



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

**MECANISMO DE REMOCIÓN DE DICLOFENACO Y NAPROXENO  
Y/O SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN UN HUMEDAL  
CONSTRUIDO: ROL DE LOS MICROORGANISMOS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

**M.C.Q. Ana Laura Zapata Morales**

DIRECTORA DE TESIS:

**Dra. Ma. Catalina Alfaro de la Torre**

CO-DIRECTOR DE TESIS:

**Dr. Alejandro Hernández Morales**

COMITÉ TUTELAR EXTENDIDO:

**Dra. Socorro Leyva Ramos**

**San Luis Potosí, S.L.P., México, Febrero de 2023**



El programa de Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al programa nacional de posgrados de calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), registro 00519, en el nivel Consolidado. Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 291047 CVU: 74300.

Proyecto realizado en el Laboratorio de Elementos Traza y Vivero de la Unidad de Biotecnología de plantas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



Mecanismos de remoción de diclofenaco y naproxeno y/o sus productos de degradación en un humedal construido: rol de los microorganismos por Zapata Morales Ana Laura se distribuye bajo una licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivadas 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

El presente trabajo fue sometido a análisis de similitud en la plataforma “turnitin” (<https://www.turnitin.com/es>). El informe de originalidad reporta un 24 % de similitud.

Zapata Morales Ana Laura Tesis-Mecanismos de remoción de diclofenaco y naproxeno.pdf
INFORME DE ORIGINALIDAD
<b>24 %</b>
INDICE DE SIMILITUD



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

**MECANISMO DE REMOCIÓN DE DICLOFENACO Y NAPROXENO  
Y/O SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN UN HUMEDAL  
CONSTRUIDO: ROL DE LOS MICROORGANISMOS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

SINODALES

Dra. Ma. Catalina Alfaro de la Torre \_\_\_\_\_

Dr. Alejandro Hernández Morales \_\_\_\_\_

Dra. Socorro Leyva Ramos \_\_\_\_\_

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar \_\_\_\_\_

Dr. Rodolfo Cisneros Almazán \_\_\_\_\_



San Luis Potosí, S.L.P., México, Febrero de 2023

## **Integrantes del Subcomité de Tesis**

Dra. Ma. Catalina Alfaro de la Torre, directora de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Dr. Alejandro Hernández Morales, codirector de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Químicas y a la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Dra. Socorro Leyva Ramos, miembro del comité tutorial extendido. Adscrita al Posgrado en Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, CONACYT por el financiamiento otorgado y hacer posible esta tesis.

A la Dra. Ma. Catalina Alfaro de la Torre por haberme abierto las puertas en su grupo de investigación, por haberme brindado su confianza; por todo su apoyo profesional y personal y, sobre todo, la oportunidad de haber desarrollado este trabajo de tesis doctoral que hoy tengo el agrado de finalizar.

Al Dr. Alejandro Hernández Morales por todo el apoyo académico y profesional que en el transcurso de esta etapa me fue tan provechoso; pero sobre todo por su apoyo incondicional.

A la Dra. Socorro Leyva Ramos, agradezco de manera infinita los retos, nuevos conocimientos y sus atinadas correcciones en el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Saraí Vega, por su paciencia, su apoyo y trabajo en el desarrollo del proyecto en el área de Química Computacional.

A mis intensas, pero bien amadas y recordadas amigas, Dánae Sánchez, Gisela Rolón, Sarahí Davalos, Julieta Ponce y Karina P. porque sin su compañía y apoyo incondicional (por todo el aguante) esta experiencia habría sido insulsa y desabrida.

Por todo y, por tanto, gracias enormes, a mis amigas del alma, Flor Alegría y Karina Monzalvo, porque por más de 8 años han demostrado ser incondicionales, porque han y se siguen mostrando como amigas cuando otros ya se han arrepentido.

Ramón, Clarisa y Rodrigo, por haberme recibido y acogido tan bien, por su apoyo y compañía, gracias.

A todas esas personas que de una u otra manera hicieron parte de esta experiencia: María José, Anayeli, Andrea, Martha, Ana Lucia, que con su amistad y colaboración hicieron posible esta tesis doctoral.

Y por último y el más importante a mi familia, gracias a mis padres por ser los primordiales promotores de mis sueños, gracias por todos los días confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias a cada uno de mis hermanos, por apoyarme, escucharme y por siempre estar ahí en cada momento, gracias a mis sobrinos por alentarme y alegrarme los días en los cuales todo era difícil.

Gracias infinitas, Alejandro por tu apoyo, tu confianza, por alentarme, por estar ahí en esas noches de desvelo y por tu amor, llegar al cierre de este ciclo, sin ti, no hubiera sido posible, gracias por la pequeña familia que hemos formado, por Mauricio, la fuerza que me impulsa a ser mejor.

## **Dedicatoria**

Esta tesis va dedicada a Dios,  
por su presencia en cada paso de mi vida,  
cuidándome y fortaleciéndome.

A mis padres y hermanos, quienes depositan  
en mí su entera confianza sobre la capacidad para  
sobresalir en cada nuevo reto.

A mi esposo Alejandro por su amor incansable  
y con quien concebí a Mauricio,  
mi impulso de cambio y mejora constante.

## Resumen

El objetivo de este estudio fue analizar la contribución de los microorganismos asociados a la raíz de *Typha latifolia*, en la remoción de diclofenaco y naproxeno en agua e identificar los subproductos de transformación formados durante el proceso, en humedales construidos de flujo subsuperficial horizontal. La celda de humedal construido horizontal de flujo subsuperficial removió diclofenaco (3 mg/L) en un 82.01 % y naproxeno (5 mg/L) en un 74.54 % durante el período de experimentación de 100 días con un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 3 días y un flujo de  $10 \pm 4$  mL/min. Las plantas no mostraron signos de efectos negativos como clorosis, marchitamiento e inhibición en el desarrollo de hojas al estar en continuo contacto con la mezcla de diclofenaco y naproxeno, todo ello en relación con una celda control que solo fue alimentada con una solución de nutrientes. La identificación de aislados bacterianos en las raíces de *Typha latifolia* fue muy diversa logrando identificar 208 colonias bacterianas (14 morfotipos en total). Se realizaron pruebas bioquímicas y análisis de tipo PCR, la identificación bacteriana usando la base de datos de GenBank reveló un porcentaje de identidad >90 % para cada uno de los aislados logrando identificar molecularmente a 7 aislados, de los cuales 5 pertenecen al género de *Pseudomonas*, uno al género de *Ranheila* y otro a *Serratia*. Se utilizaron herramientas de química computacional para modelar en la solución las posibles interacciones químicas entre diclofenaco y naproxeno con compuestos de la raíz (celulosa), así como las interacciones químicas entre los fármacos, y se proponen posibles mecanismos de degradación para los fármacos dentro del humedal. El análisis a nivel teórico semiempírico de PM6 indico una interacción entre las moléculas de diclofenaco y naproxeno a través de enlaces de hidrógeno y covalentes, lo que da lugar a moléculas más estables que podrían disminuir la eficiencia de eliminación. En cuanto a la interacción entre celulosa y fármacos (naproxeno o diclofenaco), se encontró que los fármacos interactúan con la celulosa de las plantas por puentes de hidrógeno y ocurriendo la interacción más fuerte entre la celulosa y el diclofenaco. La evaluación de los mecanismos de degradación propuestos indica que es factible la formación de 8-clorocarbazol-1-carboxilato y 6'-metoxi-2'-acetonaftona en la remoción de diclofenaco y naproxeno, respectivamente.

**Palabras clave:** Diclofenaco, naproxeno, humedales, remoción

## Abstract

The objective of this study was to analyze the contribution of microorganisms associated with the root of *Typha latifolia*, in the removal of diclofenac and naproxen in water and to identify the transformation by-products formed during the process, in constructed wetlands of horizontal subsurface flow. The subsurface flow horizontal constructed wetland cell removed diclofenac (3 mg/L) by 82.01 % and naproxen (5 mg/L) by 74.54 % during the 100-day experimentation period with hydraulic residence time (HRT) of 3 days and a flow of 10 ±4 mL/min. The plants did not show signs of negative effects such as chlorosis, wilting and inhibition of leaf development when in continuous contact with the mixture of diclofenac and naproxen, all in relation to a control cell that was only fed with a nutrient solution. The identification of bacterial isolates in the roots of *Typha latifolia* was very diverse, managing to identify 208 bacterial colonies (14 morphotypes in total). Biochemical tests and PCR analysis were performed, bacterial identification using the GenBank database revealed an identity percentage >90% for each of the isolates, achieving the molecular identification of 7 isolates, of which 5 belong to the *Pseudomonas* genus, one to the genus of *Ranheella* and another to *Serratia*. Computational chemistry tools were used to model in the solution the possible chemical interactions between diclofenac and naproxen with root compounds (cellulose) as well as the chemical interactions between the drugs, and possible degradation mechanisms for the drugs within the wetland are proposed. Semi-empirical theoretical analysis of PM6 indicated an interaction between diclofenac and naproxen molecules through hydrogen and covalent bonds, leading to more stable molecules that could decrease removal efficiency. Regarding the interaction between cellulose and drugs (naproxen or diclofenac), it was found that drugs interact with plant cellulose through hydrogen bonds and the strongest interaction between cellulose and diclofenac occurred. The evaluation of the proposed degradation mechanisms indicates that the formation of 8-chlorocarbazol-1-carboxylate and 6'-methoxy-2'-acetone is feasible in the removal of diclofenac and naproxen, respectively.

**Keywords:** Diclofenac, naproxen, wetlands, removal

# Índice

Agradecimientos.....	V
Dedicatoria.....	VI
Resumen.....	VII
Abstract.....	VIII
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>3</b>
2.1 Vías de ingreso de los fármacos al ambiente.....	4
2.2 Productos farmacéuticos detectados en el medio ambiente.....	5
2.2.1 Propiedades Físicoquímicas de los productos farmacéuticos .....	8
2.3 Efectos de diclofenaco y naproxeno en la naturaleza.....	11
2.4 Formación de subproductos de diclofenaco en el ambiente.....	13
2.5 Formación de subproductos de naproxeno en el medio ambiente.....	14
2.6 Métodos de tratamiento para la eliminación de productos farmacéuticos.....	15
2.7 Remoción de fármacos por humedales construidos.....	17
2.8 Mecanismos de eliminación de fármacos involucrados en los humedales.....	20
2.9 Comunidades microbianas involucradas en la remoción de fármacos.....	23
2.9.1 Enzimas microbianas involucradas en la degradación de fármacos.....	24
2.10 Química computacional como herramienta para comprender los procesos en un sistema de humedales.....	26
2.10.1 Métodos de resolución utilizados en química computacional.....	26
2.10.2 Interacciones entre productos farmacéuticos e influencia de su eliminación en los ambientes.....	28
2.11 Justificación.....	29
2.12 Hipótesis.....	29
2.13 Objetivo General.....	30

2.13.1	Objetivos específicos.....	30
<b>3.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>31</b>
3.1	Determinación de la eficiencia de remoción de una mezcla de diclofenaco y naproxeno en HC-FSSH.....	31
3.1.1	Determinación de condiciones y procedimiento de operación de los humedales de flujo subsuperficial.....	34
3.1.2	Preparación de soluciones y procedimientos analíticos para la determinación de la concentración disuelta de diclofenaco y naproxeno.....	35
3.1.3	Cinética de remoción de una mezcla de diclofenaco-naproxeno en pruebas por lote.....	36
3.1.4	Determinación de la eficiencia de remoción de diclofenaco y naproxeno por el material de soporte de las plantas en el HC-FSSH.....	37
3.2	Estudio microbiológico de los aislados de raíces de las plantas expuestas a una mezcla de diclofenaco y naproxeno en el HC-FSSH.....	37
3.2.1	Recolección y procesamiento de la raíz de <i>Typha latifolia</i> .....	38
3.2.2	Obtención de los aislados bacterianos de la raíz de <i>Typha latifolia</i> .....	38
3.2.2.1	Preparación de medio mínimo M9.....	39
3.3	Caracterización molecular de los aislados bacterianos.....	39
3.3.1	Amplificación del ARNr 16S de los aislados bacterianos.....	39
3.3.2	Secuenciación de los productos de PCR.....	40
3.4	Caracterización de aislados bacteriano.....	40
3.4.1	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la mezcla de diclofenaco y naproxeno en las cepas aisladas: pruebas de tolerancia a los fármacos.....	40
3.4.2	Capacidad de hidrolizar carboximetilcelulosa.....	41
3.4.3	Determinación de la degradación de pectina por los aislados bacterianos....	42
3.4.4	Capacidad de hidrolizar el almidón.....	42
3.5	Características promotoras del crecimiento vegetal por los aislados bacterianos.....	42

3.5.1 Capacidad para solubilizar fosfatos.....	43
3.5.2 Determinación de la producción de sideróforos.....	43
3.5.2.1 Preparación del agar CAS.....	44
3.5.2.2 Detección de la producción de sideróforos.....	44
3.5.3 Capacidad de los aislados bacterianos para producir de Ácido Indol Acético.....	44
3.5.3.1 Preparación del reactivo de Salkowsky.....	45
3.5.3.2 Cuantificación espectrofotométrico.....	45
3.6 Capacidad de los aislados bacterianos para la producción de lacasas.....	46
3.7 Determinación de la eficiencia de remoción de diclofenaco y naproxeno con plantas de <i>Typha latifolia</i> y cultivos en condiciones estériles.....	46
3.7.1 Germinación y desarrollo de plantas de <i>Typha latifolia</i> en condiciones estériles.....	46
3.7.2 Evaluación de la eficiencia de remoción de diclofenaco y naproxeno en mezcla con aislados bacterianos y plantas en condiciones de esterilidad.....	47
3.7.2.1 Obtención de cultivos bacterianos.....	48
3.7.2.2 Cinética de remoción de diclofenaco y naproxeno con aislados bacterianos y plantas en condiciones de esterilidad.....	48
3.8 Identificación de metabolitos de diclofenaco y naproxeno.....	48
3.8.1 Análisis por GC-MS.....	49
3.8.1.1 Derivatización.....	49
3.8.1.2 Análisis GC-MS.....	50
3.9 Identificación de interacciones fisicoquímicas entre la planta y la mezcla de los fármacos.....	50
3.9.1 Equipo y paquetes Computacionales.....	50
3.9.1.2 Gauss View y Gaussian 09.....	51
3.9.2 Estructuras Analizadas.....	51
3.9.3 Análisis de las moléculas.....	51

3.9.4 Propuesta de mecanismos de degradación de diclofenaco y naproxeno.....	52
3.10 Análisis estadísticos 75Capitulo IV. Resultados y discusión.....	54
<b>4. Resultados y Discusión.....</b>	<b>55</b>
4.1 Determinación de la eficiencia de remoción de una mezcla de diclofenaco y naproxeno en un HC-FSSH con plantas de <i>Typha latifolia</i> .....	55
4.1.1 Concentración removida de diclofenaco y naproxeno por el medio de soporte...59	
4.2 Efecto de diclofenaco y naproxeno sobre el desarrollo de <i>Typha latifolia</i> en el HC-FSSH en comparación con el sistema control.....	61
4.3 Análisis microbiológico de muestras de raíz obtenida de las plantas desarrolladas en el HC-FSSH alimentado con la solución de fármacos.....	68
4.3.1 Obtención y caracterización de los aislados bacterianos de la raíz de <i>T. latifolia</i> .....	68
4.4 Caracterización de aislados bacterianos.....	70
4.4.1 Tinción de Gram.....	70
4.4.2 Actividad enzimática de los aislados bacterianos para la hidrólisis de carbohidratos complejos.....	71
4.4.2.1 Determinación de la actividad de amilasa por aislados bacterianos de la raíz de plantas de <i>Typha latifolia</i> .....	71
4.4.2.2 Determinación de la actividad pectinasa por aislados bacterianos de la raíz de <i>Typha latifolia</i> .....	72
4.4.2.3 Producción de enzimas de tipo celulasa por aislados bacterianos de la raíz de <i>Typha latifolia</i> .....	72
4.5 Análisis bioquímico de las bacterias con potencial como promotoras de crecimiento vegetal.....	74
4.5.1 Producción de ácido indol acético (AIA).....	75
4.5.2 Producción de sideróforos.....	76
4.5.3 Capacidad de solubilización de fosfatos.....	77
4.5.4 Identificación de lacasas.....	79

4.5 Caracterización molecular de los aislados bacterianos.....	80
4.6 Análisis filogenético de los aislados bacterianos.....	81
4.7 Aislados bacterianos tolerantes a diferentes concentraciones de diclofenaco y naproxeno, pruebas de tolerancia a una mezcla de diclofenaco (3 mg/L) y naproxeno (5 mg/L).....	84
4.8 Evaluación de la eficiencia de remoción de diclofenaco y naproxeno por consorcios bacterianos y <i>Typha latifolia</i> en condiciones de esterilidad.....	86
4.9 Identificación de productos de degradación.....	91
4.9.1 Identificación de diclofenaco, naproxeno y productos de degradación por cromatografía de capa fina.....	91
4.9.2 Identificación por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas de diclofenaco, naproxeno y productos de degradación.....	93
4.10 Predicción de las interacciones químicas entre diclofenaco, naproxeno y celulosa.....	102
4.10.1 Optimización de las formas molecular y aniónicas para diclofenaco y naproxeno.....	103
4.10.2 Interacciones entre las moléculas neutras de diclofenaco y naproxeno.....	104
4.10.3 Interacciones entre las formas aniónicas de diclofenaco y naproxeno.....	105
4.10.4 Interacciones entre diclofenaco tanto en su forma molecular como aniónica con celulosa.....	106
<b>Conclusiones.....</b>	<b>111</b>
<b>Perspectivas de trabajo a futuro.....</b>	<b>113</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>114</b>
<b>Publicaciones.....</b>	<b>131</b>

## Índice de figuras

1. Vías de incorporación de fármacos al medio ambiente.....	5
2. Fármacos detectados en cuerpo de aguas o efluentes de aguas residuales y en suelo a nivel mundial.....	6
3. Rutas de transformación de diclofenaco en agua y suelo.....	14
4. Rutas de transformación de naproxeno en agua y suelo.....	15
5. Rutas de biodegradación de diclofenaco y naproxeno.....	25
6. Diseño de humedal a) Representación de humedal construido b) Imagen real de humedal con diclofenaco y naproxeno.....	32
7. Estandarización para identificar los fármacos y sus sub-productos de degradación.....	49
8. Esquema de metodología para calcular las propiedades de las moléculas.....	52
9 Mecanismo propuesto para la degradación de diclofenaco.....	53
10 Mecanismo propuesto para la degradación de naproxeno.....	53
11. Variación de la concentración de diclofenaco en el afluente y en el efluente durante el período de experimentación en el HC-FSSH. La línea punteada indica el límite de detección del método analítico.....	57
12. Variación de la concentración de naproxeno en el afluente y en el efluente durante el período de experimentación en el humedal construido. La línea punteada indica el límite de detección del método analítico.....	57
13. Concentración removida de diclofenaco y naproxeno por el material de soporte de las plantas (grava).....	60
14. Altura de las plantas (punto A) expuestas a los fármacos en el humedal control y en el humedal con la mezcla de fármacos.....	62
15. Altura de las plantas (punto B) expuestas a los fármacos en el humedal control y en el humedal con la mezcla de fármacos.....	62
16. Altura de las plantas (punto C) expuestas a los fármacos en el humedal control y en el humedal con la mezcla de fármacos.....	63
17. Número de hojas de las plantas (punto A) expuestas a los fármacos en el humedal control y en el humedal con la mezcla de fármacos.....	64

18. Número de hojas de las plantas (punto B) expuestas a los fármacos en el humedal control y en el humedal con la mezcla de fármacos.....	64
19. Número de hojas de las plantas (punto C) expuestas a los fármacos en el humedal control y en el humedal con la mezcla de fármacos.....	65
20. Contenido de clorofila (Sección A) de las plantas desarrolladas en la celda con diclofenaco y naproxeno y control.....	66
21. Contenido de clorofila (Sección B) de las plantas desarrolladas en la celda con diclofenaco y naproxeno y control.....	66
22. Contenido de clorofila (Sección C) de las plantas desarrolladas en la celda con diclofenaco y naproxeno y control.....	67
23. Morfología de colonias desarrolladas en presencia de una mezcla de diclofenaco y naproxeno.....	68
24. Halos que evidencian la degradación bacteriana del almidón en agar suplementado con almidón; (+) resultado positivo, ND (no se detecta halo hidrolítico) .....	71
25. Prueba de degradación de pectina. Los resultados positivos corresponden al crecimiento de las bacterias, un resultado negativo está representado porque no se observa crecimiento.....	72
26. Prueba de hidrolisis de carboximetilcelulosa.....	73
27. Porcentaje de aislados bacterianos con capacidad de hidrolisis de carbohidratos complejos.....	73
28. Producción de AIA de los aislados bacterianos.....	75
29. Producción de sideróforos bacterianos en agar CAS. (+) representa un resultado positivo en medio CAS inoculado con bacterias productoras de sideróforos, ND significa un resultado negativo.....	77
30. Solubilización de fosfato tricálcico en agar NBRIP. ND corresponde a las pruebas negativas, es decir, las bacterias inoculadas no fueron capaces de solubilizar el fosfato, (+) corresponde a las pruebas positivas.....	78
31. Características de promoción de crecimiento vegetal de los aislados bacterianos tolerantes a diclofenaco y naproxeno.....	78
32. Colonias bacterianas de color marrón, lo que indica que producen lacasa.....	80
33. Amplificación por PCR del ADNr 16s en gel de agarosa (0.8 %) de los aislados bacterianos de raíz de <i>Typha latifolia</i> .....	80

34. Concentración mínima inhibitoria de las cepas de la raíz de <i>Typha latifolia.</i> , en una mezcla de diclofenaco con naproxeno. a) Prueba de tolerancia para de los aislados bacterianos en una mezcla de 30:50 mg/L de diclofenaco: naproxeno b) Aislados bacterianos desarrollados en una mezcla de 300:500 mg/L diclofenaco: naproxeno c) Prueba de aislados bacterianos en una mezcla de 600:1000 mg/L de diclofenaco: naproxeno.....	85
35 Variación de la concentración de diclofenaco (a) y naproxeno (b) con los aislados bacterianos de la sección A.....	88
36. Variación de la concentración de diclofenaco (a) y naproxeno (b), con los aislados bacterianos de la sección B.....	89
37. Variación de la concentración de diclofenaco (a) y naproxeno (b), con los aislados bacterianos de la sección C.....	89
38. Cromatografía en capa fina de diclofenaco, naproxeno y su mezcla, en medio M9.....	92
39. Cromatografía en capa fina de diclofenaco, naproxeno y su mezcla con medio M9.....	92
40 Cromatogramas a) Muestra del punto A, b) Muestra del punto C.....	102
41. Geometrías optimizadas a) molécula neutra de diclofenaco, b) anión de diclofenaco, c) molécula neutra de naproxeno, d) anión de naproxeno, y, e) celulosa.....	104
42. Interacciones de diclofenaco y naproxeno con carga neutra, a) 1er. Interacción de diclofenaco y naproxeno con cargas neutras, b) 2do. Interacción de diclofenaco y naproxeno cargas neutras, c) 3er. Interacción de diclofenaco con naproxeno cargas neutras.....	104
43. Interacciones entre diclofenaco y naproxeno con carga aniónica a) primera interacción, b) segunda interacción, c) Tercera interacción.....	105
44. Interacciones posibles entre celulosa con a) diclofenaco molecular neutro, b) diclofenaco molecular aniónico, c) tercera interacción diclofenaco neutro, d) Cuarta interacción diclofenaco neutro y celulosa, e) 1era. Interacción diclofenaco carga aniónica y celulosa, f) 2da interacción diclofenaco anión y celulosa, g) 3era interacción diclofenaco anión y celulosa, h) 4ta interacción diclofenaco anión y celulosa.....	106
45. Superficie de energía potencial (PES) de mecanismos propuestos a) Diclofenaco, b) Naproxeno.....	110

## Índice de tablas

1. Concentraciones de fármacos detectados en agua en México.....	7
2. Propiedades fisicoquímicas de algunos fármacos comúnmente detectados en suelo y agua .....	9
3. Solubilidad, volatilidad y potencial de adsorción en el suelo de algunos fármacos detectados en el ambiente .....	10
4 . Estudios realizados en humedales para la eliminación de fármacos.....	18
5. Investigaciones en humedales construidos indicando el mecanismo de remoción de los productos farmacéuticos.....	21
6. Designación de celdas del humedal.....	33
7. Composición de las mezclas de diclofenaco y naproxeno con base al diseño central compuesto.....	37
8. Condiciones de la reacción de PCR.....	40
9. Aislados bacterianos de las raíces de las plantas de <i>Typha latifolia</i> desarrollada en el HC-FSSH alimentado con la solución de fármacos.....	69
10. Identificación molecular de los aislados bacterianos.....	81
11. Pruebas bioquímicas de los aislados bacterianos.....	83
12. Identificación de diclofenaco y naproxeno en muestras de agua sintética en el HC-FSS por Cromatografía de Gases Masas con detector de Espectroscopía de Masas.....	93
13. Identificación de diclofenaco y naproxeno de extractos de medio mínimo M9 con aislados bacterianos individuales, con plantas y consorcio por Cromatografía de Gases Masas con detector de Espectroscopía de Masas.....	95
14. Energías de optimización de diclofenaco, naproxeno y celulosa.....	104
15. Energía de interacción de diclofenaco, naproxeno y celulosa.....	108

## Abreviaturas y Nomenclatura

<b>EDAR</b>	Estación Depuradora de Aguas Residuales
<b>AINE</b>	Antiinflamatorios no esteroides
<b>HC-FSSH</b>	Humedal Construido-Flujo Subsuperficial Horizontal
<b>POA</b>	Procesos de Oxidación Avanzada
<b>TRH</b>	Tiempo Retención Hidráulico
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>TLC</b>	Cromatografía capa fina
<b>USEPA</b>	United States Environmental Protection Agency
<b>PES</b>	Superficie de Energía Potencial

## 1. Introducción

En los últimos treinta años, se han identificado residuos de productos farmacéuticos en casi todas las matrices de agua a nivel mundial, esto incluye agua superficial, lagos, ríos, arroyos, estuarios y agua de mar (McArdell y col. 2003., Watkinson y col., 2009), aguas subterráneas (Fick y col., 2009), en efluentes y afluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) y lodos. Los productos farmacéuticos aún no están regulados por ninguna norma, por lo cual no existen límites de concentración al ser detectados en el medio ambiente (Tijani y col., 2016), estos residuos son considerados “contaminantes emergentes” que al ingresar al medio ambiente tienen el potencial de causar impacto considerable en la salud humana y los ecosistemas (Daughton, 2004). Dentro de la gama de productos farmacéuticos, los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se encuentran entre los más conocidos, con una gran variedad de propiedades como analgésico, antipirético y antiinflamatorio, que se utilizan ampliamente en la medicina humana y veterinaria, debido a su alto consumo, los AINE se ha identificado en el medio ambiente en concentraciones generalmente del nivel de trazas.

La introducción de AINE, en matrices ambientales como suelo, sedimento, agua subterránea e incluso el agua potable se considera un problema emergente al que se le ha dado reciente importancia debido a la toxicidad de las sustancias sobre los organismos en el ambiente natural y potencialmente sobre el hombre, aún a las bajas concentraciones detectadas en el ambiente (Almeida y col., 2013). En México, el 10 % de los residuos que se desechan al ambiente son medicamentos. De ellos, en agua se han encontrado mayormente el naproxeno (54 ng/mL), el ibuprofeno y el diclofenaco, cada uno en concentraciones de 1.5 ng/mL (Peña y Castillo, 2015). Las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales en su conformación clásica mayormente basadas en tratamiento por lodos activados no remueven eficientemente los fármacos y otros contaminantes orgánicos emergentes ya que se han reportado eficiencias de remoción inferiores al 10 % en el caso de productos farmacéuticos como carbamazepina, atenolol, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, ácido mefenámico, propranolol, ácido clofíbrico y lincomicina (Petrovíc y col., 2005). Por ello, la presencia de compuestos farmacéuticamente activos se ha convertido en un problema de preocupación ya que se pueden bioacumular en los organismos acuáticos e incorporarse en la cadena trófica.

Para la eliminación de fármacos de los efluentes contaminados se han planteado diferentes alternativas. Entre éstas, se ha propuesto la implementación de humedales construidos ya que se busca que este tratamiento sea eficiente y de bajo

costo; siendo los humedales construidos una alternativa prometedora para la eliminación de productos farmacéuticos en aguas residuales (Matamoros y col., 2006). Su aplicación es sumamente atractiva debido a sus bajos requerimientos de mantenimiento y bajo costo de instalación y operación, se ha probado su efectividad en la remoción de nitratos y fosfatos, así como para metales pesados y algunas sustancias orgánicas (Prathap y col., 2017).

Diferentes estudios han reportado la capacidad de remoción de los humedales construidos para eliminar contaminantes orgánicos. Por ejemplo, Hijosa y col. (2016) utilizando un humedal horizontal de flujo subsuperficial para eliminar cafeína (19.2 µg/L) e Ibuprofeno (10.4 µg/L) reportaron eficiencias de remoción de 60 % y 90 % respectivamente; así mismo Zhang y col. (2016) indicaron una eficiencia de remoción del 96 % para ibuprofeno (250 µg/L).

En los últimos años la mayoría de los estudios en humedales construidos se basaban en la evaluación de su eficiencia de remoción. Sin embargo, existen interrogantes que no se han respondido como, la generación de subproductos de degradación cuya identificación, concentración y toxicidad no se conoce bien, el papel de las plantas, los microorganismos desarrollados en la raíz de las plantas y del medio de soporte sobre el porcentaje total del contaminante removido del agua. Otro desafío para la eliminación de los AINE se debe a que, en el medio ambiente, éstos se encuentran presentes en mezclas de diferentes sustancias químicas y se desconocen las interacciones entre ellos y si éstas interacciones dificultan o facilitan su eliminación de las soluciones e incluso su toxicidad sobre los organismos en los compartimientos ambientales.

El presente trabajo tuvo la finalidad de estudiar el papel de los microorganismos desarrollados en un humedal construido de flujo subsuperficial horizontal (HC-FSSH) plantado con *Typha latifolia* para remover una mezcla de diclofenaco y naproxeno, dos AINE detectados en efluentes, en mayor concentración, en aguas residuales de México. El proyecto tiene el propósito determinar la capacidad de remoción de los fármacos por el HC-FSSH y analizar el rol de las plantas de *Typha latifolia*, el medio de soporte y los microorganismos en la eliminación de estas sustancias presentes en la solución. Además, se estudió por modelamiento computacional, las posibles interacciones entre diclofenaco y naproxeno, y con el componente mayoritario de la estructura de la raíz, la celulosa, para dar una explicación a la eficiencia de remoción y a las limitaciones que estos sistemas puedan tener al tratar mezclas de contaminantes de tipo fármacos.

## 2. Antecedentes

En las últimas dos décadas, los compuestos farmacéuticos se han identificado como contaminantes emergentes, ya que se utilizan cada vez más tanto en terapia humana como en veterinaria, incluida la agricultura y la acuicultura (Boxall y col., 2015); donde muchos de ellos se expenden en México, sin receta médica.

Los fármacos se han diseñado para tener un modo de acción específico, dirigido a órganos determinados, son sustancias de composición química conocida que tienen la capacidad de producir efectos o cambios en una determinada propiedad fisiológica de quien lo consume; su dosificación y sus efectos (tanto benéficos como perjudiciales) son claramente conocidos cuando se recetan a los seres humanos o a los animales. Los productos farmacéuticos son esenciales en la medicina actual y aportan beneficios considerables para la sociedad, provocando que de manera mundial se administren cerca de 4 000 ingredientes activos a través de medicamentos con prescripción, medicamentos sin prescripción y medicamentos veterinarios. Los ingredientes activos abarcan una amplia variedad de productos químicos sintéticos fabricados por empresas farmacéuticas tanto en países industrializados como en países en desarrollo a un ritmo estimado del orden de 100 000 toneladas anuales (Weber y col., 2014).

Dentro de la gama de medicamentos con mayor índice de consumo mundial se encuentran los AINE, estos representan una de las clases de fármacos terapéuticos más relevantes que se encuentran en los ecosistemas acuáticos de todo el mundo (Beek y col., 2016). El uso extensivo de los AINE se debe a sus propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias para disminuir el dolor y la inflamación en terapia tanto humana como veterinaria, inhiben la síntesis y liberación de prostaglandinas, del ácido araquidónico, actuando como inhibidores no selectivos de las enzimas ciclooxigenasa (Gierse y col., 1995). Los AINE entran al medio ambiente por la actividad de las industrias farmacéuticas, la eliminación inadecuada de productos no utilizados o caducados, los desechos generados en hospitales y granjas de cría, y por las propias aguas residuales municipales tratadas o sin tratamiento (Patel y col., 2019). Los AINE se expenden por medio de una receta y muchos se comercializan sin receta, prácticamente en el mundo (Wiegand y Verneti, 2017).

Los fármacos no se asimilan completamente en los seres vivos y se eliminan en cierto porcentaje a través de la orina y heces, como metabolitos o subproductos de degradación o en una forma inalterada químicamente, en el caso de ibuprofeno este se elimina en un 10 % aproximadamente, de forma inalterada y, un 90 % se elimina

en forma de metabolitos, para diclofenaco el 60 % de la dosis administrada se excreta con la orina como metabolitos, menos del 1 % se excreta como sustancia inalterada. El resto de la dosis se elimina en forma de metabolitos a través de la bilis con las heces (Llorens, 2019). Estas sustancias tienen como destino los cuerpos de agua y el suelo, y se han convertido en unos de los productos farmacéuticos identificados con mayor frecuencia en el medio ambiente (Fekadu y col., 2019), se han detectado en diferentes ambientes en concentraciones que van desde ng a µg por litro (Sivaranjane y col., 2021)

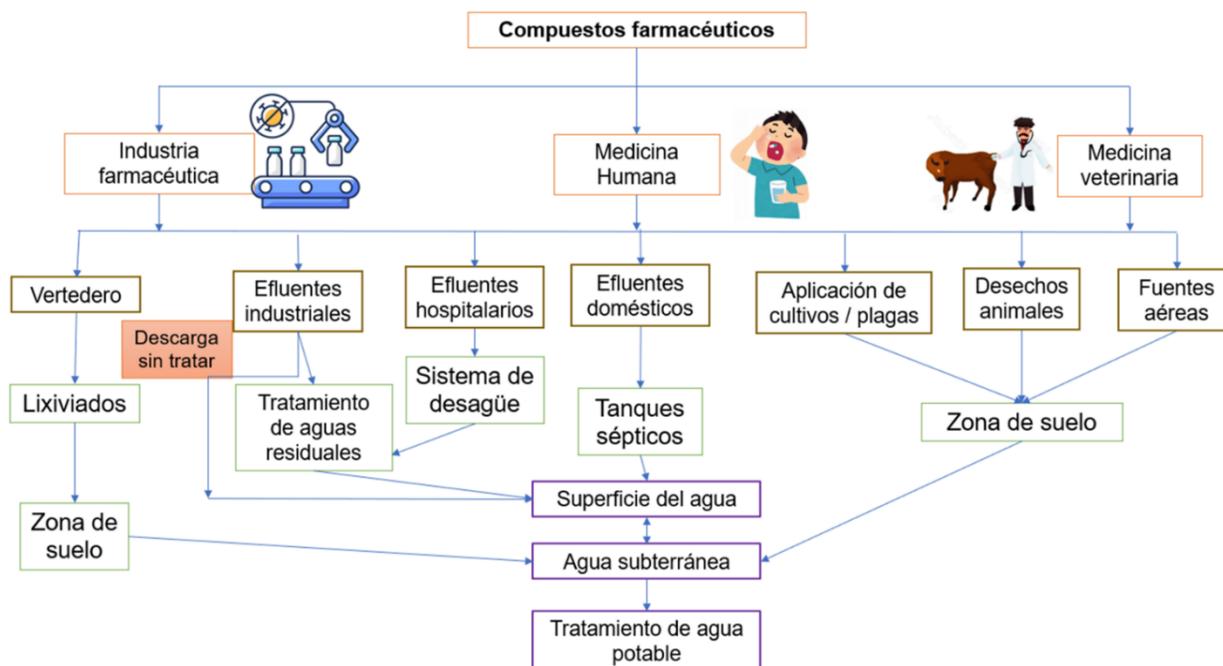
La estructura química compleja y la estabilidad de estos contaminantes, ha conllevado a que no se eliminen totalmente por las plantas de tratamiento de aguas residuales, y puedan ser consumidos involuntariamente por los humanos en agua del grifo que provienen de la potabilización de aguas superficiales (Nor y col., 2021).

En el mundo, el diclofenaco es el fármaco más frecuentemente detectado en muestras ambientales, seguido del ibuprofeno y el naproxeno los cuales se han detectado casi con la misma frecuencia que el diclofenaco, lo cual los coloca como los tres fármacos más frecuentemente detectados en muestras ambientales (Aus der Beek y col., 2016). De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas, el ácido acetilsalicílico, el paracetamol, el diclofenaco, el ibuprofeno y el naproxeno se incluyen en la lista de las dieciséis sustancias que se detectaron en aguas superficiales, potables y subterráneas en el mundo, con concentraciones medias globales que oscilan entre 0.03 y 0.90 µg/L (Aus der Beek y col., 2016)

## **2.1 Vías de ingreso de los fármacos al ambiente**

Desde la década de 1980 el consumo de productos farmacéuticos ha aumentado entre un 7 y 8 % anual en los países industrializados; donde los sectores de mayor poder adquisitivo muestran un mayor consumo (Patel y col., 2019). En los organismos, estas sustancias son biotransformadas parcialmente y se excretan como una mezcla de metabolitos. Los sistemas de aguas residuales recogen una gran variedad de fármacos de uso humano y veterinario, así como metabolitos probablemente más tóxicos que el medicamento original, al ser administrados en hogares y hospitales. A lo anterior se suma la inadecuada disposición final de los sobrantes que se prescriben y que los individuos no consumen totalmente, así como a la falta de programas de recolección de medicamentos caducos que deben implementar las autoridades sanitarias. Como consecuencia, varias clases de estos compuestos están siendo vertidos en aguas superficiales, subterráneas y aguas costeras (Parolini y col, 2011), lo que evidencia que han sido descargados continuamente en medios acuáticos sin ninguna restricción, en todo el mundo

(Matamoros y col., 2007). La Figura 1 indica las posibles rutas de ingreso de los fármacos al agua y al suelo.

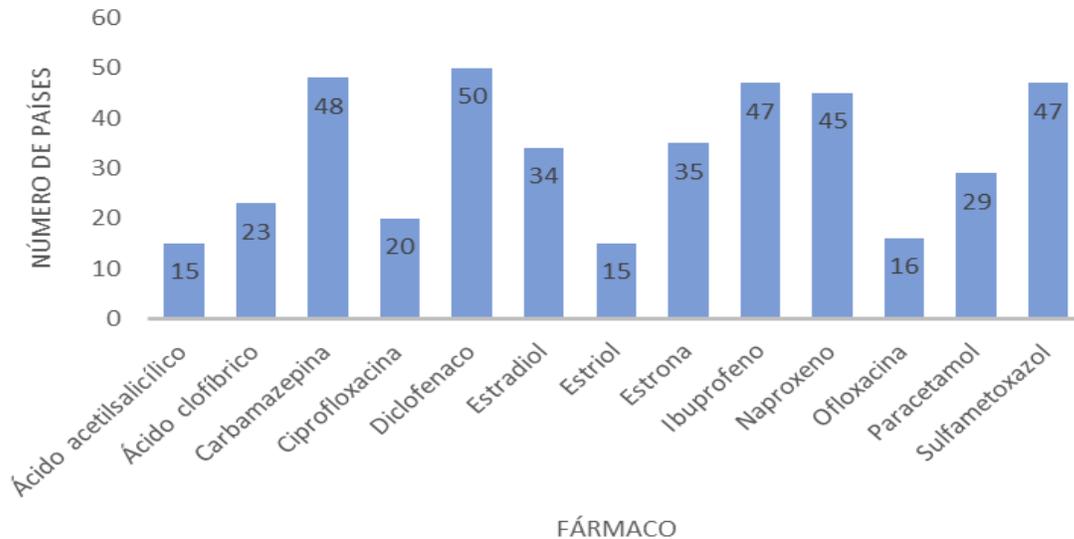


**Figura 1.** Vías de incorporación de fármacos al medio ambiente (Patel y col., 2019)

## 2.2 Productos farmacéuticos detectados en el medio ambiente

Actualmente los datos sobre el consumo de productos farmacéuticos en muchos países están disponibles; sin embargo, son aún insuficientes para establecer datos específicos de cada país sobre el consumo de estos productos (Beek y col 2016) y por lo tanto del impacto de los residuos que los contienen, aunque hay número creciente de estudios que han demostrado que los fármacos están presentes en el suelo y el agua a nivel mundial (IWW 2014; Hughes y col., 2013). Weber y col. (2014) indicaron que se han detectado más de 600 sustancias farmacéuticas activas (o sus metabolitos y productos de transformación) en el medio ambiente que pertenecen a distintos grupos terapéuticos: antibióticos, analgésicos, medicamentos para la reducción de lípidos, beta-bloqueadores, medios de contraste de rayos X y estrógenos sintéticos. En la Figura 2 se muestra la gama de fármacos reportados por diferentes países. Dentro de los fármacos AINE más detectados se encuentran diclofenaco, carbamazepina, ibuprofeno, sulfametoxazol y naproxeno. Este trabajo

se enfocará particularmente a la eliminación de diclofenaco y naproxeno mediante el uso de un humedal construido de flujo subsuperficial horizontal (HC-FSSH).



**Figura 2.** Fármacos detectados en cuerpo de aguas o efluentes de aguas residuales y en suelo a nivel mundial (Adaptación: Tim y col., 2016).

De acuerdo con Tim y col., (2016), los AINES se han detectado con mayor frecuencia en un número más importante de países, resaltando a diclofenaco como el medicamento más frecuentemente detectado.

En el caso particular de México, los estudios sobre la detección de productos farmacéuticos son pocos; sin embargo, desde 2017 han surgido investigaciones que describen la identificación de algunos fármacos en agua. La Tabla 1 muestra los fármacos mayormente detectados en agua en México.

**Tabla 1.** Concentraciones de fármacos detectados en agua en México.

Compuesto	Concentración (mg/L)	Lugar de detección	Referencia
Diclofenaco	0.0011- 0.001276		
Naproxeno	0.003- 0.00482		
Ácido salicílico	0.0002- 0.000664	Cuernavaca, Río Apatlaco	Rivera-Jaimes y col. 2018
Atenolol	0.000012- 0.0000161		
Gemfibrozilo	0.000046-0.000368		
Diclofenaco	0.12-0.36	Tlaxcala, Río Zahuapan	Olivé y Navarro-Frómeta, 2017
Naproxeno	0.36-1.56		
Triclosán	0.31-15.32		
Carbamazepina Diclofenaco Propiconazol Sotalol Bezabifrato	Concentraciones no detectadas	Cozumel, Pozos "Las Fincas"	Koch y col. 2017
Naproxeno	0.0056-0.0135	Valle de México, canales de aguas del Valle del Mezquital y Valle de Tula	Siemens et al. 2008

Es preocupante el ingreso de los fármacos en el ambiente, no sólo por su concentración sino también por sus características fisicoquímicas que explican su naturaleza de ser persistentes y/o de biotransformarse en el medio en el cual se encuentran por diferentes reacciones. Muchas de estas sustancias al incorporarse al agua o al suelo son transformadas en subproductos por fotólisis, degradación microbiana, reacciones de oxidación - reducción o por hidrólisis. Sin embargo, diferentes estudios indican que la identificación analítica de subproductos es muy complicada, debido a la escasez de patrones primarios o de técnicas de identificación, por lo que es necesario disponer de protocolos que permitan su identificación y determinar su toxicidad (Rahman, 2007; Belisario, 2007).

### 2.2.1 Propiedades Físicoquímicas de los productos farmacéuticos

Los fármacos son moléculas que tienen actividad biológica sobre diferentes organismos; sus propiedades físicoquímicas influyen en su distribución, su movilidad química, su dispersión, determinan su persistencia en el ambiente y pueden facilitar su bioacumulación (Pastrana y col., 2015).

La gran mayoría de fármacos son ácidos y bases débiles, por lo que su presencia en forma ionizada o sin disociar depende del pH del medio y de la constante de acidez ( $K_a$ ) (Cartagena, 2012). Sin embargo, dentro de las propiedades físicoquímicas existen otras con la misma importancia para poder comprender el comportamiento del medicamento en el ambiente: la solubilidad (S), la presión de vapor, la constante de la ley de Henry (H), el coeficiente de adsorción ( $K_{oc}$ ) y el coeficiente de distribución octanol-agua ( $K_{ow}$ ) (Pastrana y col., 2015).

Un fármaco con alta solubilidad en agua no tiende a acumularse en el suelo ni en la biota porque es una sustancia muy polar, muy probablemente se degraden preferentemente por hidrólisis química, por el contrario, un fármaco con un alto valor de  $K_{ow}$  (mayor a 4-5: compuesto no polar) puede fijarse mayormente en la materia orgánica, sedimento o biota, lo que indica que tiene alta probabilidad de adsorberse en suelos y de acumularse en organismos vivos, considerándose más peligroso.

Una sustancia con un valor elevado de  $K_{oc}$ , tenderá a adsorberse en el suelo, mayormente en la fracción orgánica, con un alto potencial para contaminar aguas superficiales (Peña y col., 2006; Peng y col., 2007). La constante de Henry (H) es un valor que representa la volatilización de cualquier sustancia, es decir, la sustancia pasa a la fase gaseosa en algún grado, dependiendo de su presión de vapor, su estado físico y la temperatura ambiente. Los fármacos con valores menores a  $1 \times 10^{-3}$  mm Hg como presión de vapor, se disolverán principalmente en agua (Ramos, 2009); si el valor de H es menor a  $9.9 \times 10^{-11}$  atm  $m^3/mol$  entonces se trata de un compuesto de baja volatilidad y eso puede explicar su mayor distribución en la fase sólida y/o acuosa.

Barceló y col., (2008) reportan que en los compartimientos suelo o agua con  $pK_a < 3$  ó  $4$ , los fármacos tienden a mantenerse en la solución mientras que una sustancia con  $pK_a > 10$  tiende a ser retenida en el suelo o en la fase sólida, debido a la forma en la que pueden encontrarse ionizada o no ionizada. Las Tablas 2 y 3 muestran las características físicoquímicas de algunos fármacos detectados en el medio ambiente.

**Tabla 2.** Propiedades fisicoquímicas de algunos fármacos comúnmente detectados en suelo y agua (Adaptación: Ramos, 2009; Gao y col., 2013).

Potencial de bioacumulación		Disociación ácido – base	
Coeficiente Octanol-Agua (Log K <sub>ow</sub> )		pK <sub>a</sub> (= -log K <sub>a</sub> )	
Alto 8.0 > Log K <sub>ow</sub> > 4.3	Diclofenaco (4.51)	Alta pK <sub>a</sub> < 3	
Moderado 4.3 > Log K <sub>ow</sub> > 3.5	Estradiol (4.01)                      Ibuprofeno (3.97)	Moderado 3 > pK <sub>a</sub> < 10	Atenolol (9.60)                      Paracetamol (9.38) Ciprofloxacina (6.90) Sulfametaxazol (5.7) Ofloxacina (5.49)                      Ibuprofeno (4.91) Ketoprofeno (4.45) <b>Diclofenaco (4.15)</b> <b>Naproxeno (4.15)</b>
Bajo 3.5 > Log K <sub>ow</sub>	<b>Naproxeno (3.18)</b> Carbamazepina (3.13) Ketoprofeno (3.12) Ácido Clofibrico (2.57) Estrona (2.45)                      Sulfametoxazol (0.89) Paracetamol (0.046)                      Ciprofloxacino (0.28) Atenolol (0.16) Ofloxacina (-0.39)	Baja pK <sub>a</sub> > 10	Estradiol (24.71) Carbamazepina (13.9) Ácido clorfibrico (11.45) Estrona (10.71)

**Tabla 3.** Solubilidad, volatilidad y potencial de adsorción en el suelo de algunos fármacos detectados en el ambiente (Adaptación: Ramos, 2009; Gao y col., 2013).

Solubilidad en agua (S)		Volatilidad (H)		Adsorción en suelo (Koc)	
Factor de solubilidad (a 25 °C; mg/L)		Constante Ley de Henry (a 25 °C, atm-m <sup>3</sup> /mol)		Coeficiente de Adsorción	
Muy soluble S > 1000	Atenolol (1.33X10 <sup>7</sup> ) Ofloxacina (2.83X10 <sup>7</sup> ) Ciprofloxacino (3 X10 <sup>4</sup> ) Paracetamol (1.4X10 <sup>4</sup> )	Muy volátil H < 10 <sup>-1</sup>	Ketoprofeno (2.12x10 <sup>-1</sup> )	Muy fuerte Log Koc > 4.5	Ciprofloxacina (4.78)
Soluble 1000 < S < 10 000		Volátil 10 <sup>-1</sup> > H > 10 <sup>-3</sup>		Fuerte 4.5 > Log Koc > 3.5	Ibuprofeno (3.53)
Moderadamente 100 < S < 1000	Sulfametoxazol (610; a 37 °C) Ácido clorfibrico (583)	Moderadamente 10 <sup>-3</sup> > H > 10 <sup>-5</sup>	Paracetamol (6.30x10 <sup>-5</sup> )	Moderado 3.5 > Log Koc > 2.5	
Ligeramente 0.1 < S < 100	Ketoprofeno (51; a 22 °C) Estrona (30) Ibuprofeno (21) Carbamazepina (17.7) <b>Naproxeno</b> (15.9) Estadiol (3.6; a 27 °C) <b>Diclofenaco</b> (2.37)	Ligeramente 10 <sup>-5</sup> > H > 10 <sup>-7</sup>	Ibuprofeno (1.50x10 <sup>-7</sup> ) Carbamazepina (1.08x10 <sup>-7</sup> )	Bajo 2.5 > Log Koc > 1.5	<b>Naproxeno</b> (2.51) <b>Diclofenaco</b> (2.38) Sulfametoxazol (1.86)
Insoluble S < 0.1		No volátil 10 <sup>-7</sup> > H	Ofloxacina (4.98x10 <sup>-20</sup> ) Ciprofloxacina (5.09x10 <sup>-19</sup> ) Atenolol (1.37x10 <sup>-18</sup> ) Sulfametoxazol (6.42x10 <sup>-13</sup> ) <b>Diclofenaco</b> (4.7x10 <sup>-12</sup> ) Estradiol (3.64x10 <sup>-11</sup> ) <b>Naproxeno</b> (3.39x10 <sup>-10</sup> ) Estrona (3.80x10 <sup>-8</sup> )		

Es importante resaltar que todas las propiedades fisicoquímicas de los fármacos se obtienen en condiciones controladas de laboratorio y con cantidades conocidas del medicamento y esto no ocurre en la naturaleza, sin embargo, son propiedades que ayudan a entender el comportamiento químico de las sustancias. Otro punto importante para considerar es tener en cuenta que un medicamento no permanece intacto por tiempo indefinido en el medio ambiente, ya que con el tiempo puede sufrir una transformación, influenciada por los microorganismos, el pH, el clima, entre otros (Ramos, 2009), lo cual provoca la formación de metabolitos con propiedades diferentes e incluso más tóxicos.

Debido a sus características fisicoquímicas, algunos productos farmacéuticos pueden bioacumularse, como es el caso de diclofenaco cuyo  $K_{ow}$  es alto, lo que aumenta su potencial de bioconcentrarse por su afinidad por los lípidos; tanto diclofenaco como naproxeno son compuestos no volátiles y tienen baja capacidad para ser adsorbidos por el suelo, es por ello que, la mayoría de las ocasiones son detectados en efluentes de agua y no en el suelo o en el sedimento. Son compuestos ligeramente solubles lo que explica que de la dosis que se consume, el ser humano solo asimile una fracción y el resto se elimine en orina y heces llegando así a las aguas residuales municipales.

### **2.3 Efectos de diclofenaco y naproxeno en la naturaleza**

Existe una creciente preocupación sobre los efectos negativos que pueden provocar los productos farmacéuticos en los ecosistemas y en los organismos no objetivo; como se ha explicado diclofenaco y naproxeno se encuentran en el grupo de productos farmacéuticos más detectados en al menos 50 países (Tim y col., 2016).

#### **Diclofenaco**

La introducción de diclofenaco como analgésico se inició en 1973 (Novartis, 2014), y desde entonces se han aprobado y comercializado diferentes productos farmacéuticos que contienen diclofenaco. En 2008, Zhang y colaboradores estimaron que se consumieron alrededor de 940 toneladas en todo el mundo de acuerdo con la base de datos de salud de Intercontinental Marketing Services (IMS) de forma que en 2012 ocupó el 12avo lugar en ventas de moléculas genéricas en todo el mundo siendo el medicamento más recetado (Palmer, 2012; Mcgettigan y col., 2013; FDA, 2014). Desde principios de la década del año 2000 diferentes estudios han señalado que diclofenaco es el producto farmacéutico que más se ha detectado en el ambiente (Aus der Beek y col., 2015; He y col., 2017).

Entre los efectos negativos que se han reportado por la presencia de diclofenaco en el ambiente, la literatura describe los siguientes:

- Se han determinado concentraciones en los tejidos en las branquias y en los riñones en peces de agua dulce inhibiendo el crecimiento y fecundación de los mismos (Hoeger y col., 2005).
- Es extremadamente tóxico para los buitres expuestos a través del uso de diclofenaco en medicamento de uso veterinario para el ganado. Weber y colaboradores (2014) reportaron la mortandad en poblaciones de buitres en India, Pakistán y Nepal puesto que consumen cadáveres de ganado.
- Se ha informado que 100 µg/L de diclofenaco pueden conducir a la inhibición de la síntesis de prostaglandina E2 después de 3 días de exposición en *M. galloprovincialis* (Courant y col., 2017).
- El fármaco puede generar estrés oxidativo en mejillones y peces a concentraciones de exposición de 5 ng/L a 1000 µg/L (Mezzelani y col., 2016; Toufexi y col., 2016)

## **Naproxeno**

El consumo de naproxeno se inició en 1976, convirtiéndose en el fármaco preferido para el tratamiento de la artrosis en pacientes con alto riesgo cardiovascular (Barcella y col. 2019), es un antiinflamatorio que al igual que diclofenaco no requiere de receta médica para que pueda consumirse, lo que favorece su alto consumo y la potencial entrada de este al ambiente provocando efectos negativos. Hasta ahora se conoce poco de los efectos ambientales a largo plazo por la exposición continua a naproxeno. De acuerdo con diferentes estudios algunos de los efectos de naproxeno son los siguientes:

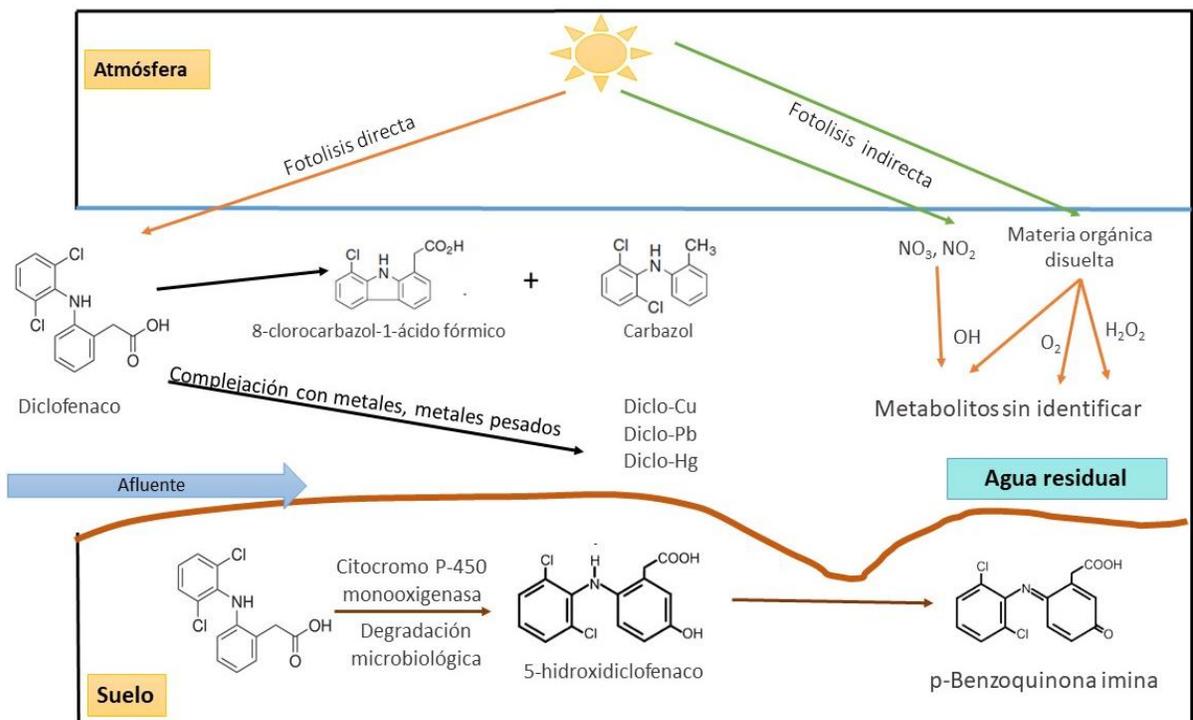
- La exposición crónica a naproxeno causó la inhibición del crecimiento de *C. dubia*, aparentemente por la formación de subproductos de la degradación fotocatalítica del naproxeno los cuales parecen ser más tóxicos que el naproxeno (Isidori y col., 2005).
- Se demostró que, en un lago, el naproxeno se acumulaba en la bilis de los peces a concentraciones 1000 veces mayores a las detectadas en el agua (Brozinski y col., 2012).
- Aún en concentraciones ambientales del orden de trazas (ng/L), el naproxeno afecta la expresión del ARNm y causa efectos gastrointestinales y renales en el pez cebra (Ding y col., 2017).
- Una exposición de 14 días a 10 µg/L de naproxeno en el pez cebra resultó en una expresión genética alterada en el tejido branquial (Li y col., 2016).

## 2.4 Formación de subproductos de diclofenaco en el ambiente

El diclofenaco entra en las aguas superficiales a través de los residuos sólidos y las aguas residuales municipales, tratadas o crudas lo que potencialmente le da la posibilidad de alcanzar las fuentes de agua que se aprovechan para la potabilización y suministro a la población. El diclofenaco también puede contaminar tierras agrícolas a través de la aplicación de lodo de alcantarillado municipal como fuente de nutrientes en el suelo, lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales utilizadas como mejoradores de suelos o a través de la disposición directa de las aguas residuales. Estudios sobre el Koc de diclofenaco demostró que la sorción incluso en sedimentos arenosos es relevante y, por lo tanto, es menos móvil en aguas subterráneas (Scheytt y col., 2005).

Diclofenaco tiende a transformarse fácilmente en el ambiente, principalmente en derivados hidroxilados, el principal proceso natural de degradación es la transformación fotocatalítica por la luz del sol (Zhang y col., 2008; Vieno y Sillanpää, 2014), aunque hasta el momento los estudios sobre la ocurrencia y toxicidad de sus metabolitos en el medio ambiente aún no se comprenden (Nor y col., 2021).

En el suelo, la presencia de microorganismos actúa para biotransformar el diclofenaco. Algunos estudios en laboratorio han utilizado hongos del suelo, para evaluar su capacidad de degradar diclofenaco. Urrea y col. (2010) utilizaron el hongo *Trametes versicolor* e identificaron los metabolitos 4-hidroxiciclofenaco y 5-hidroxiciclofenaco. Sin embargo, no fue posible detectar algunos metabolitos de degradación dada su baja concentración. La Figura 3, muestra las rutas más importantes de transformación de diclofenaco: fotólisis directa e indirecta, complejación con metales y degradación microbiana.



**Figura 3.** Rutas de transformación de diclofenaco en agua y suelo (Domaradzka y col., 2015; Arnold y col., 2007)

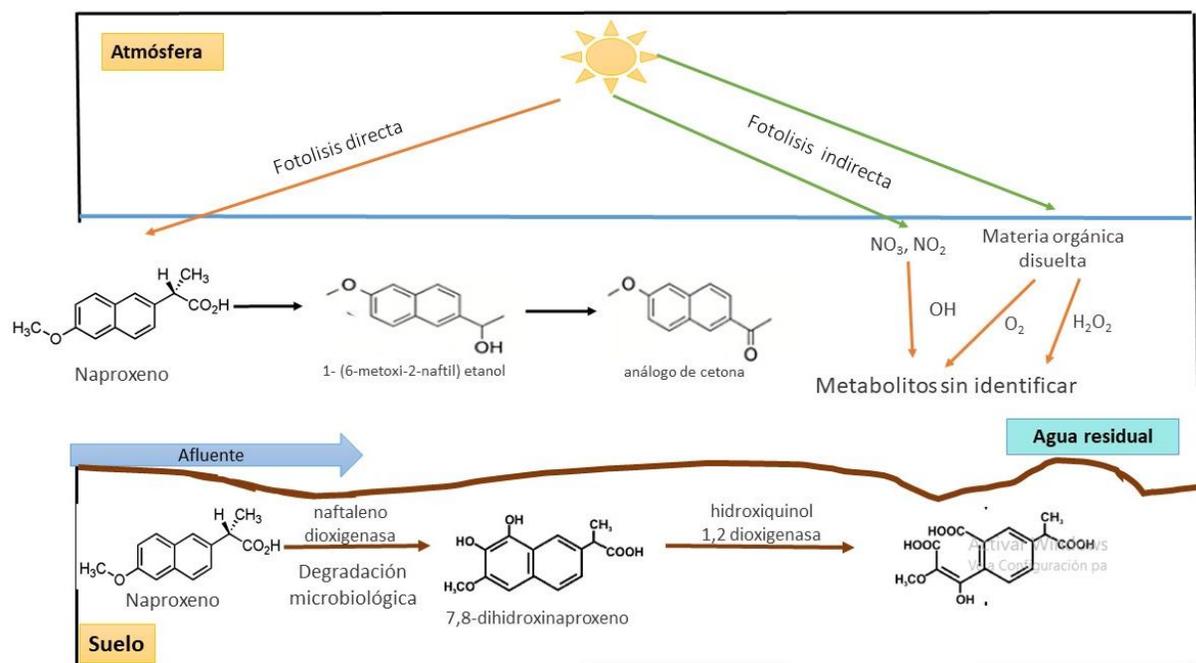
## 2.5 Formación de subproductos de naproxeno en el medio ambiente

El naproxeno es uno de los productos farmacéuticos ácidos más utilizado por el hombre por sus propiedades como antiinflamatorio y antipirético, y es posible obtenerlo sin receta médica (Straub y Stewart., 2007; Daneshvar y col., 2010; Araujo y col., 2011).

Después de la administración terapéutica este fármaco entra principalmente en los ecosistemas acuáticos a través de las plantas de tratamiento de aguas ya que en el ser humano se absorbe solo una pequeña fracción y casi el 80 % se excreta inalterado o en sus formas conjugadas (Carballa y col., 2008). Su presencia en diferentes entornos se ha convertido en un problema grave porque el naproxeno y sus derivados tienen efectos adversos sobre la biota, como la alteración de la peroxidación lipídica en moluscos del género *Bivalvos* (Zheng y col., 2012).

En el agua, el naproxeno se puede transformar por fotólisis directa e indirecta. Por fotólisis directa se han identificado algunos metabolitos como 6-O-desmetilnaproxeno (2- (6-hidroxinaftaleno) 2-il) ácido propanoico) y el 1- (6-metoxinaftaleno)2-il) etanona. No se han logrado identificar subproductos de

degradación por fotólisis indirecta, aunque no se descarta la transformación en otros subproductos. La degradación microbiológica en suelos reveló como resultado la hidroxilación de naproxeno por citocromo P-450 monooxigenasa (Tiehm y col., 2011; Topp y col., 2008). La Figura 4 detalla algunos subproductos de naproxeno identificados en agua y en suelo.



**Figura 4.** Rutas de transformación de naproxeno en agua y suelo (Domaradzka y col., 2015; Vulava y col., 2016)

## 2.6 Métodos de tratamiento para la eliminación de productos farmacéuticos

Los productos farmacéuticos se pueden eliminar usando diversos métodos de tratamiento, tales como biológicos, fisicoquímicos y de oxidación; sin embargo, la mayoría de estos tratamientos tienen desventajas, como contaminación secundaria, alto costo de mantenimiento y procedimientos complicados en el tratamiento (Grassi y col., 2012). A continuación, se describen algunos ejemplos de estos procesos de tratamiento.

Los procesos fisicoquímicos se utilizan típicamente en el tratamiento de agua convencional para eliminar patógenos, controlar problemas de sabor y olor y reducir la turbidez. Estos procesos también pueden tener el beneficio adicional de reducir

la carga de micro contaminantes en los productos terminados, sin embargo, la eliminación es frecuentemente insuficiente (Benner y col., 2013). Dentro de estos procesos se encuentran el uso de carbón activado, coagulación-floculación y filtración por membrana. Diemert y col., 2013, investigaron la eliminación halo-benzoquinona usando la coagulación como método, y determinaron una eficiencia de remoción menor al 15 %. Diferentes estudios han reportado que estos métodos son poco eficientes para remover compuestos como nonilfenol, estrona, estradiol y muchos otros productos farmacéuticos y productos de cuidado personal (Bolong y col., 2009). Los tratamientos con carbón activado y el uso de membranas han demostrado ser los más eficientes para remover fármacos,

En los últimos años se han utilizado tecnologías avanzadas como el tratamiento mediante osmosis inversa, la ultrafiltración, la nanofiltración y los procesos de oxidación avanzada para remover concentraciones traza de fármacos.

Los procesos de oxidación avanzada (POA) generan radicales hidroxilos en cantidades suficientes para ser capaces de oxidar la mayoría de los compuestos químicos complejos presentes en aguas residuales. Entre estos procesos se resalta los basados en la cavitación (generada tanto por medios de irradiación ultrasónica como por constricciones del fluido empleando válvulas, orificios o venturis, entre otros) (Gogate y col., 2009).

La fotocatalisis heterogénea es uno de los procesos de oxidación avanzada más estudiados, utiliza fotocatalisis nanoestructurada para maximizar la absorción de fotones y reactivos, teniendo como ventaja el bajo precio y la estabilidad química de la mayoría de los fotocatalizadores utilizados como el Óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ). Sin embargo, su aplicación al tratamiento de grandes volúmenes de agua es difícil, debido al costo de la electricidad requerida ya que se utiliza radiación artificial a través de lámparas ultravioleta-visible (Rodríguez y col., 2012).

Otros POA han utilizado ozono con peróxido de hidrógeno ( $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ ) y se ha logrado la remoción de 90 % de ibuprofeno y diclofenaco (Zwiener y col., 2000). Una desventaja más de estos procesos es su alto costo al aplicarlo a escala ya que puede ser hasta cuatro veces el costo de un tratamiento convencional.

Dentro de las tecnologías convencionales destacan también los procesos biológicos como los sistemas de biorreactores, lodos activados, filtros biológicos percoladores que pueden rápidamente convertir diversos compuestos orgánicos en biomasa que posteriormente pueden ser separada por medio de clarificadores o sedimentadores (Johnson y Sumpter, 2001). Los biorreactores de membrana pueden usarse para eliminar los estrógenos de las aguas residuales, con una moderada eficiencia,

donde el 17 $\beta$ -estradiol fue removido efectivamente hasta el 67 % y la estrona hasta el 91 % (Katibi y col., 2021).

Dentro de los procesos biológicos se encuentran el uso de humedales construidos (HC), los cuales comúnmente son considerados procesos terciarios por tener la función de pulimento para eliminar contaminantes residuales que no son removidos en los procesos primarios y secundarios. En los procesos de humedales construidos se utilizan plantas desarrolladas sobre un soporte de grava, arena o suelo para eliminar compuestos farmacéuticos. Una ventaja de estos procesos es su bajo costo, así como su bajo consumo de energía ya que en la mayoría de los casos se utilizan pocos aditamentos electrónicos.

## **2.7 Remoción de fármacos por humedales construidos**

Una de las alternativas para la eliminación de productos farmacéuticos son los humedales construidos, con los cuales se han reportado buenas eficiencias de remoción. Zhang y col. (2011) utilizando la planta *Typha angustifolia* lograron remover carbamazepina (26.7 - 28.4 %) e ibuprofeno (80 %). Matamoros y Salvadó (2012) reportan una remoción mayor a 80 % de diclofenaco utilizando *Phragmites australis* mientras que Ávila y col. (2013) reportan una remoción entre 60 – 78 % de ibuprofeno en un humedal de flujo subsuperficial horizontal.

Los estudios realizados basan su investigación en la cuantificación de los productos farmacéuticos y algunos han investigado la formación de productos de transformación y las vías de eliminación. La Tabla 4 resume investigaciones que se realizaron en humedales construidos, los cuales consideran identificación de metabolitos y/o microorganismos y su participación en la remoción.

**Tabla 4 . Estudios realizados en humedales para la eliminación de fármacos**

Fármaco (concentración inicial utilizada)	Tipo de humedal construido	Eficiencia de remoción	Metabolitos	Microorganismos involucrados	Referencia
Ibuprofeno (75 µg/L) Diclofenaco (2.5 µg/L) Bisfenol (1.8 µg/L)	FSSH	Ibuprofeno 52 % Diclofenaco 32 % Bisfenol 79%	SE	SE	Ávila y col., 2013
Cafeína (19.2 µg/L) Ibuprofeno (10.4 µg/L) Carbamazepina (0.99 µg/L) Diclofenaco (0.41 µg/L)	FSSH	Ibuprofeno >90 % Cafeína, diclofenaco, carbamazepina 60 %	SE	SE	Hijosa y col., 2016
Ibuprofeno (250 µg/L)	FSSH	96 %	SE	<i>α -proteobacteria</i> (48–60 %) <i>Firmicutes</i> (27.6 %) <i>Actinobacteria</i> (26.0 %) <i>Chloroflexi</i> (7.3 %) <i>Bacteroidetes</i> (2.7 %) <i>Synergistetes</i> (2.1 %) <i>Acidobacteria</i> (2.0 %)	Zhang y col., 2016 (a)
Cafeína	FSSH	93 %	SE	<i>Firmicutes</i> (39 %) <i>Actinobacteria</i> (25.1 %) <i>Proteobacteria</i> (17.1 %) <i>Synergistetes</i> (>1 %) <i>Chloroflexi</i> (5.5 %) <i>Bacteroidetes</i> (2.9 %) <i>Acidobacteria</i> (1.0 %)	Zhang y col., 2016 (b)

Fármaco (concentración inicial utilizada)	Tipo de humedal construido	Eficiencia de remoción	Metabolitos	Microorganismos involucrados	Referencia
Diclofenaco (3 mg/L)	FSSH	99 %	SE	<i>Proteobacteria</i> (100 %)	Zapata y col., (2017)
Naproxeno (5 mg/L)	FSSH	>90 %	SE	<i>Proteobacteria</i> (100 %)	Zapata y col., (2017)
Ibuprofeno (1 mg/L)	FSSH	96 %	SE	<i>Firmicutes</i> (27.6 %) <i>Actinobacteria</i> (26.0 %) <i>Proteobacteria</i> (24.9 %) <i>Chloroflexi</i> (7.3 %) <i>Bacteroidetes</i> (2.7 %) <i>Synergistetes</i> (2.1 %)	Zhang y col., 2016 (c)
Ibuprofeno (1 mg/L)	Matraz (lote)	90 %	IBU acetil hexósido, hidroxil-IBU acetil hexósido, IBU malonil hexósido y IBU hexosil hexósido.	SE	Pietrini y col., 2015
Naproxeno (6 mg/L)	Matraz (lote)	49 %	2 metabolitos sin identificación	SE	Danuta y col., 2014
Diclofenaco (0.1 g/L)	Matraz (lote)	90 %		SE	Stylianou y col., 2018

\*SE (sin estudio); FSSH se refiere a humedales construidos de flujo subsuperficial horizontal

La Tabla 4 muestra que, en la mayoría de los estudios realizados, la eficiencia de remoción es mayor al 50 %, sin embargo, las investigaciones sobre la formación de subproductos aún es poca y es necesario profundizar en los estudios, así como en las investigaciones para comprender el papel que juegan los microorganismos en remoción. De acuerdo con la tabla son pocos los estudios que han identificado los microorganismos que se desarrollan a nivel de la raíz de las plantas, en los humedales.

## **2.8 Mecanismos de eliminación de fármacos involucrados en los humedales**

Los humedales construidos se han convertido en una buena opción para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con metales (Ge y col., 2015), fármacos, materia orgánica, nutrientes, microorganismos patógenos, etc., por sus ventajas de costo-efectividad y fácil mantenimiento (Zheng y col., 2014). En el 2015, más de 1000 artículos publicados reportaron 631 sustancias farmacéuticas agrupadas en 18 categorías de acuerdo con sus clases terapéuticas. De estas publicaciones algunas (más del 50 %) tenían relación a su eliminación utilizando humedales como un sistema secundario de tratamiento de aguas residuales (Aus de Beek y col., 2015).

En las últimas décadas ha existido un interés creciente por describir los mecanismos de remoción para fármacos en los sistemas de humedales, dentro de ellos se han mencionado la degradación fotolítica (directa e indirecta), degradación microbiana que menciona tres subprocesos como mineralización, transformación a compuestos más hidrofóbicos y transformación a compuestos más hidrofílicos (Kümmerer, 2003), fitodegradación (absorción de la rizosfera, la adsorción en la superficie de la raíz, y translocación de la raíz al brote), adsorción, mecanismos derivados de la sedimentación, la hidrólisis y la autodegradación (Vo y col., 2018).

La tabla 5, detalla investigaciones en humedales construidos, en los cuales se ha buscado comprender los mecanismos de eliminación de los productos farmacéuticos, indicando si esta remoción puede deberse a las plantas, condiciones fisicoquímicas y/o los microorganismos.

**Tabla 5.** Investigaciones en humedales construidos indicando el mecanismo de remoción de los productos farmacéuticos

Fármaco	Tipo de Humedal	Condiciones de operación	Eficiencia de remoción	Mecanismo	Referencia
Carbamazepina Diclofenaco, Ketoprofeno Naproxeno (40 ng/L)	FSSH	<i>Phragmites australis</i> , TRH 8.5 días, 0.2 m de largo, 0.2 m de ancho y 0.50 m de profundidad	Carbamazepina 51 % Diclofenaco 86 % Ketoprofeno 97 % Naproxeno 72 %	Plantas	Matamoros y col., 2012
Ibuprofeno (75 µg/L) Diclofenaco (2.5 µg/L) Bisfenol (1.8 µg/L)	FSSH	<i>Phragmites australis</i> , TRH 4 días, 1.5 m de largo, 1.1 m de ancho y 0.50 m de profundidad	Ibuprofeno 52 % Diclofenaco 32 % Bisfenol 79 %	Condiciones oxidantes	Ávila y col., 2013
Cafeína (19.2 µg/L) Ibuprofeno (10.4 µg/L) Carbamazepina (0.99 µg/L) Diclofenaco (0.41 µg/L)	FSSH	<i>Typha angustifolia</i> , TRH 2 días, 1.3 m de largo, 0.8 m de ancho y 0.5 m de profundidad	Ibuprofeno >90% Cafeína, diclofenaco, carbamazepina 60%	Adsorción por raíz; participación de microorganismos	Hijosa y col., 2016
Ibuprofeno (250 µg/L)	FSSH	<i>Typha angustifolia</i> , TRH 4 días, 1.2 m de largo, 0.6 m de ancho y 0.6 m de profundidad	96 %	Adsorción por raíz	Zhang y col., 2016 (a)

La tabla 5 muestra información sobre los mecanismos involucrados en la eliminación de los fármacos en sistemas de tratamiento como humedales construidos. Diferentes estudios atribuyen la eficiencia de remoción a las plantas, sin embargo, aún es necesario conocer la metodología necesaria para identificar la distribución de los fármacos en las plantas. De acuerdo con la literatura la participación de las plantas en la fitorremediación de contaminantes orgánicos se debe a los siguientes aspectos: 1) el metabolismo de los contaminantes al interior y al exterior de la planta (rizósfera), 2) los procesos que conducen a la completa degradación de los contaminantes en el medio contaminado (mineralización), y 3) la absorción de los contaminantes (Reichenauer y Germida, 2008).

A nivel de la rizósfera, los contaminantes orgánicos pueden degradarse con base en sus características fisicoquímicas. Stottmeister y col. (2003) indican que la mayoría de las plantas utilizadas en los humedales construidos tienen la capacidad de liberar oxígeno alrededor de las puntas de su raíz y en la raíz lateral (raíz joven). El oxígeno liberado en la rizósfera puede también promover los procesos químicos oxidativos de contaminantes en aguas residuales (Sundaravadivel y Vigneswaran, 2001), lo cual favorece el desarrollo de microorganismos aeróbicos en la rizósfera que inducen procesos de biodegradación más eficientes (Dordio y Col., 2009; Li y col., 2014).

En la actualidad diferentes estudios se han enfocado en el aislamiento de los consorcios bacterianos formados dentro de humedales para conocer y comprender su papel en la remoción de los contaminantes. Sin embargo, no se ha llegado a elucidar totalmente su contribución en la remoción de productos farmacéuticos. Zapata y col. (2018) estimaron la remoción de diclofenaco (3 mg/L) y naproxeno (5 mg/L) en un humedal FSSH con un tiempo de residencia hidráulico de 5 días (TRH) obteniendo una eficiencia mayor del 90 %; cabe mencionar que los contaminantes no se encontraban en mezcla. Después de 120 días de operación del humedal, se aislaron los consorcios bacterianos desarrollados en la raíz de las plantas (*Typha latifolia*) encontrándose colonias bacterianas del género *Pseudomonas* tolerantes a concentraciones mayores de 1000 mg/L de diclofenaco o de naproxeno. Por otra parte, Zhang y col. (2015) trataron soluciones contaminadas con 250 µg/L de ibuprofeno mediante un humedal de flujo subsuperficial con plantas de *Typha angustifolia* encontrando una eficiencia de remoción del 78.5 % e identificaron 20 filos dentro de los predominantes se encontró *Firmicutes* (27.6 %), *Actinobacteria* (26.0 %) y *Proteobacteria* (24.9 %).

En un humedal construido, la coexistencia de una variedad de comunidades microbianas entre el agua, el sustrato y los compartimentos de la planta podrían ofrecer nichos ecológicos para apoyar una diversidad de vías metabólicas que conduce a la biodegradación de contaminantes orgánicos (Hijosa y col., 2011). Así,

en la rizósfera, las plantas establecen estrechas interacciones con diferentes tipos de microorganismos como las bacterias que le permiten a la planta adaptarse a condiciones medioambientales adversas (Gan y col., 2017). De esta forma, es razonable considerar que, a nivel de la rizósfera, los microorganismos pueden participar y contribuir a la eliminación de los contaminantes orgánicos. La rizósfera se caracteriza por tener un alto nivel de actividad microbiana a causa de los nutrientes secretados por las raíces de las plantas en forma de exudados solubles como aminoácidos, ácidos orgánicos y otros. La vasta actividad bacteriana presente en esta zona determina las propiedades fisicoquímicas de la rizósfera, así como el de la superficie de la raíz (Foster, 1988).

Dentro de los estudios en humedales la actividad de las poblaciones microbianas es determinante durante el tratamiento y es necesario conocer su modo de acción. Algunos procesos microbianos que han sido identificados incluyen la desnitrificación, la sulfato-reducción, la sulfoxidación y los procesos de oxidación reducción de los metales (Stottmeister y col., 2003, Whitmire y Hamilton 2005). Sin embargo, a pesar de reconocer la importancia de la interacción planta-microorganismos, aún se conoce poco sobre su contribución bioquímica a la remoción de fármacos del agua contaminada.

## **2.9 Comunidades microbianas involucradas en la remoción de fármacos**

Se conoce que los microorganismos participan en la degradación de la materia orgánica y de los xenobióticos, incluidos los productos farmacéuticos, y proporcionan productos que a su vez son nutrientes para otros organismos en la cadena alimentaria (Park y col., 2011). Las comunidades microbianas son por lo tanto claramente vitales para mantener el funcionamiento de los ecosistemas. Los cambios dentro de los grupos funcionales microbianos están relacionados con los cambios en los procesos del ecosistema (Reddy col., 2001).

Hasta el momento los estudios realizados para elucidar el papel de los microorganismos en la degradación de fármacos de tipo AINE son escasos. Uno de los pocos reportados se realizó para remover naproxeno de lodos utilizando cultivos mixtos de microorganismos (Rodarte y col., 2011); los resultados indican que el naproxeno es degradado ineficientemente por hongos o cultivos mixtos.

De los estudios reportados en la literatura, se han aislado microorganismos con la capacidad de degradar diferentes AINE. Estos son principalmente cepas bacterianas que pertenecen al género *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Patulibacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Stenotrophomonas* (Ahmed y col., 2001; Almeida y col., 2013; Chen y Rosazza, 1994; Ivshina y col., 2006; Murdoch y Hay, 2005; Zhang y col., 2013).

También se han aislados hongos (*Penicillium* sp., *Trametes versicolor*, *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata*, *C. blakesleeana*, *Beauveria bassiana*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ph. sordida*, *Actinoplanes* sp., *Bjerkandera* sp. R1, *Bj. adusta*, *Irpex lacteus*, *Ganoderma lucidum*) (Lloret y col., 2010; Rodríguez y col., 2010).

Con respecto de naproxeno y diclofenaco son pocas las cepas bacterianas que se han descrito. Quintana y col. (2005) determinaron la capacidad de los lodos activados para degradar naproxeno y encontraron que el 49 % se biodegradó mediante la transformación simultánea a desmetilnaproxeno. Carballa y col. (2004) mostraron una eliminación de 40 - 55 % de naproxeno durante un tratamiento biológico con lodos activados.

En algunos estudios se ha utilizado *S. maltophilia* KB2 (Gren y col., 2010; Wojcieszynska y col., 2011) y se identificó que metaboliza una amplia gama de compuestos aromáticos, incluidos fenol, cresoles, cloro y nitrofenoles, y algunos compuestos aromáticos de origen vegetal.

Gröning y col. (2007) realizaron pruebas con lodos activados extraídos de ríos cercanos a plantas de tratamiento de aguas residuales para degradar diclofenaco, asumiendo que la biopelícula del sedimento podría albergar microorganismos adaptados capaces de utilizar el fármaco como nutriente; se determinó un 93 % de eliminación de diclofenaco. Los autores analizaron los subproductos proponiendo tres posibles: 4-hidroxi-diclofenaco, 5-hidroxi-diclofenaco y un intermediario de benzoquinona, desafortunadamente, debido a la limitación de patrones primarios, así como a las bajas concentraciones de los fármacos la elucidación no fue totalmente exacta.

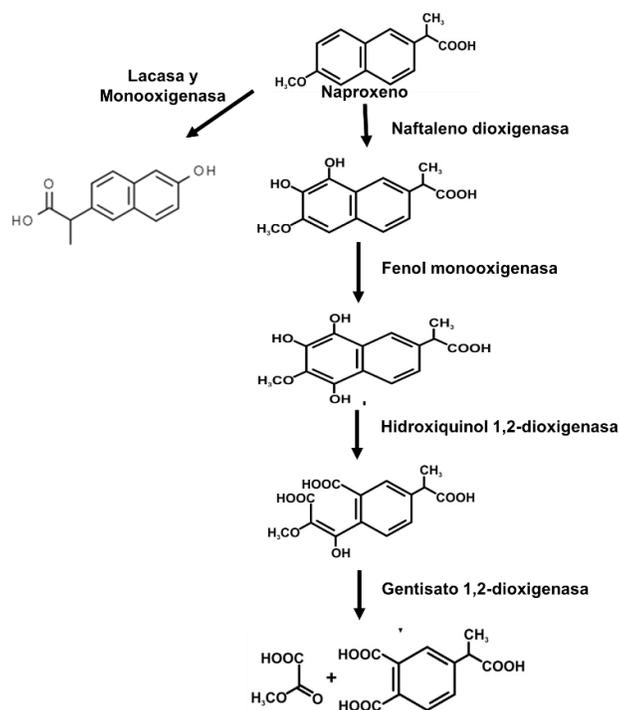
Los estudios para conocer los mecanismos de degradación de fármacos se han enfocado en evaluar la eficiencia de remoción por plantas y/o microorganismos, sin embargo, existe poca información que trate de explicar cómo es el metabolismo bioquímico y las enzimas que participan para favorecer la degradación de estos contaminantes, aspecto que se describe a continuación.

### **2.9.1 Enzimas microbianas involucradas en la degradación de fármacos**

Hasta el momento, solo pocos microorganismos, principalmente hongos (*Penicillium* sp., *Trametes versicolor*, *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata*, *C. blakesleeana*, *Beauveria bassiana*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Actinoplanes* sp., *Bjerkandera* sp. R1, *Bj. Adusta*, *Irpex lacteus*, *Ganoderma lucidum*) han sido identificados en procesos de degradación de fármacos (Lloret y col., 2010; Urrea y col., 2010; Rodarte

y col., 2011); algunos los estudios han indicado la participación de enzimas ligninolíticas en la degradación de xenobióticos, como las lacasas (oxidorreductasas de dióxígeno) que se han reconocido por su participación en la eliminación de compuestos orgánicos.

Urrea y col. (2010) estudiaron la degradación de naproxeno en experimentos en lote (matraz) determinando que las enzimas citocromo P-450 y las lacasas están involucradas, observando un 100 % de degradación de este producto farmacéutico en presencia de estas enzimas. Wojcieszynska y col. (2014) utilizaron *S. maltophilia* (bacteria aerobia gramnegativa) para remover naproxeno y lograron una eficiencia de remoción del 28 % e identificaron que las enzimas involucradas en la degradación son la mono y la dioxigenasa. En figura 5 se observa las rutas propuestas de biodegradación de diclofenaco y naproxeno por microorganismos.



**Figura 5.** Rutas de biodegradación de naproxeno (Tomado de Wojcieszynska y col. 2014)

Conocer como sucede la eliminación de los productos farmacéuticos dentro de un sistema de humedales involucra describir el papel de las plantas, el medio de soporte y los microorganismos, así como describir químicamente como sucede la degradación en el interés de inferir los mecanismos involucrados. Una herramienta de apoyo para

los estudios químicos podría ser la química computacional la cual involucra el uso de modelos matemáticos para la predicción de propiedades químicas y físicas de compuestos y permite simular las interacciones de los fármacos con otros componentes de un humedal, particularmente de las plantas; aunque el modelamiento químico también puede aportar información valiosa en el proceso de elucidación de los mecanismos de degradación. En la siguiente sección se hace una breve descripción de esta herramienta de predicción.

## **2.10 Química computacional como herramienta para comprender los procesos en un sistema de humedales**

La química computacional, conocida como química in silico (hecho por computadora o vía simulación computacional), ha evolucionado considerablemente en los últimos años, desarrollando métodos para cálculos poliatómicos que permiten simular la estructura y propiedades de los compuestos. Hoy en día es una ciencia reconocida con prestigio internacional (Chávez, 2012).

La implementación y aplicación de la química computacional nos permite investigar múltiples propiedades y comportamientos moleculares como:

- La geometría molecular. Además de distancias y ángulos de enlace, es posible caracterizar la forma y tamaños de todo tipo de moléculas y macromoléculas. La energía de todo tipo de especies químicas, incluyendo intermedios, estados de transición, estados excitados, etc., y estimar magnitudes termodinámicas tanto en fase gas como en disolución.
- La reactividad química. Propiedades cinéticas como constantes de velocidad, efectos isotópicos, secciones eficaces de reacción, etc.
- Las propiedades espectroscópicas, eléctricas y magnéticas de moléculas individuales.
- Las propiedades físicas de las fases condensadas. Descripción correcta de las interacciones intermoleculares.

### **2.10.1 Métodos de resolución utilizados en química computacional**

La química computacional abarca un amplio rango de métodos matemáticos que pueden dividirse en dos grandes categorías:

- Mecánica Molecular: Aplica las leyes de la física clásica al núcleo molecular sin considerar explícitamente a los electrones.

- Mecánica cuántica: Se basa en la ecuación de Schrödinger para describir una molécula con un tratamiento directo de la estructura electrónica y que se subdivide a su vez en dos clases según el tratamiento realizado, métodos semiempíricos y métodos de *ab initio* (“desde el principio”, Young D. 2001).

Los métodos de química cuántica permiten conocer interacciones electrón-electrón y electrón-núcleo, lo cual dentro de este proyecto es de suma importancia y por lo cual es con los que se trabajara, la química cuántica incluye los métodos *ab initio* como los basados en Hartree Fock y los métodos semiempíricos.

Los métodos *ab initio*, del latín “desde el principio”, es el nombre que reciben los cálculos computacionales que son directamente derivados de principios teóricos, sin tener en cuenta datos experimentales. Se utilizan aproximaciones matemáticas para que el proceso de cálculo sea el menor posible, simplificando o buscando una solución aproximada para los modelos matemáticos que describen estos sistemas (Young 2001). Este método es controlable ya que no requiere datos exactos y precisos, sin embargo, al ser más robusto, requiere de ordenadores de alta potencia y son métodos lentos.

Los métodos semiempíricos tienen una estructura similar a los Hartree Fock ya que tienen un hamiltoniano y una función de onda. Sin embargo, parte de la información se aproxima o es completamente omitida. Normalmente, los electrones del núcleo no se tienen en cuenta, por tanto, se utilizan parámetros. Para elaborar los parámetros se usan datos experimentales, o datos obtenidos a partir de cálculos *ab initio*.

Los cálculos semiempíricos son más rápidos que los cálculos *ab initio*, pero también son más erráticos, y son menos las propiedades que pueden calcularse con seguridad. La fiabilidad de estos métodos depende en gran medida de que la molécula sea similar a otras que se encuentren en las bases de datos (Jensen 2017).

El objetivo principal de la química computacional es predecir todo tipo de propiedades moleculares de sistemas químicos utilizando la fisicoquímica, la física molecular y la física cuántica, y emplea una gran variedad de técnicas teóricas en constante desarrollo. El principal uso de la química computacional es poder comprender la química en sistemas de difícil estudio. Su desarrollo ha logrado que numerosas investigaciones tengan el respaldo matemático o modelado del sistema lo que lleva a poder explicarlo de una forma más precisa.

Actualmente los estudios de química computacional se han enfocado en la predicción del comportamiento de sistemas complejos de moléculas, el diseño de fármacos y más recientemente en la simulación de adsorbentes para la eliminación de contaminantes (Cuevas, 2003).

Los contaminantes emergentes han generado una gama de preguntas con respecto a su ingreso, comportamiento y degradación en el medio ambiente. En este trabajo se utilizó la química computacional para predecir las interacciones de dos fármacos (diclofenaco y naproxeno) en la solución al encontrarse en una mezcla con el propósito de entender si la formación de especies químicas más complejas puede dificultar la eliminación de estas sustancias de los efluentes contaminados. Se trabajo con los métodos semiempíricos PM6, ya que son métodos más específicos, no requieren capacidad de cómputo alta y estos métodos nos dan una aproximación más real cuando se habla del tratamiento de aguas residuales que usualmente contienen mezclas de sustancias.

### **2.10.2 Interacciones entre los productos farmacéuticos e influencia en su eliminación de los ambientes contaminados**

Estudios recientes han documentado la presencia de una amplia variedad de productos farmacéuticos en el medio ambiente en todo el mundo, incluidos antibióticos, anestésicos, antiinflamatorios, compuestos antitumorales, estrógenos, agentes reductores de lípidos, diuréticos, antidepresivos, así como drogas ilícitas (Castiglioni y col., 2006; Khetan y Collins, 2007).

La identificación de mezclas de sustancias origina los siguientes retos: los productos farmacéuticos están presentes en el medio ambiente en mezclas; estas mezclas están constituidas por diversos productos químicos con diversos modos de acción y los efectos secundarios subterapéuticos son poco conocidos, especialmente en organismos no objetivo; cada producto farmacéutico se encuentra en concentraciones en el rango de nanogramos a microgramo por litro y ser tóxicos aún a esas concentraciones de por sí difíciles de cuantificar con las metodologías analíticas disponibles.

En el medio ambiente las mezclas farmacéuticas pueden incluir interacciones entre las propias sustancias o entre productos de degradación formados durante procesos metabólicos (Cedergreen, 2014), algunos estudios indican que se ha incrementado la toxicidad de las mezclas farmacéuticas en comparación con los compuestos individuales.

Actualmente existen pocas investigaciones en las cuales se identifiquen las interacciones de los fármacos con otros contaminantes, así como la identificación de las probables moléculas que se forman y el estudio de estas, como conocer si es más complicado su remoción, son más tóxicos, dentro de esto Andreu y col., 2016, indican que los productos farmacéuticos no solo pueden interactuar entre ellos, sino también con los metales pesados y los microplásticos, en su investigación indican que

la concurrencia de microplásticos y productos farmacéuticos en un ecosistema acuático conduce a su interacción mutua y la posterior absorción de contaminantes en las superficies microplásticas provocando moléculas complejas, persistentes y con un periodo de degradación sumamente extenso.

## **2.11 Justificación**

Los antiinflamatorios no esteroideos son medicamentos de alto consumo a nivel mundial y en muchos países no se requiere de receta médica para adquirirlos. Ingresan al ambiente por la inadecuada disposición de medicamentos caducos y a través de las aguas residuales municipales e industriales o los residuos sólidos, siendo diclofenaco y naproxeno las sustancias que se han detectado más frecuentemente en efluentes de aguas residuales en el mundo. En México se han reportado concentraciones de 54 ng/L para diclofenaco y 1.5 ng/L para naproxeno en efluentes de aguas residuales tratadas. Las tecnologías de tratamiento convencionales de las aguas residuales municipales mayormente basadas en lodos activados no remueven significativamente estos contaminantes, por lo que se han buscado tecnologías alternas de mayor eficiencia. Los humedales construidos son una alternativa prometedora; sin embargo, antes de implementarse a escala, es necesario estimar los procesos fisicoquímicos y/o bioquímicos involucrados en la remoción de los fármacos, así como los subproductos de degradación que se formen durante el proceso de remoción para explicar los procesos y eficiencias de remoción de los contaminantes.

Se sabe que las comunidades microbianas complejas, que se desarrollan por las interacciones entre el agua, el suelo, las plantas, desempeñan un papel clave en los ciclos biogeoquímicos de estos compuestos y son principalmente responsables de la degradación de contaminantes en los humedales (Ibekwe y col., 2007; Ligi y col., 2014). Los estudios para entender el papel de los consorcios bacterianos en la degradación de fármacos son limitados, por lo que se requiere un conocimiento detallado sobre los ensamblajes microbianos que se desarrollan en el ambiente de la raíz y su papel en la eliminación de los fármacos en agua.

## **2.12 Hipótesis**

Las colonias bacterianas aisladas de la raíz de *Typha latifolia* contribuyen a la degradación de diclofenaco y naproxeno, utilizándolos como fuente de carbono y contribuyen en los sistemas de humedales construidos para aumentar la eficiencia de remoción al interactuar benéficamente con las plantas, formando subproductos de degradación y/o eliminándolos completamente.

## **2.13 Objetivo General**

Evaluar la remoción de una mezcla de los fármacos diclofenaco y naproxeno de un humedal construido de flujo subsuperficial horizontal (HC-FSSH) con plantas de *Typha latifolia* en condiciones de operación controladas estimando la contribución de los aislados bacterianos asociados a la raíz de las plantas en el proceso de remoción y del material de soporte de las plantas y proponer las interacciones químicas entre los fármacos en la solución con las plantas y su posible efecto sobre la eficiencia de remoción de la mezcla de fármacos.

### **2.13.1 Objetivos específicos**

1. Estimar la eficiencia de remoción de diclofenaco y naproxeno mediante un humedal construido de flujo subsuperficial con plantas de *Typha latifolia* operado en condiciones controladas analizando la contribución del material de soporte y de las plantas.
2. Evaluar la capacidad de consorcios bacterianos aislados de la raíz de *Typha latifolia* desarrollados durante el proceso de tratamiento para remover diclofenaco y naproxeno.
3. Estimar los metabolitos de transformación generados como producto de la degradación de los fármacos durante el tratamiento o en los medios de cultivo durante el desarrollo de los aislados bacterianos en presencia de los fármacos.
4. Identificar las enzimas extracelulares de los aislados bacterianos involucrados en el proceso de remoción de diclofenaco y naproxeno
5. Determinar la eficiencia de remoción de diclofenaco y naproxeno en pruebas en lote conformadas con plantas *Typha latifolia* y cultivos bacterianos tolerantes a diclofenaco y naproxeno.
6. Predecir las posibles interacciones químicas en una mezcla y su interacción con la raíz de las plantas, que permita entender la tolerancia de las plantas

### 3. Metodología

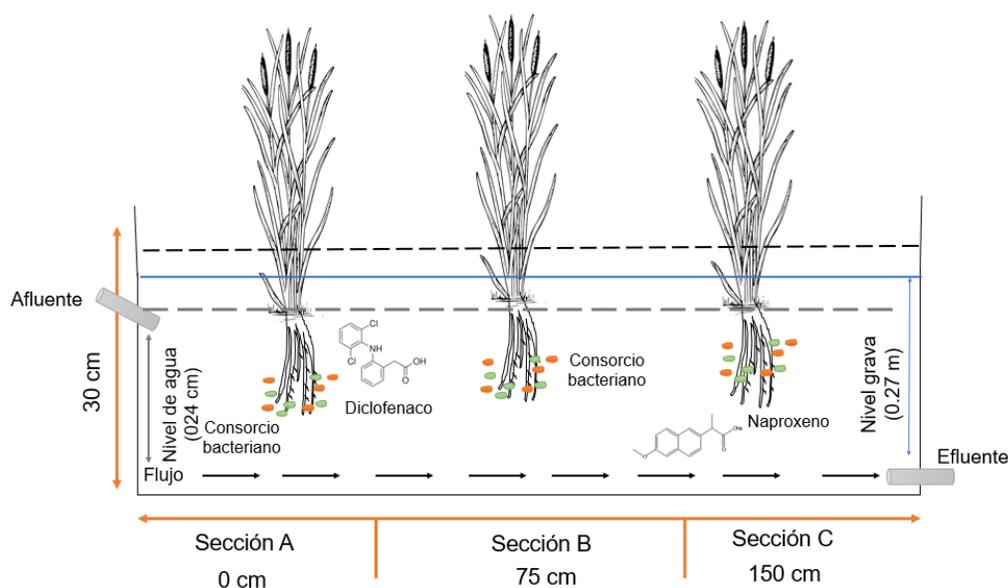
Este capítulo describe los procedimientos empleados para evaluar la eficiencia de remoción de una mezcla de diclofenaco y naproxeno por medio de un humedal construido de flujo subsuperficial horizontal (HC-FSSH), así mismo se indican los procedimientos experimentales utilizados para el estudio de los grupos bacterianos asociados a la rizósfera de las plantas desarrolladas en los humedales, su caracterización, capacidad de promoción de crecimiento vegetal. Finalmente se muestran las metodologías para las pruebas de tolerancia y eficiencia de remoción en sistemas en lote exponiendo plantas de *Typha latifolia* desarrolladas *in vitro* a los aislados bacterianos previamente aislados de las raíces de plantas expuestas a los fármacos.

#### 3.1 Determinación de la eficiencia de remoción de una mezcla de diclofenaco y naproxeno en HC-FSSH

Se utilizaron dos celdas de humedales a nivel microcosmos (HC-FSSH) que tienen las siguientes dimensiones: 1.5 m de largo x 0.30 m de ancho x 0.30 m de altura y un área de 0.45 m<sup>2</sup>. En los manuales de construcción de los humedales se recomienda una relación ancho – largo mínimo de 1:4 para favorecer la remoción de las sustancias, así, en este trabajo, la relación ancho: largo es de 1:5 (USEPA, 1998). Cada humedal tiene un puerto de entrada colocado a una altura de 20 cm con respecto de la base del humedal y un puerto de salida a 2 cm de altura, creando así un flujo horizontal y evitando la generación de zonas de bajo flujo que pudieran afectar la eficiencia de remoción. El puerto de entrada se utilizó para alimentar la solución contaminada (influyente), mientras que el puerto de salida se empleó para coleccionar muestras de la solución tratada (efluente) y dar seguimiento a la remoción de los fármacos durante la experimentación.

Con el material de soporte se generó una columna de 0.27 m de profundidad; la profundidad de la columna de grava se designó con base a que la raíz de las plantas en los humedales artificiales crece hasta unos 30 cm; la USEPA (1993) recomienda entre 10 y 100 cm de altura de la columna de material de soporte. Dado que el humedal es de flujo subsuperficial, la profundidad de la columna de la solución se mantuvo en 0.24 m para evitar que tuviera contacto con la luz solar y evitar los procesos de fotólisis. El volumen total del humedal es de 135 L del cual una parte importante (~80 %) lo ocupa el material de soporte.

La experimentación se inició con 104 plantas por m<sup>2</sup> en el humedal control y en la celda para la mezcla de fármacos con 137 plantas por m<sup>2</sup>. Durante la experimentación que duró 100 días, el flujo fue continuo con recirculación, la solución del influente se preparó cada tercer día en un bidón de plástico de 50 L y el agua tratada (efluente) se recibió en un recipiente de 20 L. Como medio de soporte para las plantas, se utilizó grava previamente lavada para evitar la introducción de tierra dentro de los humedales. En el desarrollo del experimento se realizaron mediciones de pH, una vez a la semana, así como un monitoreo de temperatura.



**Figura 6.** Representación de humedal construido

En el vivero de la Facultad de Ciencias Químicas (Unidad de Biotecnología de Plantas) se desarrollaron plantas de *Typha latifolia*. Plantas de 15-30 cm de alto se colocaron en el material de soporte manteniendo una distancia entre ellas de 20-22 cm, favoreciendo así el desarrollo de la cobertura vegetal. En este trabajo, se permitió un tiempo de 90 días previa a la experimentación para el desarrollo de la cobertura vegetal lo cual es conforme a lo que recomienda la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 1991) que propone tres meses para lograr una cobertura vegetal del 90 % con respecto del área superficial de humedal para el caso de plantas macrófitas como *T. latifolia*.

Antes de colocar las plantas en el humedal se realizó una desinfección de estas con una solución de hipoclorito de sodio al 5 %. Durante el proceso de plantación, se cuidó colocar la raíz con cierta profundidad (10 cm) no solo para dar mejor soporte a la

planta sino también para permitir un mejor desarrollo de la raíz y el contacto con la solución contaminada.

Para la experimentación, se trabajó con dos unidades de HC-FSSH, uno de los cuales sirvió como control cuyo influente era una solución nutritiva sin fármacos. Las concentraciones de diclofenaco y naproxeno en la solución sintética se determinaron previamente mediante pruebas cinéticas y se eligieron aquellas concentraciones a las que las plantas no mostraron signos de daño por la exposición a los fármacos (Tabla 6).

**Tabla 6.** Designación de celdas del humedal

Humedal	Tipo de solución
A	Diclofenaco (3 mg/L): Naproxeno (5 mg/L)
B	Control (solución nutritiva sin fármacos)

Al inicio de la experimentación, se determinó el número de plantas de *T. latifolia* (junto con sus brotes) por cada celda de humedal. A cada planta se le asignó un número, se midió la altura de cada una desde el nivel del material de soporte hasta la hoja verde más larga de las plantas, se contabilizó el número de hojas verdes de cada planta y se levantó un registro de esta información. El registro se actualizó cada 15 días, con la finalidad de documentar las alteraciones en el aspecto de las plantas en el humedal por efecto de los contaminantes, esto se realizó hasta el término de la exposición de los fármacos en el sistema de humedales que fue de 100 días.

Durante el experimento de remoción de los fármacos se mantuvo un flujo continuo del efluente de  $10 \pm 4$  mL/min. Desde el inicio de la operación de los humedales (control y con fármacos), se colectaron las primeras muestras de la solución tanto del influente como del efluente. En los primeros 20 días se colectaron muestras diariamente y después cada tercer día. Para la toma de muestras se utilizaron recipientes de vidrio de 10 mL previamente lavados con persulfato de potasio y agua desionizada. Todo el material utilizado para la toma y almacenamiento de muestras se cubrió de la luz para evitar la fotodegradación.

**Preparación de la solución sintética de fármacos.** Se preparó una solución stock de diclofenaco de 1000 mg/L desde donde se tomó el volumen necesario para tener una solución de 3 mg/L para un volumen total de 50 L; en la preparación se usó agua de grifo. En el mismo recipiente se agregó el volumen requerido de una solución stock de 2500 mg/L de naproxeno para alcanzar una concentración final de 5 mg/L. La

solución se suplementó con los siguientes nutrientes: 1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  + 1.5 mM  $\text{KNO}_3$  + 0.125 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  + 0.25 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; esta composición en nutrientes fue previamente propuesta por Loredó-Portales (2011) como la mezcla más apropiada para el desarrollo de las plantas de *Typha latifolia* en condiciones de vivero.

### 3.1.1 Determinación de condiciones y procedimiento de operación de los humedales de flujo subsuperficial

Al término de la instalación de las celdas de humedal, se determinó las condiciones mínimas de operación de estos. Se calculó el volumen de agua en cada celda para lograr la altura de columna de agua requerida marcando el nivel al que deberá mantenerse el líquido durante la experimentación.

Para la determinación del flujo del afluente (A) y del efluente (B), se estimó previamente el tiempo de residencia hidráulica (TRH) apropiado para la remoción de los contaminantes que se estudian. Los flujos se calcularon de la siguiente manera.

- 1) Tiempo de residencia hidráulica. Para determinarlo se realizaron pruebas cinéticas para la remoción del contaminante, en un sistema tipo lote, con plantas de *Typha latifolia* para simular las condiciones de la solución que se aplicarían en el estudio con los humedales. Se utilizaron soluciones con una concentración conocida de los contaminantes (diclofenaco y naproxeno) y se evaluó su remoción en función del tiempo para definir el tiempo mínimo para lograr la mayor remoción de las sustancias. Este tiempo se consideró como el tiempo de residencia de la solución contaminada en el humedal para lograr la más alta eficiencia de remoción. Como se explicará más adelante, las pruebas por lote se realizaron en matraces con la solución nutritiva conteniendo los fármacos, sin material de soporte y plantas. En cada lote de pruebas se prepararon y analizaron los controles pertinentes, es decir matraces con la solución nutritiva, los fármacos sin plantas.
- 2) Determinación de flujos. Teniendo el tiempo de residencia hidráulica (TRH o  $t$ ), se obtiene el flujo del efluente a partir de la Ecuación 1 de tiempo de retención.

$$t = V \varepsilon Q \quad (1)$$

Donde  $t$  es el tiempo de residencia de la solución en el humedal (min),  $V$  es el volumen de la celda de humedal (L, mL),  $\varepsilon$  es la porosidad de la grava y  $Q$  es el flujo ( $\text{m}^3$ ,  $\text{L}^3$ )

### **3.1.2 Preparación de soluciones y procedimientos analíticos para la determinación de la concentración disuelta de diclofenaco y naproxeno**

Todo el material utilizado para la determinación de diclofenaco y naproxeno debe estar previamente lavado y libre de materia orgánica. Por lo cual, primero se lava en una solución de Extran® al 2% posteriormente se enjuaga dos veces con agua del grifo. Enseguida el material se coloca en un recipiente con una solución de persulfato de potasio 0.03 M por 24 h, al término el material es enjuagado con agua desionizada (3 veces) y se seca en una campana de flujo laminar para evitar su contaminación.

Posteriormente se preparan las soluciones stock de diclofenaco y naproxeno, las cuales se prepararon a partir de tabletas comprimidas. Se trituraron por separado tabletas de diclofenaco y naproxeno (10 de cada una). Luego se pesaron 100 mg de diclofenaco o 550 mg de naproxeno y se disolvieron cada uno en 100 mL de agua desionizada para obtener soluciones madre de 1000 mg/L de diclofenaco o 5500 mg/L de naproxeno.

Las soluciones sintéticas se prepararon tomando los volúmenes apropiados de la solución stock para llegar a 3 mg/L de diclofenaco y 5 mg/L de naproxeno; la solución se complementó con nutrientes en las concentraciones especificadas anteriormente. Las concentraciones de diclofenaco y naproxeno se determinaron mediante métodos colorimétricos específicos para cada fármaco. El método para determinar las concentraciones de diclofenaco se basa en su reacción con el hierro (III) que se reduce a hierro (II) con el ferrocianuro de potasio, formando un complejo de color azul que puede medirse a 710 nm; el límite de detección (LOD) fue de 0,12 mg/L (Zapata y col., 2020, Barry, 2009).

Para determinar el naproxeno, el método se basa en la reacción entre el fármaco y el colorante azul de bromotimol (BTB) para formar un complejo amarillo de pares de iones. El complejo resultante se midió a 422 nm; el LOD fue de 1,64 mg/L (Alizadeh, 2015). Las determinaciones se realizaron por espectrofotometría UV/Vis (Genesys 10UV). Las muestras recolectadas de la solución del humedal (unidades plantadas y no plantadas) se cuantificaron utilizando la curva de calibración adecuada: 0-10 mg/L para diclofenaco y 0-10 mg/L para naproxeno. Las curvas de calibración se realizaron con diclofenaco grado reactivo o naproxeno (Merck con pureza >98 %).

### **3.1.3 Cinética de remoción de una mezcla de diclofenaco-naproxeno en pruebas por lote**

Previo al inicio de experimentación en el humedal se realizaron pruebas cinéticas en un sistema por lote a diferentes concentraciones de cada uno de los fármacos y un control de concentración sin plantas. Lo anterior se realizó con el fin de definir el tiempo en el cual se logra la mayor remoción de cada uno de los fármacos que nos define el tiempo mínimo requerido a utilizar en los humedales para la óptima remoción de las sustancias y al cual consideramos como el tiempo de residencia hidráulico (TRH o "t", Ec. 1).

Las pruebas cinéticas igualmente permiten determinar si diclofenaco y naproxeno se eliminan de la solución por adsorción en las paredes de los recipientes o por degradación.

Para las cinéticas de remoción con la mezcla de diclofenaco y naproxeno se realizó un diseño estadístico denominado diseño de experimentos. El propósito principal fue conocer la proporción de la mezcla de diclofenaco: naproxeno a la cual se tienen la mayor eficiencia de remoción, considerando el efecto a la salud de la planta. Se uso un diseño central compuesto utilizando el programa Minitab 16, en el cual se ingresaron los siguientes datos:

Nivel alto de concentración: Diclofenaco 3 mg/L, Naproxeno 5 mg/L

Nivel bajo de concentración: Diclofenaco 1.5 mg/L, Naproxeno 2.33 mg/L

El diseño central compuesto constó de 5 puntos centrales: 2.25 mg/L de diclofenaco con 3.67 mg/L de naproxeno, y 8 puntos con variaciones de concentración para cada fármaco. Se realizó un total de 14 experimentos ya que se consideró un control, que constó de una prueba con 3 plantas en una solución nutritiva sin fármacos, el diseño completo se muestra en el trabajo realizado por Zapata y col. 2018 (tabla 7).

**Tabla 7.** Composición de las mezclas de diclofenaco: naproxeno con base a un diseño central compuesto.

	Diclofenaco (mg/L)	Naproxeno (mg/L)
1	3.31	3.67
2	2.25	3.67
3	2.25	3.67
4	1.50	5.00
5	3.00	2.33
6	3.00	5.00
7	1.19	3.67
8	1.50	2.33
9	2.25	1.78
10	2.25	3.67
11	2.25	5.55
12	2.25	3.67
13	2.25	3.67

### **3.1.4 Determinación de la eficiencia de remoción de diclofenaco y naproxeno por el material de soporte de las plantas en el HC-FSSH**

Para evaluar el papel del medio de soporte en la remoción de los fármacos, en una unidad de HC-FSSH con material de soporte, sin plantas, se alimentó la solución del afluente conteniendo 3 mg/L de diclofenaco y 5 mg/L de naproxeno, en flujo continuo; se mantuvo un tiempo de residencia hidráulico de 3 días. La experimentación se llevó a cabo hasta que la concentración de los fármacos se mantuvo constante de forma que la duración total del experimento fue de 30 días. Durante ese tiempo, se tomó muestra del influente, del efluente y se les determinó la concentración de los fármacos. El flujo del afluente fue 4 mL/min y del efluente de 8 mL/min para mantener un tiempo de residencia hidráulico de 3 días. El flujo del influente fue menor al utilizado en el humedal con plantas debido a que la unidad era más pequeña (1 m de largo x 0.30 m de ancho x 0.22 m de altura). El material de soporte fue previamente lavado y posteriormente se colocó en la celda de humedal.

### **3.2 Estudio microbiológico de los aislados de raíces de las plantas expuestas a una mezcla de diclofenaco y naproxeno en el HC-FSSH**

En los últimos años el papel de los microorganismos para eliminar contaminantes del medio ambiente ha destacado, durante este proyecto se desea conocer el papel que tienen estos para la eliminación de diclofenaco y naproxeno, así mismo identificarlos

y conocer sus propiedades bioquímicas, en la siguiente sección se describe la metodología de recolección y el análisis molecular de los microorganismos.

### **3.2.1 Recolección y procesamiento de raíz de plantas de *Typha latifolia* expuestas a diclofenaco y naproxeno en los humedales**

Al finalizar la experimentación de remoción se colectaron plantas del humedal que estuvo expuesto a los fármacos para la obtención de la raíz y su análisis microbiológico. Se seleccionaron tres puntos del humedal: A (ingreso del influente, 0-10 cm en el sentido del flujo), B ( $75 \pm 10$  cm) y C ( $130 \pm 10$  cm). De cada punto se colectaron 3 plantas, se retiraron con mucho cuidado de la grava procurando obtener lo más posible de la raíz. A las plantas seleccionadas se les cortó la raíz para su posterior análisis; es importante tener cuidado al extraer las plantas de los humedales para evitar dañar la raíz, debido a que creció abundantemente adoptando la forma del recipiente.

Cada una de las raíces colectadas por sección se colocaron en bolsas de polipropileno, se etiquetaron con nombre, sección y se almacenaron a 4 °C, para su posterior análisis.

### **3.2.2 Obtención de los aislados bacterianos de la raíz de *Typha latifolia***

El aislamiento bacteriano se realizó por un procedimiento de diluciones. De cada raíz se pesó un gramo (peso fresco) y se colocó en 9 mL de agua desionizada estéril (dilución 1:10). Enseguida, la suspensión se agitó con ayuda de un vórtex, por un minuto. De esta dilución se tomó 1 mL y se agregó a un tubo de 15 mL que contenía 9 mL de agua desionizada estéril para una dilución 1:100, este procedimiento se realizó hasta llegar a una dilución 1:10,000,000,000.

De cada dilución se tomaron 10  $\mu$ L los cuales se colocaron en cajas Petri que contenían medio M9 suplementado con diclofenaco (3mg/L) y naproxeno (5 mg/L) como fuente de carbono. La distribución de los 10  $\mu$ L de dilución en las cajas Petri se realizó por medio de perlas de vidrio; las cajas de Petri se incubaron a 28 °C, por 48 h.

Todo el material utilizado se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min, y la manipulación de las diluciones se realizó en campana de flujo laminar.

### **3.2.2.1 Preparación de medio mínimo M9**

El medio mínimo M9 es un medio que contiene los nutrientes mínimos para el desarrollo de colonias bacterianas. Para un volumen total de 50 mL, se mezclaron 0.8 g de agar bacteriológico y 37.7 mL de agua desionizada. La solución se esterilizó a 121 °C, a 15 lb de presión durante 15 min.

Adicionalmente se deben preparar las siguientes soluciones: sales M9 10X, diclofenaco 5000 mg/L, naproxeno de 5000 mg/L, MgSO<sub>4</sub> 1 M, CaCl<sub>2</sub> 1 M. Cada una de estas soluciones se esteriliza a 121 °C, a 15 lb de presión durante 15 min.

El medio M9 suplementado con diclofenaco y naproxeno se preparó de la siguiente manera: se mezclaron 10 mL de sales 10X, 150 µL de diclofenaco de 5000 mg/L, 200 µL de MgSO<sub>4</sub> 1 M, 20 µL de CaCl<sub>2</sub> 1 M y 83 µL de naproxeno de 5000 mg/L. La concentración final de diclofenaco fue de 3 mg/L y la de naproxeno fue 5 mg/L.

Estos medios preparados se vaciaron en cajas Petri para ser inoculadas con el aislado de raíz previamente preparado. Se incubaron a 28 °C por 48 h. Después, donde se observó el crecimiento de los aislados bacterianos, se realizó un conteo de colonias y una clasificación de acuerdo con su morfología considerando, tamaño, color y borde.

## **3.3 Caracterización molecular de los aislados bacterianos**

Posteriormente al aislamiento de los microorganismos desarrollados en la raíz de las plantas, se procedió a realizar la identificación molecular, la cual nos aparta información sobre el tipo de bacteria y sus características.

### **3.3.1 Amplificación del ARNr 16S de los aislados bacterianos**

La identificación molecular de los aislados bacterianos se realizó utilizando el ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr 16S) como herramienta, este fue propuesto por Pace y col. (1986), el cual nos permite hacer una comparación de las secuencias de ARNr 16S (o de los genes que los codifican) y establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias. Para la caracterización de los aislados bacterianos se extrajo ADN de los aislados bacterianos tolerantes a diclofenaco y naproxeno.

Para cada muestra de ADN de los aislados bacterianos se procedió a realizar el análisis por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) amplificando regiones

específicas con los oligonucleótidos 1755-1 F y 1776-1 R; la Tabla 8 presenta las condiciones de la reacción de PCR. Después de la amplificación, se realizó una electroforesis de cada producto en un gel de agarosa al 0.8 %.

**Tabla 8.** Condiciones de la reacción de PCR

Etapa	Condiciones
Inicio	95°C, 5 min
Desnaturalización	95°C, 30 s
Alineamiento	48°C, 30 s
Extensión	72°C, 1 min 40 s
Extensión final	72°C, 5 min

### 3.3.2 Secuenciación de los productos de PCR

Al realizar la amplificación mediante PCR de los aislados bacterianos se obtuvo un fragmento de 1000 pb (pares de bases), el producto de PCR se purificó del gel de agarosa mediante un Kit comercial, por el método de columna. Los productos purificados se enviaron para su secuenciación al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., en donde ésta se realizó por el medio de Sanger.

Posteriormente, las secuencias obtenidas se alinearon (BLASTn) en la página de NCBI, estas se analizaron con la base de datos reportadas en el GenBank. La caracterización de los aislados bacterianos se tomó de acuerdo con la mayor similitud de las secuencias reportadas.

### 3.4 Caracterización de aislados bacteriano

A la par de que se realizó la identificación molecular de los aislados bacterianos, también se sometieron a diferentes pruebas para conocer sus actividades bioquímicas, las pruebas se realizaron al total de colonias cultivables aisladas.

#### 3.4.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la mezcla de diclofenaco y naproxeno en las cepas aisladas: pruebas de tolerancia a los fármacos

Para la determinación de la CMI, el primer paso fue la obtención de los cultivos. Cada uno de los aislados fue inoculado en tubos de ensayo que contenían 4 mL del medio mínimo M9 (líquido) y fueron incubados en estufa bacteriológica a 28 °C por 48 h.

Después, el medio de cultivo inoculado se centrifugó a 3500 rpm y se aisló el pellet desarrollado durante la incubación y que contiene las bacterias obtenidas de la raíz de las plantas. El pellet se resuspendió en 5 mL de solución salina. De cada solución se tomó 1 mL y se determinó la densidad óptica de los cultivos en un Espectrofotómetro UV/visible (Thermo Scientific Evolution™ 201) a una longitud de onda de 600 nm. Se considera que se logra un desarrollo adecuado de las bacterias cuando la absorbancia de la suspensión es de 0.5.

La CMI se realizó por el método de microdilución para lo cual se utilizaron placas de 96 pocillos (12 mm x 8 mm), las concentraciones que se utilizaron para la prueba fueron 30:50, 300:500 y 600:1000 mg/L, diclofenaco: naproxeno.

Cada pocillo contenía un volumen final 300 µL de medio M9 suplementado con la mezcla de los fármacos y 10 µL de caldo de cultivo en solución salina con absorbancia de 0.5, se tomaron 3 columnas para cada muestra (pruebas por triplicado). Cada placa se selló para evitar contaminaciones y se incubaron en estufa bacteriológica a 28 °C por 72 h.

Al final del período de incubación se midió la densidad óptica de los cultivos a 630 nm por Espectrofotometría UV/Vis y de esta manera se determinó el crecimiento de cada uno de los aislados bacterianos expuestos a las diferentes concentraciones de los fármacos.

### **3.4.2 Capacidad de hidrolizar carboximetilcelulosa**

La celulosa es un polímero de origen vegetal constituido por 15000 moléculas de D-glucosa, la cual se tiene que hidrolizar para producir azúcares simples. Para determinar la capacidad para hidrolizar la carboximetilcelulosa por cada uno de los aislados bacterianos, se preparó un medio de cultivo como sigue: 0.625 g de medio LB, 12.5 g de agar bacteriológico y 2.5 g de carboximetilcelulosa en 500 mL de agua destilada. El medio de cultivo preparado se esterilizó a 121 °C, 15 lb de presión durante 15 min. El medio preparado se vació en cajas Petri para ser inoculadas con las bacterias por el método de inoculación por picadura.

Las placas fueron incubadas durante 5 días a 28 °C, al término del tiempo y para comprobar la capacidad de los aislados bacterianos para hidrolizar la carboximetilcelulosa, a cada caja de Petri se adicionaron 4 mL de rojo congo al 0.5 %; las cajas se dejaron reposar durante 10 min, se eliminó el exceso de colorante y finalmente se agregó NaCl 1 M. La actividad de la enzima celulasa se evidenció por la presencia de halos claros alrededor de la colonia después de 15 min de haber agregado la solución salina.

### **3.4.3 Determinación de la degradación de pectina por los aislados bacterianos**

La pectina es el componente más importante de la pared celular, es un carbohidrato vegetal complejo. La prueba para la degradación de pectina se realizó sembrando los aislados bacterianos por el método de picadura, en medio de cultivo suplementado con pectina. Este medio contenía 0.625 de LB, 12.5 g de agar bacteriológico y 2.5 g de pectina en 500 mL de agua destilada (Perez y col., 2009).

Las placas inoculadas se incubaron a 28 °C durante 5 días. Para comprobar la degradación de la pectina, se agregaron 2 mL de lugol a cada prueba, se dejó reposar por 1 min y se eliminó el exceso de la solución de yodo. Un resultado positivo se visualizó con el tamaño de la colonia y la formación de un halo claro alrededor de la colonia después de la adición del lugol.

### **3.4.4 Capacidad de hidrolizar el almidón**

El almidón se encuentra en casi todas las plantas, está compuesto por amilasa, constituida por 1000 a 5000 moléculas de glucosa y amilopectina, formada por 6000 a 20000 unidades de glucosa (Allinge y Cava, 1976). Los microorganismos amilolíticos utilizan enzimas reductoras para producir azúcares simples a partir de este. Para visualizar la producción de amilasa (enzima reductora) se preparó medio de cultivo suplementado con almidón como sigue: 0.625 g de medio LB, 12.5 g de agar bacteriológico y 2.5 g de almidón en 500 mL de agua destilada. El medio se esterilizó a 121 °C, 15 lb de presión durante 15 min y posteriormente se vació en cajas Petri para ser inoculadas con las bacterias mediante el método de picadura. Posterior de la inoculación las placas fueron incubadas durante 5 días a 28 °C.

La comprobación de la hidrólisis del almidón se realizó agregando 2 mL de solución de lugol a cada placa y se dejó reposar por 2 min; una reacción positiva se observó por la formación de halos claros alrededor de las colonias después de eliminarse el exceso de lugol.

## **3.5 Características promotoras del crecimiento vegetal por los aislados bacterianos**

Las bacterias promotoras de crecimiento en las plantas (PGPR), son un grupo de diferentes microorganismos que pueden incrementar el crecimiento y la productividad vegetal, a los aislados bacterianos se les realizaron pruebas de promoción de crecimiento como su capacidad para solubilizar fosfatos, producción de sideróforos,

producción de ácido indol acético, características que dentro del proyecto permitieron evaluar el mejor desarrollo de las plantas.

### **3.5.1 Capacidad para solubilizar fosfatos**

El fósforo es uno de los elementos esenciales para el desarrollo vegetal, por lo tanto, debe estar disponible para el desarrollo de las plantas ya que constituye más de 0.2 % del peso seco de éstas (Corrales y col., 2014). Las bacterias son los microorganismos que predominantemente solubilizan fosfato mineral en los suelos si se comparan con los hongos (Kucey, 1983; Bai y col., 2020). Para evaluar la capacidad para solubilizar fosfatos de los aislados bacterianos se realizó una prueba en medio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate). El medio NBRIP contiene 8 g de agar bacteriológico, 5 g de glucosa, 2.5 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 2.5 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.125 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g de KCl, 0.05 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 0.125 g de azul de bromofenol como indicador; las sales e indicador se disuelven en 500 mL de agua destilada. Todas las colonias tolerantes a diclofenaco y naproxeno se inocularon por el método de picadura en placas con agar NBRIP; las placas fueron incubadas a 28 °C durante 72 h considerando la presencia de una zona clara alrededor de las colonias bacterianas correspondían a pruebas positivas.

### **3.5.2 Determinación de la producción de sideróforos**

La síntesis de sideróforos es importante porque confiere a los microorganismos una ventaja competitiva por los nutrientes y los espacios (Loper y Henkels, 1999), así por exclusión se restringe el crecimiento de organismos dañinos a las plantas (Ortíz y col., 2008). Se demostró también que los sideróforos, por sí mismos, actúan como activadores eficientes de los sistemas de resistencia sistémica inducida en las plantas (Ran y col., 2005). Para comprobar que los aislados bacterianos tienen la capacidad de producir sideróforos, se realizaron pruebas en medio CAS que contiene un complejo color azul formado por el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA), el Fe y el colorante CAS (Schwyn y Neilands, 1987). Una vez producidos, los sideróforos microbianos poseen actividad quelante del Fe del medio. Cuando los sideróforos, extraen el Fe del complejo azul, se libera el CAS y en el medio se produce un cambio de coloración de azul a naranja (Fernández y col., 1998) lo que constituiría una prueba positiva de producción de sideróforos.

### **3.5.2.1 Preparación del agar CAS**

Para la preparación del medio CAS se utilizó medio LB al cual se le incorporó una solución desarrollada por Alexander y Zuberer (1991) y que contiene CAS-Fe-HDTMA. El medio se preparó disolviendo 2.0 g de LB y 6.4 g de agar bacteriológico en 130 mL de agua destilada.

Inicialmente se obtiene una solución Fe-CAS, la cual se preparó disolviendo 60.5 mg de CAS en 50 mL de agua destilada y mezclando con 10 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1M (previamente preparada en HCl 10 mM). Posteriormente, la mezcla resultante se agrega lentamente a 40 mL una solución acuosa de HDTMA (72.9 mg disuelto en 40 mL de agua destilada) obteniéndose la solución con el complejo CAS-Fe-HDTMA.

Tanto el medio LB como la solución CAS-Fe-HDTMA se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 min y, una vez terminado el ciclo de esterilización, ambos se dejaron enfriar hasta 50 °C. Un volumen de 30 mL de solución CAS-Fe-HDTMA se añadió gota a gota y con agitación suave a 370 mL de medio LB hasta la obtención de un color azul homogéneo. Una vez obtenida la coloración azul, el medio CAS fue vertido en cajas Petri estériles.

### **3.5.2.2 Detección de la producción de sideróforos**

En la detección de sideróforos, los aislados bacterianos se sembraron por picadura sobre el agar CAS, las placas fueron incubadas a 28 °C por 4 días. Después del tiempo de incubación, se observó la liberación al medio de cultivo de los sideróforos bacterianos mediante el desarrollo de halos de color naranja por la liberación del Fe del complejo colorido CAS-Fe-HDTMA.

### **3.5.3 Capacidad de los aislados bacterianos para producir de Ácido Indol Acético (AIA)**

Las especies microbianas pueden alterar el desarrollo del sistema radicular y el crecimiento vegetativo de plantas por la producción de reguladores de crecimiento que incluyen auxinas, como el ácido indol acético (Bowen y Rovira, 1999). Para conocer si los aislados bacterianos son capaces de producir ácido indol acético se realizó la reacción de Salkowsky.

Para obtener los cultivos, cada uno de los aislados bacterianos se inoculó en medio líquido LB estéril, a 28 °C por 48 h. Transcurrido el tiempo se tomaron 10 µL de cada aislado que había crecido en caldo LB, los cuales fueron inoculados en tubos de ensayo con 4 mL del medio líquido LB suplementado con 0.1 % (p/v) de L-triptófano

(Trp) adicionado al medio antes de esterilizarlo en autoclave. Los tubos fueron incubados en estufa bacteriológica a 28 °C por 48 h. Transcurrido el tiempo se midió la densidad óptica de los cultivos en un espectrofotómetro UV/visible (Thermo Scientific Evolution™ 201) a una longitud de onda de 600 nm. Los tubos con los cultivos bacterianos con una absorbancia de 0.5 se centrifugaron a 3300 rpm por 15 min, finalmente los sobrenadantes se transfirieron a tubos diferentes y se almacenaron a -40 °C hasta su posterior análisis.

### **3.5.3.1 Preparación del reactivo de Salkowsky**

Para la detección de compuestos indólicos se utilizó la reacción de Salkowsky, la cual se basa en su capacidad para producir cromóforos en presencia de un ácido mineral y un agente oxidante inorgánico debido a la oxidación de los compuestos indólicos (Perley y Stowe, 1966). Un resultado positivo se identifica con una coloración rosada que va desde el rosa claro a intenso dependiendo de la concentración presente en la muestra (Lara y col., 2011).

La preparación del reactivo de Salkowsky fue de acuerdo con la formulación reportada por Sheng y Xia (2006) la cual consiste en mezclar 7.5 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5 M con 150 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y 250 mL de agua destilada.

### **3.5.3.2 Cuantificación espectrofotométrica**

La determinación espectrofotométrica de la producción de AIA se realizó mediante la metodología de Salkowsky (Gordon y Weber, 1951) aplicada a cada uno de los aislados bacterianos de *Typha latifolia*. Se preparó una curva de calibración de 5 puntos con concentraciones diferentes de AIA, para calcular la concentración de AIA producido por los aislados.

Para la construcción de la curva primeramente se prepararon 500  $\mu\text{L}$  de cada estándar (10, 20, 30, 40 y 50 mg/L de AIA) en caldo LB, a partir de una solución concentrada de 1000 mg/L de AIA en etanol al 70 %.

A cada uno de los estándares preparados se les adicionó 500  $\mu\text{L}$  de reactivo de Salkowsky (relación 1:1) para posteriormente dejarlos reposar por una hora a temperatura ambiente. Cada estándar se leyó a una longitud de onda de 530 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Scientific Evolution™ 201). Como blanco se utilizó caldo LB suplementado con 0.1 % de L-Trp al que se le adicionó también el reactivo de Salkowsky y se dejó reposar en las mismas condiciones que los estándares. Para la determinación de la concentración de AIA de los aislados

bacterianos se agregó en un tubo de ensayo 500 µL del sobrenadante del caldo de cultivo previamente centrifugado, y se le adicionaron 500 µL del reactivo de Salkowsky (relación 1:1) a cada muestra. Cada tubo se dejó reposar por una hora evitando el contacto de la luz y, una vez transcurrido el tiempo, se leyó la absorbancia a 530 nm en un Espectrofotómetro UV/visible.

### **3.6 Capacidad de los aislados bacterianos para la producción de lacasas**

Para identificar la producción de lacasas por los aislados bacterianos, se realizó una prueba cualitativa basada en el método de Yang y colaboradores (2017), que consiste en la oxidación del 2,6-dimetoxifenol por acción de las lacasas, usando agar soya tripticasa suplementado con 0.2 % de 2,6-dimetoxifenol. La identificación de la producción de lacasas por los aislados bacterianos se observa después de 5 días de incubación en el agar soya tripticasa. Las pruebas positivas se identifican por un cambio en la colonia bacteriana a color marrón debido a la oxidación del 2,6-dimetoxifenol.

### **3.7 Determinación de la eficiencia de remoción de diclofenaco y naproxeno con plantas de *Typha latifolia* y cultivos en condiciones estériles**

Para determinar el papel de los aislados bacterianos en la remoción de la mezcla de diclofenaco y naproxeno, es necesario realizar una evaluación en la cual las plantas (raíces) no tengan contacto con ningún microorganismo, por lo cual se procedió a germinar semillas en condiciones de esterilidad y así obtener las plantas necesarias para las pruebas de remoción.

#### **3.7.1 Germinación y desarrollo de plantas de *Typha latifolia* en condiciones estériles**

La esterilización de las semillas de *Typha latifolia* se realizó en condiciones de asepsia, por lo cual todo el material fue sometido a esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 min.

El método de asepsia que se llevó a cabo para el cultivo *in vitro* de *Typha latifolia* fue el estandarizado por Moctezuma-Granados (2017). Se tomaron las semillas de esta planta con una pinza y se colocaron en un tubo cónico de 50 mL, posteriormente se agregó microdín al 10 % hasta cubrir las semillas y se agitó vigorosamente por cinco minutos, una vez transcurrido el tiempo, con ayuda de una micropipeta se desechó la solución. Este proceso de lavado se llevó a cabo de la misma manera para las

siguientes soluciones: cloro al 20 %, cloro al 10 %, tween 20 al 1 % y etanol 70 %. Al finalizar se realizaron cinco lavados con agua destilada estéril agitando vigorosamente por cinco minutos entre cada lavado. Posteriormente, las semillas se cultivaron en frascos de 250 mL que contenían 50 mL de medio MS (Murashige y Skoog basal medium w/ vitamins, PhytoTechnology Laboratories) suplementado con sacarosa. Los frascos se colocaron en un cuarto de cultivo a  $25 \pm 2$  °C con un periodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad por 5 días. Todo el procedimiento se realizó bajo campana de flujo laminar.

Después del período de incubación, las plantas fueron traspasadas a frascos con capacidad de 1000 mL en medio MS semisólido (200 mL) con la finalidad de facilitar la adaptación gradual de las plantas a condiciones de hidroponía y se mantuvieron en esta condición durante 5 días. Al término del periodo de adaptación, las plantas alcanzaron una altura promedio entre 5 y 8 cm, enseguida se colocaron en nuevos frascos estériles con una solución nutritiva conteniendo 1 mM  $\text{NH}_4^+$ , 1.5 mM  $\text{K}^+$ , 0.125 mM  $\text{PO}_4^{3-}$ , 0.25 mM  $\text{Ca}^{2+}$  y sacarosa al 0.1 % (Loredo-Portales, 2011), los frascos fueron colocados en un cuarto de cultivo a  $25 \pm 2$  °C con un periodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad durante 10 días.

Posterior al periodo de adaptación, se seleccionaron plantas de acuerdo con su tamaño y se colocaron en frascos con solución nutritiva recientemente preparadas; se colocaron 3 plantas por frasco.

### **3.7.2 Evaluación de la eficiencia de remoción de diclofenaco y naproxeno en mezcla con aislados bacterianos y plantas en condiciones de esterilidad**

En esta sección se describen los pasos que se realizaron para evaluar la capacidad de los aislados bacterianos para desarrollarse y remover la mezcla de diclofenaco y naproxeno.

#### **3.7.2.1 Obtención de cultivos bacterianos**

Para obtener los cultivos, cada uno de los aislados bacterianos se inoculó en medio líquido M9 estéril, a 28 °C por 48 h. Transcurrido el tiempo se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada aislado que había crecido en caldo M9, los cuales fueron inoculados en tubos Falcón de 15 mL con medio líquido M9 suplementado 3 mg/L de diclofenaco y 5 mg/L de naproxeno como fuente de carbono, adicionado al medio después de esterilizar en autoclave. Los tubos fueron incubados en estufa bacteriológica a 28 °C por 48 h. Transcurrido el tiempo se midió la densidad óptica de los cultivos en un espectrofotómetro UV/visible (Thermo Scientific Evolution™ 201) a una longitud de onda de 600 nm. De los cultivos bacterianos con una absorbancia de 0.4 se tomó una

cantidad que representa el 1 % y se transfirió a frascos estériles de 1000 mL que contenían 200 mL de solución nutritiva suplementados con diclofenaco y naproxeno como única fuente de carbono.

### **3.7.2.2 Cinética de remoción de diclofenaco y naproxeno con aislados bacterianos y plantas en condiciones de esterilidad**

Al tener las plantas adaptadas a condiciones de hidroponía y con la solución nutritiva, se agregan los aislados bacterianos. El sistema planta-microorganismos se sometió a un periodo de adaptación de 4 días, posterior al periodo de adaptación. La solución nutritiva contenía 6 mg/L de diclofenaco y 10 mg/L de naproxeno.

Para evaluar la eficiencia de remoción de una mezcla de diclofenaco y naproxeno con plantas estériles en contacto con aislados bacterianos tolerantes a los fármacos se realizaron 2 pruebas diferentes. La primera prueba consistió en evaluar la eficiencia de remoción del sistema planta-microorganismo de manera individual, es decir los 7 aislados bacterianos identificados por secuenciación se sometieron a una prueba de cinética de remoción. El sistema consistía en un frasco estéril de 1000 mL que contenía 200 mL de solución nutritiva con 6 mg/L de diclofenaco y 10 mg/L de naproxeno; cada sistema se inoculó con 1 % del aislado bacteriano y se colocaron 3 plantas de una altura promedio 15 ( $\pm 5$ ) cm.

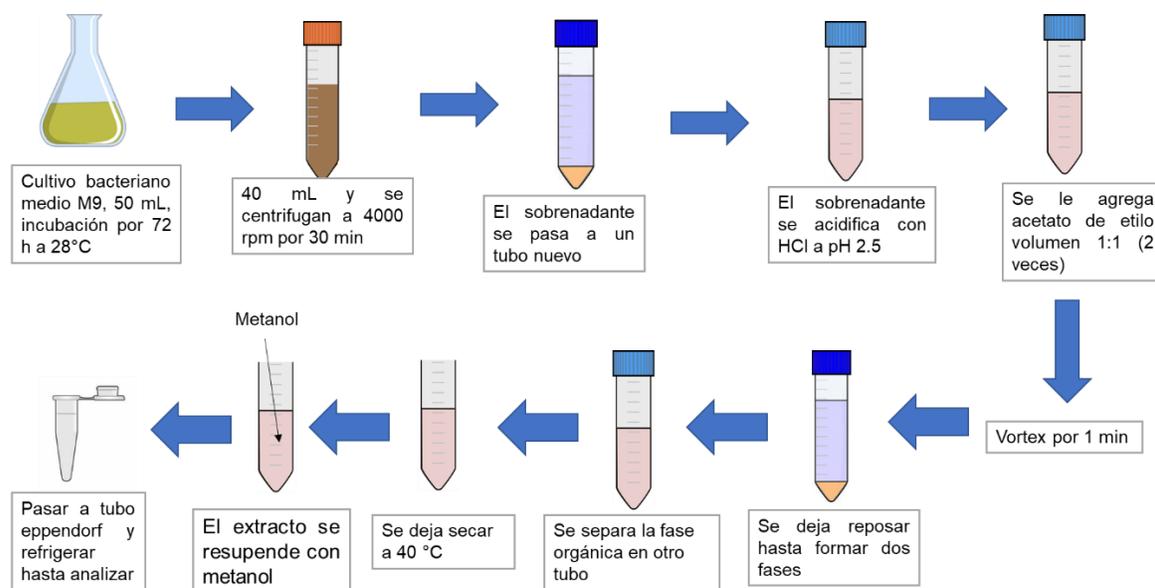
La segunda prueba consistió en someter cada consorcio bacteriano identificado por sección. La preparación del sistema donde se realizaron las pruebas se hizo como en la misma forma que las pruebas anteriores. Los aislados bacterianos correspondieron a los obtenidos de los sitios A, B o C.

En las primeras 12 h del inicio de los experimentos, de cada uno se tomaron muestras del medio cada 4 h, y posteriormente cada 12 h. Tanto el muestreo como la preparación de los experimentos se realizó bajo campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad para evitar cualquier contaminación en los sistemas.

### **3.8 Identificación de metabolitos de diclofenaco y naproxeno**

Para identificar los principales metabolitos de diclofenaco y naproxeno, tanto en las pruebas de remoción de fármacos realizadas en los sistemas planta-microorganismo como en la solución de los humedales se tomaron muestras de 50 mL de la solución para proceder a la obtención de los extractos de los fármacos y sus metabolitos en una fase de metanol para su posterior análisis. (figura 7).

Posteriormente a la extracción, se realizó un prueba por cromatografía en capa fina (TLC), en la cual se utilizó como fase móvil una mezcla de tolueno: acetona: ácido acético glacial en proporción 15:10:0.2 (v:v:v). El propósito de la prueba fue realizar una identificación preliminar de las sustancias. El factor de retención (Rf) de diclofenaco fue de 0.73, para naproxeno de 0.63 y para la mezcla de 0.5.



**Figura 7.** Estandarización para identificar los fármacos y sus sub-productos de degradación.

### 3.8.1 Análisis por GC-MS

Dentro del análisis de la eficiencia de remoción de los fármacos es importante conocer si se forman productos de degradación, debido a que estos normalmente se encuentran en concentraciones traza, se usó cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas para identificar los posibles productos formados durante la experimentación.

#### 3.8.1.1 Derivatización

Se tomaron alícuotas de 100 µL de las muestras previamente tratadas y se eliminó el contenido de solvente orgánico para lo cual se trataron bajo flujo de nitrógeno. Enseguida se agregaron 20 µL de piridina y 80 µL de BSTFA con 1 % de TMCS a cada alícuota. La mezcla se incubó a 85 °C durante 25 min, se llevaron a temperatura ambiente y se añadió isooctano hasta un volumen final de 200 µL. Finalmente, se transfirieron 100 µL de mezcla a un vial y se realizó el análisis inmediatamente por Cromatografía de Gases acoplada a Masas (GC-MS).

### **3.8.1.2 Análisis GC-MS**

Para el análisis se usó un Cromatógrafo de Gases Perkin Elmer modelo Clarus 580 acoplado a un Espectrómetro de Masas de Ionización por Impacto de Electrones (EIMS; Perkin Elmer modelo 560S). Para el análisis se hicieron inyecciones de 0.5  $\mu$ L de las muestras a analizar; la inyección fue en modo splitless. La temperatura en el inyector fue de 280 °C. La fase de cromatografía se realizó en una columna capilar (Agilent J&W DB-1MSUI) de 60 m x 250  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m y se utilizó helio como gas portador a un caudal constante de 1 mL/min. El programa del horno del Cromatógrafo se inició a una temperatura inicial de 45 °C, se mantuvo durante 5 minutos, y luego se incrementó a una velocidad de 6 °C /min a 170 °C, enseguida se aplicó una segunda rampa de 10 °C/min para llegar a 305 °C, temperatura que se mantuvo por 10 minutos. La temperatura de la línea de transferencia se fijó en 230 °C.

Los espectros de masas se obtuvieron a 70 eV de energía electrónica. Las mediciones se realizaron en modo SCAN con el rango m/z establecido en 40-550. La temperatura de la fuente de iones se fijó en 200 °C y se hizo funcionar a 2.9 exploraciones por segundo. Los datos obtenidos por el GC-EIMS se examinaron con el software TurboMass (Perkin Elmer, Inc.). Se utilizó el software AMDIS (<http://www.amdis.net/>) para la determinación del tiempo de retención y la extracción del espectro de masas de cada componente de los cromatogramas. Para la identificación de compuestos se utilizó el software de biblioteca de espectros de masas y la base de datos NIST MS Search versión 2.0 (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, 2008). Para la cuantificación se utilizó una curva de calibración con diclofenaco y naproxeno.

## **3.9 Identificación de interacciones fisicoquímicas entre la planta y la mezcla de los fármacos**

Para la identificación de las interacciones fisicoquímicas entre diclofenaco y naproxeno cuando se encuentran en solución, así como las interacciones que pueden presentar con celulosa como uno de los principales componentes de la raíz de las plantas, fue necesario apoyarse en la química computacional. El análisis fue dirigido por la Dra. Saraí Vega investigadora de la Facultad de Ciencias Químicas (UASLP).

### **3.9.1 Equipo y paquetes Computacionales**

Para diseñar y analizar las moléculas es necesario contar con equipo computo con la capacidad para realizar los cálculos necesarios. En este trabajo se utilizó el software Gaussian 09 con una estación de trabajo que contenía un procesador de cuatro núcleos Intel Xeon, con cuatro GB de memoria RAM, Servidor Prometeo, con 24 procesadores de Cuatro núcleos y 12 GB de memoria RAM por procesador.

### 3.9.1.2 Gauss View y Gaussian 09

El paquete computacional Gauss View 5 se requirió para visualizar, modelar y construir digitalmente átomos y moléculas. Gaussian 09 es un paquete computacional especializado para el cálculo de estructuras y propiedades químicas; utiliza una interfaz sencilla para el usuario denominada GaussView, capaz de construir moléculas de manera visual, lo que permite introducir la estructura de la molécula y demás datos mediante comandos a través de un entorno visual más atractivo mediante ventanas que se despliegan y que contienen toda la información necesaria para resolver la estructura química diseñada, sin recurrir a realizarlo a través de programación.

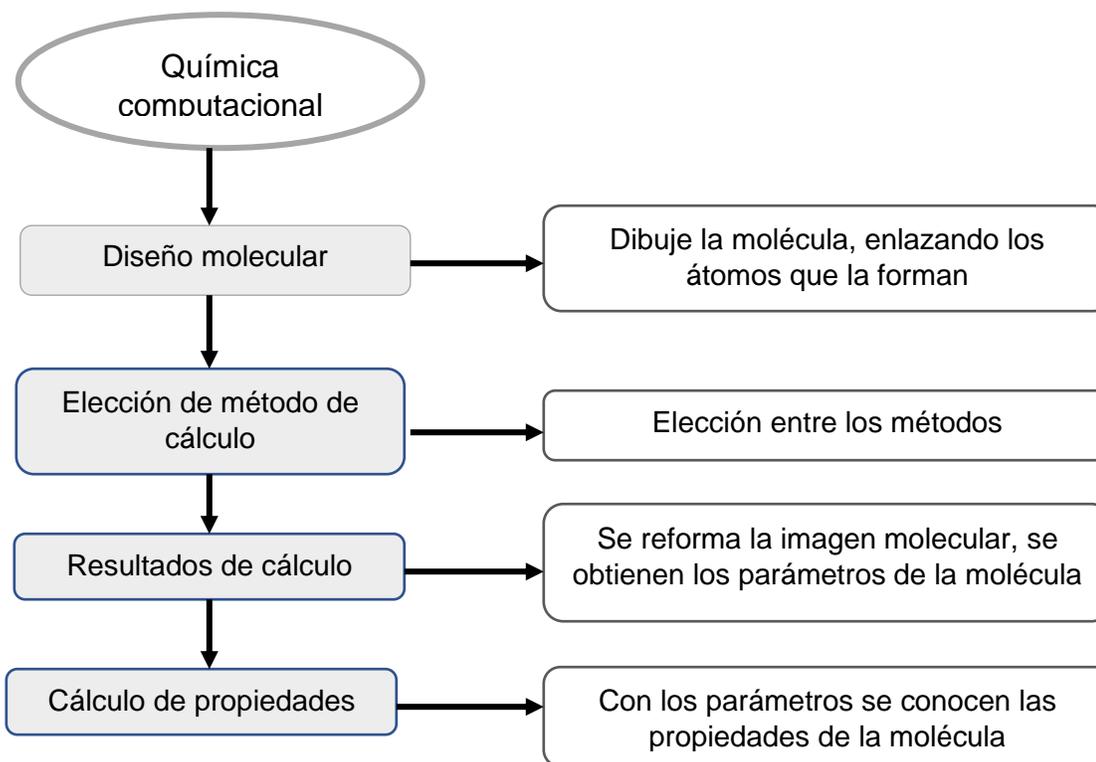
### 3.9.2 Estructuras Analizadas

Para comprender las interacciones entre los fármacos se realizaron análisis in silico de diclofenaco, naproxeno y celulosa como un componente importante de la estructura de la raíz. Diclofenaco es una molécula que incluye un ácido fenilacético, una amina secundaria y un grupo fenilo con dos átomos de cloro en posiciones orto a la amina; el naproxeno tiene como grupos funcionales un éter y un ácido carboxílico. La celulosa se optimizó para comprender sus posibles interacciones con diclofenaco y naproxeno, ya que la pared celular de la planta está compuesta casi en su totalidad por polímeros que no contienen nitrógeno, incluidas la celulosa y la lignina.

Para este trabajo, se modeló un fragmento de celulosa con tres unidades de  $\beta$ -glucosa, que tiene el tamaño adecuado para soportar una molécula de diclofenaco o naproxeno. El fragmento de celulosa se diseñó de dos maneras diferentes, la primera basándose en la bibliografía de la molécula general de celulosa y la segunda se construyó una monocapa compuesta por dos cadenas de celulosa ( $1\beta$ ) utilizando el software celulosa-builder (Gomes, 2012), luego se tomó solo una cadena de esta monocapa y finalmente se redujo la cadena a tres unidades de  $\beta$ -glucosa, en la sección de resultados se describen ambos diseños y simulaciones.

### 3.9.3 Análisis de las moléculas

De acuerdo con Cjuno, 2003, existe un procedimiento general utilizado en la química computacional el cual se muestra en la figura 8.

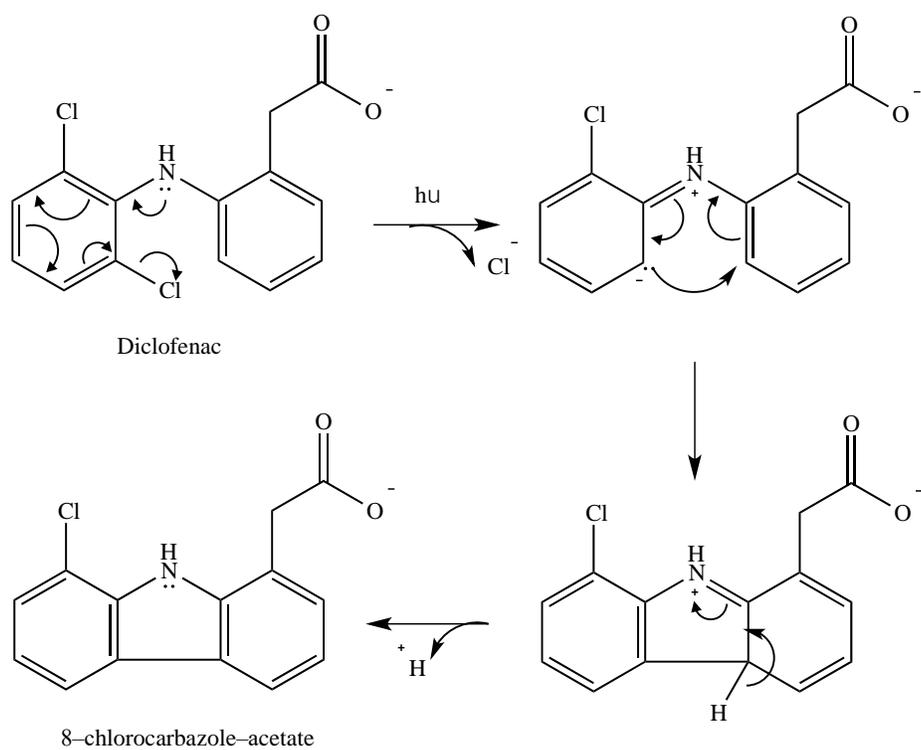


**Figura 8.** Esquema de metodología para calcular las propiedades de las moléculas.

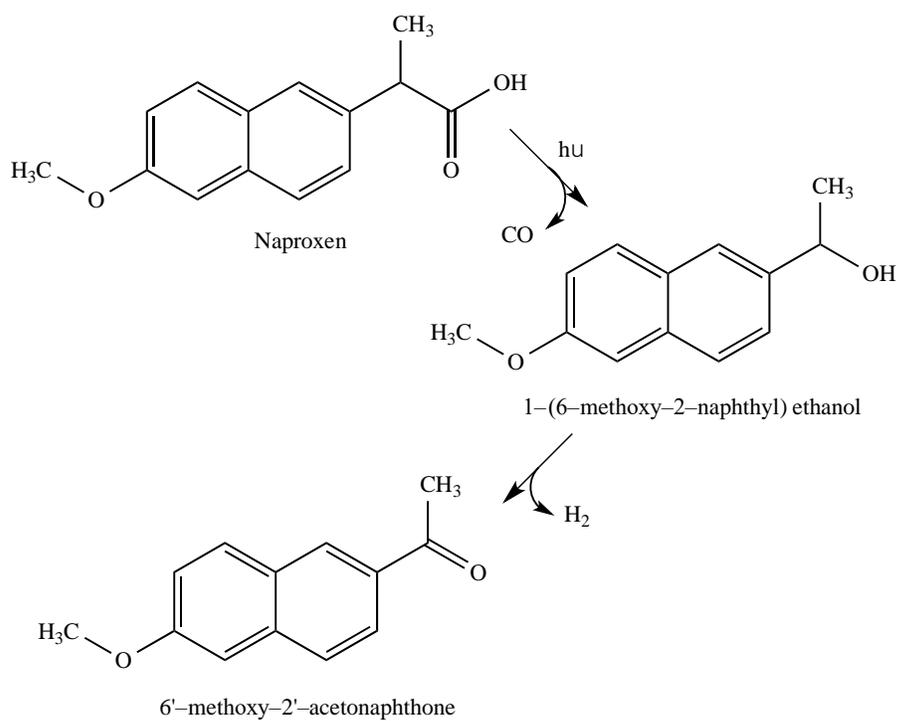
### 3.9.4 Propuesta de mecanismos de degradación de diclofenaco y naproxeno

En este trabajo se utilizaron los métodos empíricos, optimizando y calculando la frecuencia de cada molécula. Se hizo una propuesta de dos mecanismos de degradación del diclofenaco y naproxeno en el humedal, el primero para que el diclofenaco se degrade a 8-clorocarbazol-1-acetato (figura 9) y el segundo para que el naproxeno se degrade a 6'-metoxi-2'-acetonaftona (figura 10). Inicialmente, se calcularon las geometrías de los reactivos, las moléculas intermedias y los productos generados. Además, se calcularon las frecuencias de vibración molecular correspondientes a cada estructura generada. Todos los cálculos se realizaron con Gaussian09W y GaussView 3.

Las superficies de energía potencial (PES) se generaron a través de una coordenada de reacción: separación interatómica C-Cl (para diclofenaco) y C-C (para naproxeno) para encontrar estados de transición (TS). La estructura con la máxima energía en cada PES se utilizó para calcular los estados de transición con el método LST / QST (Halgren y Lipscomb, 1977). Los estados de transición fueron confirmados por una sola frecuencia imaginaria.



**Figura 9** Mecanismo propuesto para la degradación de diclofenaco



**Figura 10** Mecanismo propuesto para la degradación de naproxeno

### **3.10 Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos de los parámetros de crecimiento y/o desarrollo de las plantas se sometieron a un análisis estadístico usando el programa Minitab 16, este análisis se realizó separando los grupos de muestras del humedal control y se compararon con las muestras del humedal con la mezcla de fármacos. Se realizó una prueba ANOVA con intervalo de confianza por el método Tukey en el cual los resultados de medias y/o desviación estándar se agrupan por letras en las cuales si se presentan iguales para los datos es que no hay diferencias significativas entre ellos, y por contrario, si los resultados muestran diferentes letras (a, b, c, d) estos son significativamente diferentes.

## 4. Resultados y discusión

En este capítulo se describen los resultados del trabajo sobre la remoción de diclofenaco y naproxeno desde una solución sintética de concentración conocida utilizando un humedal construido de flujo subsuperficial horizontal con plantas de *Typha latifolia* operado en flujo continuo y a condiciones controladas. Se muestran también los datos del aislamiento de bacterias de la raíz de las plantas *Typha latifolia* expuestas en el humedal a la mezcla de fármacos; así como la identificación de las bacterias aisladas, sus propiedades bioquímicas y la identificación de enzimas involucradas en la degradación de compuestos orgánicos. Finalmente, mediante modelamiento químico utilizando herramientas de la química computacional, se predicen las interacciones químicas entre los fármacos y con la celulosa como componente de la raíz, con el propósito de describir la remoción de diclofenaco y naproxeno de la solución.

### 4.1 Determinación de la eficiencia de remoción de una mezcla de diclofenaco y naproxeno en lote y en HC-FSSH con plantas de *Typha latifolia*

La determinación de las concentraciones para trabajar en los humedales se determinó por las pruebas en sistema por lote, con una mezcla Diclofenaco: Naproxeno con diseño Central Compuesto (Zapata-Morales 2018). Los resultados de las pruebas en lote mostraron la capacidad de *Typha latifolia* para remover la mezcla de diclofenaco y naproxeno, ya que en cada una de las pruebas las eficiencias de remoción fueron mayores al 80 %, sin embargo al evaluar el efecto de estos en el desarrollo de la planta, las concentraciones superiores a 5.5 de naproxeno mostraban un efecto negativo a la planta, la cual comenzaba a presentar clorosis, marchites y la cantidad de clorofila disminuyó a comparación de la prueba control. En el caso para diclofenaco en concentraciones de 2 a 3.5 de este no se observaron efectos en la planta. Por lo cual se evaluó la concentración en 3 mg/L de diclofenaco y 5 mg/L de naproxeno, concentraciones que se evaluaron individualmente en celdas de humedal.

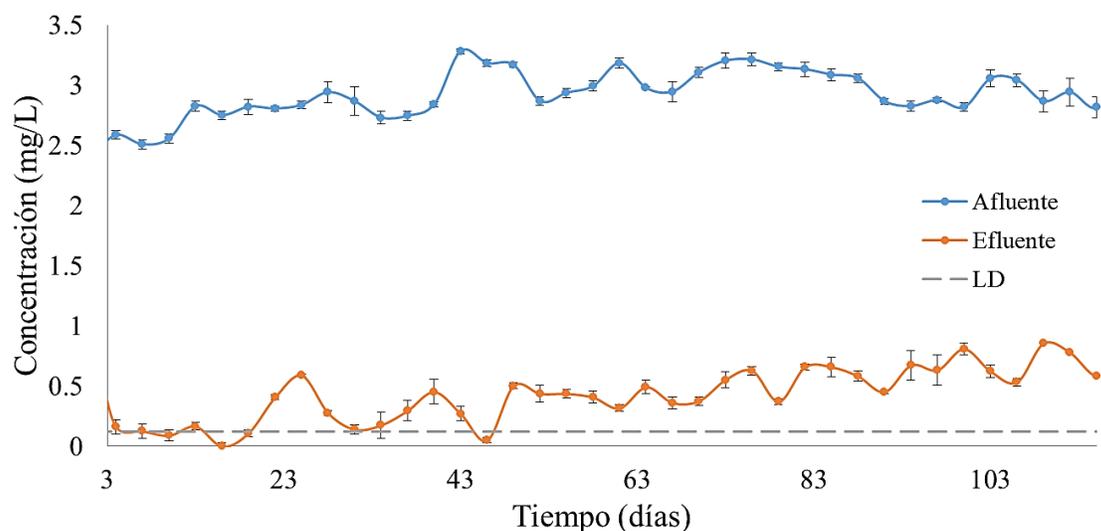
Primero se determinaron las condiciones de operación del HC-FSSH en cuanto al flujo de influente y del efluente para lograr un tiempo de residencia hidráulico (TRH) que se estableció en 3 días. El flujo del influente fue de  $10 \pm 4$  mL/min.

Una vez que se logró el desarrollo de la cobertura vegetal, se inició la experimentación mediante la alimentación de un influente consistente de una solución de diclofenaco (concentración  $2.58 \pm 0.33$ ) y naproxeno (concentración

5.05 ± 0.20) a un flujo continuo de 10 ± 4 mL/min. Las concentraciones elegidas fueron previamente determinadas por Zapata y col. (2020) a través de pruebas en lote para evaluar la tolerancia de las plantas a cada uno de los fármacos estudiados. Zapata y col. (2020) observaron también que *T. latifolia* tolera muy bien estas concentraciones en un sistema HC-FSSH en pruebas individuales.

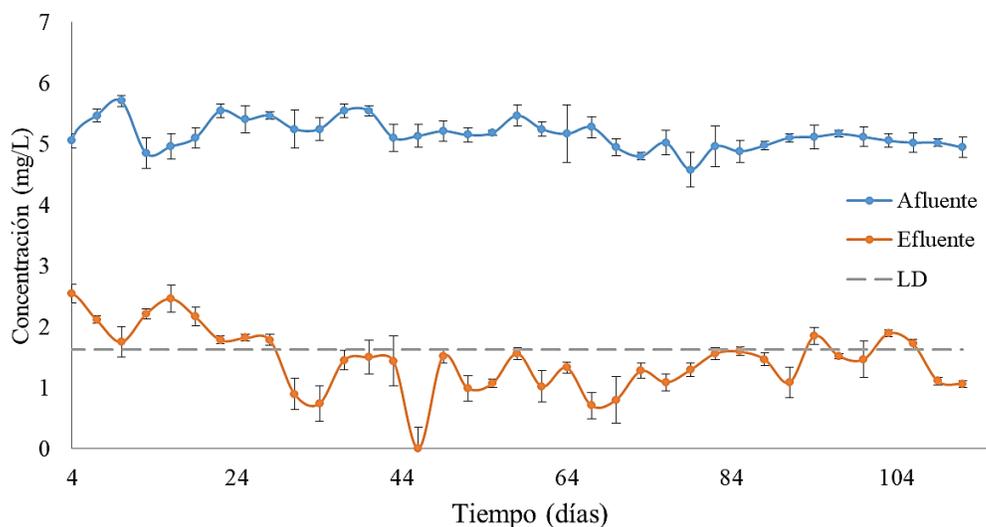
Cada 3 días se alimentó al HC-FSSH solución sintética recientemente preparada de diclofenaco y naproxeno en agua desionizada adicionada de nutrientes o bien, efluente tratado reconstituido con la concentración requerida de los contaminantes, así como de los nutrientes (1 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + 1.5 mM K<sup>+</sup> + 0.125 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> + 0.25 mM Ca<sup>2+</sup>; Loredó-Portales, 2011). Frecuente se verificó el nivel de la columna de agua en el humedal y se hicieron los ajustes correspondientes al flujo de salida cuando fue necesario para compensar pérdidas de agua por evapotranspiración. Al inicio de la experimentación con la solución sintética de fármacos, del HC-FSSH se tomaron muestras de influente y efluente cada 24 h, por 20 días, y en las muestras se determinaron las concentraciones de diclofenaco y naproxeno. Posteriormente cuando los flujos de entrada (influyente) y salida (efluente) se mantuvieron constantes, la colecta de muestras de la solución se realizó cada tercer día. Como se explicó en metodología, a la par del humedal con fármacos, se trabajó con un humedal control que se alimentó solamente con la solución de nutrientes y cuyos resultados se describirán más adelante.

La figura 11 muestra la variación de la concentración de diclofenaco en el humedal. En el afluente, la concentración se mantuvo entre 2.5 mg/L y 3.3 mg/L. La concentración en el efluente varió apreciablemente en el período de 0 a 20 días oscilando entre 1 mg/L y 0.5 mg/L. Es posible que esto se deba al proceso de adaptación de las plantas ante el contaminante. Posteriormente a partir del día 21, las concentraciones de diclofenaco en el efluente se mantuvieron entre 0.5-0.8 mg/L. El período total de experimentación fue de 100 días.



**Figura 11.** Variación de la concentración de diclofenaco en el afluente y en el efluente durante el período de experimentación en el HC-FSSH. La línea punteada indica el límite de detección del método analítico.

De igual forma que diclofenaco se dio seguimiento a las variaciones de concentración de naproxeno (figura 12). La concentración inicial en el afluente fue de 5.05 mg/L y se mantuvo entre 4.7 y 5.2 mg/L; en el efluente la concentración fue menor al límite de detección del método analítico utilizado a partir del día 25 de la experimentación.



**Figura 12.** Variación de la concentración de naproxeno en el afluente y en el efluente durante el período de experimentación en el humedal

construido. La línea punteada indica el límite de detección del método analítico.

Las eficiencias de remoción de diclofenaco y naproxeno fueron de 82 % y 74.5 %, respectivamente. Estos resultados nos muestran la capacidad del humedal construido para remover los fármacos en mezcla, así como la capacidad de *Typha latifolia* para desarrollarse en presencia de estas sustancias. Estos resultados concuerdan con los reportados por Hijosa y col. (2016) quienes estudiaron el comportamiento de una mezcla de productos farmacéuticos y de cuidado personal (ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco, ácido salicílico, cafeína, carbamazepina, dihidrojasmonato de metilo, galaxolida y tonalida) en cinco unidades de humedales de las cuales tres fueron sembradas con *Typha angustifolia* y dos con *Phragmites australis*.

Al analizar sus resultados y comparar los humedales que estudiaron, identificaron que la raíz de *Typha angustifolia* tenía una mayor capacidad de absorción de fármacos que *Phragmites australis*. Aunque no se establece la correlación de mayor absorción con mayor biomasa, indicaron que *Typha angustifolia* presentó mayor biomasa que *Phragmites australis* atribuyéndole a esto las diferencias observadas en la remoción de las sustancias estudiadas; durante este experimento las plantas de *Typha angustifolia* fueron expuestas a concentraciones de 0.41 mg/L para diclofenaco y 1.74 mg/L para naproxeno, y las eficiencias de eliminación fueron superiores al 60 % para ambas sustancias, lo que indica la capacidad de esta planta para eliminar productos farmacéuticos.

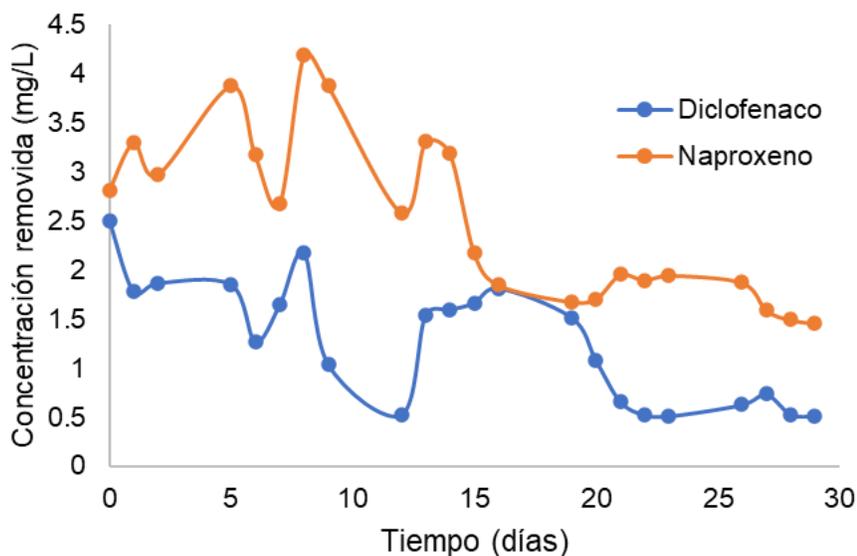
Algunos autores indican que la eficiencia de remoción en humedales construidos depende de un sistema de mecanismos los cuales en mayor o menor proporción dependiendo de fármaco, clima, diseño, sustrato y planta participan (Hu y col., 2021). En el caso particular de la planta la remoción se puede dividir en dos categorías: (1) roles directos, que incluyen absorción, translocación y degradación de la planta, y (2) roles indirectos que incluyen la promoción de actividades microbianas y enzimáticas a través de la secreción de exudados y la pérdida radial de oxígeno. En este trabajo no se analizó cada uno de los puntos mencionados, sin embargo, es importante resaltar que *Typha angustifolia* tiene capacidad para desarrollarse en presencia de la mezcla de fármacos y en el sistema de humedales se obtienen eficiencias de remoción igual o superiores a las reportadas.

Los resultados de las eficiencias de remoción de los fármacos en mezcla son diferentes a los reportados en nuestro trabajo del 2018, en donde se trabajó con dos celdas de humedales para remover de manera individual diclofenaco y/o naproxeno,

de lo cual se removió diclofenaco (3 mg/L) en un 98 % y naproxeno (5mg/L) en un 99 % durante el período de experimentación que fue de 105 días. Esto demuestra que para el sistema de humedales es más complicado la remoción de mezclas, sin embargo, se remueve más del 70% de ambos fármacos.

#### **4.1.1 Concentración removida de diclofenaco y naproxeno por el medio de soporte**

Para evaluar la contribución del material de soporte de las plantas, asumiendo que los fármacos se pueden remover por adsorción sobre la grava, se realizó un experimento en un HC-FSSH alimentado con una solución conteniendo nutrientes y los fármacos pero que no contenía plantas. Las concentraciones que se determinaron en la solución afluyente en el inicio de la experimentación fueron de  $2.58 \pm 0.4$  mg/L de diclofenaco y  $4.5 \pm 0.9$  mg/L de naproxeno. Cada 3 días se alimentó la solución influente recientemente preparada con diclofenaco, naproxeno y nutrientes, en agua de grifo, o bien, el efluente se fue reconstituido con la concentración requerida de los contaminantes y recirculado al humedal. De manera continua se verificó el nivel de la columna de agua en el humedal y se hicieron los ajustes necesarios al flujo del efluente para mantener la columna de agua y el TRH que fue de 3 días. Las concentraciones de los fármacos en el influente y en el efluente se realizaron en muestras tomadas cada 24 h. La figura 13 muestra la concentración removida (mg/L) de diclofenaco y naproxeno durante los 30 días de experimentación.



**Figura 13.** Concentración removida de diclofenaco y naproxeno por el material de soporte de las plantas (grava).

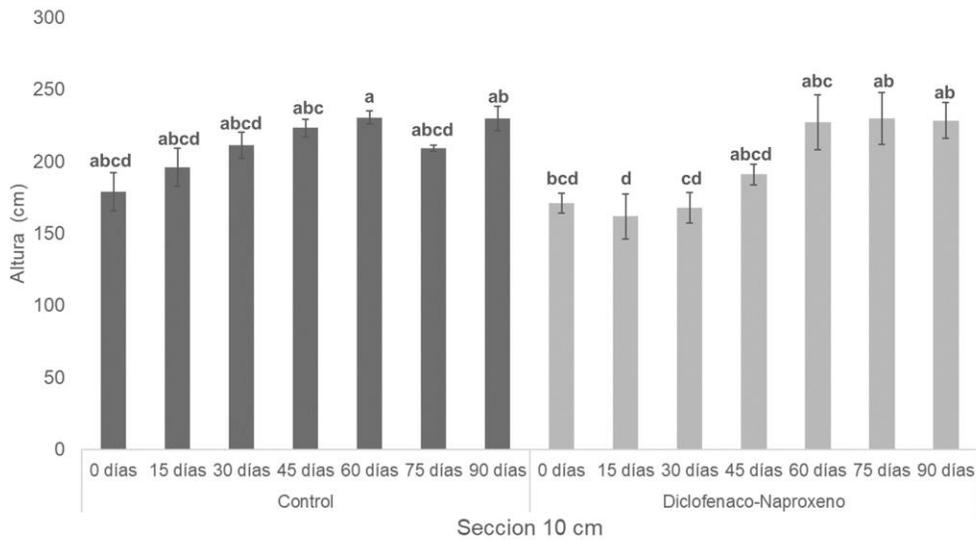
Posteriormente de 16 días de experimentación, la concentración de los fármacos en los efluentes se comenzó a mantener constante, estos datos son los que se consideraron para determinar la contribución de la grava a la remoción total de los fármacos en el humedal.

La contribución de la grava a la remoción total de los fármacos fue de 20.4 % para diclofenaco y 30.8 % para naproxeno y la remoción total de diclofenaco y naproxeno en el humedal con plantas de *T. latifolia* fue de 88.0 % y 76.0 %, en el mismo periodo. Varios procesos podrían estar ocurriendo en el humedal construido y contribuir a la eliminación de diclofenaco y naproxeno. Uno de estos procesos podría ser la adsorción por parte de la grava. Zapata y col., (2020), estimaron que *T. latifolia* eliminó más del 90 % de diclofenaco o naproxeno en sistemas por lotes con soluciones individuales de los productos farmacéuticos en las concentraciones probadas en este trabajo. De acuerdo con los resultados de Zapata y col., (2020), *T. latifolia* puede eliminar el diclofenaco y el naproxeno tanto de soluciones simples como de mezclas. En este trabajo, considerando el aporte de sustrato, la remoción atribuida a las plantas se estima en 67.6 % para diclofenaco y 45.2 % para naproxeno, sin embargo, no se hizo distinción entre los procesos que ocurren a nivel de raíces como adsorción, absorción y los atribuidos a los microorganismos desarrollados en la raíz que podrían contribuir a la asimilación de estas sustancias por parte de las plantas. Los resultados de la contribución de la grava se obtuvieron al hacer una diferencia entre la eficiencia de remoción de las plantas en el día 30 al igual que en la grava.

Ávila y col., 2014 realizaron una prueba en humedales construidos de flujo vertical (VF) a escala piloto con arena o grava, plantados con *Phragmites australis* expuestos a ocho productos farmacéuticos y encontraron que los humedales construidos con arena eliminaban concentraciones más altas que aquellos con grava, excepto por diclofenaco para el cual el VF humedal construido a base de arena removió  $85 \pm 17 \%$  y con grava  $74 \pm 15 \%$ , por lo tanto, el sustrato fue importante en la eficiencia de remoción de los fármacos, también indicaron que se observó una mayor remoción de diclofenaco en humedales con menos condiciones oxidativas, sin embargo este aspecto no se evaluó.

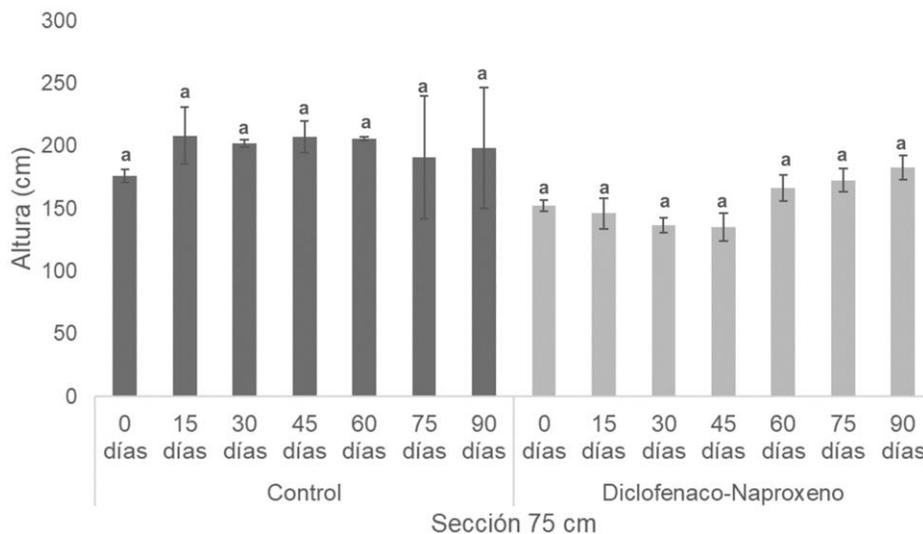
#### **4.2 Efecto de diclofenaco y naproxeno sobre el desarrollo de *Typha latifolia* en el HC-FSSH en comparación con el sistema control**

Los efectos de los fármacos en la salud de las plantas son importantes. De acuerdo con Dordio y col., (2009), los efectos de los contaminantes se evalúan con base en su toxicidad, considerando las funciones de las plantas para la eliminación de estos productos, por lo cual se puede analizar la arquitectura radicular, la tasa de crecimiento relativo de la planta y las concentraciones de pigmentos fotosintéticos tales como carotenoides y clorofila en tejidos vegetales. Durante la experimentación se dio seguimiento a los parámetros de crecimiento de la planta midiendo su altura, número de hojas y su contenido total de clorofila. Se seleccionaron 9 plantas en cada humedal (con fármacos y control), la selección dependió de su ubicación en cada humedal con respecto a la distancia de alimentación del afluente. Se seleccionaron tres plantas de cada punto elegido A (0-10cm), B (75 cm) y C (120-130 cm). Al inicio de operación de los humedales, a las plantas se les asignó un número para darles seguimiento durante la experimentación. Cada 15 días durante la experimentación, las plantas se midieron y se contaron para llevar un registro de la cobertura vegetal en el humedal durante la exposición a los fármacos. Los resultados se compararon contra el humedal control (libre de fármacos). Los resultados del parámetro de altura de las plantas de las plantas elegidas en A, B y C se muestran en las figuras 14, 15, 16 en los cuales se observa la variación de la altura en función del tiempo para cada humedal (con fármacos y control).



**Figura 14.** Altura de las plantas (punto A) expuestas a los fármacos en el humedal control y en el humedal con la mezcla de fármacos.

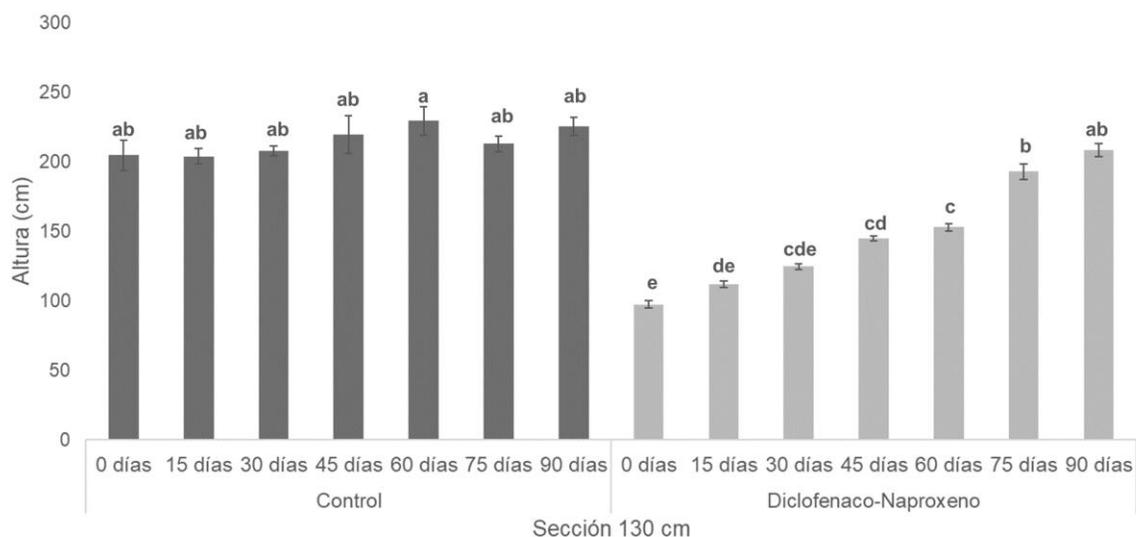
Los resultados de la variación de altura al comparar la sección A (figura 14) en humedal control y humedal en contacto con los fármacos muestran que no existen diferencias significativas en el crecimiento de las plantas. Lo cual es indicativo que la presencia de diclofenaco y naproxeno no afecta el crecimiento de *Typha latifolia*.



**Figura 15.** Altura de las plantas (punto B) expuestas a los fármacos en el humedal control y en el humedal con la mezcla de fármacos.

En la sección B (figura 15), se observa que los datos de crecimiento de *T. latifolia* no muestran una diferencia significativa a lo largo de todo el periodo de experimentación, cuando se analiza por humedal (control y con fármacos); en la gráfica se observa que los datos pertenecen al mismo grupo “a”.

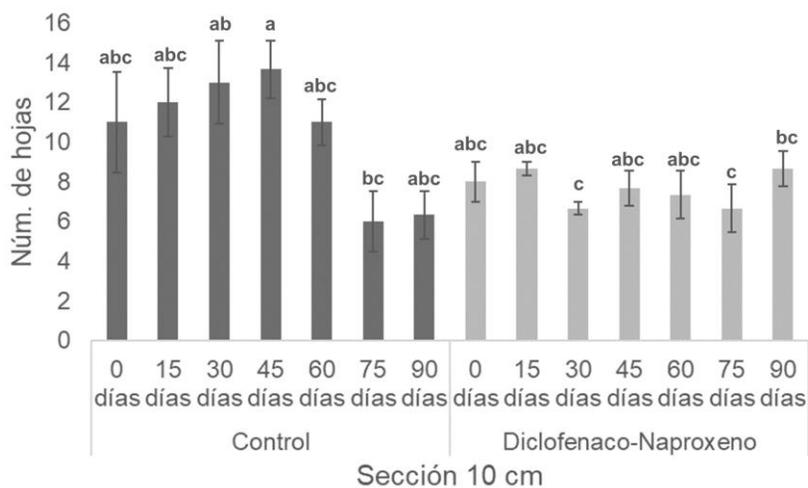
En la figura 16 se puede observar que el desarrollo de las plantas de la sección C del humedal control tuvieron siempre un desarrollo, a diferencia de las plantas en contacto con la mezcla de los fármacos, donde se observa que probablemente por el periodo de adaptación estas se desarrollaron de manera más lenta en los primeros 45 días; posteriormente, en el período de 75 y 90 días, las diferencias en altura no son significativas, lo cual indica que las plantas se adaptaron y crecieron al final con la misma tendencia que las plantas del humedal control.



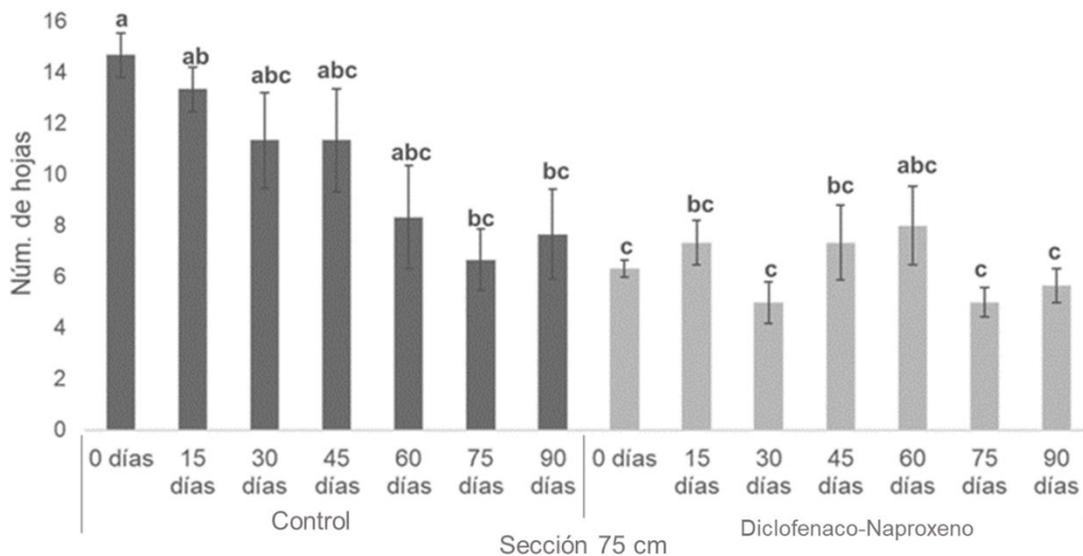
**Figura 16.** Altura de las plantas (punto C) expuestas a los fármacos en el humedal control y en el humedal con la mezcla de fármacos.

El parámetro de altura de las plantas en los humedales con la mezcla de fármacos demuestra que no hay efectos negativos en el desarrollo de las plantas si se comparan ambos humedales (control y con fármacos). Es decir, la planta no se ve afectada en su desarrollo durante el tiempo de experimentación.

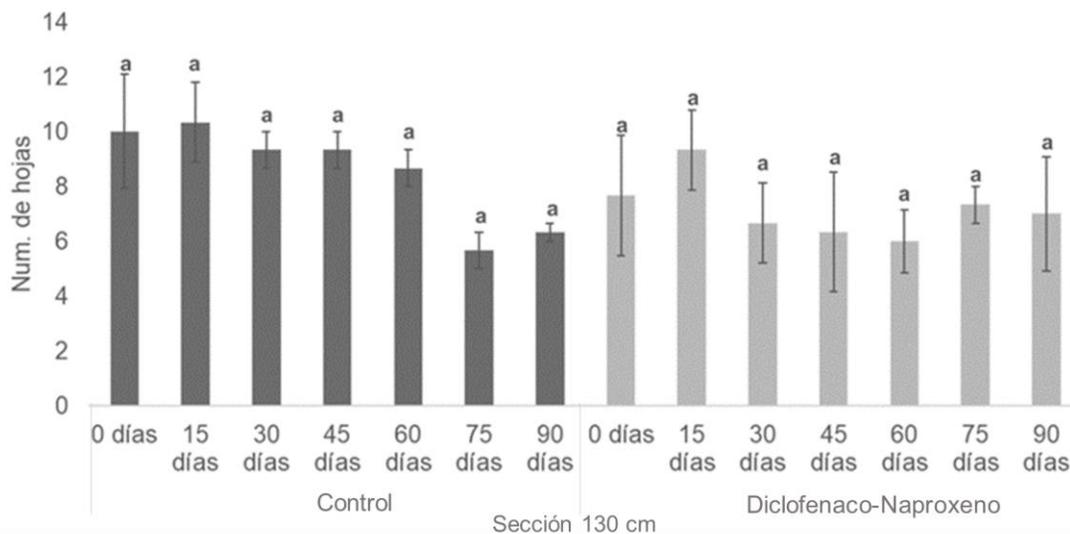
Durante la experimentación también se realizó un conteo del número de hojas desarrolladas, los resultados se muestran en las figuras 17, 18 y 19. Este parámetro se midió realizando un conteo de las hojas nuevas restando las hojas que presentaban clorosis o marchitamiento.



**Figura 17.** Número de hojas de las plantas (punto A) expuestas a los fármacos en el humedal control y en el humedal con la mezcla de fármacos.



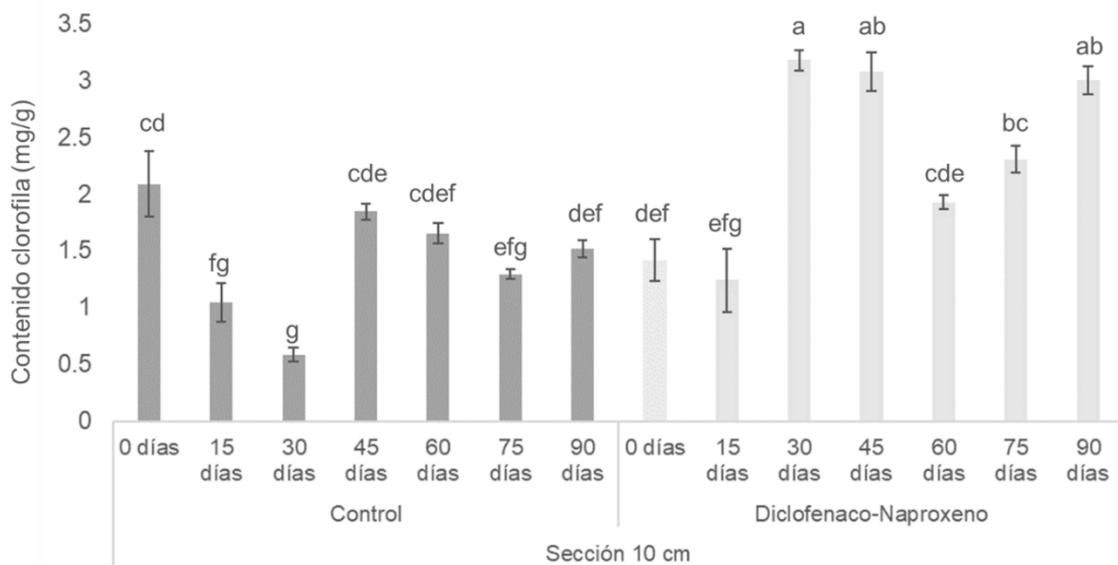
**Figura 18.** Número de hojas de las plantas (punto B) expuestas a los fármacos en el humedal control y en el humedal con la mezcla de fármacos.



**Figura 19.** Número de hojas de las plantas (punto C) expuestas a los fármacos en el humedal control y en el humedal con la mezcla de fármacos.

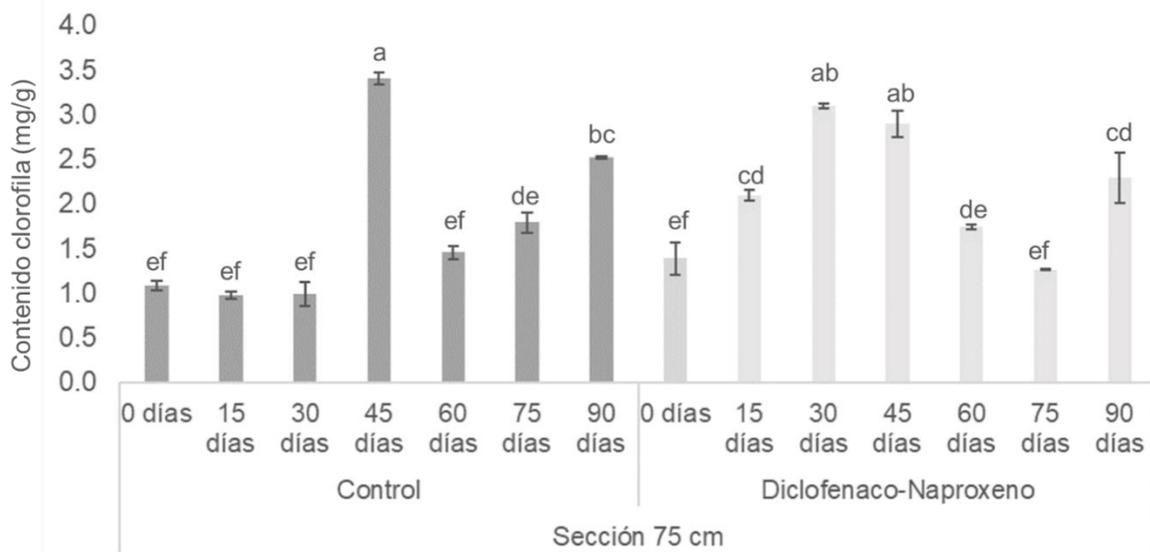
En el desarrollo de las hojas se observa que la adición de la mezcla de diclofenaco y naproxeno no tiene efecto en su crecimiento cuando se compara con las plantas desarrolladas en ausencia de los fármacos.

Durante el desarrollo del proyecto se cuantificó la cantidad de clorofila producida en las plantas en contacto con los fármacos (diclofenaco 3 mg/L y naproxeno 5mg/L) en la celda de humedal y se realizó una comparación con las plantas desarrolladas en la celda control, durante todo el proceso de operación de estos (100 días; análisis cada 15 días, la figura 20,21 y 22 muestran los resultados de contenido de clorofila en cada una de las secciones.



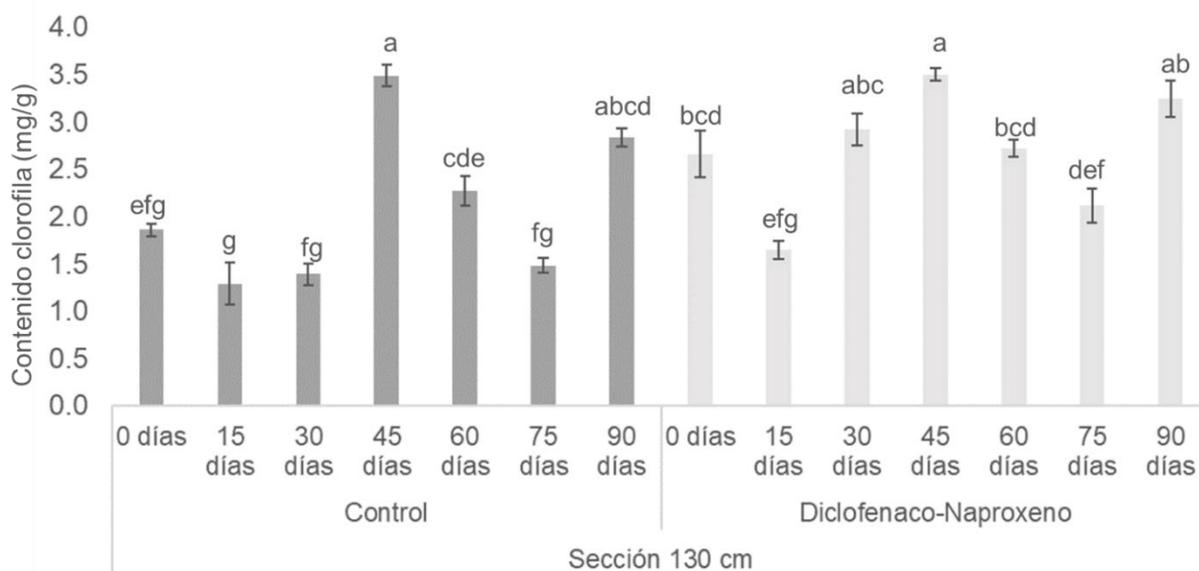
**Figura 20.** Contenido de clorofila (Sección A) de las plantas desarrolladas en la celda con diclofenaco y naproxeno y control

La figura 20 muestra el contenido de clorofila en la sección A, donde se observa que existe una diferencia significativa entre la celda control y las plantas expuestas a diclofenaco-naproxeno, esto se observa a partir del día 30, donde la cantidad de clorofila en las plantas de *Typha latifolia* expuestas a la mezcla de fármacos es mayor.



**Figura 21** Contenido de clorofila (Sección B) de las plantas desarrolladas en la celda con diclofenaco y naproxeno y control

En la figura 21 se observa que no hay diferencia significativa en el contenido de clorofila de las plantas desarrolladas en la celda control comparando con las expuestas a diclofenaco-naproxeno.



**Figura 22.** Contenido de clorofila (Sección C) de las plantas desarrolladas en la celda con diclofenaco y naproxeno y control

El contenido de clorofila de las plantas de la sección C, no muestran una diferencia significativa comparando las plantas expuestas a la solución con los fármacos y las de la celda control, lo que indica que no existe un efecto negativo en el desarrollo de las plantas.

Al observar los resultados de las figuras 20, 21 y 22, no se observó un efecto significativo de los fármacos sobre el contenido de clorofila, lo cual indica que diclofenaco y naproxeno no son tóxicos para las plantas. De manera visual las plantas no presentaron clorosis. Un estudio realizado por Dordio y col. (2009) en el cual realizaron pruebas in-vitro con plantas de *Typha spp.*, en contacto con una solución de ácido clofíbrico (4 mg/L), no se observaron signos visuales de toxicidad sobre la planta. En este caso, la planta no solo fue capaz de crecer en las soluciones con ácido clofíbrico si no que continuó eliminando el contaminante hasta alcanzar remociones de 46 % a 64 %. En el estudio realizado por Amaya-Chávez (2006) para la eliminación del metilparatión, informó que la clorofila de las plantas de *Typha spp.*, no se vio afectado por xenobióticos orgánicos, en el estudio las plantas no presentaron efectos tóxicos. Lo cual demuestra que *Typha spp.* tiene gran capacidad para crecer en medios contaminados con este tipo de sustancias.

#### 4.3 Análisis microbiológico de muestras de raíz obtenida de las plantas desarrolladas en el HC-FSSH alimentado con la solución de fármacos

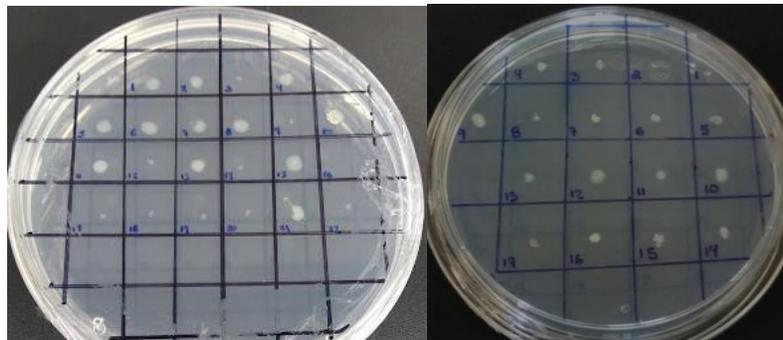
Los siguientes apartados muestran los resultados para el análisis de los aislados bacterianos desarrollados en la raíz de las plantas en contacto con la mezcla de diclofenaco y naproxeno, posterior a los 100 días de experimentación.

##### 4.3.1 Obtención y caracterización de los aislados bacterianos de la raíz de *T. latifolia*.

Se recolectó la raíz de plantas seleccionadas de acuerdo con el procedimiento descrito en la Metodología, para el análisis del consorcio bacteriano cultivable desarrollado en la raíz de las plantas de *Typha latifolia* durante el tratamiento de la solución sintética con fármacos en el humedal construido, se recolectó la raíz de plantas seleccionadas de acuerdo con el procedimiento descrito en la Metodología. Las raíces recolectadas fueron lavadas con agua desionizada estéril, el agua de lavado se utilizó para obtener los aislados bacterianos. Por lo cual posterior al lavado se tomaron alícuotas (200 µL) del agua y se colocaron en cajas de Petri con medio mínimo M9 sólido suplementado con 3 mg/L de diclofenaco y 5 mg/L de naproxeno como fuente de carbono.

Enseguida, las muestras se incubaron a 28 °C durante 48 h, al término del periodo de incubación se observaron las colonias desarrolladas y clasificaron por su morfología; este mismo proceso se realizó para los aislados desarrollados en el humedal control.

La diversidad morfológica fue muy representativa, se observaron colonias grandes de color blanco con un borde uniforme y circular como colonias pequeñas de color blanco con borde irregular, entre otras. La figura 23 muestra un aspecto de las colonias bacterianas desarrolladas en el humedal con fármacos.



**Figura 23.** Morfología de colonias desarrolladas en presencia de una mezcla de diclofenaco y naproxeno.

Los resultados obtenidos muestran la gran diversidad de bacterias que colonizan las raíces de *Typha latifolia*. Las colonias de bacterias aisladas del humedal corresponden a las obtenidas de las raíces de plantas de los puntos A, B y C del humedal alimentado con la solución de fármacos. Se identificó un total de 14 morfotipos de los cuales 6 procedían de las plantas del punto A, 3 del punto B y 5 del punto C, así se aisló un total de 208 colonias. La tabla 9 muestra el número de colonias aisladas de acuerdo con la parte del humedal de la cual se obtuvieron.

**Tabla 9.** Aislados bacterianos de las raíces de las plantas de *Typha latifolia* desarrollada en el HC-FSSH alimentado con la solución de fármacos.

Punto A		Punto B		Punto C	
Morfotipo	Número de Colonias	Morfotipo	Número de Colonias	Morfotipo	Número de colonias
<b>E1</b>	26	<b>M1</b>	21	<b>S1</b>	16
<b>E2</b>	18	<b>M2</b>	9	<b>S2</b>	21
<b>E3</b>	9	<b>M3</b>	21	<b>S3</b>	10
<b>E4</b>	21			<b>S4</b>	17
<b>E5</b>	3			<b>S5</b>	14
<b>E6</b>	2				
Total	79	Total	51	Total	78

La cuantificación de microorganismos es un elemento crítico en los estudios de ecología microbiana, debido a que las comunidades microbianas pueden responder rápidamente a los cambios ambientales causados por la contaminación y los factores ambientales, dentro de esto los contaminantes pueden provocar un aumento (Kaplan & Kitts 2004) o una disminución (Bordenave et al. 2007) en la diversidad microbiana dependiendo de su toxicidad y cantidad la cual probablemente sea causada por la presión selectiva de los contaminantes.

Con los resultados de la identificación de los morfotipos desarrollados, se realizó una comparación con los estudios de 2018., en los cuales se identificó la morfología de colonias bacterianas desarrolladas en presencia de diclofenaco o naproxeno en humedales por separado, de lo cual se observó 9 morfotipos en presencia de diclofenaco y 7 morfotipos diferentes desarrollados en presencia de naproxeno, es decir un total de 16 morfologías diferentes, en este trabajo se identificaron 14 morfologías diferentes lo cual representa una disminución en la diversidad microbiana, lo cual puede indicar que los fármacos en mezcla promueven un desarrollo bacteriano especializado para funciones como la asimilación de sustancias orgánicas complejas.

#### **4.4 Caracterización de aislados bacterianos**

Para conocer características particulares de los aislados bacterianos se les realizó las siguientes pruebas: tinción de Gram, determinación de la actividad enzimática para la hidrólisis de carbohidratos complejos, análisis bioquímico para conocer su potencial como promotoras de crecimiento vegetal, así como pruebas de tolerancia a diferentes concentraciones de diclofenaco y naproxeno en mezcla.

##### **4.4.1 Tinción de Gram**

Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas. Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo (Casasola, 2022).

Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa. La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, cuyo componente estructural único son los lipopolisacáridos. Las bacterias G (+) retienen el cristal-violeta después de la decoloración y aparecen de color azul intenso (purpura). Las bacterias G (-) no son capaces de retener el cristal-violeta después de la decoloración y son teñidas de rojo con safranina.

Al realizar la tinción de Gram a cada uno de los aislados bacterianos, se determinó que el 100% de las colonias bacterianas son bacilos Gram negativo.

#### 4.4.2 Actividad enzimática de los aislados bacterianos para la hidrólisis de carbohidratos complejos

Debido a las características de la pared celular vegetal, las bacterias para poder colonizar el interior de los tejidos vegetales deben ser capaces de producir enzimas hidrolíticas. Algunas de estas enzimas participan en la asimilación de la fuente de carbono para su crecimiento (Dávila y col., 2006). Con el propósito de conocer la naturaleza de los aislados bacterianos se determinó la producción de las enzimas amilasa, pectinasa y celulasa, en agar suplementado con almidón, pectina y carboximetilcelulosa, respectivamente. Un resultado positivo se evidenció con la presencia de halos claros indicando la producción de enzimas hidrolíticas.

##### 4.4.2.1 Determinación de la actividad de amilasa por aislados bacterianos de la raíz de plantas de *Typha latifolia*

Las amilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de 1,4  $\alpha$ -D- glucanos como el almidón y glucógeno (Pedroza, 1999). Para observar la actividad enzimática de los aislados bacterianos se utilizó agar suplementado con almidón. La figura 24 muestra los halos hidrolíticos formados alrededor de las colonias bacterianas que indican un resultado positivo.



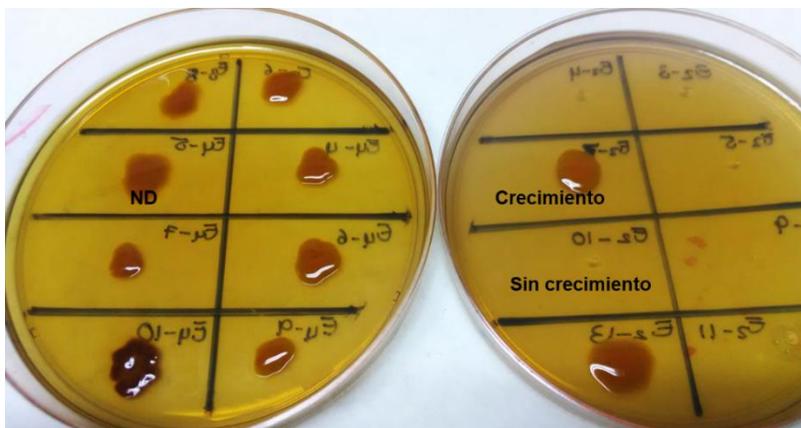
**Figura 24.** Halos que evidencian la degradación bacteriana del almidón en agar suplementado con almidón; (+) resultado positivo, ND (no se detecta halo hidrolítico).

De todas las colonias bacterianas, 32 de 208 mostraron la capacidad para hidrolizar almidón, de las cuales 27 son de la sección A, 3 de la sección B y dos de la sección C.

#### 4.4.2.2 Determinación de la actividad pectinasa por aislados bacterianos de la raíz de *Typha latifolia*

La producción de la enzima pectinasa se realizó en agar suplementado con pectina, un resultado positivo se detectó con la formación de halos hidrolíticos. En la figura 25 se observan los resultados; el crecimiento de las colonias representa un resultado positivo ya que indica que las bacterias fueron capaces de metabolizar la pectina.

La prueba de producción de pectinasa se realizó a las 208 colonias identificadas, de las cuales 28 aislados mostraron resultados positivos, 25 son de la sección A, y 3 de la sección B.



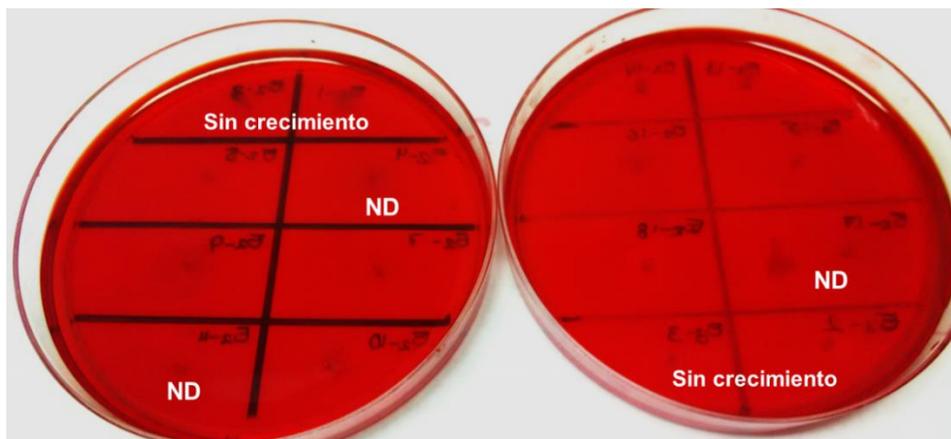
**Figura 25.** Prueba de degradación de pectina. Los resultados positivos corresponden al crecimiento de las bacterias, un resultado negativo está representado porque no se observa crecimiento.

#### 4.4.2.3 Producción de enzimas de tipo celulasa por aislados bacterianos de la raíz de *Typha latifolia*

La celulosa es un polímero de glucosa, unidas por los carbonos 1 y 4 en un enlace beta-glucosídico, muy resistente. Este enlace tan solo pueden romperlo algunas bacterias y hongos especializados (Cuamatzi y col., 2004). Cuando los microorganismos son capaces de hidrolizar celulosa muestran un crecimiento en la

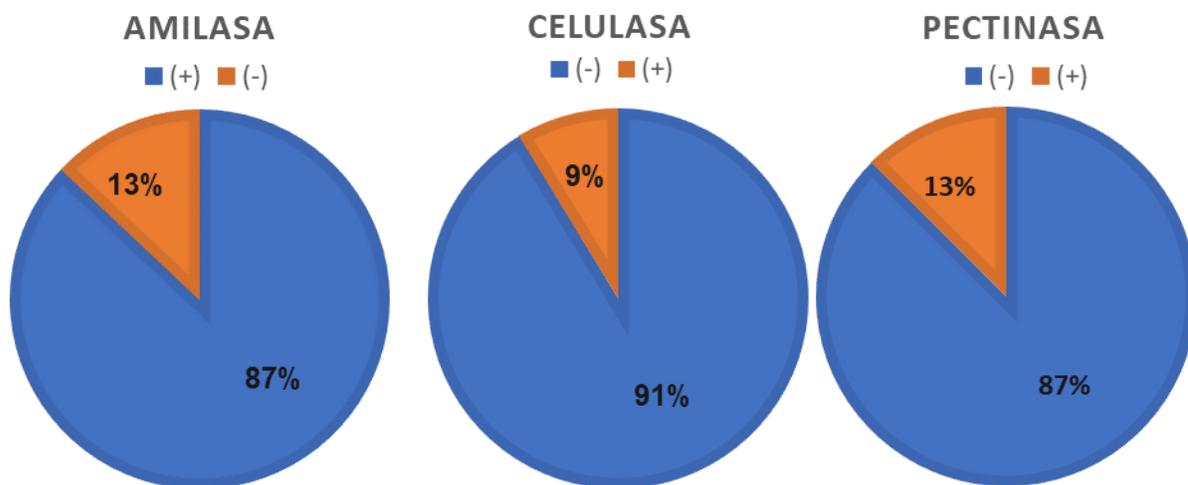
placa Petri, por el contrario, cuando no se observa crecimiento el resultado es negativo.

En la figura 26 se pueden observar los resultados para la hidrólisis de carboximetilcelulosa, de las 208 colonias solo 3 mostraron un crecimiento posterior a la incubación.



**Figura 26.** Prueba de hidrólisis de carboximetilcelulosa.

La figura 27 resume los resultados observados de las pruebas de hidrólisis de carbohidratos complejos por los aislados bacterianos obtenidos de la raíz de las plantas previamente expuestas a fármacos en el HC-FSSH.



**Figura 27.** Porcentaje de aislados bacterianos con capacidad de hidrólisis de carbohidratos complejos.

En la figura 27 se encuentra el porcentaje de los aislados bacterianos que tienen actividad de amilasas, pectinasas y celulasas, cada aislado bacteriano presenta desarrollo y características bioquímicas diferentes.

Pérez y col. (2009), sugieren que los microorganismos deben poseer la maquinaria bioquímica para degradar carbohidratos complejos, es decir para penetrar y sobrevivir en el interior de la planta, sobre todo cuando las condiciones externas presentan algún estrés para ellos.

Los resultados indican que la actividad enzimática para hidrolizar carboximetilcelulosa, pectina y almidón la presentan menos del 60% de los aislados bacterianos, lo cual sugiere que es más probable que durante la experimentación siempre estuvieron en contacto con los contaminantes, sin embargo, no existe información que compruebe lo anterior. En referencia a lo reportado por Pérez y col. (2009), las colonias aisladas de la raíz de las plantas en contacto con los fármacos tienen poca o nula capacidad de penetrar y sobrevivir en el interior de la planta.

#### **4.5 Análisis bioquímico de las bacterias con potencial como promotoras de crecimiento vegetal**

Los microorganismos son sensibles tanto a las deficiencias como a excesivas concentraciones de contaminantes, reducen su crecimiento y actividad enzimática, pero a su vez tienen la capacidad de adaptarse a ellas (Mengoni y col., 2006).

Entre las funciones de los microorganismos simbióticos con las raíces de plantas se destacan: promover la movilidad y disponibilidad de los contaminantes a las plantas, mediante la producción de sideróforos (Carrillo y col., 2011), reducir el pH del suelo por acción de los ácidos orgánicos sintetizados (Berzaín y col., 2007), solubilizar fosfatos, producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal (fitohormonas) y ser resistentes a metales pesados y contaminantes orgánicos. Al grupo de bacterias que estimulan el crecimiento de las plantas se les denomina rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGRs), esto describe a las bacterias que tienen la capacidad de colonizar las raíces de forma intensa y pueden ejercer un efecto positivo sobre los cultivos (Barea y col., 2005).

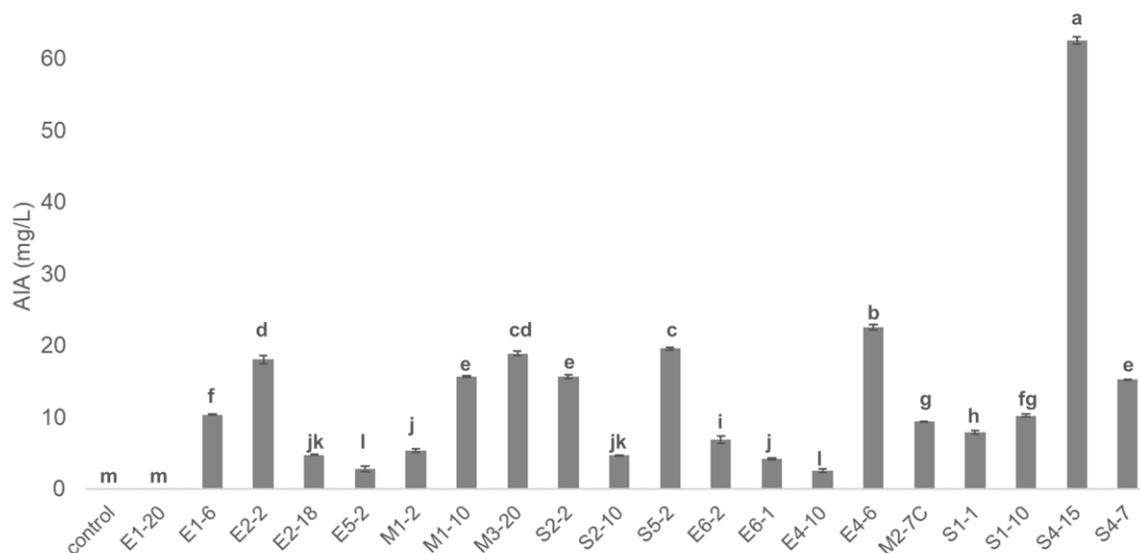
Los mecanismos directos para la promoción del crecimiento vegetal son aquellos en donde los microorganismos actúan sobre la planta. Dentro de estos encontramos la producción de promotores de crecimiento vegetal, la presencia de un consorcio bacteriano que pueda funcionar como barrera de protección hacia las plantas ya que son capaces de mejorar el crecimiento de su planta hospedera a través de mecanismos como la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos, la producción de ácido indol acético (AIA) y por poseer la enzima ACC desaminasa

(Rivieros, 2008). Para conocer si los aislados bacterianos desarrollados en presencia de la mezcla de los fármacos pueden tener un papel positivo en la planta se les realizaron pruebas de su capacidad para promover el crecimiento vegetal.

#### 4.5.1 Producción de ácido indol acético (AIA)

Las bacterias habitantes de la rizósfera pueden influenciar el crecimiento de las plantas contribuyendo con el pool endógeno de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en estas, como las auxinas, entre las que se encuentra el ácido Indolacético (AIA) (Patten y Glick, 2002). La producción de AIA por las cepas aisladas fue evaluada en medio LB (Luria Bertani) con triptófano, inductor de la producción de AIA, cuya concentración fue cuantificada por medio de reacción colorimétrica con el reactivo de Salkowski. Dada la cantidad de aislados bacterianos, en este trabajo solamente se realizó la determinación de producción de AIA a 3 aislados bacterianos de cada morfotipo. La figura 28 muestra los resultados, donde los pertenecientes a la Sección A, se muestran con la inicial E, los aislados de la sección B, se representan con la letra M y los resultados de los aislados de la sección C, se muestran con la inicial S.

De acuerdo con estos resultados, se puede observar que el aislado bacteriano de la sección C (S4-15) presentó mayor producción de AIA y una mayor diferencia significativa comparando con las otras muestras.



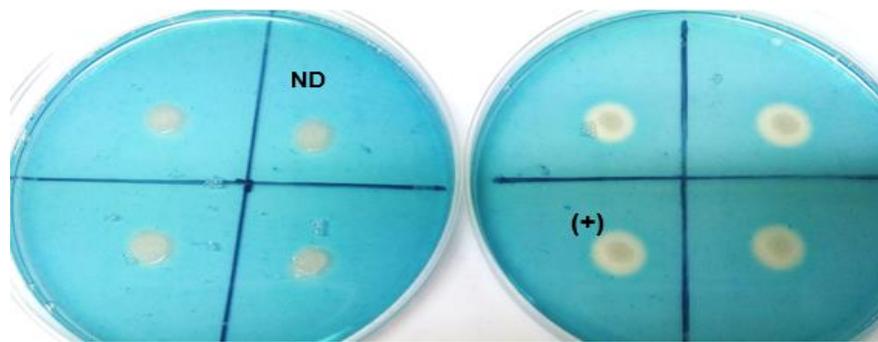
**Figura 28.** Producción de AIA de los aislados bacterianos.

En las últimas décadas, se ha estudiado la interacción de las bacterias tolerantes a contaminantes con las plantas fitorremediadoras, debido a que ciertas bacterias son capaces de aumentar la eficacia de la fitorremediación al promover el crecimiento vegetal y facilitar la captación de contaminantes (Kidd y col., 2007). Uno de los principales factores que se evalúa en promoción de crecimiento vegetal es el crecimiento radical, bajo este contexto fue que se analizó la producción bacteriana de ácido indolacético en las colonias bacterianas aisladas. Con los resultados obtenidos del número de colonias bacterianas analizadas, es posible identificar que el 86 % (20 de 24 colonias analizadas) tienen capacidad de producir AIA.

La capacidad de producir AIA por los aislados bacterianos representa un beneficio para la planta promoviendo su desarrollo radicular, diferentes estudios han reportado la importancia de los aislados bacterianos en la producción de AIA, el cual permite un desarrollo de las plantas aún en situaciones de estrés, así como se ha indicado que muchas de estos aislados pertenecen al género de *Pseudomonas* (Vega y col., 2016).

#### **4.5.2 Producción de sideróforos**

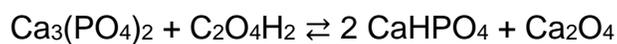
La producción de sideróforos es un mecanismo indirecto usado por las bacterias promotoras de crecimiento vegetal para captar hierro; sin embargo, estos solo se producen cuando los microorganismos se encuentran en condiciones hipoférricas. El suelo solo provee comúnmente  $10^{-18}$  M de este metal (Mercado y col., 2007), esta condición hace que las rizobacterias, entre otro tipo de microorganismos, generen estos compuestos para asegurar su supervivencia. En la detección de sideróforos, los aislados bacterianos se sembraron por picadura sobre el agar CAS, las placas fueron incubadas a 28 °C por 4 días. Después del tiempo de incubación, se observó la liberación al medio de cultivo de los sideróforos bacterianos mediante el desarrollo de halos de crecimiento por la liberación del Fe del complejo colorido CAS-Fe-HDTMA. Los resultados positivos para algunos de los aislados muestran que aún en condiciones limitantes de Fe, son capaces de crecer ya que solubilizan el Fe no disponible por la producción de sideróforos y lo utilizan para su metabolismo (figura 29).



**Figura 29.** Producción de sideróforos bacterianos en agar CAS. (+) representa un resultado positivo en medio CAS inoculado con bacterias productoras de sideróforos, ND significa un resultado negativo.

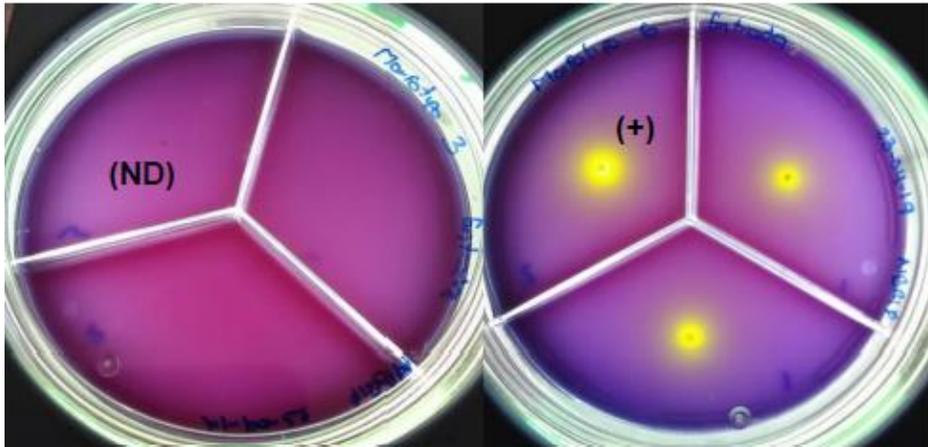
#### 4.5.3 Capacidad de solubilización de fosfatos

El fósforo es uno de los requerimientos esenciales para el crecimiento y funcionamiento de la planta, éste se encuentra involucrado en el desarrollo de la raíz, en el crecimiento y la floración, además se encuentra constituyendo los fosfolípidos de las membranas celulares y del material genético; cumple funciones en el metabolismo energético celular y en procesos de fotosíntesis (Corrales y col. 2014). Los fosfatos que no pueden ser asimilados por las plantas, pueden ser llevados a formas solubles por la acción de muchos microorganismos. La vía principal de solubilización es mediante la producción de ácidos orgánicos como ácido oxálico, cítrico, malónico, indolacético, láctico, entre otros.



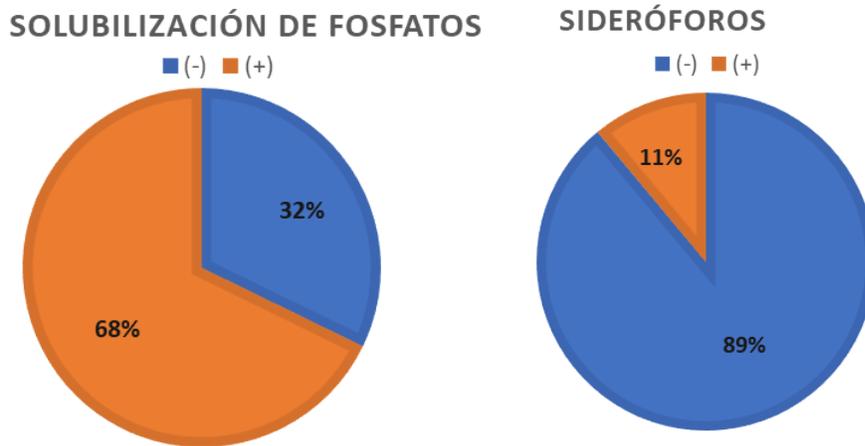
Reacción tomada de Plazas (2007)

Los ácidos orgánicos permiten que haya solubilización debido a que la presencia de estos implica un descenso en el pH hasta valores aproximados de 2. La prueba se realizó en medio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate). Un resultado positivo se indica con zonas claras alrededor de las colonias, esto se debe a la capacidad de virar el medio de cultivo NBRIP, de azul a amarillo. Este mecanismo empleado por las bacterias para solubilizar el fosfato inorgánico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  del medio NBRIP se manifiesta por el vire del azul de bromofenol utilizado como indicador (figura 30). Estos resultados sugieren que las bacterias producen ácidos orgánicos lo que provoca el descenso del pH y resulta en la solubilización del fosfato.



**Figura 30.** Solubilización de fosfato tricálcico en agar NBRIP. ND corresponde a las pruebas negativas, es decir, las bacterias inoculadas no fueron capaces de solubilizar el fosfato, (+) corresponde a las pruebas positivas.

La figura 31 muestra los resultados para la capacidad de los aislados bacterianos promotores de crecimiento vegetal.



**Figura 31.** Características de promoción de crecimiento vegetal de los aislados bacterianos tolerantes a diclofenaco y naproxeno.

De acuerdo con los resultados el 68 % de los aislados bacterianos tienen la capacidad de solubilizar fosfatos, Patiño (2010) indica que algunas bacterias son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta y favorecer su crecimiento o desarrollo por medio de la solubilización de fosfato inorgánico de

diferentes compuestos como son el fosfato bicálcico y fosfato tricálcico, durante el estudio las plantas se desarrollaron sin observarse efectos negativos, lo cual sugiere que los aislados bacterianos promueven el crecimiento de *Typha latifolia* expuestas a diclofenaco-naproxeno.

#### **4.5.4 Identificación de lacasas**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son los principales contaminantes distribuidos de manera uniforme en un entorno natural como el suelo, el aire o el medio ambiente acuático. Consisten en un anillo de benceno dispuesto de forma lineal, angular o en grupos (Li y col. 2011, Zeng y col. 2011). La mayoría de estos contaminantes y sus intermedios son peligrosos para los humanos y también cancerígenos para los seres vivos. Estos hidrocarburos aromáticos son de naturaleza xenobiótica debido a su baja solubilidad en agua y baja tasa de degradación (Ihssen y col. 2015).

Hasta la fecha, hay pocos informes disponibles que muestran la capacidad de las bacterias para degradar compuestos xenobióticos (Zeng y col. 2011; Menaka y col. 2015). Se presume que la enzima lacasa convierte los hidrocarburos aromáticos policíclicos en sus formas de quininas y, posteriormente, dióxido de carbono.

Las lacasas son enzimas del tipo oxidoreductasas, es una enzima versátil que tiene la capacidad de oxidar una amplia gama de compuestos fenólicos y no fenólicos al convertir una molécula de oxígeno en agua en la reducción concomitante de 4 electrones. Estos electrones libres catalizan la oxidación de diferentes compuestos aromáticos y no aromáticos, así como aminas fenólicas que contienen anillos sustituidos con varios grupos funcionales como metoxi, amino, diamino y algunos otros compuestos metálicos  $[\text{Mo}(\text{CN})_8]^{4-}$ ,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  y  $[\text{Os}(\text{CN})_6]$  (Chandra y Chowdhary 2015; Rezaei y col. 2017). Las lacasas son glucoproteínas ubicuamente encontradas, que van desde varios hongos hasta plantas superiores.

Para identificar si los aislados bacterianos producen lacasas, se realizó un ensayo propuesto por Yun y col. (2008), en el cual se prepararon cajas Petri con 15 mL de medio de agar de soya tríptica (TSA) modificado con 0.01 % de 2,6 dimetoxifenol (DMP), de acuerdo con el procedimiento descrito en la metodología.—Una vez realizadas las pruebas, la formación de un color ladrillo o marrón después de 3 días de incubación, alrededor de las colonias se consideró como prueba positiva indicando que ese microorganismo produce lacasa oxidante. La figura 32 muestra resultados de la identificación cualitativa de lacasas.

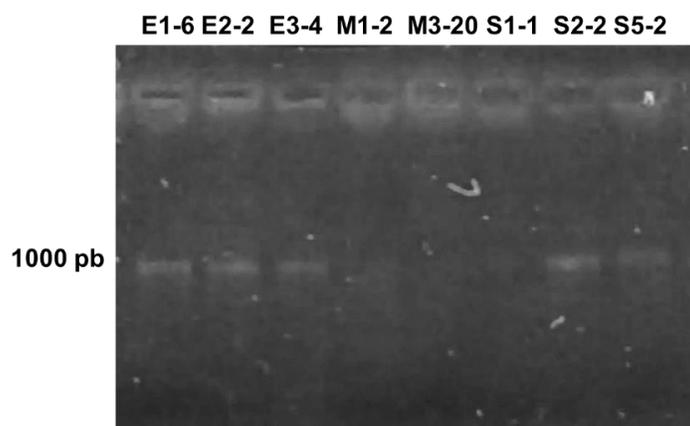


**Figura 32** Colonias bacterianas de color marrón, lo que indica que producen lacasa.

Como se mencionó anteriormente las lacasas han mostrado capacidad para degradar productos farmacéuticos, de las 208 colonias analizadas se observó que solo 80 presentan la capacidad de producir lacasas, lo que representa el 38 % del total; de ellas, las colonias bacterianas desarrolladas en la sección A muestran mayor capacidad. Probablemente esto sea porque estos aislados son quienes tienen el contacto inicial con la mezcla de diclofenaco y naproxeno.

#### 4.5 Caracterización molecular de los aislados bacterianos

Al identificar de manera morfológica las colonias bacterianas, se realizó la extracción de ADN de un aislado bacteriano de cada morfotipo, se realizó la amplificación de ADNr 16S con los oligonucleótidos 1755-1 F y 1776-1 R. La figura 33 muestra un gel de agarosa al 0.8 % con los productos de PCR obtenidos.



**Figura 33.** Amplificación por PCR del ADNr 16s en gel de agarosa (0.8 %) de los aislados bacterianos de raíz de *Typha latifolia*.

#### 4.6 Análisis filogenético de los aislados bacterianos

Los aislados bacterianos pudieron ser identificados molecularmente por secuenciación del ADNr 16S con el método de Sanger.

Todas las secuencias tuvieron una alta similitud (>90 %) con las secuencias más relacionadas reportadas en GenBank. La tabla 10 muestra los resultados con mayor similitud para cada aislado bacteriano.

**Tabla 10.** Identificación molecular de los aislados bacterianos.

Aislado bacteriano	Organismo	% de identidad	No. acceso
<b>E1-6</b>	<i>Pseudomonas putida</i> strain Z1	97.52	MT453802
<b>E2-2</b>	<i>Pseudomonas putida</i> strain A4	86.76	MT453803
<b>E5-2</b>	<i>Serratia</i> sp. strain BR13817	95.47	MT453804
<b>M1-2</b>	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> strain R3	98.08	MT453805
<b>M3-20</b>	<i>Pseudomonas</i> sp. G.W-CD.16	93.08	MT453806
<b>S2-2</b>	<i>Rahnella aquatilis</i> strain DGE5	97	MT453807
<b>S5-2</b>	<i>Pseudomonas hunanensis</i> strain yy061 1	95.61	MT453808

Como se observa en la tabla 10, de acuerdo con la base de datos con el GenBank, se logró obtener resultados de la secuenciación de 7 morfotipos bacterianos, los cuales tienen una similitud >90 % al género *Pseudomonas*. La tabla 11 resume los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a los aislados bacterianos.

De manera general las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* son conocidas por su habilidad para colonizar diferentes tipos de hábitats y por su excelente capacidad para adaptarse rápidamente a nuevos ambientes. Se ha observado que, en un ambiente espacialmente estructurado, la población de algunas *Pseudomonas* diverge rápidamente, dando lugar a la aparición de distintos morfotipos adaptados a cada nicho específico (Martínez, 2017).

Diferentes estudios que se han realizado sobre la expresión génica durante la colonización de la raíz de las plantas han revelado la existencia de un mecanismo muy importante que modula el metabolismo de la bacteria para adaptarse a las condiciones rizosféricas. Se ha observado un incremento en la expresión de genes relacionados con la adquisición de carbono y nitrógeno (aminoácidos, dipéptidos y poliaminas) y con el metabolismo de los azúcares y derivados. También se ha observado que durante el proceso de colonización de la raíz por *P. putida*, se inducen genes relacionados con la detoxificación de compuestos producidos por la planta en respuesta a la interacción con el microorganismo en cuestión u otros que se encuentren en el entorno rizosférico.

La variabilidad de microorganismos en los humedales se ve influenciada por diferentes factores, un factor importante que influye fuertemente en el proceso de degradación microbiana es la estructura química de los compuestos orgánicos (Dua y col., 2002; Reddy y De Laune, 2008). Los compuestos orgánicos con estructuras simples que poseen alta solubilidad en agua y baja adsorptividad, podrían ser fácilmente degradados por microorganismos. La degradación de contaminantes orgánicos en humedales construidos, también se ve influenciada por el sustrato, la vegetación y el oxígeno y potencial redox, temperatura, pH, nutrientes disponibles y presencia de sustancias tóxicas (Calheiros y col., 2009; Li y col., 2010; Reddy y De Laune, 2008).

Por lo anterior es importante conocer a que se debe la variación en la diversidad microbiana dependiendo del fármaco. La alimentación de contaminantes farmacéuticos a humedales artificiales puede afectar el desarrollo y las actividades de los microbios en humedales construidos. Un estudio realizado por Weber y col. (2011) donde se evaluó la influencia de ciprofloxacino sobre la distribución de las comunidades bacterianas en humedales construidos plantados con *P. australis*, mostraron que la presencia de ciprofloxacino provocaba un efecto adverso sobre las comunidades bacterianas en los humedales, lo que provocaba una reducción en la capacidad de asimilación antropogénica de compuestos a base de carbono. Sin embargo, después de una adaptación de 2-5 semanas, las comunidades bacterianas pueden volver a su funcionalidad normal.

Los resultados mostrados por Weber y col. (2011) son una pauta importante para la interpretación de la diversidad bacteriana por fármacos; Los aislados bacterianos obtenidos en este trabajo, en su mayoría, pertenecen al género de *Pseudomonas*.

**Tabla 11.** Pruebas bioquímicas de los aislados bacterianos.

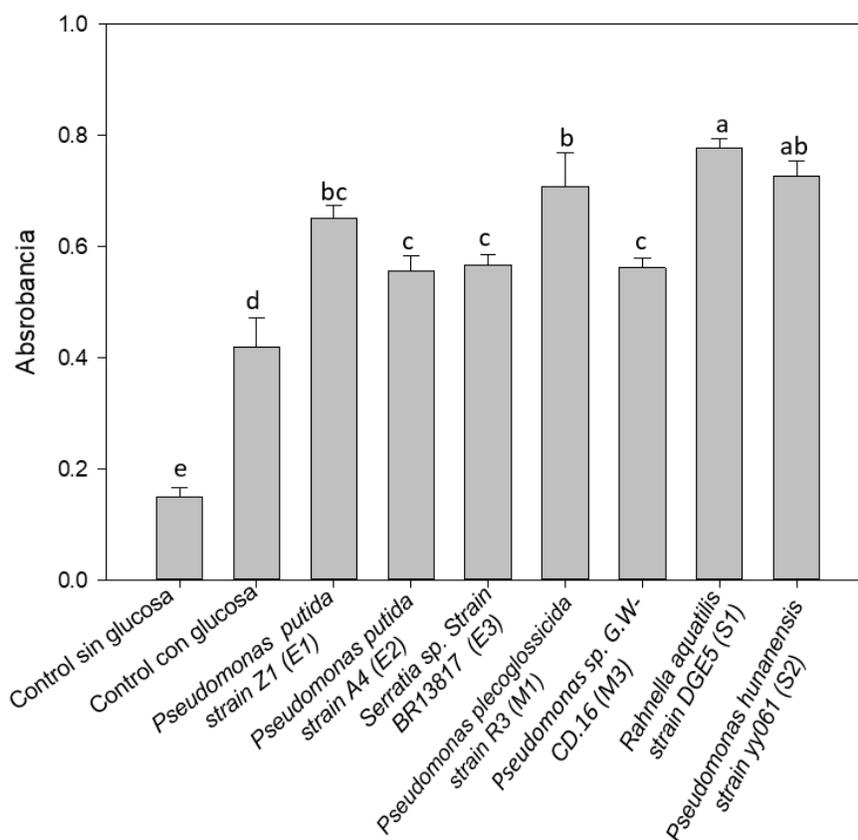
Identificación	Tinción de gram	Almidón	Pectina	Celulosa	NBRIP-fosfatos	Lacasas DMP	AIA
<i>Pseudomonas putida strain Z1</i>	BACILOS (-)	ND	ND	ND	(+)	(+)	10.344
<i>Pseudomonas putida strain A4</i>	BACILOS (-)	ND	ND	ND	(+)	(-)	17.409
<i>Serratia sp. strain BR13817</i>	BACILOS (-)	ND	ND	ND	(-)	(+)	2.518
<i>Pseudomonas plecoglossicida strain R3</i>	BACILOS (-)	ND	ND	ND	(+)	(+)	5.199
<i>Pseudomonas sp. G.W-CD.16</i>	BACILOS (-)	ND	ND	ND	(+)	(+)	18.786
<i>Rahnella aquatilis strain DGE5</i>	BACILOS (-)	ND	ND	ND	(+)	(+)	15.67
<i>Pseudomonas hunanensis strain yy061</i>	BACILOS (-)	ND	ND	ND	(+)	(-)	19.366

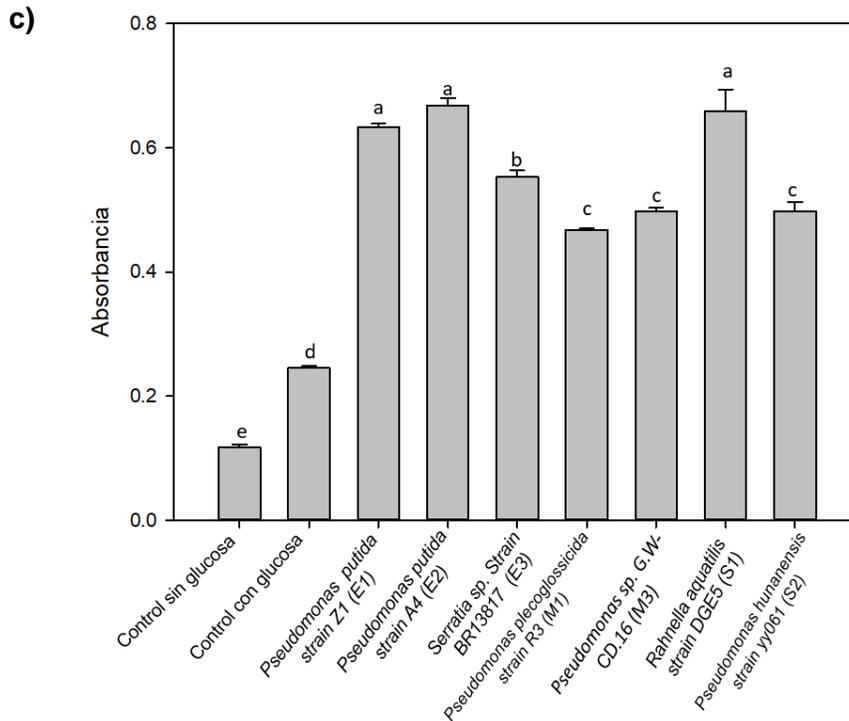
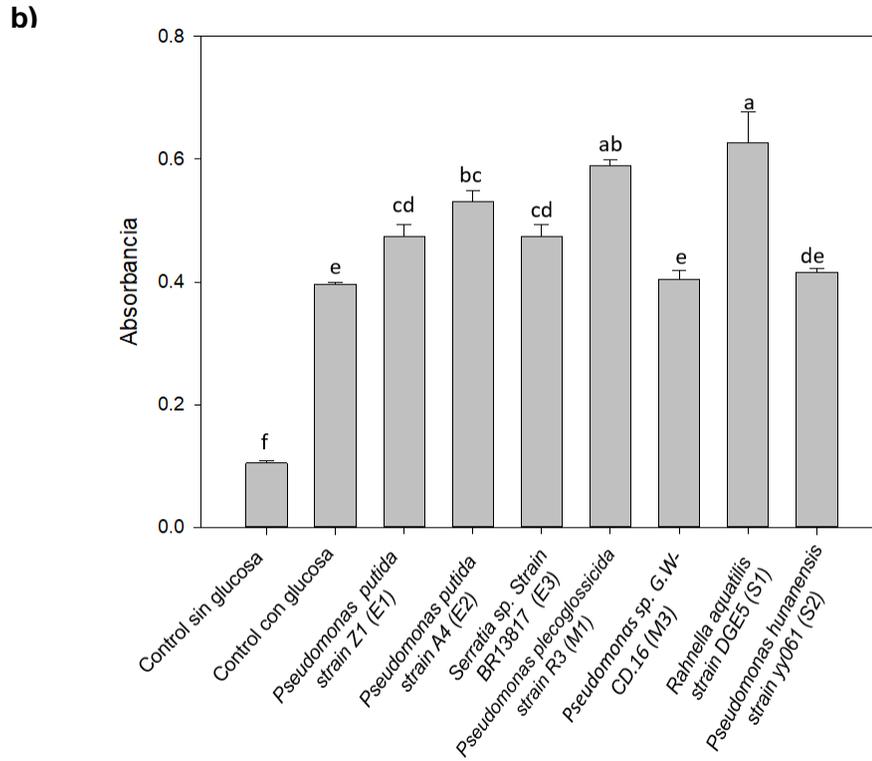
#### 4.7 Aislados bacterianos tolerantes a diferentes concentraciones de diclofenaco y naproxeno, pruebas de tolerancia a una mezcla de diclofenaco (3 mg/L) y naproxeno (5 mg/L)

Para las diferentes bacterias aisladas se determinó la tolerancia que presentaban a una mezcla de diclofenaco y naproxeno mediante ensayos para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Se realizaron las pruebas en medio M9 suplementado con los mezclas de fármacos en concentraciones de 30:50, 300:500 y 600:1000 mg/L de diclofenaco:naproxeno, respectivamente.

En la figura 34 se observa el comportamiento de los aislados bacterianos presentes en la raíz de *Typha latifolia*.

a)





**Figura 34.** Concentración mínima inhibitoria de las cepas de la raíz de *Typha latifolia.*, en una mezcla de diclofenaco con naproxeno. a) Prueba de tolerancia para de los aislados bacterianos en una mezcla de 30:50 mg/L de diclofenaco: naproxeno

b) Aislados bacterianos desarrollados en una mezcla de 300:500 mg/L diclofenaco: naproxeno c) Prueba de aislados bacterianos en una mezcla de 600:1000 mg/L de diclofenaco: naproxeno.

El objetivo de esta prueba fue para observar si al aumento de la concentración de fármaco, los microorganismos disminuían su crecimiento o este se inhibe. El control utilizado fue GRC-065 un aislado bacteriano que pertenece al genero de *Pseudomonas* y que se ha reportado con capacidad para desarrollarse en presencia de contaminantes como metales pesados, la fuente de carbono para este aislado fue glucosa y dentro de la prueba se buscaba observar si los microorganismos aislados muestran un mayor crecimiento en presencia de los compuestos farmacéuticos a comparación de un asilado desarrollado con una fuente de carbono diferente.

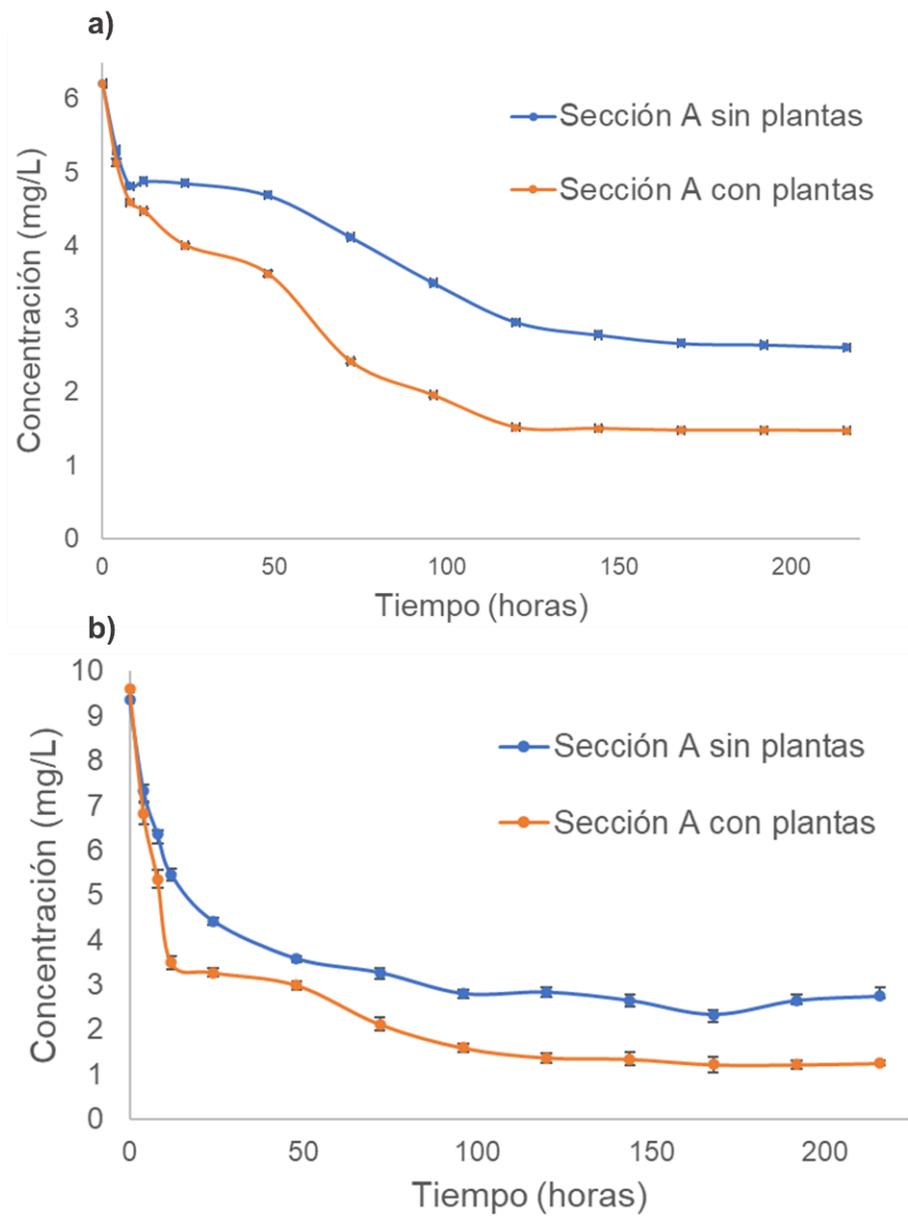
De acuerdo con los resultados, se observa que los 7 aislados desarrollaron mayor crecimiento en las 3 pruebas, a comparación de GRC-065 que se desarrollaba con glucosa. De los aislados bacterianos se observa que no se inhibe su crecimiento aún en concentraciones de 600:1000 mg/L de diclofenaco y naproxeno, es importante resaltar que *Rahnella aquatilis* presento el mayor crecimiento en las 3 pruebas, este aislado bacteriano ha sido estudiado recientemente para evaluar la remoción de productos farmacéuticos en el ambiente, debido a que se ha aislado como una bacteria acuática nativa (Huys y col., 2000), en un estudio realizado por Idroosa y col.,2015, *Rahnella aquatilis* mostro una alta capacidad para desarrollarse en un medio con concentraciones de 200, 250 y 300 mg/L de ampicilina, y mostró una eliminación completa del antibiótico dentro de los 8 días de experimentación. Estos resultados muestran la capacidad de *R. aquatilis* para remover productos farmacéuticos.

#### **4.8 Evaluación de la eficiencia de remoción de diclofenaco y naproxeno por consorcios bacterianos y *Typha latifolia* en condiciones de esterilidad**

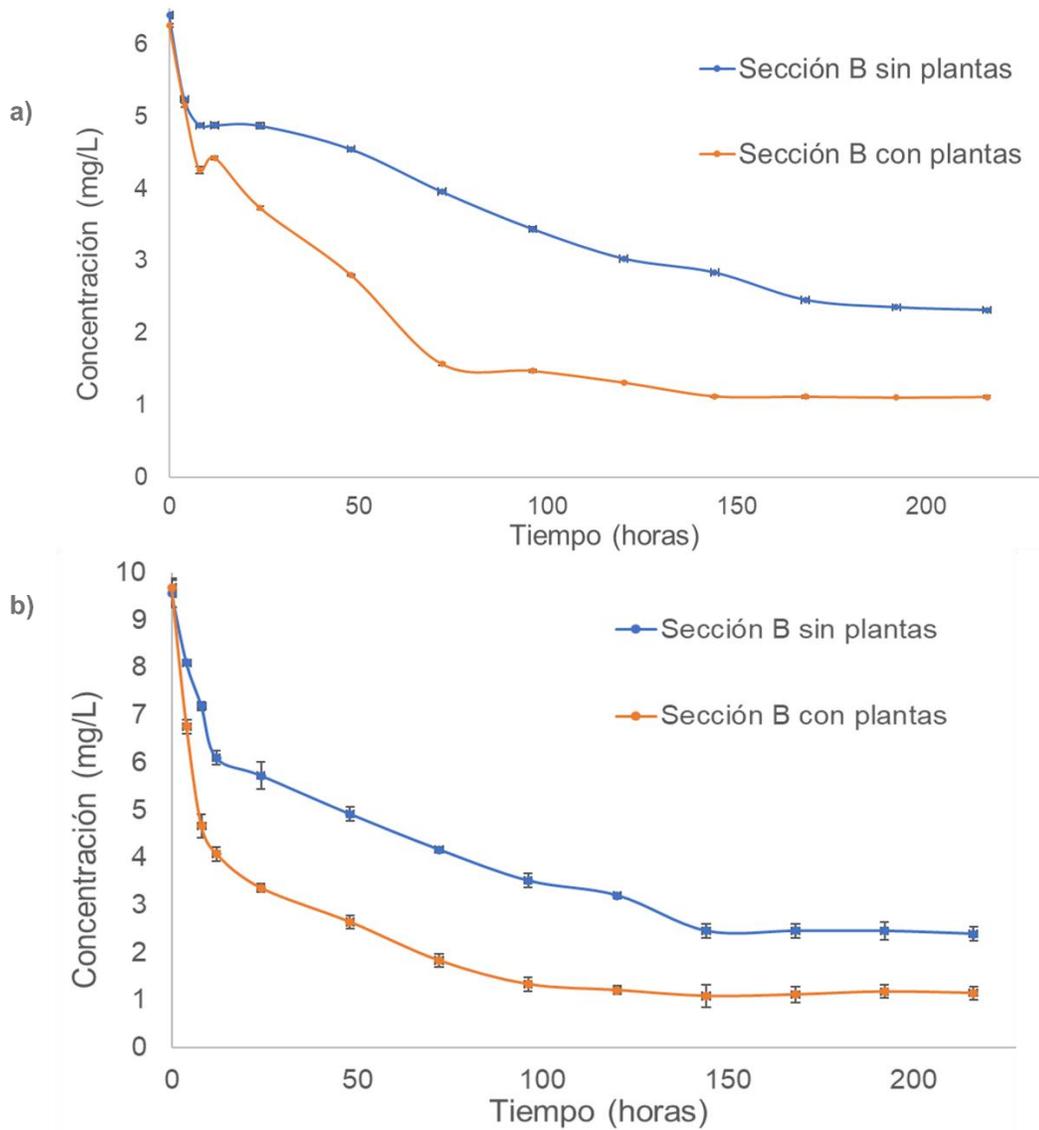
Se realizó la evaluación de la eficiencia de remoción de la mezcla de diclofenaco y naproxeno cuando las plantas se encuentran en condiciones estériles y se le añaden los aislados bacterianos con tolerancia a los fármacos.

Las pruebas se realizaron en soluciones sintéticas que contenían solución nutritiva, suplementadas con diclofenaco (6 mg/L) y naproxeno (10 mg/L) hasta un volumen de 200 mL aforado con agua desionizada estéril, 3 plantas y el consorcio bacteriano.

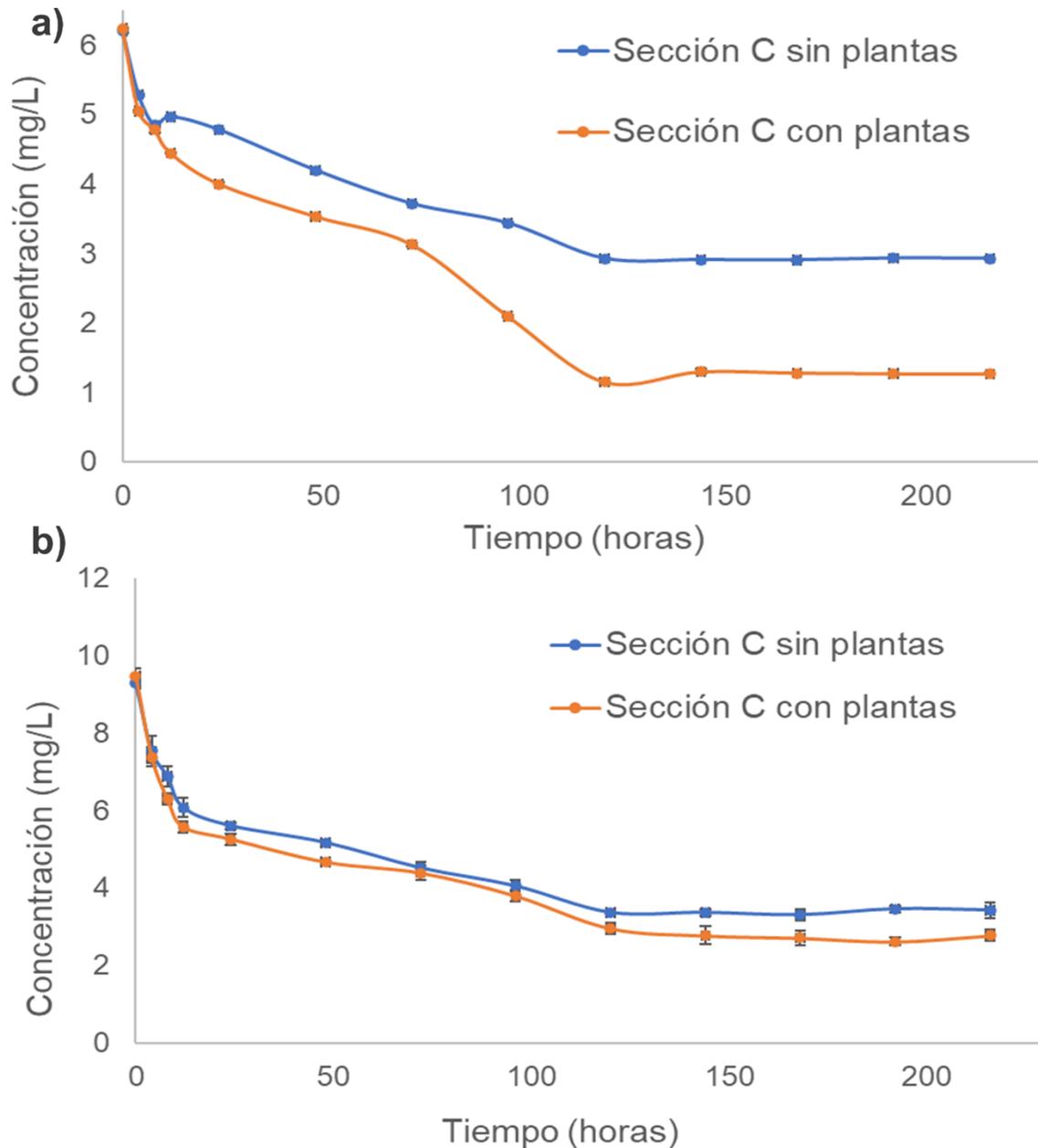
Las figuras 35, 36, 37 muestran la variación de diclofenaco y naproxeno de acuerdo con cada sección de los consorcios y comparando la eficiencia con un control en el cual no se agregaron aislados bacterianos.



**Figura 35** Variación de la concentración de diclofenaco (a) y naproxeno (b) con los aislados bacterianos de la sección A.



**Figura 36.** Variación de la concentración de diclofenaco (a) y naproxeno (b), con los aislados bacterianos de la sección B.



**Figura 37.** Variación de la concentración de diclofenaco (a) y naproxeno (b), con los aislados bacterianos de la sección C.

Las figuras 35 a 37 muestran la variación de diclofenaco y naproxeno en donde se puede observar cómo aumenta la eficiencia de remoción en los sistemas en los cuales se tiene planta con consorcio bacteriano, para la figura 37 se obtuvo una eficiencia de remoción del 58 % para diclofenaco cuando solo están los fármacos y plantas y del 76 % cuando en el sistema se encuentran las plantas y el consorcio bacteriano, para naproxeno la eficiencia de remoción cuando solo se encuentran las plantas esta fue

70 % y cuando se encuentra también el consorcio bacteriano la eficiencia de remoción es del 87 %, para la experimentación con el consorcio bacteriano de la sección B, la eficiencia de remoción de diclofenaco fue de 63 % sin bacterias y del 82 % cuando hay aislados bacterianos, en el caso de naproxeno las eficiencia de remoción cuando no se encuentran los aislados bacterianos fue del 74 % y en presencia de aislados fue de 88 %.

Para la sección C, las eficiencias de remoción para diclofenaco y naproxeno cuando solo están las plantas son del 52 % y 63 % respectivamente, pero cuando se encuentra el sistema planta-consorcio bacteriano las eficiencias son 79 % para diclofenaco y 70 % para naproxeno.

#### **4.9 Identificación de productos de degradación**

Conocer la capacidad de los sistemas de humedales para remover productos farmacéuticos es de gran interés para los investigadores, sin embargo, actualmente los estudios tratan de identificar no solamente el porcentaje de remoción, sino también los productos de degradación que forman durante la experimentación. En este trabajo, algunas muestras fueron seleccionadas para identificar la presencia de productos de degradación, lo cual se describe en los siguientes apartados.

##### **4.9.1 Identificación de diclofenaco, naproxeno y productos de degradación por cromatografía de capa fina**

La cromatografía en capa fina (TLC) es la técnica de separación e identificación de sustancias químicas mediante un disolvente que se mueve sobre un soporte sólido adsorbente; el uso de esta técnica nos permite conocer la relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa el cual se conoce como  $R_f$ , y tiene un valor constante para cada compuesto en condiciones cromatográficas determinadas. Esta técnica se utilizó para identificar de forma preliminar diclofenaco y naproxeno. Se realizó una prueba control en la cual los fármacos se diluían en etanol y posteriormente se realizaba la TLC y una prueba con dos extractos que se obtuvieron a partir de medio de cultivo M9 suplementado con los fármacos y un aislado bacteriano.

El procedimiento para el análisis por cromatografía en capa fina se describió en la sección 4.8. El valor de  $R_f$  para diclofenaco fue de 0.73, para naproxeno de 0.63 y para la mezcla de 0.5. La figura 36 muestra los resultados para la prueba de identificación de los fármacos y su mezcla.



correspondieron a 12 muestras del humedal construido y las restantes son muestras de los extractos de aislados bacterianos en medio mínimo M9 con diclofenaco, naproxeno y/o la mezcla.

El análisis de las muestras se realizó en la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología- Espectroscopia de masas por sus siglas en ingles NIST-MS.

La tabla 12 muestra el resultado de los compuestos identificados en las muestras de humedales y la tabla 13 muestra los compuestos identificados en los extractos de aislados bacterianos.

**Tabla 10.** Identificación de diclofenaco y naproxeno en muestras de agua de los humedales por Cromatografía de Gases Masas con detector de Espectroscopía de Masas

Muestras	Compuesto	Tiempo de Retención (TR, min)	Área
<i>Humedal Control sección A</i>	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.556	13056808
<i>Humedal Control sección B</i>	Ácido hexadecanoico, éster metílico	35.431	9842312
	Ácido octadecanoico, éster metílico	37.527	18190482
	d-Glucosa, 4-O-[6-desoxi-2,3,4-tris-O-(trimetilsilil)- $\alpha$ -l-manopiranosil]-2,3,5,6-tetrakis-O-(trimetilsilil	36.521	1274465
<i>Humedal Control sección C</i>	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.554	2929393
	Ácido 1,3-bencenodicarboxílico, éster bis(2-etilhexílico)	42.944	8014319
	Naproxeno + bstfa	37.151	119712352

<i>Humedal mezcla sección A</i>	Naproxeno + bstfa	37.124	52052360
	Diclofenaco, trimetilsilil éster	39.203	8638572
	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.549	3389926
	Ácido tetradecanoico, éster trimetilsilílico	34.621	9005924
<i>Humedal Mezcla sección B</i>	Naproxeno + bstfa	37.118	25755656
	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.551	4173718
	Ácido tetradecanoico, éster trimetilsilílico	34.621	6677609
	Ácido hexadecanoico, éster trimetilsilílico	36.806	6084547
	Diclofenaco, trimetilsilil éster	39.199	7031813
	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.557	3870615
	1-[2-(1-hidroxiisopropiloxi) etil] Naftaleno	39.737	1514222
<i>Humedal mezcla sección C</i>	D-galactosa, 2,3,4,5,6-pentakis- O-(trimetilsilil)-, o-metiloxima, (1Z)-	36.359	23774934

\* N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida (bstfa)

**Tabla 11.** Identificación de diclofenaco y naproxeno de extractos de medio mínimo M9 con aislados bacterianos individuales, con plantas y consorcio por Cromatografía de Gases Masas con detector de Espectroscopía de Masas

Muestras	Compuesto	Tiempo de Retención (TR, min)	Área
<i>Consortio bacteriano con Plantas Dic-Nap</i>	Ácido 1-naftaleno acético, éster trimetilsilico	33.561	12963050
	Naproxeno + bstfa	37.115	18309680
<i>Consortio Planta Dic-Nap</i>	Ácido 1-naftaleno acético, éster trimetilsilico	33.556	13321489
	Naproxeno + bstfa	37.117	11724629
<i>Control Dic-Nap Planta S/cultivo</i>	Naproxeno + bstfa	37.127	58625408
	Diclofenaco, éster trimetilsilico	39.207	6877963
	Diclofenaco, trimetilsilil éster	39.208	4749960
<i>Control Dic-Nap s/Cultivo s/planta</i>	4,4-Dimethyl-N-(2-feniletil)androst-2-en-17-amina	38.523	10805422
	Ácido 1-naftaleno acético, éster trimetilsilílico	33.551	12745579
<i>Pseudomonas plecoglossicida strain R3 S/Plantas Dic-Nap</i>	Naproxeno + bstfa	37.119	55581584
	Diclofenaco, trimetilsilil éster	39.202	2362519
<i>Control Dic s/cultivo</i>	Diclofenaco, trimetilsilil éster	39.204	20693594
	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.55	7600153
<i>Pseudomonas hunanensis strain yy061 Plantas Dic-Nap</i>	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.565	25375706

	Naproxeno + bstfa	37.147	106792640
<i>Pseudomonas putida strain A4/Plantas Dic-Nap</i>	1H-Ciclopenta[b]quinoxalin-1-ona, 2,3-dihidroxi-6,7-dimetilo	33.146	1064113
	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.552	4318245
	Naproxeno + bstfa	37.121	32544440
<i>Pseudomonas hunanensis strain yy061 Nap</i>	Naproxeno + bstfa	37.117	25366436
<i>Rahnella aquatilis strain DGE5 Dic-Nap Plantas</i>	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.55	6600247
	Naproxeno + bstfa	37.114	41328488
<i>Pseudomonas putida strain Z1 S/Plantas Dic-Nap</i>	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.559	17123862
	Naproxeno + bstfa	37.143	123040400
	5H-1-Benzazepin-5-ona, 1,2,3,4-tetrahidro-1-[(4-metilfenil)sulfonilo]-	38.5225	9754106
	Diclofenaco, trimetilsilil éster	39.193	3268509
<i>Pseudomonas putida strain Z1 Nap</i>	Naproxeno + bstfa	37.152	11039319
<i>Control Dic-Naps/Cultivos/planta</i>	Naproxeno + bstfa	37.141	89185800
	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.568	24091602
	Diclofenaco, éster metílico	38.427	9406575

	Diclofenaco, trimetilsilil éster	39.213	14086271
<i>Control S/fármaco s/cultivo</i>	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.55	
<i>Pseudomonas sp. G.W-CD.16 Plantas Dic/Nap</i>	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.56	16853262
	Naproxeno + bstfa	37.154	173112512
	4,4-Dimethyl-N-(2-phenylethyl)androst-2-en-17-amine	38.529	10623871
<i>Pseudomonas putida strain A4 Plantas Dic-Nap</i>	Naproxeno + bstfa	37.13	61535352
	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.546	2831508
	Diclofenaco, trimetilsilil éster	39.198	1937268
<i>Control Plantas s/cultivo s/fármaco</i>	Dulcitol, hexakis(trimetilsilil) éter	36.3665	26427380
	Ácido hexadecanoico, éster trimetilsilílico	36.837	154384080
	Ácido octadecanoico, éster trimetilsilílico	38.688	70950848
<i>Control s/dic-nap Plantas</i>	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.547	8982464
	Ácido tetradecanoico, éster trimetilsilílico	34.628	27460202
	d-galactosa, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-, o-metiloxima, (1Z)-	36.355	10643324

	Ácido hexadecanoico, éster trimetilsilílico	36.814	72082344
	Ácido octadecanoico, éster trimetilsilílico	38.69	127680208
<i>Rahnella aquatilis strain DGE5 Dic-Naps/plantas</i>	Naproxeno + bstfa	37.155	99396848
	Ácido octadecanoico, éster trimetilsilílico	38.692	63444248
	Ácido hexadecanoico, éster trimetilsilílico	36.842	85346816
	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.571	5527395
<i>Rahnella aquatilis strain DGE5 Dic-Nap</i>	Diclofenaco, trimetilsilil éster	39.197	6868869
	Naproxeno + bstfa	37.121	40415984
	d-galactosa, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-, o-metiloxima, (1Z)-	36.348	10320414
<i>Pseudomonas putida strain Z1 Dic</i>	Silanol, trimetil-, fosfato (3:1)	24.526	380456576
	Ácido hexadecanoico, éster 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi]propílico	41.604	6773539
	Ácido tetradecanoico, éster trimetilsilílico	36.807	
	Naproxeno + bstfa	37.131	47934036
	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.546	4753239
	Diclofenaco, éster metílico	38.418	4907423

<i>Serratia sp. strain BR13817 Plantas Dic-Nap</i>	Ácido hexadecanoico, éster 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi]propílico	41.594	4635756
<i>Contro Dic-Nap s/cultivo</i>	Ácido tetradecanoico, éster trimetilsilílico	34.626	10965082
	Ácido hexadecanoico, éster 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi]propílico	41.617	32305196
	Ácido octadecanoico, éster 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi]propílico	43.377	6112928
<i>Pseudomonas putida strain Z1 Dic Nap</i>	Naproxeno + bstfa	37.112	17374674
	Ácido octadecanoico, éster trimetilsilílico	38.674	16410814
<i>Control Nap M9</i>	Naproxeno + bstfa	37.126	36178480
	1-Naphthaleneacetic acid, trimethylsilyl ester	33.57	20599854
	Ácido octadecanoico, éster trimetilsilílico	34.62	5697295
<i>Pseudomonas hunanensis strain yy061 Dic-Nap s/Plantas</i>	Ácido hexadecanoico, éster 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi]propílico	41.598	2983173
<i>Pseudomonas plecoglossicida strain R3 Plantas Dic-Nap</i>	Naproxeno + bstfa	37.103	10458680
	Ácido tridecanoico, éster metílico	37.52	1467601
	Ácido octadecanoico, éster trimetilsilílico	38.664	7405951

<i>Pseudomonas hunanensis strain yy061 Dic</i>	2-(4-metoxifenil)-2-(4-trimetoxisililoxi)propano	24.561	666861952
	Ácido 1-naftalenoacético, éster trimetilsilílico	33.611	14350290
	Ácido hexadecanoico, éster 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi]propílico	41.614	46290048

Los resultados de las tablas 12 y 13 muestran la identificación cualitativa de las muestras analizadas por GC-MS, durante el desarrollo del trabajo no fue posible realizar una curva de calibración que nos permitiera identificar cuantitativamente los resultados. Sin embargo, de los resultados se obtuvieron cromatogramas que nos permiten visualizar la presencia de los fármacos, así como realizar una comparación de diclofenaco y naproxeno iniciales y después del tratamiento.

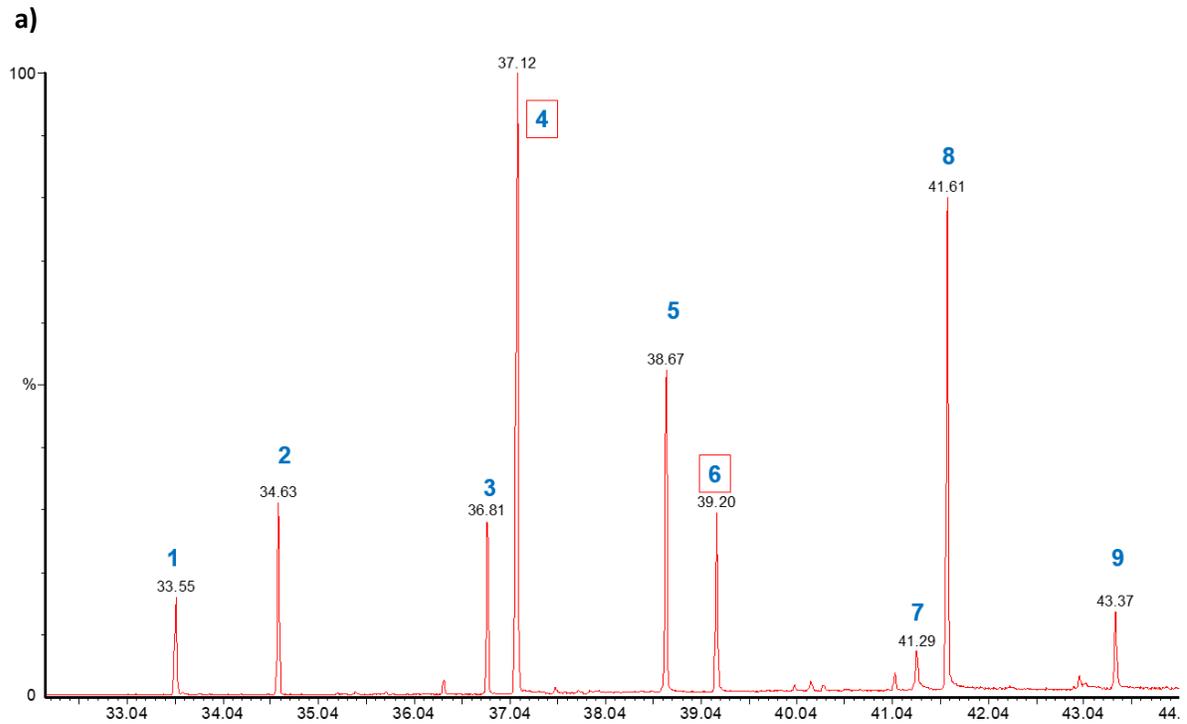
La figura 40 muestra dos cromatogramas, donde se observa el tiempo de retención y porcentaje de abundancia de cada compuesto. La figura 40(a) muestra que el diclofenaco tiene un porcentaje de abundancia relativa del 30 % y un tiempo de retención de 39.30 min, al comparar el porcentaje de abundancia con la figura 40 (b), se evidencia que la presencia del fármaco ha disminuido ya que esta abundancia es del 10 %. En el caso del naproxeno, en la figura 40 (a) se observa un porcentaje de abundancia de 90 % y un tiempo de retención de 37.12 min y en la figura 40 (b) su abundancia es de 30 %, así mismo podemos observar los diferentes compuestos que se identificaron los cuales son: 1. Ácido naftalenacético, 2. Ácido tetradecanoico, 3. D-galactosa, 2,3,4,5,6-pentakis, 4. Ácido palmítico, 5. Naproxeno, 6. Ácido octadecanoico, 7. Diclofenaco, éster metílico, 8. Ácido hexadecanoico, 9. Ácido octadecanoico

Diferentes estudios han indicado que identificar los productos de degradación de los fármacos es complicado debido a situaciones como la baja concentración que los hace indetectables y la falta de estándares para su cuantificación (Verlicchi y Zambello, 2014). En nuestros resultados se identificó solamente diclofenaco y naproxeno, así como ácidos grasos.

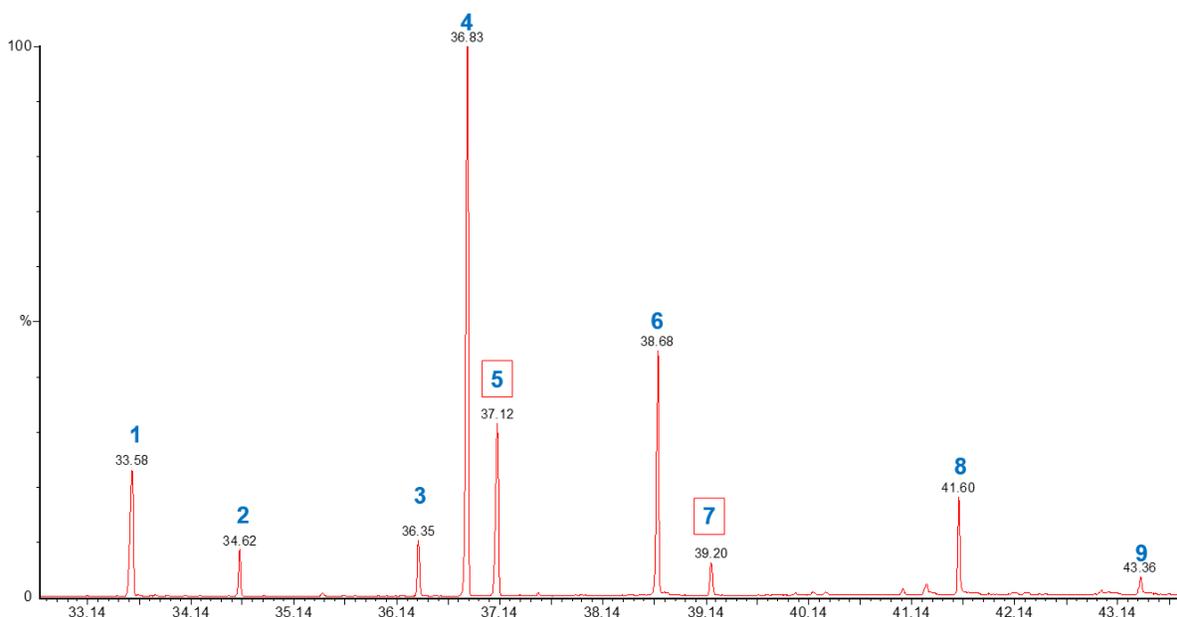
La identificación de ácidos grasos puede asociarse como biomarcadores de la biomasa microbiana, Kato y col. 2005 son biomarcadores de la biomasa microbiana viable y la estructura de las comunidades microbianas in situ que pueden reflejar la condición real de la comunidad microbiana. En un estudio realizado por Yan y col., 2018, evaluaron

la eficiencia de remoción en humedales construidos plantados con *Cyperus alternifolius* y sin plantar, y la diversidad microbiana, así como la identificación de ácidos grasos, debido a que se ha demostrado que son un buen indicador de microorganismos vivos.

Dentro de los resultados indicaron que la presencia de plantas fue beneficiosa para aumentar los ácidos grasos a diferencia de las no plantas, lo cual indicaba una mayor diversidad microbiana.



b)



**Figura 40** Cromatogramas a) Muestra del punto A, b) Muestra del punto C

#### **4.10 Predicción de las interacciones químicas entre diclofenaco, naproxeno y celulosa como componente mayor de las plantas mediante modelamiento químico computacional**

De acuerdo con el procedimiento que se indicó en Metodología, se diseñaron moléculas de diclofenaco, naproxeno y celulosa utilizando el software Gaussview3. La celulosa se modeló mediante tres unidades de  $\beta$ -glucosa en una primera simulación. En una segunda simulación se utilizó una estructura cristalina propuesta por Gomes, (2012). Todas las moléculas se optimizaron a un nivel teórico semi-empírico con el método PM6 con base a las capacidades de cómputo a las que la Facultad de Ciencias Químicas puede acceder.

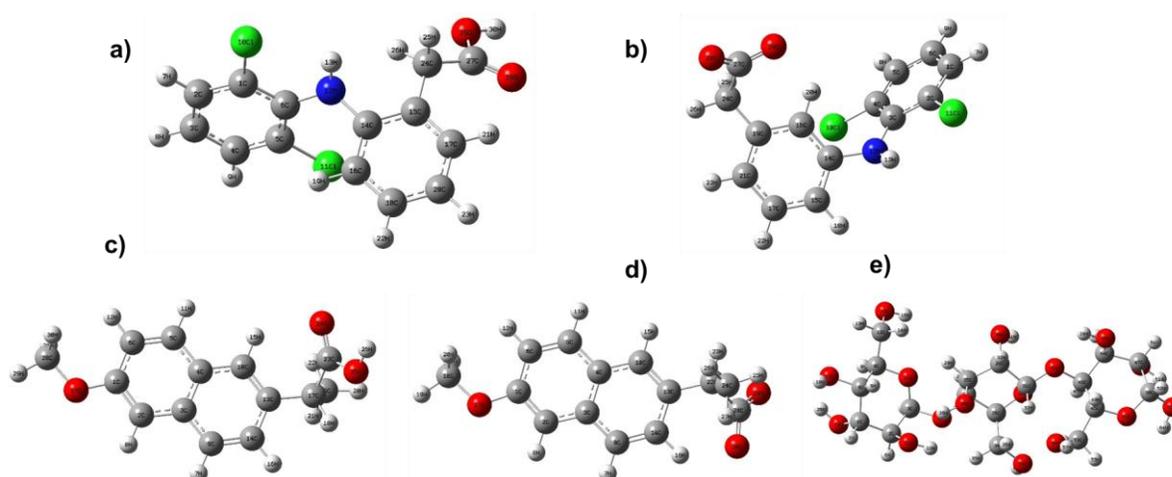
Además, se optimizaron los aniones correspondientes a diclofenaco y a naproxeno. Este último tiene un grupo de ácido carboxílico que se desprotona a un pH ambientalmente relevante (5-8), de esta forma el naproxeno se presenta en el ambiente principalmente en forma aniónica lo cual también explicaría la forma en que interacciona químicamente con otras sustancias en ambientes acuáticos y edáficos (Liu et al.2019). Por su parte, el diclofenaco se puede encontrar en el ambiente en su forma aniónica o como derivados hidroxilados (Lonappan et al. 2016) debido a sus características fisicoquímicas; por ello en este trabajo también se modeló a la sustancia en sus formas aniónicas.

La raíz de las plantas está constituida principalmente de compuestos celulósicos (holocelulosa y  $\alpha$ -celulosa) lignina y extractos (Fernández-Villareal et al., 2022). En un esfuerzo por entender cómo sería la interacción química entre los fármacos y la raíz, se trabajó con la celulosa optimizada para comprender sus posibles interacciones con diclofenaco y naproxeno. La pared celular de la planta está compuesta casi en su totalidad por polímeros que no contienen nitrógeno, incluidas la celulosa y la lignina como se indica previamente. En las paredes celulares de las plantas superiores, las fibras de tracción están hechas de polisacárido celulosa, la macromolécula orgánica más abundante en la tierra, unida fuertemente en una red por reticulación de glicanos (Alberts et al. 2002). Se analizaron las interacciones de diclofenaco con naproxeno, diclofenaco con celulosa, naproxeno con celulosa y/o diclofenaco, naproxeno y celulosa utilizando las energías obtenidas.

#### 4.10.1 Optimización de las formas molecular y aniónicas para diclofenaco y naproxeno

La optimización de la geometría de las moléculas es el paso fundamental para modelar una estructura química, su objetivo es ubicar un mínimo de energía en la superficie de energía potencial de la estructura química y así lograr la conformación más estable en el estado fundamental. El cálculo de optimización de la geometría de las estructuras se realizó con el programa de química computacional Gaussian 09 y su interfaz gráfica Gauss View 5.0.

La figura 39 muestra las estructuras optimizadas de diclofenaco, naproxeno (neutro y aniónico) y celulosa, así como la tabla 14 muestra las energías obtenidas para cada molécula optimizada.



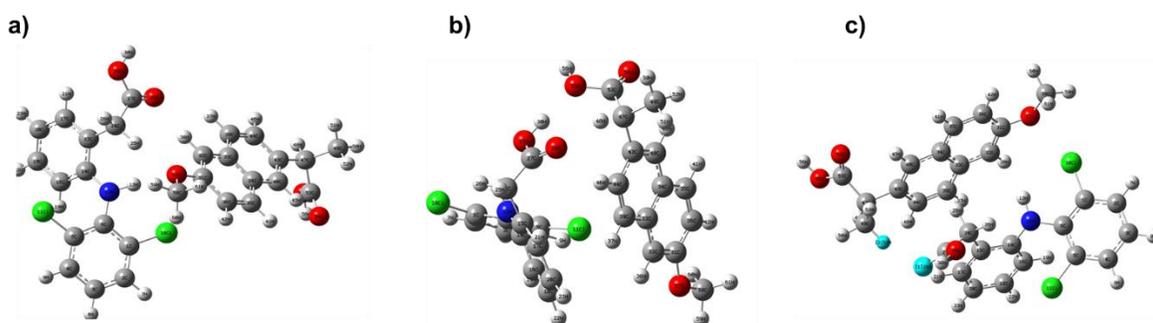
**Figura 41.** Geometrías optimizadas a) molécula neutra de diclofenaco, b) anión de diclofenaco, c) molécula neutra de naproxeno, d) anión de naproxeno, y, e) celulosa.

**Tabla 12.** Energías de optimización de diclofenaco, naproxeno y celulosa.

Molécula	Energía (Kcal/mol)
<b>Diclofenaco</b>	-59.963
Anión Diclofenaco	-99.568
<b>Naproxeno</b>	-101.471
Anión Naproxeno	-136.812

#### 4.10.2 Interacciones entre las moléculas neutras de diclofenaco y naproxeno

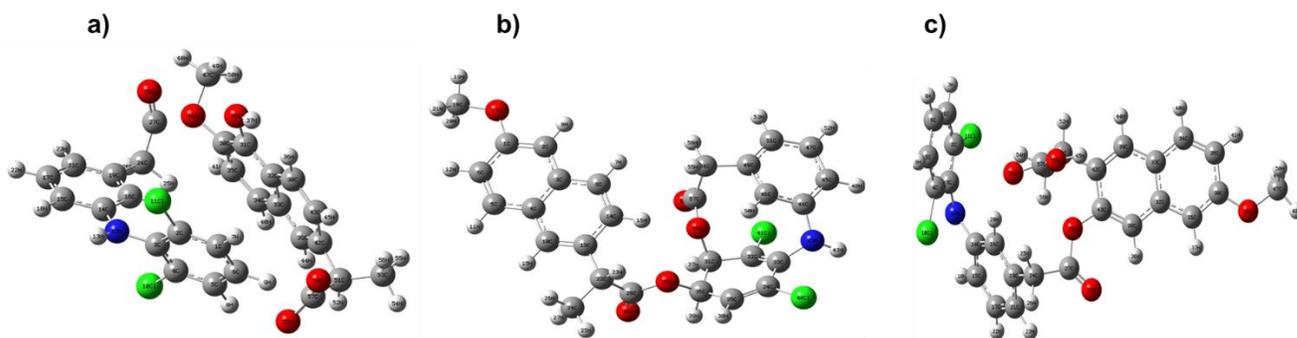
Posterior a la optimización de las moléculas se procedió a las pruebas de interacción entre las moléculas optimizadas, se inició creando archivos nuevos en GaussView, en los cuales se colocaba la molécula de diclofenaco y naproxeno neutros lo más cercanas posibles, y se optimizaban para conocer la energía de interacción que pudiese existir entre ellas. La figura 40 muestra las interacciones posibles entre ellas, y la tabla 15 se indican las energías de interacción.



**Figura 42.** Interacciones de diclofenaco y naproxeno con carga neutra, a) 1er. Interacción de diclofenaco y naproxeno con cargas neutras, b) 2do. Interacción de diclofenaco y naproxeno cargas neutras, c) 3er. Interacción de diclofenaco con naproxeno cargas neutras.

#### 4.10.3 Interacciones entre las formas aniónicas de diclofenaco y naproxeno

Posterior a encontrar las interacciones de diclofenaco y naproxeno cuando tienen cargas neutras, se realizó la misma metodología comentada anteriormente, pero con las moléculas aniónicas. En la figura 43 se observan las 3 posibles interacciones de diclofenaco y naproxeno aniónicos.



**Figura 43.** Interacciones entre diclofenaco y naproxeno con carga aniónica a) primera interacción, b) segunda interacción, c) Tercera interacción.

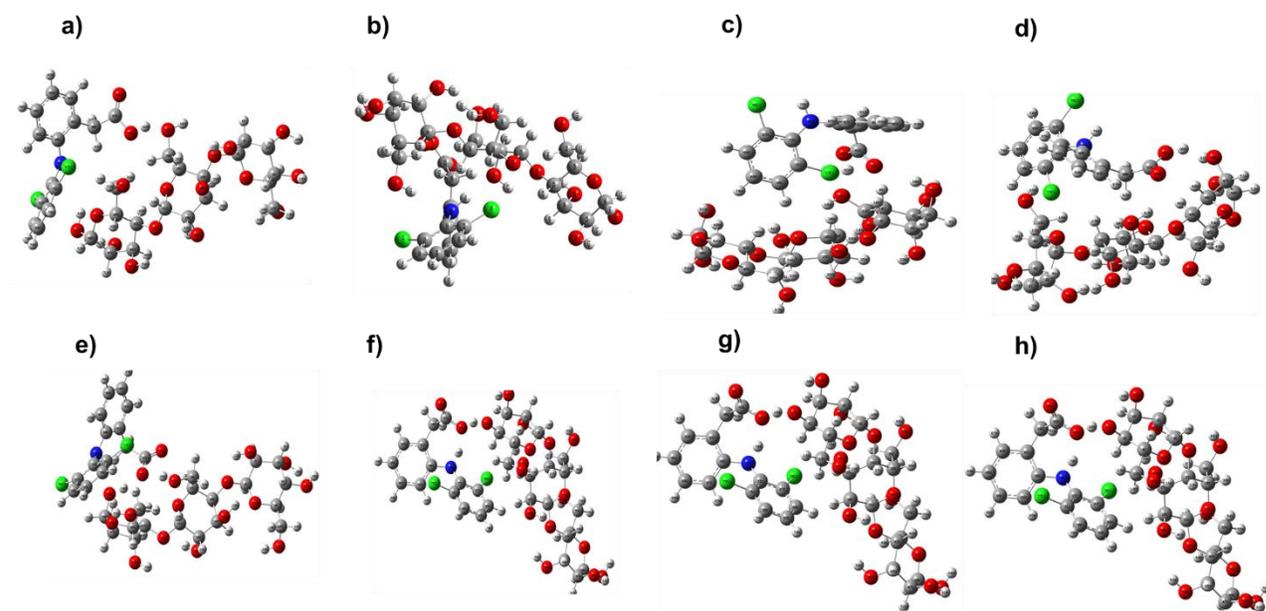
Las interacciones entre el diclofenaco neutro y el naproxeno (a) y en las formas aniónicas (b) se muestran en la figura 43. En ambos casos, el naproxeno se une al diclofenaco; además, se observan puentes de hidrógeno entre los grupos carboxílicos del diclofenaco neutro y el naproxeno (a). Las energías de interacción, tabla 15 indican que la interacción entre productos farmacéuticos neutros es más fuerte que la interacción entre productos farmacéuticos aniónicos.

Este resultado sugiere que cuando se mezclan naproxeno y diclofenaco en el humedal, forman una molécula más compleja que dificultaría los procesos de adsorción/absorción que realizan las plantas. Esto podría explicar las menores eficiencias de remoción en el humedal artificial con *T. latifolia* expuesto a una mezcla de diclofenaco y naproxeno en comparación con las determinadas previamente usando soluciones individuales de diclofenaco o naproxeno (Zapata y col. 2020).

#### 4.10.4 Interacciones entre diclofenaco tanto en su forma molecular como aniónica con celulosa

Para conocer si dentro del sistema de humedales diclofenaco interacciona químicamente con algún compuesto de las plantas, se selecciona la celulosa ya que es uno de los componentes principales de las raíces de plantas, para las interacciones se crearon archivos de trabajo en los cuales se tenía como molécula principal la

celulosa y posteriormente se dibujaba diclofenaco neutro o con carga aniónica, seguido de esto se optimizaban las moléculas juntas para conocer su energía de interacción la cual fuese más estable, en a figura 44 se observan las interacciones entre diclofenaco y celulosa.



**Figura 44.** Interacciones posibles entre celulosa con a) diclofenaco molecular neutro, b) diclofenaco molecular aniónico, c) tercera interacción diclofenaco neutro, d) Cuarta interacción diclofenaco neutro y celulosa, e) 1era. Interacción diclofenaco carga aniónica y celulosa, f) 2da interacción diclofenaco anión y celulosa, g) 3era interacción diclofenaco anión y celulosa, h) 4ta interacción diclofenaco anión y celulosa.

En la figura 44 se muestran las interacciones optimizadas de la celulosa con naproxeno neutro/aniónico o diclofenaco neutro/aniónico.

Para todos los sistemas, la interacción observada entre la celulosa y el diclofenaco o el naproxeno se produjo mediante puentes de hidrógeno. La distancia interatómica entre los átomos que forman los puentes de hidrógeno también se muestra en la tabla 15. Para un puente de hidrógeno X----H-B, donde X es el aceptor del puente de hidrógeno y B es el donante del puente de hidrógeno, el X----H es un indicador de la fuerza del enlace de hidrógeno. Según Buemi y Zuccarello, las interacciones de los enlaces de hidrógeno pueden ser débiles (superiores a 2.2 Å), moderadas (1.5-2.2 Å) y fuertes (1.2-1.5 Å).

En el sistema neutro diclofenaco-celulosa (figura 44 a) se observan dos enlaces de hidrógeno de fuerza moderada, H95-O63 y O93-H29, el primero se forma entre el hidrógeno del grupo COOH del diclofenaco y el oxígeno de la celulosa con una distancia interatómica de 1.7175 Å; el segundo se forma entre el oxígeno del grupo COOH del diclofenaco y el hidrógeno de la celulosa con una distancia interatómica de 2.1875 Å.

Para la molécula neutra de naproxeno-celulosa (figura 44 c), el hidrógeno del grupo COOH del naproxeno interactúa con el oxígeno de la celulosa formando un puente de hidrógeno de fuerza moderada, con una distancia interatómica H92-O5 de 1.73489 Å. En el sistema aniónico diclofenaco-celulosa (figura 41 b) se observan dos puentes de hidrógeno de fuerza moderada, O93-H64 y O94-H43, ambos formados por la interacción entre los oxígenos del grupo diclofenaco COO<sup>-</sup> con la celulosa. Para el sistema aniónico naproxeno-celulosa (figura 44 d), se forma un fuerte puente de hidrógeno a partir de la interacción entre el oxígeno del grupo COO<sup>-</sup> del naproxeno y el hidrógeno de la celulosa, con una distancia interatómica H43-O90 de 1.3292 Å.

La energía de interacción ( $\Delta E$ ) para todos los sistemas, que se muestra en la tabla 15, se calculó como (Hobza, 2011):

$$\Delta E = E_{\text{(celulosa-sistema fármaco)}} - (E_{\text{celulosa}} + E_{\text{fármaco}})$$

Donde  $E_{\text{celulosa-fármaco}}$  es la energía de la interacción optimizada entre celulosa y fármaco, y  $E_{\text{celulosa}} + E_{\text{fármaco}}$  es la energía del fragmento de celulosa optimizado más la energía de la molécula de fármaco optimizada, el fármaco se refiere a diclofenaco o naproxeno. Los valores de  $\Delta E$  sugieren que la interacción entre fármacos aniónicos y celulosa es más fuerte que la interacción entre fármacos neutros y celulosa; además, notamos que no hay diferencia significativa entre la energía de interacción de los sistemas aniónicos diclofenaco-celulosa y aniónico naproxeno-celulosa. Entonces podríamos explicar la remoción ligeramente mayor de diclofenaco (82%) vs naproxeno (74.5%) porque el diclofenaco forma más puentes de hidrógeno que el naproxeno lo que podría favorecer el proceso de adsorción sobre la celulosa.

**Tabla 13.** Energía de interacción de diclofenaco, naproxeno y celulosa.

Interacciones diclofenaco y naproxeno neutras		
Interacciones	Energía (Kcal/mol)	Puente de hidrogeno y distancia (Å)
1	-168.428	(H13, O57) 2.019
2	-170.084	(H48, O28) 2.099
3	-167.729	(H51, O28) 2.167
Interacciones diclofenaco y naproxeno aniones		
Interacciones	Energía (Kcal/mol)	Puente de hidrogeno y distancia (Å)
1	-75.779	(H9, O59) 1.981
2	-112.276	(H96, O65) 1.782
3	-0.146.153	(H96, O65) 1.782
Interacciones diclofenaco neutro y celulosa		
Interacciones	Energía (Kcal/mol)	Puente de hidrogeno y distancia (Å)
1	-777.479	(H96, O65) 1.782
2	-780.063	(H79, O40) 1.9709
3	-786.864	(H96, O15) 1.731
4	-783.894	(H96, O60) 1.841
Diclofenaco anión y celulosa		
Interacciones	Energía (Kcal/mol)	Puente de hidrogeno y distancia (Å)
1	-850.849	(H66, O95) 1.728

2	-844.206	(H18, O95) 1.517
3	-870.916	(H61, O94) 1.702
4	-859.866	(H66, O95) 1.724
Naproxeno neutro y celulosa		
Interacciones	Energía (Kcal/mol)	Puente de hidrogeno y distancia (Å)
1	-815.1524	(H92, O63) 1.809
Naproxeno anión y celulosa		
Interacciones	Energía (Kcal/mol)	Puente de hidrogeno y distancia (Å)
1	-827.188	(H64, O91) 1.947

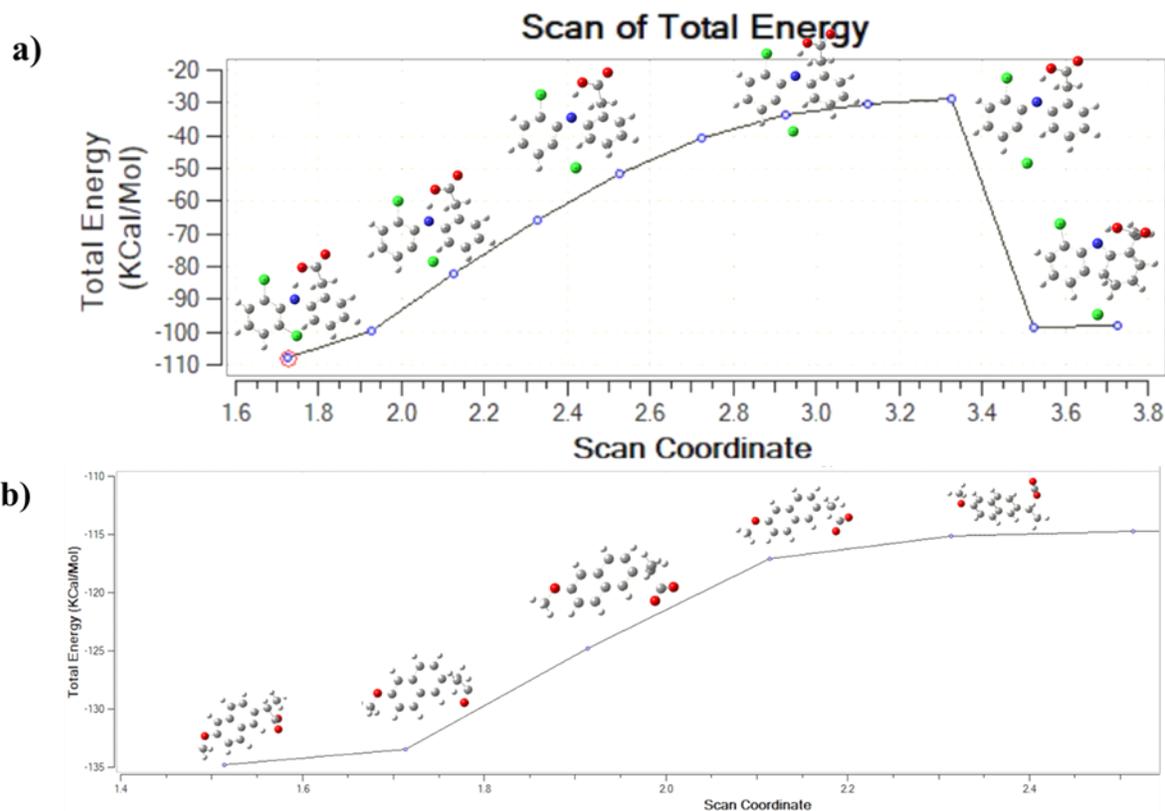
#### 4.10.5 Propuestas de mecanismos de remoción de diclofenaco y naproxeno

El uso de humedales artificiales para la remoción de contaminantes orgánicos ha sido profundamente estudiado y enfocándose en el desempeño eficiente de estos, en términos de eliminación de medicamentos, la mayoría de los autores examinan diferencias de concentración entre las determinadas en los afluentes y contrastando con la de los efluentes; de esta manera, muchos estudios calculan las eficiencias de remoción (Yin et al. 2017). Sin embargo, existe un interés creciente en una mejor comprensión de los mecanismos de degradación que se producen en los humedales por los contaminantes orgánicos.

Uno de los puntos críticos por los que queremos entender los mecanismos de eliminación de drogas en los humedales es saber cómo se forman los productos de degradación. Para el diclofenaco y el naproxeno, se ha indicado la formación de ácido fórmico 8-clorocarbazol y análogo de cetona, respectivamente (Domaradzka et al. 2015).

Según el estudio computacional, la superficie de energía potencial (PES) del diclofenaco aniónico, calculada aumentando la distancia interatómica, muestra la ruptura del enlace C5-Cl11 en los primeros pasos y la formación de carbazol (figura 45a). El TS obtenido del máximo en el PES sugiere que la formación de carbazol se logra a través de un mecanismo concertado donde se rompe el

enlace C5-Cl11 y la ciclación ocurre en un solo paso que involucra energía de activación ( $E_a$ ) de 79.57 kcal / mol. Además, se puede ver que un oxígeno del carboxilato se protona tomando hidrógeno de la amina. Para el naproxeno, el PES se calculó aumentando la distancia interatómica, mostrando el acercamiento de C17 y C23, con la liberación de CO y H<sub>2</sub> (figura 45b), que involucra energía de activación ( $E_a$ ) de 20.07 kcal / mol.



**Figura 45.** Superficie de energía potencial (PES) de mecanismos propuestos a) Diclofenaco, b) Naproxeno

## Conclusiones

- El tratamiento de una solución contaminada con diclofenaco y naproxeno en un humedal construido de flujo subsuperficial horizontal no tuvo efectos fitotóxicos sobre las plantas de *Typha latifolia* ya que estas no mostraron alteración en su desarrollo (tamaño de las plantas, desarrollo de la raíz y contenido de clorofila total) durante el periodo de experimentación de 100 días.
- La remoción total de diclofenaco (3 mg/L) y de naproxeno (5 mg/L) fue de 82 % y 74 % respectivamente, en las condiciones experimentales de este trabajo (pH 6.5 a 7.2; TRH 3 d) por lo que el tratamiento fue eficiente ya que la remoción es superior a lo reportado por otros trabajos desarrollados en condiciones experimentales similares para el tratamiento de soluciones contaminadas con mezclas de fármacos.
- En la remoción total de los fármacos, el sustrato de soporte de las plantas (grava) contribuyó con 20.4 % para diclofenaco y 30.8 % para naproxeno mientras que las plantas contribuyeron con 67.6 % para diclofenaco y 46.0 % para naproxeno calculados en el mismo período de tratamiento (30 d); el sustrato posiblemente remueve los fármacos mediante adsorción.
- El modelado computacional de las interacciones químicas entre el diclofenaco o el naproxeno con una molécula modelada de celulosa, principal componente de la raíz de las plantas, a un nivel teórico semiempírico de PM6 indica que las interacciones intermoleculares están mediadas por puentes de hidrógeno y que la interacción celulosa – diclofenaco es más fuerte (1.514) que la interacción celulosa – naproxeno (1.809), lo cual puede explicar la mayor eficiencia de remoción del diclofenaco en comparación con la del naproxeno.
- El modelado químico computacional permitió analizar las interacciones químicas entre los fármacos en la solución (dato del puente) y sugiere la formación de especies químicas complejas que podrían estar relacionadas con

la menor remoción de diclofenaco y naproxeno cuando están en mezcla en la solución contaminada. El empleo de herramientas químicas computacionales ha sido muy poco empleado en el estudio de los procesos de remoción de contaminantes químicos orgánicos.

- De las raíces de *Typha latifolia* desarrollada en los humedales se aislaron 14 morfotipos diferentes que corresponden mayormente a bacterias del género de *Pseudomonas*; *Serratia* y *Rahnella* correspondieron solamente a dos morfotipos.
- Los aislados bacterianos producen ácido indol acético (AIA) una fitohormona promotora de crecimiento vegetal.
- Los aislados bacterianos identificados son altamente tolerantes a los fármacos estudiados (3 - 300 mg/L de diclofenaco; 50 - 500 mg/L de naproxeno).
- La adición de los aislados bacterianos a plantas de *Typha latifolia* obtenidas en condiciones de asepsia y posteriormente expuestas a la mezcla de fármacos demostró que los aislados bacterianos contribuyen a la remoción de los fármacos.

## Perspectivas de trabajo futuro

Los resultados obtenidos en este proyecto permiten proponer los siguientes aspectos que merecen atención como trabajo a futuro en lo que se refiere a la remoción de diclofenaco y de naproxeno mediante humedales construidos de flujo subsuperficial horizontal:

- Estudiar el efecto sobre la remoción de diclofenaco y naproxeno de parámetros como la variación del TRH que podría optimizarse buscando la mayor eficiencia de remoción.
- Determinar los productos de degradación de diclofenaco y de naproxeno durante el tratamiento de las soluciones contaminadas en los humedales con el propósito de conocer las rutas de degradación y dar una explicación conceptual al proceso de remoción, apoyándose en herramientas como la utilizada en este trabajo: química computacional.
- Para describir el consorcio bacteriano que se desarrolla en el ambiente de la rizosfera de plantas en los humedales es necesario utilizar herramientas como la metagenómica lo cual requiere del estudio de procesos metodológicos específicos para la obtención y purificación del ADN. Esta etapa es crítica en los estudios de metagenómica y tiene dificultades metodológicas específicas relacionadas con el tamaño de muestra y el rompimiento de las moléculas. El conocimiento del consorcio bacteriano y de los aislados es necesario para explicar en mejor medida el papel de los microorganismos en la remoción de los contaminantes orgánicos.

## Bibliografía

- Ahmed, S., Javed, M. A., Tanvir, S., & Hameed, A. (2001). Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain that degrades 4-acetamidophenol and 4-aminophenol. *Biodegradation*, 12(5), 303-309. <https://doi.org/10.1023/A:1014395227133>
- Alexander D, Zuberer D (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fert Soils* 12, 39–45 <https://doi.org/10.1007/BF00369386>
- Allinge, N., Cava, M., & De Jongh, D. (1976). *Química orgánica*. España: Editorial Barcelona Reverté.
- Almeida, B., Oehmen, A., Marques, R., Brito, D., Carvalho, G., & Crespo, M. B. (2013). Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture. *Bioresource technology*, 133, 31-37.
- Alizadeh, N., & Keyhanian, F. (2015). Simple, sensitive and selective spectrophotometric assay of naproxen in pure, pharmaceutical preparation and human serum samples. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 72(5), 867–875.
- Andreu, V., Gimeno-García, E., Pascual, J. A., Vazquez-Roig, P., & Picó, Y. (2016). Presence of pharmaceuticals and heavy metals in the waters of a Mediterranean coastal wetland: potential interactions and the influence of the environment. *Science of the Total Environment*, 540, 278-286. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.007>
- Araujo, L., Villa, N., Camargo, N., Bustos, M., García, T., & Prieto, A. D. J. (2011). Persistence of gemfibrozil, naproxen and mefenamic acid in natural waters. *Environmental Chemistry Letters*, 9(1), 13-18. <https://doi.org/10.1007/s10311-009-0239-5>
- Arnold, W. A., & McNeill, K. (2007). Transformation of pharmaceuticals in the environment: Photolysis and other abiotic processes. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 50, 361-385. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(07\)50011-5](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(07)50011-5)

- Aus der Beek T, Weber F, Bergmann A, Hickmann S, Ebert I, Hein A, Küster A (2016) Pharmaceuticals in the environment--Global occurrences and perspectives. *Environ Toxicol Chem.* 35(4):823-35. 10.1002/etc.3339.
- Ávila, C., Reyes, C., Bayona, J. M., & García, J. (2013). Emerging organic contaminant removal depending on primary treatment and operational strategy in horizontal subsurface flow constructed wetlands: influence of redox. *Water research*, 47(1), 315-325. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.005>
- Ávila, C., Nivala, J., Olsson, L., Kassa, K., Headley, T., Mueller, R. A., ... & García, J. (2014). Emerging organic contaminants in vertical subsurface flow constructed wetlands: influence of media size, loading frequency and use of active aeration. *Science of the total environment*, 494, 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.128>
- Bai, J., Yu, L., Ye, X., Yu, Z., Guan, Y., Li, X., ... & Liu, X. (2020). Organic phosphorus mineralization characteristics in sediments from the coastal salt marshes of a Chinese delta under simulated tidal cycles. *Journal of Soils and Sediments*, 20(1), 513-523. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02404-5>
- Barcella CA, Lamberts M, McGettigan P, Fosbol EL, Lindhardsen J, Torp-Pedersen C, Gislason GH, Olsen AS (2019) Differences in cardiovascular safety with non-steroidal anti-inflammatory drug therapy-a nationwide study in patients with osteoarthritis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 124:629–641. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13182>
- Barry A., Mahood M., & Hamezh, M. J. (2009). Spectrophotometric determination of diclofenac sodium in pharmaceutical preparations. *Journal Kerbala University*, 7(2), 310–316.
- Bordenave, S., Goñi-Urriza, M. S., Caumette, P., Duran, R. (2007). Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6089-6097. <https://doi.org/10.1128/AEM.01352-07>

- Brozinski, J. M., Lahti, M., Meierjohann, A., Oikari, A., & Kronberg, L. (2013). The anti-inflammatory drugs diclofenac, naproxen and ibuprofen are found in the bile of wild fish caught downstream of a wastewater treatment plant. *Environmental science & technology*, 47(1), 342-348. <https://doi.org/10.1021/es303013j>
- Buemi, G., & Zuccarello, F. (2004). DFT study of the intramolecular hydrogen bonds in the amino and nitro-derivatives of malonaldehyde. *Chemical physics*, 306(1-3), 115-129. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2004.07.020>
- Carballa, M., Fink, G., Omil, F., Lema, J. M., & Ternes, T. (2008). Determination of the solid–water distribution coefficient (K<sub>d</sub>) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge. *Water research*, 42(1-2), 287-295. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.012>
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Ternes, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water research*, 38(12), 2918-2926. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.029>
- Cartagena C. (2012) Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos. *Lasallista de investigación*, 8-2: 143-153.
- Castiglioni, S., Zuccato, E., Crisci, E., Chiabrando, C., Fanelli, R., & Bagnati, R. (2006). Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography– tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 78(24), 8421-8429. <https://doi.org/10.1021/ac061095b>
- Cedergreen, N. (2014). Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PloS one*, 9(5), e96580.
- Chandra, R., & Chowdhary, P. (2015). Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(2), 326-342. <https://doi.org/10.1039/C4EM00627E>
- Chen, Y. J., & Rosazza, J. P. (1994). A bacterial, nitric oxide synthase from a *Nocardia* species. *Biochemical and biophysical research communications*, 203(2), 1251-1258. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2317>

- Cuevas G, Cortés F. Introducción a la química computacional, Fondo de Cultura Económica. 2003.
- Corrales Ramírez, L. C., Arévalo Galvez, Z. Y., & Moreno Burbano, V. E. (2014). Solubilization of phosphates: an important microbial function in plant development. *Nova*, 12(21), 68-79.
- Daneshvar, A., Svanfelt, J., Kronberg, L., & Weyhenmeyer, G. A. (2010). Winter accumulation of acidic pharmaceuticals in a Swedish river. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(4), 908-916. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0261-y>
- Daughton, C. G. (2004). Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environmental Impact Assessment Review*, 24(7-8), 711-732. <https://doi.org/10.1016/j.eiar.2004.06.003>
- Díaz-González, F., & Sánchez-Madrid, F. (2015). NSAIDs: learning new tricks from old drugs. *European journal of immunology*, 45(3), 679-686.
- Diemert, S., Wang, W., Andrews, R. C., & Li, X. F. (2013). Removal of halo-benzoquinone (emerging disinfection by-product) precursor material from three surface waters using coagulation. *Water research*, 47(5), 1773-1782. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.12.035>
- Ding, T., Lin, K., Yang, B., Yang, M., Li, J., Li, W., & Gan, J. (2017). Biodegradation of naproxen by freshwater algae *Cymbella* sp. and *Scenedesmus quadricauda* and the comparative toxicity. *Bioresource technology*, 238, 164-173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.018>
- Domaradzka, D., Guzik, U., & Wojcieszynska, D. (2015). Biodegradation and biotransformation of polycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(2), 229-239. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9364-8>
- Dordio, A. V., Duarte, C., Barreiros, M., Carvalho, A. P., Pinto, A. P., & da Costa, C. T. (2009). Toxicity and removal efficiency of pharmaceutical metabolite clofibric acid

by *Typha spp.*—potential use for phytoremediation? *Bioresource technology*, 100(3), 1156-1161. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.034>

Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R., & Van der Bruggen, B. (2019). Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *The Science of the Total Environment*, 654, 324–337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.072>

Fernandez, A. I. G., Fernandez, A. F., Perez, M. J., Nieto, T. P., & Ellis, A. E. (1998). Siderophore production by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Lack of strain specificity. *Diseases of aquatic organisms*, 33(2), 87-92.

Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R. H., Phan, C., Tysklind, M., & Larsson, D. G. J. (2009). Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2522–2527. <https://doi.org/10.1897/09-073>

Foster, R. C. (1988). Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and fertility of soils*, 6(3), 189-203. <https://doi.org/10.1007/BF00260816>

Gao, Y., & Deshusses, M. A. (2011). Adsorption of clofibric acid and ketoprofen onto powdered activated carbon: effect of natural organic matter. *Environmental technology*, 32(15), 1719-1727.

Gaussian 09, Revision A.1, Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery JA Jr., Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam JM, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R,.

- Gomes TC., & Skaf MS. J. (2012) Cellulose-Builder: A toolkit for building crystalline structures of cellulose. *Comput. Chem.*, 33(14), 1338-1346. <https://doi.org/10.1002/jcc.22959>
- Gröning, J., Held, C., Garten, C., Claußnitzer, U., Kaschabek, S. R., & Schlömann, M. (2007). Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere*, 69(4), 509-516. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.03.037>
- Gren, I., Wojcieszynska, D., Guzik, U., Perkosz, M., & Hupert-Kocurek, K. (2010). Enhanced biotransformation of mononitrophenols by *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 in the presence of aromatic compounds of plant origin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 289–295. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0172-6>.
- Guo, J., Boxall, A., & Selby, K. (2015). Do pharmaceuticals pose a threat to primary producers? *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(23), 2565–2610. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1061873>
- Hijosa-Valsero, M., Fink, G., Schlüsener, M. P., Sidrach-Cardona, R., Martín-Villacorta, J., Ternes, T., & Bécares, E. (2011). Removal of antibiotics from urban wastewater by constructed wetland optimization. *Chemosphere*, 83(5), 713-719. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.004>
- Hijosa-Valsero, M., Reyes-Contreras, C., Domínguez, C., Bécares, E., & Bayona, J. M. (2016). Behaviour of pharmaceuticals and personal care products in constructed wetland compartments: Influent, effluent, pore water, substrate and plant roots. *Chemosphere*, 145, 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.090>
- Hobza, P. (2011). The calculation of intermolecular interaction energies. *Annual Reports Section "C"(Physical Chemistry)*, 107, 148-168. <https://doi.org/10.1039/C1PC90005F>
- Hoeger B., Kollner B., Dietrich D., Hitzfeld B. (2005) Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout. *Aquatic Toxicology*, (75):53–64.

- Hu, X., Xie, H., Zhuang, L., Zhang, J., Hu, Z., Liang, S., & Feng, K. (2021). A review on the role of plant in pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) removal in constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 780, 146637. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146637>
- Ibekwe, A. M., Lyon, S. R., Leddy, M., & Jacobson-Meyers, M. (2007). Impact of plant density and microbial composition on water quality from a free water surface constructed wetland. *Journal of applied microbiology*, 102(4), 921-936. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4853-4862.2002>
- Ihssen, J., Reiss, R., Luchsinger, R., Thöny-Meyer, L., & Richter, M. (2015). Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli*. *Scientific reports*, 5(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep10465>
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtiera, L., & Rubino, M. (2005). Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Science of the Total Environment*, 348(1-3), 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.068>
- Ivshina, I. B., Rychkova, M. I., Vikhareva, E. V., Chekryshkina, L. A., & Mishenina, I. I. (2006). Catalysis of the biodegradation of unusable medicines by alkanotrophic rhodococci. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(4), 392-395. <https://doi.org/10.1134/S0003683806040090>
- Jensen, F. *Introduction to computational chemistry*. (2017) 3a ed. John Wiley & Sons
- Kaplan, C. Kitts, C.L. (2004) Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 1777-1786. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.3.1777-1786.2004>
- Katibi, K. K., Yunus, K. F., Che Man, H., Aris, A. Z., bin Mohd Nor, M. Z., & Binti Azis, R. S. (2021). Recent advances in the rejection of endocrine-disrupting compounds from water using membrane and membrane bioreactor technologies: a review. *Polymers*, 13(3), 392. <https://doi.org/10.3390/polym13030392>

- Khetan, S. K., & Collins, T. J. (2007). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chemical reviews*, 107(6), 2319-2364. <https://doi.org/10.1021/cr020441w>
- Kucey, R. (1983). Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 63(4), 671-678. <https://doi.org/10.4141/cjss83-068>
- Kümmerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 5-7. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg293>
- Lara, C., Oviedo, L., & Alemán, A. (2011). Strain native with potential in the acetic acid production indol to improve the agriculture. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(1), 17-23.
- Li Y, Liu F, Liu Y, Zhu J, Zhang Q. (2011) Endophytic bacterial diversity in roots of *Typha angustifolia* L. in the constructed Beijing Cuihu Wetland (China), *Research in Microbiology*, 162(2):124-131. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.021>
- Li, Q., Wang, P., Chen, L., Gao, H., & Wu, L. (2016). Acute toxicity and histopathological effects of naproxen in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18832-18841. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7092-4>
- Ligi, T., Oopkaup, K., Truu, M., Preem, J. K., Nõlvak, H., Mitsch, W. J., Truu, J. (2014). Characterization of bacterial communities in soil and sediment of a created riverine wetland complex using high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing. *Ecological Engineering*, 72, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.09.007>
- Lloret, L., Eibes, G., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Feijoo, G., & Lema, J. M. (2010). Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochemical Engineering Journal*, 51(3), 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.06.005>
- Lonappan, L., Brar, S. K., Das, R. K., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2016). Diclofenac and its transformation products: environmental occurrence and toxicity-a review. *Environment International*, 96, 127-138.

- Loper JE, Henkels MD (1999) Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 65:5357–5363
- Loredo Portales R. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Evaluación de un humedal construido de flujo subsuperficial para la remoción de Pb y Cd mediante plantas de *Typha latifolia*. Facultad de Ciencias Químicas, UASLP. Dic 2, 2011.
- Matamoros, V., & Bayona, J. M. (2006). Elimination of pharmaceuticals and personal care products in subsurface flow constructed wetlands. *Environmental science & technology*, 40(18), 5811-5816.
- Matamoros, V., & Bayona Termens, J. M. (2007). Els Aiguamolls construïts: una tecnologia sostenible per a l'eliminació de fàrmacs i productes d'higiene personal d'aigües residuals domèstiques.
- Matamoros, V., & Salvadó, V. (2012). Evaluation of the seasonal performance of a water reclamation pond-constructed wetland system for removing emerging contaminants. *Chemosphere*, 86(2), 111-117.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.09.020>
- McArdell, C. S., Molnar, E., Suter, M. J. F., & Giger, W. (2003). Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environmental Science & Technology*, 37(24), 5479–5486.  
<https://doi.org/10.1021/es034368i>
- McGettigan P, Henry D. (2013) Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high-income countries. *PLoS Med.* 10.1371/journal.pmed.1001388.
- Menaka, S., Lone, T. A., & Lone, R. A. (2015). Cloning of laccase gene from a newly isolated 2, 4-dichlorophenol degrading *Bacillus subtilis* from dyeing industry sites. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science*, 1, 1602-1608. 10.5829/idosi.ajeaes.2015.15.8.94202

- Mercado-Blanco J, Bakker PA. (2007) Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas spp.*: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 92(4):367-89. 10.1007/s10482-007-9167-1.
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Da Ros, Z., Fattorini, D., d'Errico, G., Milan, M., Bargelloni, L., Regoli, F. 2016. Ecotoxicological potential of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research* 121: 31-39.
- Murdoch, R. W., & Hay, A. G. (2005). Formation of catechols via removal of acid side chains from ibuprofen and related aromatic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6121-6125.
- Ortíz-Castro, R., Valencia-Cantero, E., & López-Bucio, J. (2008). Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant signaling & behavior*, 3(4), 263-265. <https://doi.org/10.4161/psb.3.4.5204>
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., & Olsen, G. J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. In *Advances in microbial ecology* (pp. 1-55). Springer, Boston, MA.
- Park, J. H., Bolan, N., Megharaj, M., Naidu R., Chung, J. W. (2011). Bacterial-Assisted Immobilization of Lead in Soils: Implications for Remediation (Symposium 3.5. heavy metal contaminated soils< special issue> International symposium: soil degradation control, remediation, and reclamation, Tokyo Metropolitan University Symposium Series No. 2, 2010). *Pedologist*, 54(3), 162-174.
- Parolini, M. (2020). Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. *The Science of the Total Environment*, 740(140043), 140043. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140043>
- Pastrana L., Baños M., López M., Torres B. (2015) Ecofarmacovigilancia en México: perspectivas para su implementación. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46:16-40.

- Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C. U., Jr, & Mohan, D. (2019). Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chemical Reviews*, 119(6), 3510–3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>
- Patiño C. 2010. Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia (tesis doctoral en Ciencias Agropecuarias- Manejo de Suelos y Aguas). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira
- Peña-Álvarez, A., & Castillo-Alanís, A. (2015). Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(1), 29-42
- Pérez, C., Rojas, J. y Valen, H. 2009. Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.*, 1, 286-301.
- Petrović, M., Hernando, M. D., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2005). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. *Journal of Chromatography A*, 1067(1-2), 1-14.
- Pietrini, F., Di Baccio, D., Aceña, J., Pérez, S., Barceló, D., & Zacchini, M. (2015). Ibuprofen exposure in *Lemna gibba* L.: Evaluation of growth and phytotoxic indicators, detection of ibuprofen and identification of its metabolites in plant and in the medium. *Journal of hazardous materials*, 300, 189-193. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.06.068>
- Plazas EC. (2007) Mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en bacterias fosfato solubilizadoras. [Tesis de grado]. Colombia.
- Quintana J, Weiss S, Reemtsma T. (2005) Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal

- wastewater treated by a membrane bioreactor, *Water Research*, 39(12):2654-2664. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.068>
- Ramos C. (2009) Medicamentos de consumo humano en el agua, propiedades fisicoquímicas. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 47(2).
- Ran, L. X., Van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M. (2005). No role for bacterially produced salicylic acid in rhizobacterial induction of systemic resistance in *Arabidopsis*. *Phytopathology*, 95(11), 1349-1355. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1349>
- Reddy, C. A., & Mathew, Z. A. C. H. A. R. I. A. (2001, November). Bioremediation potential of white rot fungi. In *British mycological society symposium series* (Vol. 23, pp. 52-78).
- Reichenauer, T. G., & Germida, J. J. (2008). Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. *ChemSusChem: Chemistry & Sustainability Energy & Materials*, 1(8-9), 708-717. <https://doi.org/10.1002/cssc.200800125>
- Rezaei S, Shahverdi AR, Faramarzi MA (2017) Isolation, one-step affinity purification, and characterization of a polyextremotolerant laccase from the halophilic bacterium *Aquisalibacillus elongatus* and its application in the delignification of sugar beet pulp. *Bioresour Technol* 230:67–75. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.036>
- Rivera-Jaimes JA, Postigo C, Melgoza-Alemán RM, Aceña J, Barceló D, López de Alda M. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci Total Environ*. 2018 Feb 1;613-614:1263-1274. [10.1016/j.scitotenv.2017.09.134](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.134).
- Rodarte-Morales, A. I., Feijoo, G., Moreira, M. T., & Lema, J. M. (2011). Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1839-1846. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0642-x>
- Rodríguez C, Marco E, Caminal G. (2010) Naproxen degradation test to monitor *Trametes versicolor* activity in solid-state bioremediation processes, *Journal of Hazardous Materials*, (179): 1152-1155. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.091>

- Scheytt, T., Mersmann, P., Lindstädt, R., & Heberer, T. (2005). Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments. *Chemosphere*, 60(2), 245-253. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.12.042>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Siemens, J., Huschek, G., Siebe, C., & Kaupenjohann, M. (2008). Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley. *Water Research*, 42(8-9), 2124-2134. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.019>
- Sivaranjane, R., & Kumar, P. S. (2021). A review on remedial measures for effective separation of emerging contaminants from wastewater. *Environmental Technology & Innovation*, 23(101741), 101741. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101741>
- Stewart, J. J. P. J. (1989) Optimization of parameters for semiempirical methods I. *Method Comput. Chem.*, 10 (2), 209-220. <https://doi.org/10.1002/jcc.540100208>
- Stottmeister U., Wießner A., Kusch P., Kappelmeyer U., Kästner M., Bederski O. (2003) Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 22:93-117. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.08.010>
- Stylianou, K., Hapeshi, E., Vasquez, M. I., Fatta-Kassinos, D., & Vyrides, I. (2018). Diclofenac biodegradation by newly isolated *Klebsiella* sp. KSC: microbial intermediates and ecotoxicological assessment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 3242-3248. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.052>
- Straub, J. O., & Stewart, K. M. (2007). Deterministic and probabilistic acute-based environmental risk assessment for naproxen for Western Europe. *Environmental*

- Toxicology and Chemistry: An International Journal, 26(4), 795-806.  
<https://doi.org/10.1897/06-212R.1>
- Sundaravadivel, M., & Vigneswaran, S. (2001). Constructed wetlands for wastewater treatment. *Critical reviews in environmental science and technology*, 31(4), 351-409. <https://doi.org/10.1080/20016491089253>
- Tiehm, A., Schmidt, N., Stieber, M., Sacher, F., Wolf, L., & Hoetzel, H. (2011). Biodegradation of pharmaceutical compounds and their occurrence in the Jordan Valley. *Water Resources Management*, 25(4), 1195-1203.  
<https://doi.org/10.1007/s11269-010-9678-9>
- Tijani, J. O., Fatoba, O. O., Babajide, O. O. & Petrik, L. F. (2016). Pharmaceuticals, endocrine disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 14(1), 27-49.  
<https://doi.org/10.1007/s10311-015-0537-z>
- Topp, E., Hendel, J. G., Lapen, D. R., & Chapman, R. (2008). Fate of the nonsteroidal anti-inflammatory drug naproxen in agricultural soil receiving liquid municipal biosolids. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(10), 2005-2010. <https://doi.org/10.1897/07-644.1>
- Toufexi E, Dailianis S, Vlastos D, Manariotis ID. (2016) Mediated effect of ultrasound treated Diclofenac on mussel hemocytes: First evidence for the involvement of respiratory burst enzymes in the induction of DCF-mediated unspecific mode of action. *Aquat Toxicol*. 10.1016/j.aquatox.2016.03.017.
- United States Environmental Protection Agency. Subsurface flow constructed wetlands for wastewater treatment: a technology assessment. 1993
- Urrea E., Pérez M., Blánquez P., Vicent T., Caminal G. (2010) Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR. *Bioresource Technology*, 101:2159–2166.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.019>

- Vega-Celedón, Paulina, Canchignia Martínez, Hayron, González, Myriam, & Seeger, Michael. (2016). Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. *Cultivos Tropicales*, 37(Supl. 1), 33-39.
- Vieno, N., & Sillanpää, M. (2014). Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant—A review. *Environment international*, 69, 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.021>
- Vo, HNP., Bui, XT., Nguyen, TMH (2018) Insights of the Removal Mechanisms of Pharmaceutical and Personal Care Products in Constructed Wetlands. *Curr Pollution Rep* 4, 93–103. <https://doi.org/10.1007/s40726-018-0086-8>
- Vulava, V. M., Cory, W. C., Murphey, V. L., & Ulmer, C. Z. (2016). Sorption, photodegradation, and chemical transformation of naproxen and ibuprofen in soils and water. *Science of the Total Environment*, 565, 1063-1070. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.132>
- Watkinson, A., Murby, E., Kolpin, D. & Costanzo, S. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of The Total Environment*, 407(8), 2711-2723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.059>
- Weber F, Beek T, Bergmann A, Carius A, Grüttner G, Hickmann S, Ebert I, Hein A, Küster A, Rose J, Koch-Jugl J, Stolzenberg H-C. (2014). Pharmaceuticals in the environment- the global perspective. Occurrence, effects, and potential cooperative action under SAICM. German Environment Agency, pp. 1–12.
- Whitmire, S. L., & Hamilton, S. K. (2005). Rapid removal of nitrate and sulfate in freshwater wetland sediments. *Journal of Environmental Quality*, 34(6), 2062-2071. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.0483>
- Wiegand, T.J. and Verneti, C.M. (2019) Nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) toxicity. (2017) <https://emedicine.medscape.com/article/816117>.
- Wojcieszynska, D., Guzik, U., Greń, I., Perkosz, M., & Hupert-Kocurek, K. (2011). Induction of aromatic ring cleavage dioxygenases in *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 in cometabolic systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 805-811.

- Wojcieszńska D, Domaradzka D, Hupert-Kocurek K, Guzik U. (2014) Bacterial degradation of naproxen--undisclosed pollutant in the environment. *J Environ Manage.* 1;145:157-61. [10.1016/j.jenvman.2014.06.023](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.06.023).
- Wu S, Zhang L, Chen J. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms.(2012) *Appl Microbiol Biotechnol.* 96(4):875-84. [10.1007/s00253-012-4414-4](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4414-4).
- 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, 303-320. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102>
- Young, D. C. (2001). A practical guide for applying techniques to real-world problems. *Computational Chemistry*, New York, 9, 390.
- Zapata Morales A. (2018) Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Remoción de fármacos mediante de humedales construidos. Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.
- Zapata-Morales, A.L., Alfaro-De la Torre, M.C., Hernández-Morales, A. et al. Isolation of Cultivable Bacteria Associated with the Root of *Typha latifolia* in a Constructed Wetland for the Removal of Diclofenac or Naproxen. *Water Air Soil Pollut* 231, 423 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04781-x>
- Zeng, J., Lin, X., Zhang, J., Li, X., & Wong, M. H. (2011). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the bacterial laccase CueO from *E. coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(6), 1841-1849. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3009-1>
- Zhang, D. Q., Tan, S. K., Gersberg, R. M., Sadreddini, S., Zhu, J., & Tuan, N. A. (2011). Removal of pharmaceutical compounds in tropical constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 37(3), 460-464. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.11.002>
- Zhang, Y., Geißen, S. U., & Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73(8), 1151-1161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>

- Zhang Y, Xie J, Liu M, Tian Z, He Z, Nostrand J, Ren L, Zhou J, Yang M. (2013) Microbial community functional structure in response to antibiotics in pharmaceutical wastewater treatment systems, *Water Research*, (47) 6298-6308. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.003>
- Zhang, Y., Lv, T., Carvalho, P. N., Arias, C. A., Chen, Z., & Brix, H. (2016). Removal of the pharmaceuticals ibuprofen and iohexol by four wetland plant species in hydroponic culture: plant uptake and microbial degradation. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3), 2890-2898. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5552-x>
- Zhang, D., Luo, J., Lee, Z. M. P., Gersberg, R. M., Liu, Y., Tan, S. K., & Ng, W. J. (2016). Characterization of microbial communities in wetland mesocosms receiving caffeine-enriched wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(14), 14526-14539. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6586-4>
- Zhang, Y., Lv, T., Carvalho, P. N., Zhang, L., Arias, C. A., Chen, Z., & Brix, H. (2017). Ibuprofen and iohexol removal in saturated constructed wetland mesocosms. *Ecological Engineering*, 98, 394-402.
- Zind, H., Mondamert, L., Remaury, Q. B., Cleon, A., Leitner, N. K. V., & Labanowski, J. (2021). Occurrence of carbamazepine, diclofenac, and their related metabolites and transformation products in a French aquatic environment and preliminary risk assessment. *Water Research*, 196(117052), 117052
- Zheng, B., Zheng, Z., Zhang, J., Liu, Q., Wang, J., Luo, X., & Wang, L. (2012). Degradation kinetics and by-products of naproxen in aqueous solutions by gamma irradiation. *Environmental Engineering Science*, 29(6), 386-391. <https://doi.org/10.1089/ees.2010.0215>

## Publicaciones

Los resultados de este proyecto se publicaron o están en proceso de publicación en.

- **Zapata-Morales, A. L.**, Rodríguez-Vega, S., Alfaro-De la Torre, M.C., Hernández-Morales, A., Leyva-Ramos S., Soria-Guerra R.E. Efficiency of cattail to remove a mixture of pharmaceuticals in a constructed wetland. Journal of the Mexican Chemical Society. Aceptado (Noviembre, 2022) Publicado (Enero, 2023) <http://dx.doi.org/10.29356/jmcs.v67i1.1848>
- **Zapata-Morales, A. L.**, Alfaro-De la Torre, M.C., Hernández-Morales, A., Leyva-Ramos S., Vázquez-Martínez Juan. Bacterial isolates contribution to the removal of diclofenac and naproxen in mixture in a constructed wetland with *Typha latifolia*. En preparación.