVA) de la remoción de los cinco fármacos de estudio con *Chrysopogon zizanioides*. El valor F del modelo de 10033,86 implica que el modelo es significativo. Los valores P inferiores a 0.0500 (en este caso p-value es < 0.0001) indican que los términos del modelo son significativos. En este caso A, B, AB son términos de modelo significativos.

Tabla 4.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo factorial seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con *Chrysopogon zizanioides* y cinco fármacos.

Source Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value	Significant
Modelo	362,68	19	19,09	10033,86	< 0.0001	***
A-Fármaco	342,44	4	85,61	45000,82	< 0.0001	***
B-Tiempo	12,36	3	4,12	2166,42	< 0.0001	***
AB	7,88	12	0,6565	345,07	< 0.0001	***
Pure Error	0,0761	40	0,0019			
Cor Total	362,76	59				

Tabla 5.- Ajuste estadístico de parámetros, Desviación estándar (Std. Dev.), Media (Mean), Coeficiente de variación (C.V. %) con *Chrysopogon zizanioides* y cinco fármacos.

Std. Dev.	0,0436	R ²	0,9998
Mean (Media)	97,87	Adjusted R ²	0,9997
C.V. %	0,0446	Predicted R ²	0,9995
		Adeq Precision	313,2792

El R² ajustado de 0,9997 informa sobre la robustez del modelo adoptado.

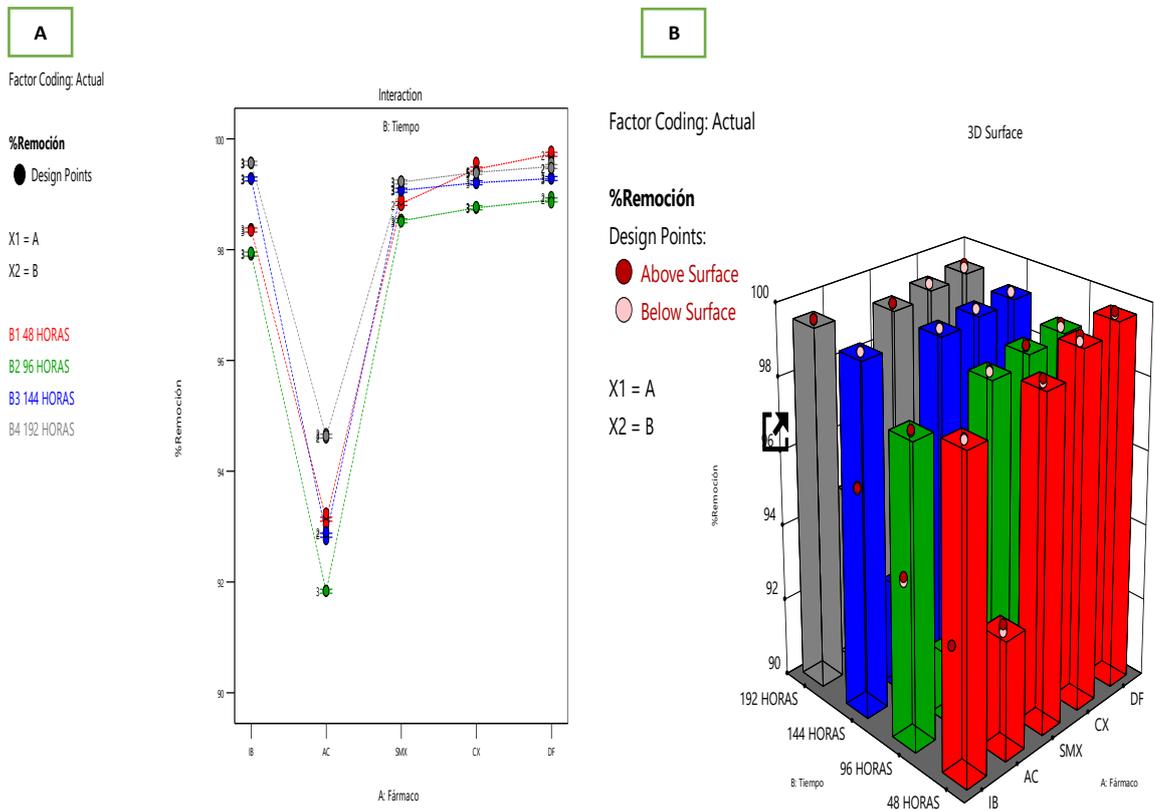


Figura 13.- A) Gráfico de interacciones y B) codificación de factores para Fármaco (X1) y Tiempo (X2) con *C. zizanioides* y cinco fármacos.

El análisis estadístico realizado demostró que existen diferencias significativas (valor- $p < 0.0001$) entre los factores X1 y X2 (Fármaco, Tiempo), lo cual incide en la variable de respuesta que es el porcentaje de remoción. Como se puede observar en la figura 13, la diferencia está en el acetaminofén que presenta el menor porcentaje de remoción.

Asimismo, queda claro que *C. zizanioides* tiene un excelente poder de remoción del resto de fármacos, ibuprofeno, sulfametoxazol, ciprofloxacina y diclofenaco.

Se observa también que entre 48 y 96 h se presenta un descenso en el porcentaje de remoción para luego subir poco a poco hasta las 192 h del experimento.

3.1.3.2 Mezcla de dos productos farmacéuticos

A continuación, en la tabla 6 se exponen los resultados del Análisis de varianza (ANOVA) de la remoción de los dos fármacos (CX y SMX) con *Chrysopogon zizanioides*. El valor F del modelo de 3794,81 implica que el modelo es significativo. Los valores-p inferiores a 0.0500, en este caso p-value es < 0.0001 , indican que los términos del modelo son significativos. En este caso A, B, AB son términos significativos de modelo.

Tabla 6.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo factorial seleccionado, la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con *Chrysopogon zizanioides* y dos fármacos.

Source Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	Significant
Modelo	314,33	7	44,90	3794,81	< 0.0001	***
A-Fármaco	4,20	1	4,20	354,52	< 0.0001	***
B-Tiempo	309,02	3	103,01	8705,00	< 0.0001	***
AB	1,11	3	0,3713	31,38	< 0.0001	***
Pure Error	0,1893	16	0,0118			
Cor Total	314,52	23				

Tabla 7.- Ajuste estadístico de parámetros, Desviación estándar (Std. Dev.), Media (Mean), Coeficiente de variación (C.V. %) con *Chrysopogon zizanioides* y cinco fármacos.

Std. Dev.	0,1088	R ²	0,9994
Mean	95,94	Adjusted R ²	0,9991
C.V. %	0,1134	Predicted R ²	0,9986
		Adeq Precision	140,4798

El R² Ajustado de 0,9991 advierte sobre la robustez del modelo adoptado, como se observa en la tabla 7.

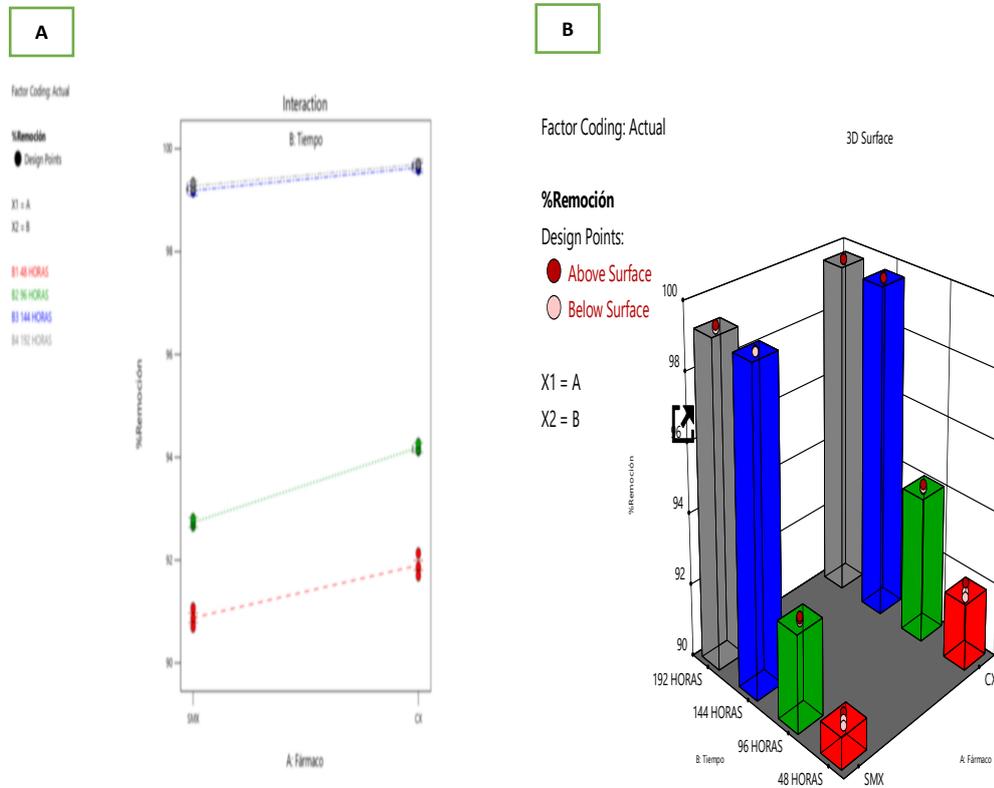


Figura 14.- A) Gráfico de interacciones y B) Codificación de factores para Fármaco (X1) y Tiempo (X2) con *C. zizanioides* y dos fármacos.

El análisis estadístico realizado demostró que existen diferencias significativas (valor- $p < 0.0001$) entre los factores X1 y X2 (Fármaco, Tiempo), lo cual incide en la variable de respuesta que es el porcentaje de remoción. Como se puede visualizar en la figura 14, en el caso del ensayo realizado con la solución de dos fármacos, en un tiempo de experimentación de 192 h, la especie *C. zizanioides* removió más rápido la

ciprofloxacina (CX) que el sulfametaxazol (SMX) entre el periodo de 48 a 96 h, observándose que al final del experimento, el porcentaje de remoción es similar.

Asimismo, se puede evidenciar que el porcentaje de remoción de la disolución de los dos antibióticos (CX, SMX) es muy alta, en el orden del 90,7% al 99,9%. Se observa también que estos porcentajes van aumentando conforme avanza el tiempo del experimento. Se confirma que existen diferencias significativas entre los factores A y B (Fármaco, Tiempo), dado que $P < 0.0001$.

3.1.4 Fitorremediación con *Eichhornia crassipes* para mezcla de productos farmacéuticos

3.1.4.1 Mezcla de cinco productos farmacéuticos

En la tabla 8 se puede visualizar que el valor F del modelo de 190,66 implica que el modelo es significativo. Los valores-p inferiores a 0.0500 (en este caso p-value es < 0.0001) indican que los términos del modelo son significativos. En este caso A, B, AB son términos de modelo significativos.

Tabla 8.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo factorial seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con *Eichhornia crassipes* y cinco fármacos.

Source Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value	Significant
Modelo	182,16	19	9,59	190,66	< 0.0001	***
A=Fármaco	137,74	4	34,44	684,79	< 0.0001	***
B=Tiempo	13,08	3	4,36	86,69	< 0.0001	***
AB	31,34	12	2,61	51,94	< 0.0001	***
Pure Error	2,01	40	0,0503			
Cor Total	184,17	59				

Tabla 9.- Ajuste estadístico de parámetros, Desviación estándar (Std. Dev.), Media (Mean), Coeficiente de variación (C.V. %) con *Eichhornia crassipes* y cinco fármacos.

Std. Dev.	0,2242	R ²	0,9891
Mean	97,98	Adjusted R ²	0,9839
C.V. %	0,2289	Predicted R ²	0,9754
		Adeq Precision	50,2879

En la tabla 9, el R² ajustado de 0,9839 explica la robustez del modelo adoptado.

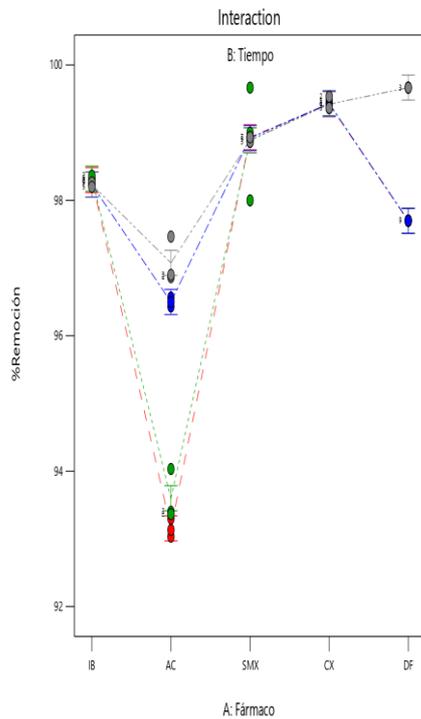
A

Factor Coding: Actual

%Remoción
● Design Points

X1 = A
X2 = B

B1 24 HORAS
B2 48 HORAS
B3 72 HORAS
B4 96 HORAS



B

Factor Coding: Actual

3D Surface

%Remoción

Design Points:

● Above Surface
○ Below Surface

X1 = A

X2 = B

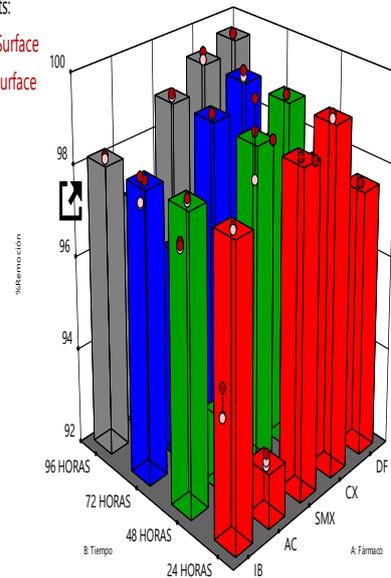


Figura 15.- A) Gráfico de interacciones y B) Codificación de factores para Fármaco (X1) y Tiempo (X2) con *E. crassipes* y cinco fármacos.

El análisis estadístico realizado demostró que existen diferencias significativas (valor- $p < 0.0001$) entre los factores A y B (Fármaco, Tiempo), lo cual incide en el porcentaje de remoción. Puesto que el nivel de un factor depende del nivel de otro factor, es importante evaluar las interacciones.

El acetaminofén se comporta muy diferente a los otros productos farmacéuticos, pues como se puede observar en la figura 15, entre 24 h y 48 h, el porcentaje de remoción es menor; sin embargo, desde las 72 h hasta las 96 h el porcentaje de remoción mejora. Asimismo, se evidencia que la especie *E. crassipes* remueve bastante bien

ciprofloxacina, sulfametoxazol, ibuprofeno, y diclofenaco. El porcentaje de remoción de la solución de cinco fármacos varía de 93,3% a 99,7%, siendo el acetaminofén con menor porcentaje de remoción y el diclofenaco con el porcentaje mayor de remoción.

3.1.4.2 Mezcla de dos productos farmacéuticos

En la tabla 10 se puede observar que el valor F del modelo de 49,76 implica que el modelo es significativo. Los valores-p inferiores a 0.0500 (en este caso p-value es < 0.0001, 0,0335, 0,0138) indican que los términos del modelo son significativos. En este caso A, B, AB son términos significativos del modelo.

Tabla 10.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo factorial seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con *Eichhornia crassipes* y dos fármacos.

Source Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	significant
Modelo	0,4469	7	0,0638	49,76	< 0.0001	***
A=Fármaco	0,0069	1	0,0069	5,41	0,0335	***
B=Tiempo	0,4213	3	0,1404	109,46	< 0.0001	***
AB	0,0187	3	0,0062	4,85	0,0138	***
Pure Error	0,0205	16	0,0013			
Cor Total	0,4674	23				

Tabla 11.- Ajuste estadístico de parámetros, Desviación estándar (Std. Dev.), Media (Mean), Coeficiente de variación (C.V. %) con *Eichhornia crassipes* y dos fármacos.

Std Dev.	0,0358	R ²	0,9561
Mean	99,79	Adjusted R ²	0,9469
C.V. %	0,0359	Predicted R ²	0,9312
		Adeq Precision	20,3896

El R² ajustado de 0,9469 implica que el modelo adoptado es robusto.

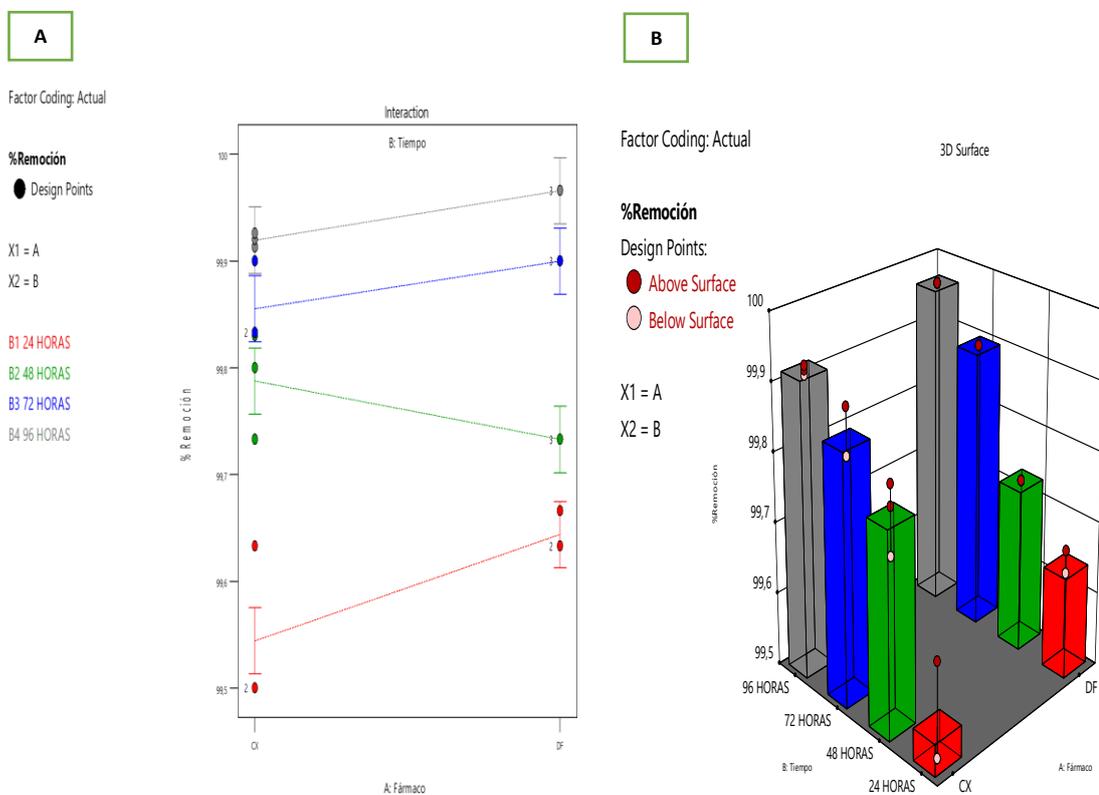


Figura 16.- A) Gráfico de interacciones y B) Codificación de factores Fármaco (X1) y Tiempo (X2) con *E. crassipes* y dos fármacos.

El análisis estadístico realizado demostró que existen diferencias significativas (valor- $p < 0.0001$) entre los factores X1 y X2 (Fármaco, Tiempo), lo cual incide en el porcentaje de remoción.

Como se puede evidenciar en la figura 16, *E. crassipes* removió en forma eficiente los dos fármacos (CX, DF), dado que el porcentaje de remoción es muy alto, del orden del 99,6 % a 99,9%. Sin embargo, es importante señalar que el porcentaje de remoción de ciprofloxacina es menor que diclofenaco en las primeras 24 h, aspecto que se vuelve tendencia durante las 96 h del experimento, salvo en el tiempo de 48 h, donde el porcentaje de remoción de ciprofloxacina es ligeramente mayor.

3.1.5 Estrés oxidativo de *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes*

Se llevó a cabo procesos de extracción y electroforesis SDS-PAGE para ver el perfil proteico. Se trabajó con las dos especies vegetales de estudio para la extracción de proteínas de tallos y raíces, las pruebas se realizaron con ciprofloxacina a 3mg/L frente a un control que no contenía el fármaco. Cabe indicar que *E. crassipes* fue expuesta a una solución de ciprofloxacina a 3 mg/L de concentración por un tiempo de 24 h.

Se utilizó el marcador ***Standard Broad Range*** para la estimación del peso molecular en geles SDS-PAGE, como se puede ver en las figuras 17 y 18.

Se obtuvo geles de extractos de proteínas de tallos y raíces de *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes* utilizando el método de ácido tricloroacético-acetona (TCA-acetona).

En la figura 17, en los geles de electroforesis corridos con muestras extraídas de raíces y tallos de las plantas de *C. zizanioides* usadas para la remoción de la ciprofloxacina, se pudo detectar un incremento general en la presencia de proteínas con respecto al control (I) y el marcador (MM). Se evidenció la presencia de dos proteínas de aproximadamente 56,2 kDa y 35,8 kDa.

Se observa que en las líneas indicadas con (K), (M) y (O), que son muestras que contienen proteínas de tallos de *C. zizanioides* con ciprofloxacina, y en el control que no contenía el fármaco se expresa una banda proteica intensa ca de aproximadamente 56,2 kDa

Además, en las tres muestras de tallo (K, M, O con ciprofloxacina) se expresan dos bandas de un peso aproximado de 35,8 kDa, que no se observa en la muestra control (sin fármaco).

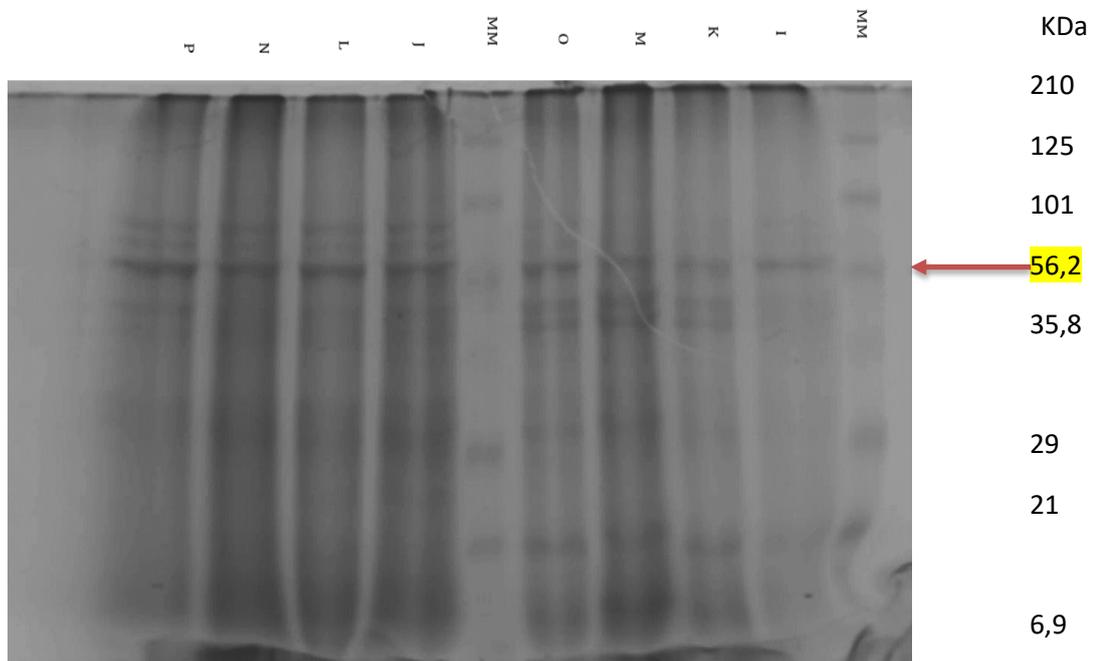


Figura 17.- Gel de extractos de proteínas obtenidos utilizando el método TCA-acetona de tallos y raíces de *Chrysopogon zizanioides*. MM= Standard Broad Range; I = Proteína de tallo; K= Proteína de tallo + CX; M= Proteína de tallo +CX; O = Proteína de tallo + CX; J= Proteína de raíz; L= Proteína de raíz + CX; N= Proteína de raíz +CX; P= Proteína de raíz + CX

Asimismo, se puede observar que ocurre lo mismo con las líneas señaladas con (L), (N) y (P), que corresponden a muestras que contienen proteínas de raíces de *C. zizanioides* con ciprofloxacina, cuyo control está indicado con (J) que es una muestra que contiene proteína de raíz de esta planta sin el fármaco.

En la figura 18, se observa que el mismo fenómeno ocurre con *E. crassipes*, luego de haber sido expuesta al mismo tipo de solución de ciprofloxacina.

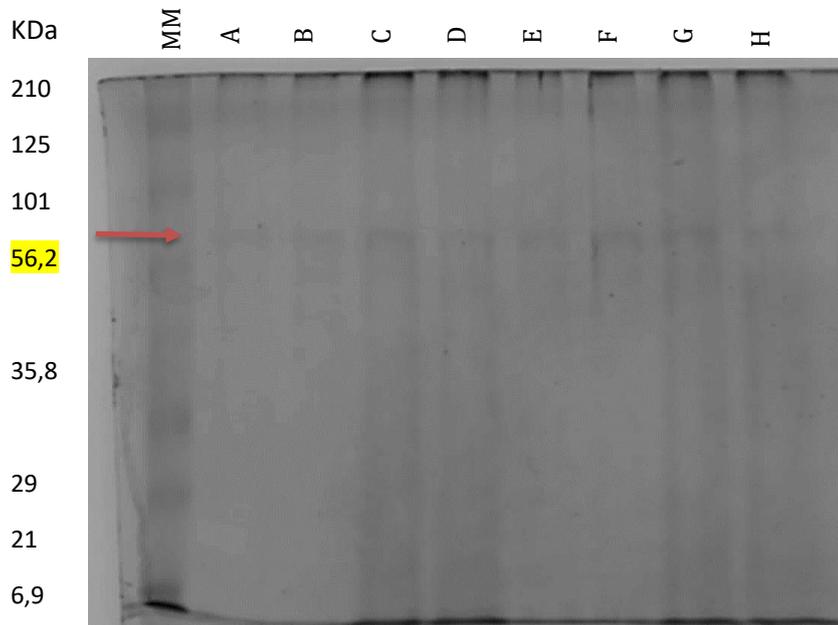


Figura 18.- Gel de extractos de proteínas obtenidos utilizando el método TCA-acetona de tallos y raíces de *Eichhornia crassipes*. MM= Standard broad Range; A = Proteína de tallo; B= Proteína de raíz; C= Proteína de tallo + CX; D= Proteína de raíz +CX; E = Proteína de tallo + CX; F= Proteína de raíz + CX; G= Proteína de tallo + CX; H= Proteína de raíz + CX

Se puede visualizar que en las líneas señaladas con (C), (E) y (G), que son muestras que contienen proteínas de tallos *E. crassipes* con ciprofloxacina, la banda de proteínas se tiñe de tonos más oscuros al nivel de los 56,2 KDa del marcador Standard Broad Range (MM), similar que aquella banda de proteínas del control (A), que no contiene el fármaco.

De la misma manera, ocurre con las líneas señaladas con (D), (F) y (H), que corresponden a muestras que contienen proteínas de raíces de *E. crassipes* con

ciprofloxacina, cuyo control está indicado con (B) que es una muestra que contiene proteína de raíz de esta planta sin el fármaco.

3.1.6 Evaluación del proceso de fitorremediación a mayor escala en laboratorio

3.1.6.1 Ensayos con *Chrysopogon zizanioides* a mayor escala en laboratorio

En la tabla 12 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para el modelo seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con *Chrysopogon zizanioides*. La suma de cuadrados es Tipo II Clásico. El valor F del modelo de 11,38 implica que el modelo es significativo. Sólo hay un 0,02% de probabilidades de que un valor F tan grande podría ocurrir debido al ruido. Los valores P inferiores a 0.0500 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso A es un término del modelo significativo. Adequate Precision mide la relación señal-ruido, una relación mayor que 4 es deseable. Su relación de 7.611 indica una señal adecuada para el modelo.

Tabla 12.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con *Chrysopogon zizanioides*.

Source Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value	
	1,15	3	0,3830	11,38	0,0029	Significant
A= <i>C. zizanioides</i> (vetiver)	1,15	3	0,3830	11,38	0,0029	
Pure Error	0,2693	8	0,0337			
Cor Total	1,42	11				
Std. Dev.	0,1835					
Mean	87,72					
C.V. %	0,2092					
Adequate Precision	7,6112					

*Modelo de origen (Source Model), Suma de cuadrados (Sum of Squares), Grados de Libertad (df), Cuadrada media (Mean Square), Desviación estándar (Std.Dev.), Mean (Media), Coeficiente de variación (C.V. %), Precisión adecuada (Adequate Precision).

Factor Coding: Actual

% de remoción

● Design Points

(1 = A

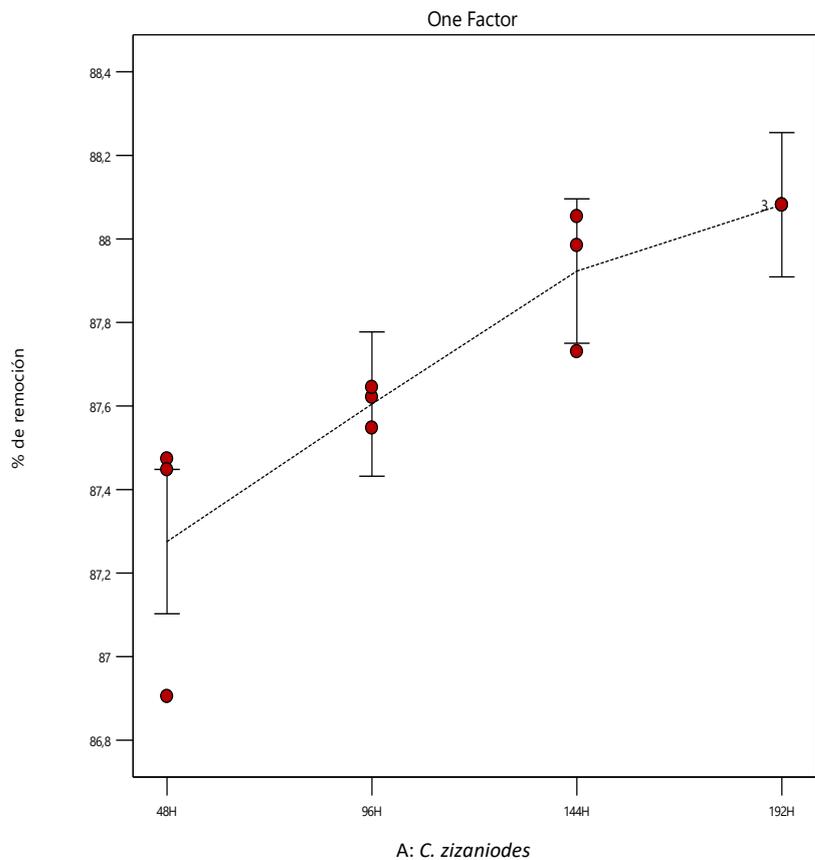


Figura 19.- Gráfica de caja del ANOVA para el porcentaje de remoción de ciprofloxacina por parte de *C. zizanioides* en función del tiempo.

El análisis estadístico realizado demostró que existe diferencias significativas porque valor- $p < 0,005$, en el caso de estudio valor- $p = 0.0029$. Se observa en la figura 19, que *Chrysopogon zizanioides* (vetiver) es eficiente en la remoción de ciprofloxacina en el proceso de fitorremediación implementado a mayor escala. La media estimada de porcentaje de remoción varía de 87,28% a 88,08% como se puede corroborar en la tabla

13, donde se visualiza que el error estándar es 0,1059, valor cercano a cero que significa un casi nulo error aleatorio.

Tabla 13.- Tratamiento de la media de porcentajes de remoción con *Chrysopogon zizanioides*.

Treatment	Estimated Mean	Standard Error
1-48 h	87,28	0,1059
2-96 h	87,60	0,1059
3-144 h	87,92	0,1059
4-192 h	88,08	0,1059

3..1.6.2 Ensayos con *Eichhornia crassipes* a mayor escala en laboratorio

En la tabla 14 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para el modelo seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con *Eichhornia crassipes*. La suma de cuadrados es Tipo II Clásico. El valor F del modelo de 24,16 implica que el modelo es significativo. Sólo hay un 0,02% de probabilidades de que un valor F tan grande podría ocurrir debido al ruido. Los valores-p inferiores a 0.0500 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso, A es un término del modelo significativo. Adequate Precision mide la relación señal-ruido. Una relación mayor que 4 es deseable, de tal forma que su relación de 9.925 indica una señal adecuada del modelo.

Tabla 14.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con *Eichhornia crassipes*.

Source Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value	Significant
Modelo	53,92	3	17,97	24,16	0,0002	***
<i>E. crassipes</i> (jacinto de agua)	53,92	3	17,97	24,16	0,0002	***
Pure Error	5,95	8	0,7439			
Cor Total	59,87	11				
Std.Dev.	0,8625					
Mean	86,78					
C.V. %	0,9940					
Adequate Precision	9,9246					

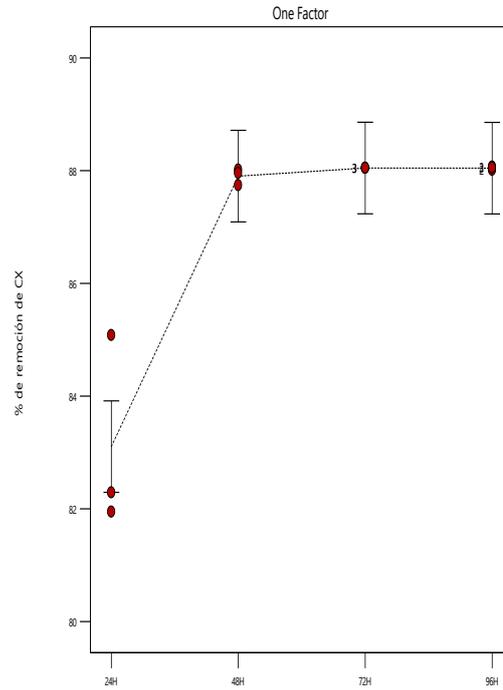
*Modelo de origen (Source Model), Suma de cuadrados (Sum of Squares), Grados de Libertad (df), Cuadrada media (Mean Square), Desviación estándar (Std.Dev.), Mean (Media), Coeficiente de variación (C.V. %), Precisión adecuada (Adequate Precision).

Factor Coding: Actual

% de remoción de CX

● Design Points

X1 = A



A: *E. crassipes*

Figura 20.- Gráfica de caja del ANOVA para el porcentaje de remoción de ciprofloxacina por parte de *E. crassipes* en función del tiempo.

El análisis estadístico realizado demostró que existe diferencias significativas porque en este caso, $\text{valor-p} < 0,005$ ($\text{valor-p} = 0.002$). En la figura 20 se observa que hay diferencias significativas entre las 24 h y los demás tiempos de remoción, mientras que entre los tiempos 48, 72 y 96 h no existen diferencias significativas. Se puede evidenciar también que *E. crassipes* (jacinto de agua) es eficiente en la remoción de ciprofloxacina en el proceso de fitorremediación implementado a mayor escala. La media estimada de porcentaje de remoción varía de 83,10% a 88,04% como se puede

corroborar en la tabla 15, donde se visualiza que el error estándar es 0,4980, valor por debajo 0,5 que significa un error aleatorio aceptable.

Tabla 15.- Tratamiento de la media de porcentajes de remoción con *Eichhornia crassipes*.

Treatment	Estimated Mean	Standard Error
1-24 h	83,10	0,4980
2-48 h	87,90	0,4980
3-72 h	88,05	0,4980
4-96 h	88,04	0,4980

3.1.6.3 Ensayos con *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes* a mayor escala en laboratorio

En la tabla 16 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para el modelo seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes*. La suma de cuadrados es Tipo II Clásico. El valor F del modelo de 84,78 implica que el modelo es significativo. Sólo hay un 0,01% de probabilidades de que un valor F tan grande podría ocurrir debido al ruido. Los valores P inferiores a 0.0500 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso, A es un término modelo significativo. Adequate Precision

mide la relación señal-ruido. Una relación mayor que 4 es deseable. Su relación de 25.829 indica una señal adecuada del modelo.

Tabla 16.- Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo seleccionado, donde la variable de respuesta es el porcentaje de remoción con *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes*.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value		p-value	significant
Model	3,27	5	0,6548	84,78		< 0.0001	***
A=JACINTO+VETIVER	3,27	5	0,6548	84,78		< 0.0001	***
Pure Error	0,0927	12	0,0077				
Cor Total	3,37	17					
Std. Dev.	0,0879						
Mean	88,05						
C.V. %	0,0998						
Adequate Precision	25,8293						

*Modelo de origen (Source Model), Suma de cuadrados (Sum of Squares), Grados de Libertad (df), Cuadrada media (Mean Square), Desviación estándar (Std.Dev.), Mean (Media), Coeficiente de variación (C.V. %), Precisión adecuada (Adequate Precision).

Factor Coding: Actual

% de remoción de CX

● Design Points

X1 = A

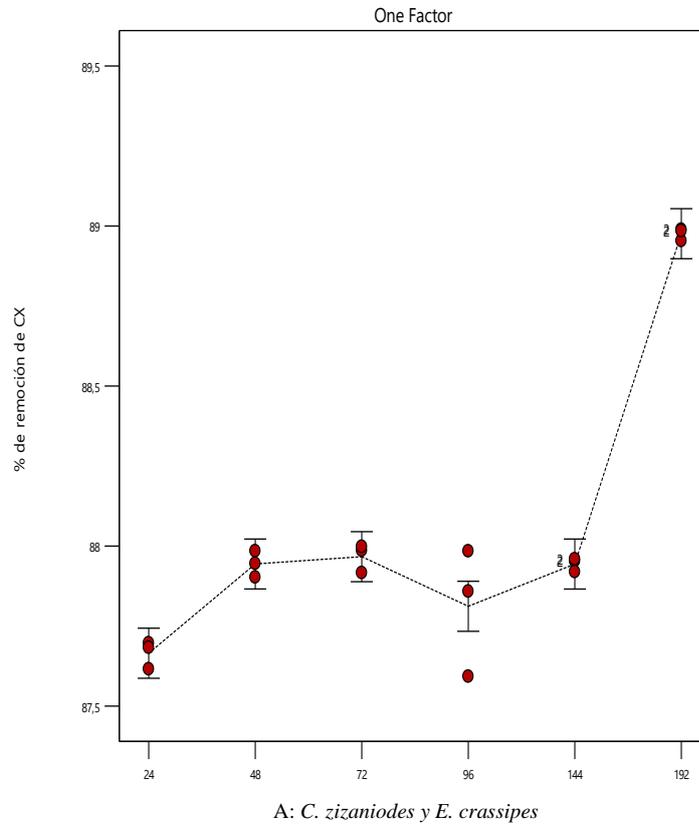


Figura 21.- Gráfica de caja del ANOVA para el porcentaje de remoción de ciprofloxacina por parte de *C. zizanioides* y *E. crassipes* en función del tiempo

El análisis estadístico realizado demostró que existe diferencias significativas porque valor- $p < 0,005$, en el caso de estudio valor- $p < 0.0001$. En la figura 21, se visualiza que el porcentaje de remoción de ciprofloxacina va creciendo hasta las 72 h, luego desciende ligeramente hasta las 96 h y vuelve a crecer hasta el final del experimento a las 192 h. Se evidencia también que, el sistema *C. zizanioides* (*vetiver*) - *E. crassipes* (*jacinto de agua*) es eficiente en la remoción de ciprofloxacina en el proceso de fitorremediación implementado a mayor escala. La media estimada de porcentaje de

remoción varía de 87,67% a 88,98% como se puede corroborar en la tabla 17, donde se visualiza que el error estándar es 0,05707, valor muy cercano a cero que significa un error aleatorio casi nulo.

Tabla 17.- Tratamiento de la media de porcentajes de remoción con *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes*.

Treatment	Estimated Mean	Standard Error
1-24 h	87,67	0,0507
2-48 h	87,94	0,0507
3-72 h	87,97	0,0507
4-96 h	87,81	0,0507
5-144 h	87,94	0,0507
6-192 h	88,98	0,0507

Los resultados obtenidos presentan un gran interés científico, luego del proceso de análisis científico y estadístico, los mismos que son discutidos en el siguiente acápite.

3.2 DISCUSIÓN

3.2.1 Remoción de fármacos con *Chrysopogon en zizanioides* en soluciones acuosas de cada uno de los productos farmacéuticos.

Los valores de porcentajes de remoción obtenidos en este estudio para el Sulfametoxazol por parte de *C. zizanioides*, alcanzaron un porcentaje máximo de 66,53% a las 192 h (Figura 11A), valor de remoción que resulta no óptimo. Al analizar el ascenso de la curva de absorción, se visualiza que para encontrar el óptimo sería necesario reducir las concentraciones e incrementar el tiempo. Cabe mencionar que estos resultados se pueden correlacionar con los valores de absorción del Sulfametoxazol obtenidos en otros estudios, como por ejemplo, se ha registrado un porcentaje de remoción de alrededor del 19% de este fármaco, únicamente después de 24 h de exposición de plantas de col china y espinaca de agua, en soluciones de Sulfametoxazol con una concentración de 100 mg/L (Chen et al., 2017).

En el caso de la ciprofloxacina *C. zizanioides* fue muy eficiente, pues al analizar las muestras correspondientes a este fármaco, se obtuvieron valores óptimos del 98,32% de remoción a las 149 h (Figura 11B) con una concentración de 3 mg/L, estos resultados son similares a un estudio donde se alcanzó una remoción del 97% de ciprofloxacina en un período experimental de 30 días, en plantas de *C. zizanioides*

expuestas a 0,05 y 0,1 mg/L de este antibiótico, y 80% y 85% de remoción respectivamente al ser expuestas a soluciones con concentraciones de 1 a 10 mg/L de ciprofloxacina (Panja, Sarkar, Li, & Datta, 2019).

Los ensayos realizados con ibuprofeno para evidenciar la capacidad de *C. zizanioides* como agente de fitoremediación de este fármaco, arrojaron resultados favorables con un porcentaje de remoción máximo de 73,33% a las 192 h (Figura 11C). En otro estudio, se demostró que el ibuprofeno puede ser removido de un medio acuoso en su totalidad por la especie *Phragmites australis* después de 21 días de exposición, a una concentración de 60 mg/L (He et al., 2017). Bajo estos parámetros es posible que *Chrysopogon zizanioides* tenga la misma capacidad de remoción con respecto al ibuprofeno, por lo que se sugieren ensayos a futuro que consideren tiempos prolongados de exposición de esta especie vegetal en medio acuoso con este fármaco.

En este estudio, se logró un porcentaje máximo de remoción del 73,33% del diclofenaco a las 192 h, lo mismo que el ibuprofeno (Figura 11D), los valores máximos obtenidos en este estudio resultan semejantes a otros reportes donde se usaron especies vegetales para determinar sus capacidades de absorción del diclofenaco, como es el caso de la especie *Typha latifolia* que fue el objeto de estudio de (Bartha, Huber, & Schröder, 2014), quienes demostraron que dicha especie es capaz de absorber un máximo del 80% del diclofenaco presente en una solución de este fármaco con una concentración de 1mg/L.

En la presente investigación, *C. zizanioides* fue menos eficiente con la absorción del acetaminofén, pues se obtuvo un porcentaje de 38,49% a las 192 h (Figura 11E) a una concentración de 3 mg/L, siendo este valor de remoción el menor registrado entre los cinco fármacos analizados en este estudio. Varias pueden ser las razones de este valor reducido, incluyendo las características del fármaco y su compatibilidad con la estructura de la especie vegetal evaluada. En un estudio usando *Brassica juncea*, el porcentaje de remoción para el acetaminofén alcanzó el 60% en 165 h a una concentración de 1mM que corresponde a aproximadamente a 150 mg/L (Bartha, Huber, Harpaintner, & Schröder, 2010).

Asimismo, se ha reportado en varios informes que *C. zizanioides* tiene la capacidad de remover fenol, tetraciclina y 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) del sustrato en el que crece (Panja, Sarkar, & Datta, 2018). *C. zizanioides* puede considerarse como uno de los mejores fitorremediadores de la acrilamida por ser una planta perenne con gran biomasa y un sistema radicular largo, denso y extendido, por lo que esta planta es capaz de absorber acrilamida en el suelo durante un largo período de tiempo (Paz-Alberto & Sigua, 2013).

En comparación con otras plantas, *C. zizanioides* es más eficiente en la absorción de ciertos metales pesados y productos químicos debido a la capacidad de su sistema de raíces para alcanzar mayores profundidades y volumen. Asimismo, se descubrió que esta planta es altamente tolerante en condiciones extremadamente adversas, por lo tanto, se puede utilizar para la rehabilitación de relaves mineros, vertederos de basura

y vertederos de desechos industriales, que a menudo son extremadamente ácidos o alcalinos, ricos en metales pesados y bajos en nutrientes para las plantas (Suelee et al., 2017). Adicionalmente, sostienen que las plantas pueden limpiar muchos tipos de contaminantes como metales, pesticidas, aceites y explosivos (Shikha & Gauba, 2016).

Por otra parte, *C. zizanioides* es una planta xerofítica e hidrofítica que tiene varias cualidades excepcionales como la tolerancia a las condiciones de agua caliente, estabilización y rehabilitación de pendientes, conservación del suelo y el agua, recuperación de tierras degradadas, estabilización de dunas costeras, control de erosión, rehabilitación ecológica, tolerancia a diferentes tipos de contaminantes orgánicos e inorgánicos y crecimiento en suelos contaminados (Suleiman, Bhat, Jacob, & Al-Burais, 2018).

Es importante señalar que *C. zizanioides* se mantuvo fresca y saludable durante las 192 h que duró el experimento, en todas las soluciones preparadas a las cuatro concentraciones consideradas en este estudio, lo que demuestra que es una especie resistente y apropiada para la fitorremediación de estos contaminantes emergentes, esto es consistente con otros reportes que indican esta especie fue muy resistente, inclusive a la radiación en comparación con otras plantas (Roongtanakiat & Akharawutchayanon, 2017). En otro estudio se demostró un crecimiento normal y aparentemente saludable de *C. zizanioides* por un periodo de 12 meses en un suelo contaminado por una mina de hierro (Banerjee, Goswami, Lavania, Mukherjee, & Lavania, 2019).

Los resultados obtenidos en este estudio reflejan la eficiencia del vetiver (*C. zizanioides*) en la remoción de los cinco fármacos del estudio, lo que demuestra que esta técnica de fitorremediación probada a nivel laboratorio puede ser prometedora a mayor escala, siendo coherente con lo probado en 1995 en Queensland, Australia, donde este pasto, fue reconocido por primera vez por tener características "súper absorbentes" adecuadas para la remoción de lixiviados y efluentes generados en vertederos y plantas de tratamiento de aguas residuales, lo cual fue corroborado por científicos chinos en 1997 y desde entonces el denominado Sistema Vetiver se ha utilizado con éxito para estos fines en Australia, China y Tailandia (Maharjan & Pradhanang, 2017; Panja et al., 2018).

La especie *C. zizanioides* (vetiver) está connotando la atención mundial como un medio natural para diversas aplicaciones ambientales, incluyendo la desintoxicación de suelos y agua contaminados (Kiiskila, Li, Sarkar, & Datta, 2020).

3.2.2 Remoción de fármacos con *Chrysopogon zizanioides* de soluciones acuosas con mezclas de productos farmacéuticos

En el caso de *C. zizanioides*, los resultados obtenidos para las mezclas de cinco fármacos estudiados son más elevados que cuando se evaluó individualmente, como se puede observar en la figura 13, lo que indica que la interacción entre los compuestos

farmacéuticos actuando en conjunto ha provocado una respuesta mayor a la suma de los efectos que provocarían por separado. Este fenómeno se conoce como efecto sinérgico.

De igual forma, el porcentaje de remoción de la solución de dos fármacos de sulfametoxazol y ciprofloxacina (SMX, CX) es muy alta, del orden del 90,7% al 99,9%, como se puede visualizar en la figura 14, lo cual guarda coherencia con lo reportado por (Panja, Sarkar, & Datta, 2020), que indica que el sistema vetiver se está adaptando en todo el mundo debido a su capacidad de remoción y alta tolerancia a varios contaminantes orgánicos e inorgánicos tóxicos. En el referido estudio, se observó una remoción significativa ($p < 0.05$) de esta mezcla de fármacos. En dicho estudio investigaron el potencial del vetiver (*C. zizanioides*), para eliminar dos antibióticos ampliamente recetados, ciprofloxacina y tetraciclina, logrando una remoción de más del 90% de antibióticos de la matriz secundaria de aguas residuales. Se observó una remoción significativa ($p < 0.05$) de esta mezcla de fármacos.

3.2.3 Remoción de fármacos con *Eichhornia crassipes* en soluciones acuosas de cada uno de los productos farmacéuticos.

Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de *Eichhornia crassipes* para remover los cinco fármacos estudiados en medio acuoso en un periodo experimental

de 96 h a diferentes concentraciones consideradas en esta investigación (3, 6, 9 y 12 mg/L).

En este escenario, *E. crassipes* presentó un porcentaje de remoción bajo de sulfametaxazol (Figura 12A), se observó que el mayor porcentaje de remoción de 36,05% se obtuvo con la concentración más baja (3 mg/L) a las 24 h. En otro estudio realizado por Cui (2016), se ha logrado una alta eficiencia del 70% al 90% de remoción de sulfametoxazol, en el mismo periodo de tiempo con *Typha latifolia*, lo que implica que existen otras especies que pueden remover este fármaco de mejor forma que *E. crassipes*.

En el caso de la ciprofloxacina (Figura 12B), se visualiza que el valor óptimo de remoción al 91,18% se da con una concentración de 3 mg/L en un tiempo de 96 h, lo que informa del alto poder de absorción de *E. crassipes*.

Asimismo, *E. crassipes* presentó una capacidad de remoción aceptable en el caso del ibuprofeno (Figura 12C), ya que se observa un valor óptimo en el porcentaje de remoción 65,04% con una concentración de 12 mg/L en un tiempo de 60 h. Estos resultados son comparables con la investigación de (Madikizela, Ncube, & Chimuka, 2018), que reportó que *Typha* eliminó casi el 60% de ibuprofeno en las primeras 24 h, logrando una remoción superior al 99%, en una solución de ibuprofeno con una concentración inicial de 20 mg/L, en un periodo de 21 días.

En el caso del diclofenaco (Figura 12D), *E. crassipes* fue muy eficiente, se observa que alcanza un porcentaje de remoción de 95.01%, a una concentración de 3mg/L en un tiempo de 24h. Por el contrario, con una concentración alta de 12mg/L, el porcentaje de remoción inicia con 23,32% y a medida que aumenta el tiempo, el porcentaje de remoción se incrementa. Según (He et al., 2017), *Phragmites australis* removió 18% de diclofenaco en soluciones con concentraciones de 30 mg/L, en un periodo de 14 días.

Se observa un comportamiento diferente de *E. crassipes* en cuanto al acetaminofén (Figura 12E) en la que se presentan dos casos, el primero muestra que con una concentración de 3 mg/L y a medida que aumenta el tiempo se alcanza un porcentaje máximo de remoción de 71,09%. Para el segundo caso, con una concentración de 12 mg/L y a medida que aumenta el tiempo se alcanza un máximo de remoción de 70,57%.

Según Cardinal et al. (2014), algunas especies de plantas acuáticas, *Ipomoea aquatica*, *Azolla caroliniana*, *Lemna minor*, *Phragmites australis*, *Typha latifolia*, *Salix atrocinerea* y *Scirpus validushan*, *Eichhornia crassipes* han demostrado capacidad para remover ibuprofeno, diclofenaco, sulfametaxazol y acetaminofén de las aguas residuales, logrando una alta eficacia de remoción de entre el 70% y 90%.

Los resultados obtenidos en esta investigación reflejan la capacidad de *E. crassipes* en la remoción de los cinco fármacos de estudio, lo que demuestra que esta técnica de fitorremediación probada a nivel laboratorio puede ser prometedora a mayor escala, siendo coherente con lo reportado por la literatura científica.

Al realizar una comparación entre los porcentajes máximos de remoción obtenidos en esta primera fase de experimentos (Tabla 18), se puede evidenciar que *C. zizanioides* y *E. crassipes* presentan una alta eficiencia en la remoción del antibiótico ciprofloxacina en una solución acuosa con 3mg/L de concentración, de 98,32% y 91,18% respectivamente. En cuanto al diclofenaco, *E. crassipes* alcanzó una máxima remoción del 95%, mientras que *C. zizanioides* presentó un máximo porcentaje de remoción del 73,33%. Para ibuprofeno *C. zizanioides* presentó un máximo porcentaje de remoción del 73,33% y *E. crassipes* alcanzó un máximo porcentaje de remoción del 65,04%.

Con *E. crassipes* se logró un máximo porcentaje de remoción de acetaminofén de 71,09%, mientras que con *C. zizanioides* se obtuvo un máximo porcentaje de remoción de 38,49%. En el caso del sulfametoxazol, *C. zizanioides* presentó un máximo porcentaje de remoción de 65,53%, en tanto que con *E. crassipes* se obtuvo un porcentaje máximo de remoción de 36,05%.

Estos resultados permiten visualizar que el porcentaje de absorción de los fármacos varía significativamente entre las dos especies investigadas, lo que implica que estos seres vivos son dinámicos en su comportamiento al ser expuestos a estímulos externos, como es el caso de los diferentes fármacos estudiados, las diferentes concentraciones y los propios mecanismos de absorción de las raíces de las plantas en medios hidropónicos (Panja et al., 2020; Mishra & Maiti, 2017).

Tabla 18.- Máximos porcentajes de remoción obtenidos considerando soluciones independientes de cada fármaco con las dos especies de estudio

Fármaco	<i>C. zizanioides</i> % remoción	<i>E. crassipes</i> % remoción
SMX	65,53	36,05
CX	98,32	91,18
AC	38,49	71,09
IBU	73,33	65,04
DC	73,33	95,01

En este escenario, como órgano primario de absorción, las raíces de *C. zizanioides* y *E. crassipes* pueden absorber los fármacos de estudio, en un contexto muy dinámico que depende de la solubilidad, polaridad y los canales de absorción que las plantas activen en este proceso (Cui, 2016).

De acuerdo con lo reportado por este mismo autor, al tratarse de sustancias polares, poco solubles en agua y poco biodegradables, como es el caso de los fármacos estudiados por su naturaleza orgánica (Figuras 1, 2, 3, 4 y 5), entre otras cosas por poseer un coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) debajo de 5 como se puede visualizar en la tabla 20, el mecanismo de absorción posiblemente sería el de fitoestabilización, el mismo que consiste en la absorción y acumulación de los contaminantes en las raíces, por captación pasiva a través de la vía apoplástica, esta vía

consiste en el transporte de agua y minerales a través del apoplasto, que incluye las paredes celulares, el xilema y el espacio intercelular entre células de las raíces de las plantas (Pourrut et al., 2011).

La acumulación de contaminantes en la rizosfera de las plantas se puede dar por varios procesos, entre ellos el denominado flujo de masas, que consiste en el movimiento del agua y los contaminantes de la solución hacia la raíz, debido a la pérdida de agua por la transpiración de la planta, lo cual crea una fuerza de succión por la diferencia de presión de agua entre el interior y exterior de la planta (McGrath et al., 2002; Darrah et al., 2006).

Esta explicación es coherente con las características morfológicas y fisiológicas de las dos especies estudiadas que presentan un alto grado de transpiración. De igual forma se puede mencionar que ambas especies son poseedoras de un gran sistema radicular que crece a buen ritmo y alcanzan longitudes de más de cinco metros en el caso de *C. zizanioides* y de entre dos a tres metros en el caso de *E. crassipes*.

Adicionalmente, por tratarse de especies vegetales estudiadas bajo condiciones controladas y de asepsia, lo que elimina la posibilidad de acción de otros factores y microorganismos, esta investigación indica que *C. zizanioides* y *E. crassipes* son las únicas responsables de la remoción de los cinco fármacos estudiados del medio acuoso.

3.2.4 Remoción de fármacos con *Eichhornia crassipes* de soluciones acuosas con mezclas de productos farmacéuticos

En el caso de *E. crassipes*, los resultados obtenidos para las mezclas de cinco fármacos estudiados son más elevados que cuando se evaluó individualmente, como se puede observar en la figura 15, produciéndose el fenómeno conocido como efecto sinérgico, lo que indica que la interacción entre los compuestos farmacéuticos actuando en conjunto ha provocado una respuesta mayor a la suma de los efectos que se obtuvo por separado. Es un aspecto similar a lo ocurrido con *C. zizanioides*.

Por otra parte, *E. crassipes* removió en forma eficiente la mezcla de los dos fármacos ciprofloxacina (99,6%) y diclofenaco (99,9%), como se puede ver en la figura 16, lo cual se podría comparar con el trabajo realizado por (Gupta & Balomajumder, 2015), quienes encontraron que *E. crassipes* pudo captar más del 99% del fenol en una solución única y doble de Cromo y Phenol (a 10 mg/L), en 14 y 11 días respectivamente.

Al comparar los resultados obtenidos en la presente investigación por fitorremediación de *C. zizanioides* y *E. crassipes*, considerando soluciones independientes, soluciones de cinco fármacos juntos y sus máximos porcentajes de remoción, se puede corroborar el efecto sinérgico ocurrido, como se establece en la tabla 19.

Tabla 19.- Máximos porcentajes de remoción obtenidos considerando soluciones independientes y soluciones de cinco fármacos juntos (efecto sinérgico), con las dos especies de estudio.

Fármaco	<i>C. zizanioides</i> % remoción (Independiente)	<i>C. zizanioides</i> % remoción (Mezcla)	<i>E. crassipes</i> % remoción (Independiente)	<i>E. crassipes</i> % remoción (Mezcla)
SMX	65,53	99,2	36,05	98,9
CX	98,32	99,4	91,18	99,4
AC	38,49	94,6	71,09	97,4
IBU	73,33	99,6	65,04	98,2
DC	73,33	99,4	95,01	99,7

Asimismo, en la tabla 20, se puede observar que los porcentajes de remoción de los fármacos son diferentes para cada especie estudiada, lo que indica que la remoción depende de la naturaleza del producto farmacéutico, de la especie de planta seleccionada, de la concentración y del tiempo de exposición.

Cui (2016), explica que, debido a sus estructuras polares poco solubles en agua y baja degradación, se puede afirmar que los fármacos de estudio son persistentes y no se adsorben en el subsuelo, por lo tanto, se pueden encontrar en el medio acuático. Gracias a esta condición, este tipo de contaminantes emergentes pueden ser absorbidos con facilidad por las raíces de ciertas plantas hiper acumuladoras como lo son *C. zizanioides*

y *E. crassipes*. Asimismo, este autor indica que el proceso de remoción biológica de contaminantes por plantas incluye varios mecanismos como absorción, adsorción y degradación. Adicionalmente confirma en su investigación que las concentraciones de los fármacos polares no mostraron ningún cambio en los controles durante el período experimental, lo que indicaría que la fotodegradación y la adsorción superficial parecen ser insignificantes comparados con el proceso de absorción, por lo que se concluye que la principal forma de absorción de fármacos polares durante el período experimental es la absorción por las raíces de las plantas.

Tabla 20.- Características físico químicas de los fármacos de estudio.

Fármaco	pKa	log Kow	pH	Peso molecular g/mol	Grupo	Formula molecular	Tipo de molécula
Ciprofloxacina	6,1	1,32	6,5	331,3	Fluoroquinolonas	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	Polar
Sulfametoxazol	5,9	0,89	6,5	253,3	Sulfonamida	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	Polar
Ibuprofeno	5,2	3,14	6,5	206,3	Ácido propiónico	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	Polar
Diclofenaco	4,2	4,51	6,5	318,1	Ácido mono carboxílico	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ N O ₂	Polar
Acetaminofén	6,7	0,49	6,5	151,2	Ácido débil	C ₈ H ₉ N O ₂	Polar

Fuente. - National Center for Biotechnology Information, 2020

Es importante señalar que *E. crassipes*, posee un mecanismo de defensa frente a las aguas contaminadas que consiste en absorber el agua y multiplicarse rápidamente, ahí

puede radicar una de las razones de la rápida y potente absorción de fármacos. Mientras que *C. zizanioides* no se multiplica con la misma rapidez que *E. crassipes*, tal vez por eso, *C. zizanioides* absorbe el agua y por tanto los contaminantes de manera relativamente más lenta. Se ha reportado una alta tasa de multiplicación de *E. crassipes*, podría duplicarse su número en un periodo de siete días en condiciones adecuadas de temperatura y humedad (Mishra & Maiti, 2017).

Las especies *C. zizanioides* y *C. zizanioides*, poseen características fisiológicas especiales que implica la tolerancia a un amplio rango de pH de 3.3 a 12.5; alto nivel de tolerancia a herbicidas y pesticidas, alta eficiencia en la absorción de metales pesados y de nutrientes como el fósforo y nitrógeno en aguas contaminadas (Truong & Tan Van, 2008; Mathew et al., 2016; Mishra & Maiti, 2017).

Según Shalini A. et al. (2013), se utilizaron cinco especies diferentes de plantas de humedales para probar su eficiencia en la remoción de los antibióticos fluoroquinolónicos de uso común (que no se degradan fácilmente), como son, ciprofloxacina, mesilato de gemifloxacina, ofloxacina y gatifloxacina de medio acuoso. Para la remoción de ciprofloxacina, las especies *Chrysopogon zizanioides*, *Taxodium distichum* y *Colocasia esculenta* fueron las más eficientes.

En el presente estudio llevado a cabo en laboratorio, se pudo demostrar que las especies de plantas seleccionadas presentan comportamientos muy interesantes frente a cinco productos farmacéuticos críticos presentes en medio acuoso, debido a los

importantes porcentajes de remoción obtenidos, ya sea en soluciones acuosas de cada fármaco, soluciones de mezclas de dos y cinco fármacos y, en experimentos realizados a mayor escala en condiciones controladas de invernadero.

3.3 ESTRÉS OXIDATIVO DE *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes*

Como ya se indicó anteriormente el análisis del perfil de proteínas de raíces y tallos de *C. zizanioides* y *E. crassipes*, se llevó a cabo por medio de electroforesis SDS PAGE.

En este contexto, se pudo identificar en la figura 17, en los geles de electroforesis corridos con muestras extraídas de raíces y tallos de las plantas de *C. zizanioides* usadas para la remoción de la ciprofloxacina, que la banda proteica en la muestra “I” es más intensa que en la muestra “K”. En las tres muestras de tallo (K, M, O) existen dos bandas que presentan un peso aproximado de 35,8 kDa, que no se ven en la muestra sin fármaco. También se visualiza una proteína de 56,2 kDa en todas la muestras de esta especie, lo que genera interés para futuras investigaciones.

En la figura 18, se observa que el mismo fenómeno ocurre con *E. crassipes*, luego de haber sido expuesta al mismo tipo de solución de ciprofloxacina. Se puede visualizar que en las líneas señaladas con (C), (D), (G) y (H), la banda de proteínas se tiñe de

tonos más oscuros al nivel de los 56,2 KDa igual que aquella banda de proteínas del control (MM) al mismo nivel.

Varios estudios han reportado los efectos del estrés oxidativo en las especies *E. crassipes* y *C. zizanioides*. (Rani, Yasur, Loke, & Dutta, 2016) demostraron alteraciones metabólicas en las plantas de *E. crassipes* como consecuencia del estrés oxidativo producido por la exposición de la especie mencionada a nano partículas de plata, en un proceso de fitorremediación acuática.

El estudio antes mencionado señala que un aumento en la expresión de las proteínas sería un indicador de los efectos del estrés oxidativo a nivel molecular. De la misma manera, (Manikandan, Ezhili, & Venkatachalam, 2016) describieron fuertes impactos en el crecimiento de las plantas de *C. zizanioides* a consecuencia del estrés oxidativo causado por su exposición a dosis tóxicas de Cadmio.

De acuerdo con el estudio realizado por (Romero, 2018), el perfil de proteínas obtenido mediante electroforesis SDS PAGE, permitió la identificación de proteínas que se observaron como diferenciales en una respuesta fisiológica ante el estrés incidente de tipo hídrico. Este estudio establece que en raíces de papaya cv. Maradol y Silvestre, las bandas diferencialmente acumuladas y detectadas mediante SDS PAGE a las 24h, corresponden a dos bandas polipeptídicas de peso molecular similar a las detectadas en nuestra investigación. Dichas bandas podrían corresponder a proteínas de tipo “constitutivo”, una de ellas al nivel de 35.31 kDa en raíces de papaya cv. Maradol y

35.42 kDa en raíces de papaya silvestre y otra a 61.82 kDa en cv. Maradol y 60 kDa en silvestre. Esta investigación permite inferir que en el caso de *C. zizanioides* y *E. crassipes*, el perfil de proteínas obtenido podría establecer indicios de estrés oxidativo.

Si bien es cierto, el estudio del uso de las dos especies como agentes de fitorremediación en aguas contaminadas con fármacos aún es reducido, cabe mencionar que debido a su carácter amigable con el ambiente y a sus características morfológicas y fisiológicas, las dos especies han sido ampliamente estudiadas con relación a su beneficio en la remoción de otros agentes contaminantes en el agua.

En función de los resultados obtenidos se puede decir que ciertas concentraciones de fármacos estarían induciendo estrés oxidativo entre las células de las plantas expuestas y, que la acumulación excesiva de proteínas, podría aparecer como un indicador de esta sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) entre las células de raíces, tallos y hojas de *C. zizanioides* y *E. crassipes*.

Durante la fase experimental del presente proyecto se implementó el método de extracción de proteínas TCA/Fenol (Método modificado por BM-CIBE-ESPOL), que permitió eliminar compuestos no proteicos de las muestras a analizar, posteriormente la corrida del gel SDS PAGE y la detección con Azul de Coomassie, por ser uno de los métodos más reconocidos para la efectiva separación de proteínas. Este proceso puede arrojar datos aproximados de peso molecular y cantidad de proteínas, lo que facilitaría el reconocimiento de la clase que posee y que estaría estimulando la manifestación de

agregados proteicos tóxicos a la raíz de las dos especies vegetales, al ser expuestas a la ciprofloxacina con una concentración de 3mg/L. Según estudios realizados, es posible que este proceso ocurra con concentraciones variadas de diferentes fármacos (Oh-Ishi & Maeda, 2002; Den Engelsman et al., 2011).

3.4 PROCESO A MAYOR ESCALA CON *Chrysopogon zizanioides* y *Eichhornia crassipes*

Las especies *C. zizanioides* y *E. crassipes* demostraron su capacidad de remoción de los cinco fármacos en estudios, en el proceso implementado a mayor escala bajo condiciones controladas de invernadero.

Se observó que *C. zizanioides* (Figura 19) es eficiente en la remoción de ciprofloxacina en el proceso de fitorremediación implementado a mayor escala, su porcentaje de remoción varía entre 86,8% y 88,2%. Estos resultados son comparables con estudios donde *C. zizanioides* removió el 90% de ciprofloxacina (CX) y tetraciclina (TTC) del efluente de aguas residuales secundarias, a cuatro concentraciones diferentes de CX (0,05, 0,1, 1 y 10 mg/L) en todos los casos, la tasa de remoción fue rápida en los primeros 3 días, después fue más lenta durante el resto del período experimental de 30 días (Panja et al., 2020).

De igual forma, *E. crassipes* (Figura 20) también es eficiente en la remoción de ciprofloxacina en el proceso de fitorremediación implementado a mayor escala, dado que el porcentaje de remoción varía de 83% al 89%. Si bien es cierto que aún no hay otros reportes sobre remoción de ciprofloxacina con esta planta, existen múltiples estudios que reportan que *E. crassipes* se utilizó para la remoción de metales pesados, compuestos orgánicos e inorgánicos, como por ejemplo, en un estudio realizado por (Gupta & Balomajumder, 2015) encontraron que *E. crassipes* puede captar más del 99% del fenol de una solución con 10 mg/L de este compuesto, en 14 días de experimentación.

Por otra parte, el sistema conformado con *C. zizanioides* y *E. crassipes* (Figura 21) resultó ser eficiente en la remoción de ciprofloxacina en el proceso de fitorremediación implementado a mayor escala, ya que el porcentaje de remoción varía de 87% al 89%. Estos resultados se pueden correlacionar con el estudio realizado por Y. L. Lin & Li (2016), donde se procedió a la remoción de seis productos farmacéuticos y de cuidado personal comúnmente detectados en el medio acuático (PPCP), incluyendo carbamazepina (CBZ), ibuprofeno (IBU), sulfadiazina (DIA), sulfametoxazol (SMX), sulfametazona (SMZ) y triclosán (TRI). Se llevaron a cabo ensayos con *E. crassipes* y *Pistia stratiotes* a concentraciones iniciales altas (10 mg/L) y bajas (0,8 mg/L). Después de 13 días de exposición, *P. stratiotes* y *E. crassipes* fueron capaces de remover entre 80 y 90% de una mezcla de PPCPs con concentraciones altas y bajas. Reportaron que la eficacia fue mucho menor en la mezcla de alta concentración, debido al efecto tóxico

de los PPCPs en las plantas acuáticas. *P. stratiotes* resultó ser más eficiente en comparación con *E. crassipes* por su tasa de crecimiento más rápida y su sistema radicular más desarrollado observado en este estudio (Y. L. Lin & Li, 2016).

Además de *Eichhornia crassipes*, plantas como Lechuga de Agua (*Pistia stratiotes*), Pato (*Agua lemna*), Bulrush (*Typha*), Vetiver Grass (*Chrysopogon zizanioides*), Common Reed (*Phragmites australis*), se han implementado con éxito en el tratamiento de aguas residuales que contienen diferentes tipos de contaminantes (Dipu, Kumar, & Thanga, 2011; Datta et al., 2013; Xie et al., 2015; Y. L. Lin & Li, 2016).

3.5 CONSIDERACIONES FINALES

El sistema de vetiver se está adaptando en todo el mundo debido a su capacidad de remoción y alta tolerancia a varios contaminantes orgánicos e inorgánicos tóxicos. El potencial del vetiver (*C. zizanioides*), una hierba perenne de crecimiento rápido en tierra es también capaz de crecer en una instalación hidropónica con la misma facilidad y rapidez (Panja et al., 2020).

La fitoremediación utilizando jacinto de agua (*E. crassipes*), como parte de los sistemas de tratamiento de aguas residuales tiene un efecto potencial muy notable y excepcional en el medio ambiente, mediante la captación de dióxido de carbono (CO₂) de la

atmósfera, al mismo tiempo que absorbe los contaminantes de las aguas (Rezania et al., 2015).

Es menester señalar que los sistemas de humedales artificiales están siendo evaluados alrededor del mundo, de cara a la implementación de sistemas sostenibles de tratamiento de aguas residuales. Estos sistemas son interesantes no solamente por las bondades ecosistémicas en imitación a la naturaleza, sino también porque contribuyen a la disminución de emisiones contaminantes a la atmósfera y, al no utilizar ningún tipo de compuesto químico, se aporta en la disminución de esos contaminantes que afectan negativamente aguas y suelos. Por otro lado, el costo beneficio de la implementación de estos sistemas alternativos de tratamiento de aguas son económicamente atractivos. Los humedales construidos pueden ser una herramienta eficaz para eliminar productos farmacéuticos (Rai, 2018).

Un hecho crucial en la actualidad constituye la remoción incompleta de muchos productos farmacéuticos en las plantas tradicionales de tratamiento de aguas residuales (PTARs), causando su detección generalizada en los influentes y efluentes de las PTARs y por ende en los cuerpos de agua naturales, con una considerable posibilidad de retorno a los sistemas de distribución de agua potable, lo cual afectaría su calidad. En este sentido, es muy importante evitar que los productos farmacéuticos y sus productos de transformación, se conviertan en amenazas inminentes para los ecosistemas acuáticos e incluso para la salud humana (Cui, 2016).

Las aguas residuales seguirán existiendo e incrementando sus volúmenes conforme la población humana va creciendo, al igual que la presencia de contaminantes emergentes seguirán acumulándose en los ecosistemas, por lo tanto, las afectaciones negativas continuarán, si es que no se toman las medidas oportunas y apropiadas. En este contexto, la atención de la comunidad científica deberá centrarse en la búsqueda de alternativas de tratamiento sostenibles de las aguas residuales.

CAPÍTULO 4.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- La especie *C. zizanioides* removió la CX en un 98,3% de una solución con concentración de 3 mg/L en un tiempo de 149 h, seguido por IBU y DF con un máximo de remoción de 73,33% y SMX con 66,53%, obteniéndose el menor porcentaje de remoción para AC de 38,49% a las 192 h.
- La especie *E. crassipes* removió DF en un 95% de una solución con una concentración de 3 mg/L en un tiempo de 24 h, seguido de CX y AC con una remoción máxima de 91,18% y 71% respectivamente a las 96 h. Mientras que los más bajos porcentajes de remoción se obtuvo para IBU y SMX con 57,56% y 36% respectivamente.
- En la disolución de los cinco fármacos juntos, con *C. zizanioides* se removió 85,2% a 99,7%, mientras que con *E. crassipes* 93,3% a 99,7%.
- Los porcentajes de remoción con las mezclas de fármacos son más altos comparados con los resultados obtenidos de manera independiente para cada

fármaco, lo que podría deberse a un efecto sinérgico de estos compuestos en este tipo de soluciones.

- *Chrysopogon zizanioides* presentó un alto porcentaje de remoción de la disolución de dos fármacos (SMX, CX), del orden del 90,7% al 99,9%. De igual forma, *E. crassipes* presentó una alta remoción del 99,6% al 99,9% de la disolución de dos fármacos (DF, CX).
- En el proceso implementado a mayor escala de 20 L de disolución a 3 mg/L, se observa que *C. zizanioides* es eficiente en la remoción de CX con un porcentaje de remoción que varía de 86,8 % al 88,2%, de igual forma, *E. crassipes* presenta un porcentaje de remoción que va de 83% al 89%.
- El sistema *C. zizanioides* - *E. crassipes* también es eficiente en la remoción de CX en el proceso de fitorremediación implementado a mayor escala, llegando a un porcentaje de remoción que va de 87% al 89%.
- Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de *C. zizanioides* para remover los cinco fármacos estudiados en medio acuoso en un periodo experimental de 192 h a diferentes concentraciones consideradas en esta investigación (3, 6, 9 y 12 mg/L).
- Este estudio constituye el primer reporte científico de fitorremediación a escala laboratorio con las especies *C. zizanioides* y *E. crassipes* que incluye cinco fármacos de uso cotidiano.

- Esta investigación proporciona información importante para partes interesadas como entidades gubernamentales para promover la investigación de contaminantes emergentes en aguas residuales y tomar decisiones informadas en torno a la calidad de sus descargas.
- El presente estudio confirma que *C. zizanioides* y *E. crassipes* pueden tener una aplicación potencial en la fitorremediación de ambientes contaminados por compuestos farmacéuticos polares y por ende de otros compuestos polares.
- Este estudio aporta conocimiento de dos especies potenciales hiperacumuladoras para fitorremediación de aguas residuales de productos farmacéuticos y de contaminantes emergentes en general, que puede servir de base para continuar las investigaciones en dirección a establecer lineamientos para una prueba piloto y posteriormente para un tratamiento terciario.
- La importancia de esta tesis doctoral radica en la propuesta de una alternativa sostenible para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con productos farmacéuticos y por ende de contaminantes emergentes en general, al haber generado conocimiento desde la investigación básica, lo que servirá de punto de partida para investigaciones futuras en el campo de la fitorremediación y biotecnología ambiental en nuestro medio.

4.2 RECOMENDACIONES

Se necesita:

- Llevar a cabo estudios fármaco cinéticos en dirección a obtener mayor información sobre los mecanismos de absorción de fármacos en las especies *E.crassipes* y *C. zizanioides*.
- Realizar un modelo matemático en dirección a comprender la complejidad de los diversos procesos de la rizosfera de *E.crassipes* y *C. zizanioides* y las soluciones acuosas, dado que es una región dinámica donde tienen lugar múltiples procesos de interacción entre las raíces y el medio circundante, como es el caso de las aguas contaminadas con contaminantes emergentes.
- Probar el sistema de fitorremediación de fármacos con las especies *E.crassipes* y *C. zizanioides* a nivel piloto para evaluar sus capacidades de remoción a mediana escala.
- Efectuar investigaciones para analizar la ocurrencia de los productos farmacéuticos en el afluente y el efluente de las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (PTAR) y en las cuencas hidrográficas principales de Ecuador, debido a los potenciales efectos nocivos en la salud y en los ecosistemas dulce acuáticos.

- Evaluar el impacto ambiental de las mezclas de diferentes productos farmacéuticos y demás contaminantes emergentes en las fuentes de agua superficiales, aguas subterráneas y en los sistemas de agua potable.
- Conformar equipos transdisciplinarios de investigación para abordar futuras investigaciones en el ámbito de los contaminantes emergentes, así como también conformar redes científicas, donde se pueda compartir experiencias e integrar el conocimiento sobre este particular tema de interés mundial.
- Elaborar más estudios de productos farmacéuticos para determinar sus fuentes de contaminación, así como los riesgos asociados al ambiente, salud humana y vida acuática en los países en desarrollo por ende en Ecuador.
- Investigar sobre técnicas y tecnologías sostenibles de tratamiento para la remoción eficiente de estos contaminantes emergentes y de esta forma disminuir el impacto a los ecosistemas acuáticos y a la salud humana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, V., Ginebreda, A., Mor, J. R., Petrovic, M., Sabater, S., Sumpter, J., & Barceló, D. (2015). Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environment International*, 85, 327–333. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2015.09.023>
- Agunbiade, F. O., Olu-Owolabi, B. I., & Adebowale, K. O. (2009). Phytoremediation potential of *Eichornia crassipes* in metal-contaminated coastal water. *Bioresource Technology*, 100(19), 4521–4526. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.011>
- Alidina, M., Hoppe-Jones, C., Yoon, M., Hamadeh, A. F., Li, D., & Drewes, J. E. (2014). The occurrence of emerging trace organic chemicals in wastewater effluents in Saudi Arabia. *Science of the Total Environment*, 478, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.093>
- Balakrishna, K., Rath, A., Praveenkumarreddy, Y., Guruge, K. S., & Subedi, B. (2017). A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137(October 2016), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.014>
- Banerjee, R., Goswami, P., Lavania, S., Mukherjee, A., & Lavania, U. C. (2019).

Vetiver grass is a potential candidate for phytoremediation of iron ore mine spoil dumps. *Ecological Engineering*, 132(January), 120–136.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.10.012>

Bartha, B., Huber, C., Harpaintner, R., & Schröder, P. (2010). Effects of acetaminophen in *Brassica juncea* L. Czern.: Investigation of uptake, translocation, detoxification, and the induced defense pathways. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(9), 1553–1562.

<https://doi.org/10.1007/s11356-010-0342-y>

Bartha, B., Huber, C., & Schröder, P. (2014). Uptake and metabolism of diclofenac in *Typha latifolia* - How plants cope with human pharmaceutical pollution. *Plant Science*, 227, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.06.001>

Batt, A. L., Furlong, E. T., Mash, H. E., Glassmeyer, S. T., & Kolpin, D. W. (2017). The importance of quality control in validating concentrations of contaminants of emerging concern in source and treated drinking water samples. *Science of the Total Environment*, 579, 1618–1628.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.127>

Brausch, J. M., Connors, K. A., Brooks, B. W., & Rand, G. M. (2012). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 218* (Vol. 218).

<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3137-4>

Cardinal, P., Anderson, J. C., Carlson, J. C., Low, J. E., Challis, J. K., Beattie, S. A.,

... Wong, C. S. (2014). Macrophytes may not contribute significantly to removal of nutrients, pharmaceuticals, and antibiotic resistance in model surface constructed wetlands. *Science of The Total Environment*, 482, 294–304.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.095>

Caviedes, Diego., Delgado, D. (2017). Environmental normativity to regulate the presence of residual pharmaceutical products in aquatic environments. *Revista Jurídica*, 16(1), 121–130. <https://doi.org/10.25054/16576799.1445>

Chahal, K. K., Bhardwaj, U., Kaushal, S., & Sandhu, A. K. (2015). Chemical composition and biological properties of *Chrysopogon zizanioides* (L.)Roberty syn. *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash-a review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 6(4), 251–260.

Chen, H. R., Rairat, T., Loh, S. H., Wu, Y. C., Vickroy, T. W., & Chou, C. C. (2017). Assessment of veterinary drugs in plants using pharmacokinetic approaches: The absorption, distribution and elimination of tetracycline and sulfamethoxazole in ephemeral vegetables. *PLoS ONE*, 12(8), 1–16.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183087>

Cui, H. (2016). *Options for the Phytoremediation of Polar Pharmaceuticals: Uptake and Removal of Metformin and Iopromide by Typha latifolia L.*

D. Richardson, S., & A. Ternes, T. (2014). Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*, 86(6), 2813–2848.

<https://doi.org/10.1021/ac500508t>

- Darrah, P. R., Jones, D. L., Kirk, G. J. D., & Roose, T. (2006). Modelling the rhizosphere: A review of methods for “upscaling” to the whole-plant scale. *European Journal of Soil Science*, 57(1), 13–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2006.00786.x>
- Datta, R., Das, P., Smith, S., Punamiya, P., Ramanathan, D. M., Reddy, R., & Sarkar, D. (2013). Phytoremediation Potential of Vetiver Grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.)] for Tetracycline. *International Journal of Phytoremediation*, 15(4), 343–351. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.702803>
- Den Engelsman, J., Garidel, P., Smulders, R., Koll, H., Smith, B., Bassarab, S., ... Jiskoot, W. (2011). Strategies for the assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development. *Pharmaceutical Research*, 28(4), 920–933. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0297-1>
- Desbiolles, F., Malleret, L., Tiliacos, C., Wong-Wah-Chung, P., & Laffont-Schwob, I. (2018). Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: Is there a risk for the Mediterranean aquatic environment? *Science of the Total Environment*, 639, 1334–1348. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.351>
- Dettenmaier, E. M., Doucette, W. J., & Bugbee, B. (2009). Chemical hydrophobicity and uptake by plant roots. *Environmental Science and Technology*, 43(2), 324–329. <https://doi.org/10.1021/es801751x>

- Dipu, S., Kumar, A. A., & Thanga, V. S. G. (2011). Phytoremediation of dairy effluent by constructed wetland technology. *Environmentalist*, *31*(3), 263–278. <https://doi.org/10.1007/s10669-011-9331-z>
- Ebele, A. J., Abou-Elwafa Abdallah, M., & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, *3*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>
- Fang, T.-H., Nan, F.-H., Chin, T.-S., & Feng, H.-M. (2012). The occurrence and distribution of pharmaceutical compounds in the effluents of a major sewage treatment plant in Northern Taiwan and the receiving coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, *64*(7), 1435–1444. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2012.04.008>
- Fang, W., Peng, Y., Muir, D., Lin, J., & Zhang, X. (2019). A critical review of synthetic chemicals in surface waters of the US, the EU and China. *Environment International*, *131*(June), 104994. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104994>
- Farré, M. la, Pérez, S., Kantiani, L., & Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *27*(11), 991–1007. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.010>
- Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R., & Van der Bruggen, B. (2019). Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the

African and European challenge. *Science of the Total Environment*, 654, 324–337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.072>

Gamarra, J. S., Godoi, A. F. L., de Vasconcelos, E. C., de Souza, K. M. T., & Ribas de Oliveira, C. M. (2015). Environmental Risk Assessment (ERA) of diclofenac and ibuprofen: A public health perspective. *Chemosphere*, 120, 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.020>

Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V. K., Tushara Chaminda, G. G., An, A. K., & Kumar, M. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*, 6(September 2017), 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>

Guerra, P., Kim, M., Shah, A., Alaei, M., & Smyth, S. A. (2014). Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. *Science of The Total Environment*, 473–474, 235–243. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.12.008>

Gunnarsson, C. C., & Petersen, C. M. (2007). Water hyacinths as a resource in agriculture and energy production: A literature review. *Waste Management*, 27(1), 117–129. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.12.011>

Guo, Y., Qi, P. S., & Liu, Y. Z. (2017). A Review on Advanced Treatment of Pharmaceutical Wastewater. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 63(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/63/1/012025>

- Gupta, A., & Balomajumder, C. (2015). Removal of Cr(VI) and phenol using water hyacinth from single and binary solution in the artificial photosynthesis chamber. *Journal of Water Process Engineering*, 7, 74–82.
<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2015.05.008>
- He, Y., Langenhoff, A. A. M., Sutton, N. B., Rijnaarts, H. H. M., Blokland, M. H., Chen, F., ... Schröder, P. (2017). Metabolism of Ibuprofen by *Phragmites australis*: Uptake and Phytodegradation. *Environmental Science and Technology*, 51(8), 4576–4584. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00458>
- Hossain, A., Nakamichi, S., Habibullah-Al-Mamun, M., Tani, K., Masunaga, S., & Matsuda, H. (2018). Occurrence and ecological risk of pharmaceuticals in river surface water of Bangladesh. *Environmental Research*, 165, 258–266.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2018.04.030>
- I, C. T., Ii, I. P., & I, A. V. (2018). Aprovechamiento del Jacinto de Agua (*Eichhornia crassipes*) para la síntesis de carboximetilcelulosa. *Revista Cubana de Química*, 30(2), 211–221.
- Jiang, Y., Xu, C., Wu, X., Chen, Y., Han, W., Gin, K. Y. H., & He, Y. (2018). Occurrence, seasonal variation and risk assessment of antibiotics in Qingcaosha reservoir. *Water (Switzerland)*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/w10020115>
- Jose, J., Sandra Pinto, J., Kotian, B., Mathew Thomas, A., & Narayana Charyulu, R. (2020). Comparison of the regulatory outline of ecopharmacovigilance of

pharmaceuticals in Europe, USA, Japan and Australia. *Science of the Total Environment*, 709, 134815. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134815>

Kafle, B. P., & Kafle, B. P. (2020). Application of UV–VIS spectrophotometry for chemical analysis. *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*, 79–145. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814866-2.00005-1>

Kalia, V. C. (2019). Pharmaceutical and personal care product contamination: a global scenario. In *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816189-0.00002-0>

Kermia, A. E. B., Fouial-Djebbar, D., & Trari, M. (2016). Occurrence, fate and removal efficiencies of pharmaceuticals in wastewater treatment plants (WWTPs) discharging in the coastal environment of Algiers. *Comptes Rendus Chimie*, 19(8), 963–970. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.05.005>

Kibuye, F. A., Gall, H. E., Elkin, K. R., Ayers, B., Veith, T. L., Miller, M., ... Elliott, H. A. (2019). Fate of pharmaceuticals in a spray-irrigation system: From wastewater to groundwater. *Science of the Total Environment*, 654, 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.442>

Kiiskila, J. D., Li, K., Sarkar, D., & Datta, R. (2020). Metabolic response of vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*) to acid mine drainage. *Chemosphere*, 240,

124961. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124961>

Kwarciak-Kozłowska, A. (2019). Removal of pharmaceuticals and personal care products by ozonation, advance oxidation processes, and membrane separation. In *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816189-0.00007-x>

Lai, W. W. P., Lin, Y. C., Tung, H. H., Lo, S. L., & Lin, A. Y. C. (2016). Occurrence of pharmaceuticals and perfluorinated compounds and evaluation of the availability of reclaimed water in Kinmen. *Emerging Contaminants*, 2(3), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.05.001>

Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J., & Cai, Y. (2012). Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere*, 89(11), 1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.079>

Li, Y., Fang, J., Yuan, X., Chen, Y., Yang, H., & Fei, X. (2018). Distribution characteristics and ecological risk assessment of tetracyclines pollution in the Weihe River, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(9). <https://doi.org/10.3390/ijerph15091803>

Lin, H., Li, H., Chen, L., Li, L., Yin, L., Lee, H., & Yang, Z. (2018). Mass loading and emission of thirty-seven pharmaceuticals in a typical municipal wastewater treatment plant in Hunan Province, Southern China. *Ecotoxicology and*

Environmental Safety, 147(September), 530–536.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.052>

Lin, Y. L., & Li, B. K. (2016). Removal of pharmaceuticals and personal care products by *Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 58, 318–323.

<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.06.007>

Liu, J. L., & Wong, M. H. (2013). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. *Environment International*, 59, 208–224. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.012>

Llorca, M., Farré, M., Eljarrat, E., Díaz-Cruz, S., Rodríguez-Mozaz, S., Wunderlin, D., & Barcelo, D. (2017). Review of emerging contaminants in aquatic biota from Latin America: 2002–2016. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(7), 1716–1727. <https://doi.org/10.1002/etc.3626>

Madikizela, L. M., Ncube, S., & Chimuka, L. (2018). Uptake of pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions and natural occurring plant species: A review. *Science of the Total Environment*, 636(September), 477–486.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.297>

Maharjan, A., & Pradhanang, S. (2017). Potential of *Vetiver grass* for Wastewater Treatment. *Environment and Ecology Research*, 5(7), 489–494.

<https://doi.org/10.13189/eer.2017.050704>

- Majumder, A., Gupta, B., & Gupta, A. K. (2019). Pharmaceutically active compounds in aqueous environment: A status, toxicity and insights of remediation. *Environmental Research*, 176(June), 108542.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108542>
- Manikandan, R., Ezhili, N., & Venkatachalam, P. (2016). Phosphorus Supplementation Alleviation of the Cadmium-Induced Toxicity by Modulating Oxidative Stress Mechanisms in Vetiver Grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty] . *Journal of Environmental Engineering*, 142(9), 1–10.
[https://doi.org/10.1061/\(asce\)ee.1943-7870.0001112](https://doi.org/10.1061/(asce)ee.1943-7870.0001112)
- Mathew, M., Rosary, S. C., Sebastian, M., & Cherian, S. M. (2016). Effectiveness of Vetiver System for the Treatment of Wastewater from an Institutional Kitchen. *Procedia Technology*, 24, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.05.028>
- McGrath, S. P., Zhao, F. J., & Lombi, E. (2002). Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Interactions in the Root Environment: An Integrated Approach*, 207–214.
https://doi.org/10.1007/978-94-010-0566-1_20
- Mishra, S., & Maiti, A. (2017). The efficiency of *Eichhornia crassipes* in the removal of organic and inorganic pollutants from wastewater: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(9), 7921–7937.
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-8357-7>

- Montenegro, S., Pulido, S., & Calderón, L. (2019). Prácticas de Biorremediación en suelos y aguas. *Editorial UNAD*, 1(May), 49.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.10138.26564>
- Oh-Ishi, M., & Maeda, T. (2002). Separation techniques for high-molecular-mass proteins. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 771(1–2), 49–66. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00112-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00112-5)
- Orita, N., & Doucette, W. J. (2012). Root uptake of organic contaminants into plants: Species differences. *Civil and Environmental Engineering, Master of(All Graduate Theses and Dissertations Paper 1287.)*. Retrieved from <http://digitalcommons.usu.edu/etd/1287>
- Paíga, P., Santos, L. H. M. L. M., Ramos, S., Jorge, S., Silva, J. G., & Delerue-Matos, C. (2016). Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Science of the Total Environment*, 573, 164–177.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.089>
- Panja, S., Sarkar, D., & Datta, R. (2018). Vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*) is capable of removing insensitive high explosives from munition industry wastewater. *Chemosphere*, 209, 920–927.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.06.155>
- Panja, S., Sarkar, D., & Datta, R. (2020). Removal of antibiotics and nutrients by

Vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*) from secondary wastewater effluent.

International Journal of Phytoremediation, 22(7), 764–773.

<https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1710813>

Panja, S., Sarkar, D., Li, K., & Datta, R. (2019). Uptake and transformation of

ciprofloxacin by vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*). *International*

Biodeterioration and Biodegradation, 142(February), 200–210.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.05.023>

Paz-Alberto, A. M., & Sigua, G. C. (2013). Phytoremediation: A Green Technology

to Remove Environmental Pollutants. *American Journal of Climate Change*,

02(01), 71–86. <https://doi.org/10.4236/ajcc.2013.21008>

Peña-Guzmán, C., Ulloa-Sánchez, S., Mora, K., Helena-Bustos, R., Lopez-Barrera,

E., Alvarez, J., & Rodriguez-Pinzón, M. (2019). Emerging pollutants in the

urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *Journal*

of Environmental Management, 237, 408–423.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>

Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., & Pinelli, E. (2011). Lead uptake,

toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination*

and Toxicology, 213(April), 113–136. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_4)

6_4

Rai, P. K. (2018). Phytoremediation of Emerging Contaminants in Wetlands. In

Phytoremediation of Emerging Contaminants in Wetlands.

<https://doi.org/10.1201/9781351067430>

- Rani, P. U., Yasur, J., Loke, K. S., & Dutta, D. (2016). Effect of synthetic and biosynthesized silver nanoparticles on growth, physiology and oxidative stress of water hyacinth: *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(2), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2074-1>
- Rasheed, T., Bilal, M., Nabeel, F., Adeel, M., & Iqbal, H. M. N. (2019). Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environment International*, 122(September 2018), 52–66. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.038>
- Rezania, S., Ponraj, M., Talaiekhosani, A., Mohamad, S. E., Md Din, M. F., Taib, S. M., ... Sairan, F. M. (2015). Perspectives of phytoremediation using water hyacinth for removal of heavy metals, organic and inorganic pollutants in wastewater. *Journal of Environmental Management*, 163, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.08.018>
- Rivera-Jaimes, J. A., Postigo, C., Melgoza-Alemán, R. M., Aceña, J., Barceló, D., & López de Alda, M. (2018). Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 613–614, 1263–1274.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.134>

Romero, B. G. (2018). *Caracterización fisiológica y análisis del perfil de proteínas en plantas de Carica papaya L. tolerantes y susceptibles sometidas a estrés hídrico.*

Roongtanakiat, N., & Akharawutchayanon, T. (2017). Evaluation of *Vetiver grass* for radiocesium absorption ability. *Agriculture and Natural Resources.*

<https://doi.org/10.1016/j.anres.2017.01.002>

Sankar, R. (2020). *Applications of HPLC.* (April).

Semerjian, L., Shanableh, A., Semreen, M. H., & Samarai, M. (2018). Human health risk assessment of pharmaceuticals in treated wastewater reused for non-potable applications in Sharjah, United Arab Emirates. *Environment International*, *121*(May), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.048>

Sharma, B. M., Bečanová, J., Scheringer, M., Sharma, A., Bharat, G. K., Whitehead, P. G., ... Nizzetto, L. (2019). Health and ecological risk assessment of emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, and artificial sweeteners) in surface and groundwater (drinking water) in the Ganges River Basin, India. *Science of the Total Environment*, *646*, 1459–1467.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.235>

Shikha, S., & Gauba, P. (2016). Phytoremediation of Industrial and Pharmaceutical Pollutants. *Recent Advances in Biology and Medicine*, *02*(October), 113.

<https://doi.org/10.18639/rabm.2016.02.341789>

Shraim, A., Diab, A., Alsuhaime, A., Niazy, E., Metwally, M., Amad, M., ...

Dawoud, A. (2017). Analysis of some pharmaceuticals in municipal wastewater of Almadinah Almunawarah. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S719–S729.

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.11.014>

Su, R., Zhang, G., Wang, P., Li, S., Ravenelle, R. M., & Crittenden, J. C. (2015).

Treatment of Antibiotic Pharmaceutical Wastewater Using a Rotating Biological Contactor. *Journal of Chemistry*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/705275>

Suconota, C., & Arèvalo, M. (2017). Determinación mediante técnica ultravioleta-visible de la capacidad de adsorción de mezclas de fármacos sobre residuos vegetales. *Universidad de Cuenca*.

Suelee, A. L., Hasan, S. N. M. S., Kusin, F. M., Yusuff, F. M., & Ibrahim, Z. Z.

(2017). Phytoremediation Potential of Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides*) for Treatment of Metal-Contaminated Water. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228(4).

<https://doi.org/10.1007/s11270-017-3349-x>

Sui, Q., Cao, X., Lu, S., Zhao, W., Qiu, Z., & Yu, G. (2015). Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. *Emerging Contaminants*, 1(1), 14–24.

<https://doi.org/10.1016/j.emcon.2015.07.001>

Suleiman, M. K., Bhat, N. R., Jacob, S., & Al-Burais, M. (2018). Performance

evaluation of *Chrysopogon zizanoides* under urban conditions of Kuwait. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 305–312.

<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.09.012>

Tadić, Đ., José, M., Hernandez, B., Cerqueira, F., Matamoros, V., Piña, B., & Maria, J. (2021). Occurrence and human health risk assessment of antibiotics and their metabolites in vegetables grown in field-scale agricultural systems. *Journal of Hazardous Materials*, 401(July 2020), 123424.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123424>

Truong, P., & Tan Van, T. (2008). Vetiver System Applications- Technical Reference Manual. *Network*, 126.

Valdés, M. E., Amé, M. V., Bistoni, M. de los A., & Wunderlin, D. A. (2014).

Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Science of The Total Environment*, 472, 389–396. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.10.124>

Voloshenko-Rossin, A., Gasser, G., Cohen, K., Gun, J., Cumbal-Flores, L., Parra-

Morales, W., ... Lev, O. (2015). Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: Discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro-Guayllabamba-Esmeraldas rivers. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 17(1), 41–53. <https://doi.org/10.1039/c4em00394b>

Wang, Y., Wei, X., Zhang, R., Wu, Y., Farid, M. U., & Huang, H. (2017).

Comparison of chemical, ultrasonic and thermal regeneration of carbon nanotubes for acetaminophen, ibuprofen, and triclosan adsorption. *RSC Advances*, 7(83), 52719–52728. <https://doi.org/10.1039/c7ra08812d>

Xie, Z., Lu, G., Liu, J., Yan, Z., Ma, B., Zhang, Z., & Chen, W. (2015). Occurrence, bioaccumulation, and trophic magnification of pharmaceutically active compounds in Taihu Lake, China. *Chemosphere*, 138, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.086>

Yang, Y., Ok, Y. S., Kim, K. H., Kwon, E. E., & Tsang, Y. F. (2017). Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total Environment*, 596–597, 303–320. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102>

National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 1983, Acetaminophen. Retrieved December 29, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetaminophen>.

National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 3033, Diclofenac. Retrieved December 29, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac>.

National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 3672, Ibuprofen. Retrieved December 29, 2020

from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ibuprofen>.

National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 2764, Ciprofloxacin. Retrieved December 29, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin>.

National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5329, Sulfamethoxazole. Retrieved December 29, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethoxazole>.

LISTA DE PUBLICACIONES

Artículos publicados en la revista Latin American Journal of Biotechnology and Life Sciences (Bionatura), indexada en SCOPUS.

1. Presencia de productos farmacéuticos en el agua y su impacto en el ambiente
Presence of pharmaceutical products in water and its impact on the environment
Checa Artos Miriam¹, Sosa del Castillo Daynet¹, Ruiz Barzola Omar^{1,2}, Barcos-Arias Milton^{1}*
Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.16> (registering DOI)
2. Remoción de cinco productos farmacéuticos catalogados como contaminantes emergentes en medio acuoso utilizando la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*)
Removal of five pharmaceutical products classified as emerging pollutants in aqueous medium using the vetiver species (*Chrysopogon zizanioides*)
Checa-Artos Miriam¹, Sosa del Castillo Daynet¹, Vanegas María Eulalia³, Ruiz-Barzola Omar^{1,2}, Barcos-Arias Milton^{1}*
Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2020.06.01.7>

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS INTERNACIONALES

- Presentación de audio cartel “Remoción de cinco productos farmacéuticos catalogados como contaminantes emergentes en medio acuoso utilizando la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*)”, V CONGRESO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD CIBB 2020, modalidad virtual, Escuela Superior Politécnica del Litoral, del 5 al 8 de octubre de 2020, Guayaquil, Ecuador.
- Presentación de poster científico REMOCIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN MEDIO ACUOSO UTILIZANDO LA ESPECIE VETIVER (*Chrysopogon zizanioides*), X ENCUENTRO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA Y XII SIMPOSIO REDBIO ARGENTINA del 11 al 15 de noviembre de 2019, Montevideo, Uruguay.
- Presentación de la ponencia “EMERGING POLLUTANTS REMOVAL FROM WATER USING VETIVER (*Chrysopogon zizanioides*)”, en The first IWA-IDB International Conference on Sustainable Use of Water: Cities, Industry and Agriculture, realizado en Guayaquil, del 30 de septiembre al 03 de Octubre de 2019.

ANEXO 1

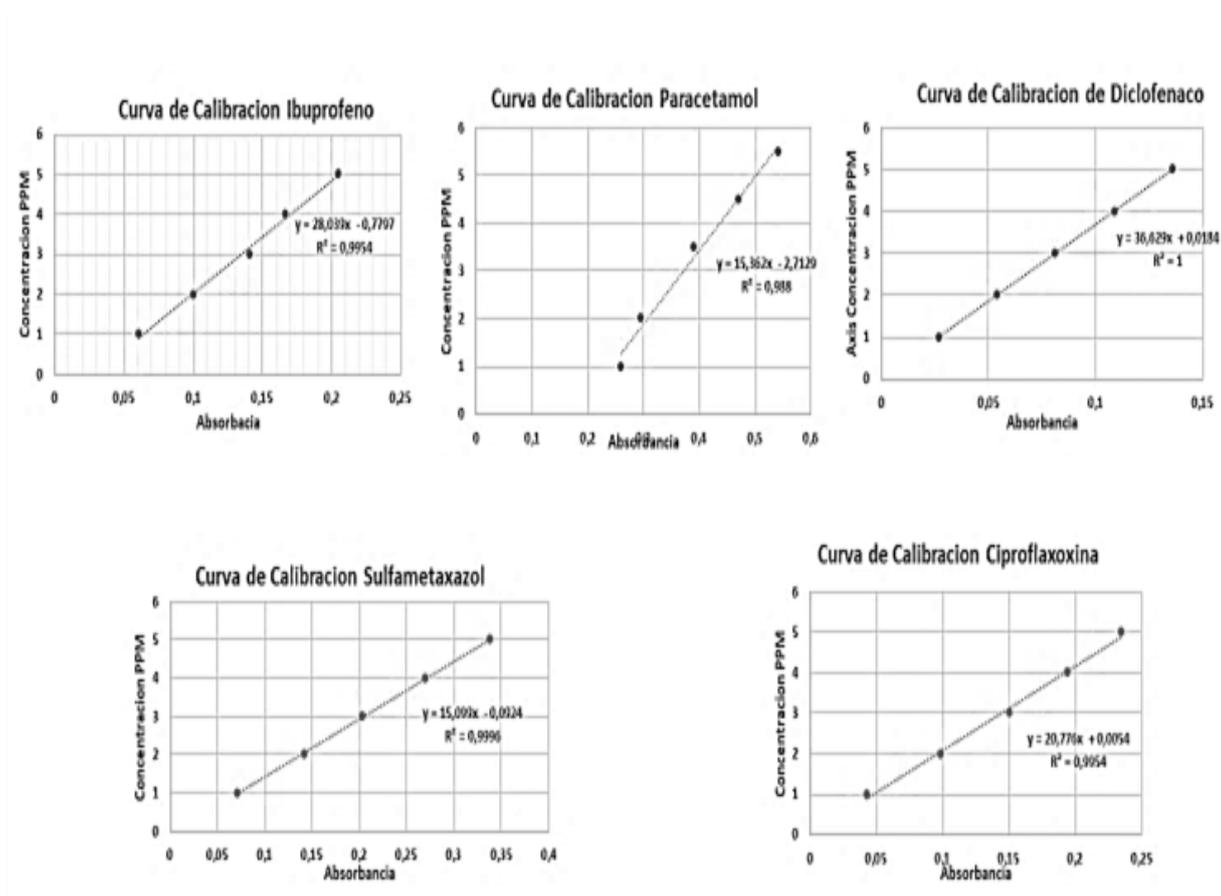


Figura 9.- Curvas de calibración para A) ibuprofeno, B) acetaminofén, C) diclofenaco, D) sulfametaxazol y E) ciprofloxacina.

Para mezclas de fármacos, utilizando el software VISIONlite analizamos las curvas obtenidas de los análisis espectrofotométricos y determinamos los valores correspondientes a cada fármaco de acuerdo con la longitud de onda a la que cada uno es detectado por el equipo.

Para realizar análisis cuantitativos para mezclas de analitos por espectrometría UV-Vis se aplicó la ley de Beer-Lambert representada por la ecuación 15 (Suconota & Arèvalo, 2017; Kafle & Kafle, 2020):

$$A = \epsilon b C \quad (15)$$

Donde,

A = Absorbancia a una longitud de onda

λ = -log transmitancia

ϵ = Absortividad Molar

b = Longitud de la celda en cm.

C = Concentración en moles/litros

En este contexto, tomando en consideración los coeficientes de absortividad de cada analito y la absorbancia total a cada longitud de onda, se obtiene la ecuación 16:

$$A(\lambda_i) = \epsilon_{i,1}. b. C_1 + \epsilon_{i,2}. b. C_2 + \dots \dots \dots + \epsilon_{i,i}. b. C_i \quad (16)$$

ANEXO 2

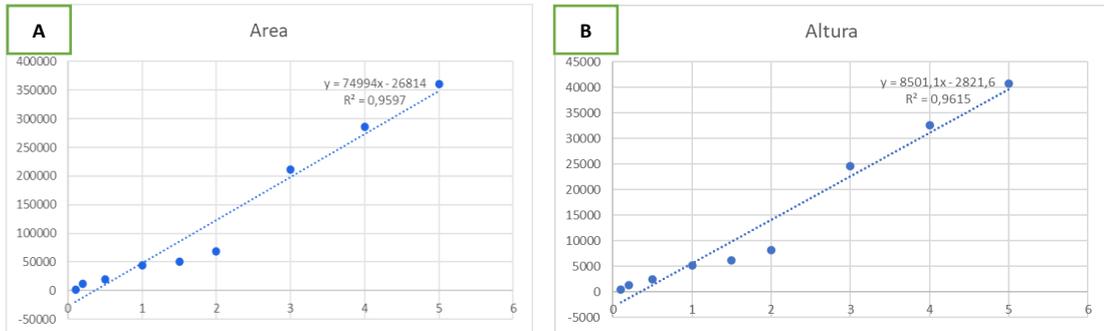


Figura 10.- Curvas de calibración para determinar ciprofloxacina por HPLC en muestras de agua con base en: A) Área y B) Altura.