



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA**

**Facultad de Química e Ingeniería del Rosario**

*“Maestría en Ingeniería Ambiental y Desarrollo Sustentable”*

T E S I S

*“Caracterización de la respuesta fisiológica de *Salvinia sp.* frente a la exposición a metales pesados y su relación con la eficiencia del proceso de fitorremediación”*

Para optar por el grado de:

“MAGISTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL Y DESARROLLO SUSTENTABLE”

P R E S E N T A

**Ing. WENDI GUADALUPE LLATANCE OYARCE**

DIRECTORES:

Dra. Julia EMILIANI

Dr. Leonardo Martín PÉREZ

ROSARIO – ARGENTINA

**2019**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Dios por darme fortaleza, fe y sabiduría. También con inmenso cariño a mis padres Celma Esperanza Oyarce Rojas y Sabino Llatance Escobedo, por todo su apoyo inquebrantable en todos los aspectos de mi vida, por orientarme con sus consejos y ser un claro ejemplo de superación.

A mis hermanos Neecker Arturo Llatance Oyarce y Gretsy Gabriela Llatance Oyarce, por su confianza, cariño, comprensión y ser los mejores hermanos durante todo este tiempo y a todos los que aportaron con un granito de arena para culminar una etapa de vital importancia en mi vida personal y profesional.

## AGRADECIMIENTOS

Al Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo (PRONABEC) del Perú por otorgarme la beca para realizar mis estudios de maestría.

A la Pontificia Universidad Católica Argentina por la contribución en los nuevos saberes adquiridos en la “Maestría en Ingeniería Ambiental y Desarrollo Sustentable”.

De manera especial, mis agradecimientos a mi directora Dra. Julia Emiliani y director Dr. Leonardo Martín Pérez por brindarme su apoyo, paciencia y valioso tiempo en el asesoramiento de esta investigación.

También agradezco al Dr. Lucas M. Salvatierra, que en conjunto con el Dr. Leonardo Martín Pérez me acogieron en su grupo y me permitieron desarrollarme en una de sus líneas de investigación. De igual manera a la Lic. Daniela Bergara por haber sido generosa con su tiempo, por su paciencia para la enseñanza, y por su ayuda en el manejo de los distintos equipos de laboratorio. A la vez al equipo de Bio&TecMA: Dra. María Sol Herrera, Dra. Dana Loureiro, Dr. Mauricio Braia, Ing. Camila Olivera, Lic. Iván Carralero Bon, Gilda Domingo; por la acogida cordial en el equipo de investigación.

A la Mg. Arq. Ana E. Espinoza por todas las facilidades que me brindó desde antes de la obtención de la beca, durante la obtención de ella y por su amable acogida durante mi estadía a lo largo de la maestría.

A mis padres, hermanos y amistades, por su respaldo emocional e incondicional durante el desarrollo la maestría.

Por último, quiero agradecer a Dios, porque cada día de esta experiencia ha sido única e invaluable.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	IX
I. INTRODUCCIÓN.....	11
I.1. Metales pesados.....	12
I.1.1. Cadmio.....	13
I.1.2. Cobre.....	14
I.1.3. Plomo.....	16
I.1.4. Zinc.....	17
I.1.5. Contaminación del agua por metales pesados.....	19
I.1.6. Legislación vigente.....	21
I.2. Fitorremediación.....	22
I.2.1. Mecanismos de eliminación de contaminantes.....	25
I.2.2. Cinética de eliminación de contaminantes en procesos de fitorremediación.....	27
I.3. <i>Salvinia sp.</i> .....	29
I.3.1. <i>Salvinia biloba</i> Raddi.....	30
I.3.2. Estudios de eliminación de metales pesados utilizando <i>S. biloba</i> .....	32
II. OBJETIVOS.....	36
II.1. Objetivo General.....	36
II.2. Objetivos Específicos.....	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
III.1. Recolección del material vegetal.....	37
III.2. Preparación de soluciones <i>stock</i> de metales pesados.....	38

III.3.	Determinación de la capacidad fitorremediadora de <i>S. biloba</i> .....	38
III.4.	Cuantificación del metal adsorbido en la biomasa vegetal. ....	40
III.5.	Cuantificación del metal acumulado intracelularmente. ....	40
III.6.	Determinación de parámetros fisiológicos en hojas de <i>S. biloba</i> .....	41
III.6.1.	Cuantificación del contenido de pigmentos fotosintéticos. ....	41
III.6.2.	Cuantificación de antocianinas y flavonoides totales .....	42
III.6.3.	Carbohidratos solubles.....	42
III.7.	Análisis estadístico.....	43
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
IV.1.	Eliminación de metales pesados en aguas contaminadas empleando <i>S. biloba</i> .....	44
IV.2.	Análisis de compartimentalización.....	52
IV.3.	Evaluación del grado de fitotoxicidad de los metales pesados en <i>S. biloba</i> .....	56
V.	CONCLUSIONES.....	63
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Procesos involucrados en la fitorremediación de contaminantes químicos.....	23
<b>Fig. 2.</b> Representación esquemática celular de los diferentes sistemas de defensa que utilizan las plantas expuestas a metales/metaloides.. .....	27
<b>Fig. 3. y Fig 4.</b> Descripción de la especie <i>Salvinia biloba</i> .....	31
<b>Fig. 5.</b> Recolección y aclimatación de las macrófitas seleccionadas. ....	37
<b>Fig. 6.</b> Preparación del material vegetal .....	39
<b>Fig. 7.</b> Cinéticas de eliminación de metales divalentes en la columna de agua a distintos tiempos y concentración. ....	45
<b>Fig. 8.</b> Distribución de $Cd^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Pb^{2+}$ y $Zn^{2+}$ en los tres compartimentos definidos para <i>S. biloba</i> luego de 48 h de exposición a distintas concentraciones iniciales de cada metal, en forma independiente .....	53
<b>Fig. 9.</b> Fotografías ilustrativas de los cambios observados en la biomasa de <i>S. biloba</i> luego de 48 h de exposición .....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales actividades generadoras de metales pesados .....	19
<b>Tabla 2.</b> Porcentajes de remoción para $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ y $\text{Zn}^{2+}$ a distintos tiempos y concentración de exposición en sistemas operados con <i>S. biloba</i> .....	47
<b>Tabla 3.</b> Resultados de la aplicación de modelos cinéticos y cálculo de las constantes de velocidad (K) de eliminación de $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ y $\text{Zn}^{2+}$ en muestras de agua contaminada utilizando <i>S. biloba</i> .....	51
<b>Tabla 4.</b> Contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides), antioxidantes (flavonoides y antocianinas) y carbohidratos solubles en hojas de <i>S. biloba</i> expuestas a $50\pm 2$ o $100\pm 1$ $\mu\text{M}$ de $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ o $\text{Zn}^{2+}$ .....	60

## RESUMEN

El uso de plantas para remover contaminantes (*i.e.*, fitorremediación) es una técnica ampliamente utilizada y validada, a la vez de ser económica, sustentable y bajo impacto ambiental. Se han estudiado y utilizado diversos tipos de plantas para la remoción de metales pesados en medios acuáticos, debido a que cada especie posee diferentes características y capacidades. Entre ellas, las macrófitas del género *Salvinia* han demostrado ser muy eficientes en la remoción de metales y metaloides.

La presente investigación tuvo por objeto ahondar en el conocimiento de la capacidad fitorremediadora de *Salvinia sp.* frente a la exposición a metales pesados, en la respuesta fisiológica de estas plantas al estrés metálico, y su incidencia en el proceso de fitorremediación. Para ello, se expusieron especímenes autóctonos de *Salvinia biloba* Raddi, obtenidos de humedales naturales del río Paraná, a iguales concentraciones ( $50\pm 1$  o  $100\pm 2$   $\mu\text{M}$ ) de cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ), cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), plomo ( $\text{Pb}^{2+}$ ) o zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) en ensayos independientes, y se analizó la eficiencia y la velocidad de remoción para cada metal en la columna de agua a 0, 2, 4, 6, 10, 24 y 48 h de tratamiento. Adicionalmente, se realizó un análisis de compartimentalización mediante el cual se determinó la cantidad de metal adsorbido superficialmente a la biomasa y acumulado intracelularmente. Finalmente, se evaluó el efecto fitotóxico ocasionado en *S. biloba* a causa de la exposición a los diferentes metales.

A partir de los resultados obtenidos se demostró que, en las condiciones ensayadas, *S. biloba* mostró mayor eficiencia para la remoción de iguales concentraciones de  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  respecto a  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . La adsorción y la acumulación intracelular de los metales se dio de manera progresiva a lo largo del tiempo; sin embargo, se evidenciaron diferencias en las cinéticas de remoción para  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (primer orden), respecto a las obtenidas para  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (segundo orden).



Adicionalmente, se manifestaron algunos cambios diferenciales, tanto en las características físicas de las plantas como en los parámetros fisiológicos estudiados contenido de clorofilas, flavonoides, más no se manifestaron cambios significativos en carotenoides, antocianinas y carbohidratos solubles, lo cual implica que la respuesta fisiológica de *S. biloba* frente a la exposición a metales pesados es diferente para cada relación metal/concentración. Sin embargo, el daño toxicológico provocado en las plantas a causa del estrés metálico parece no estar directamente vinculado con su capacidad de acumulación, indicando que los mecanismos de respuesta al estrés en *S. biloba* responden en forma independiente a la regulación del proceso de fitorremediación.

## ABSTRACT

The use of plants to remove pollutants from the environment (*i.e.*, phytoremediation) is a validated and widely used technique, and at the same time, it is an economic, sustainable and eco-friendly technology. Several plants have been used for metal ions removal from aquatic environments since each species has distinctive characteristics. In particular, macrophytes belonging to *Salvinia sp.* have proved to be highly efficient in metal ions and metalloids removal from contaminated waters.

The aim of the present investigation was to get insight into *Salvinia sp.* phytoremediation performance against the exposure to different heavy metals. In addition, plants physiologic response induces by metallic stress and how metals phytotoxicity could affect the phytoremediation process was also assed. For these purposes, autochthonous free-floating *S. biloba* Raddi specimens were collected from naturally-occurring wetlands at Paraná river, and separately exposed to  $50\pm 1$  or  $100\pm 2$   $\mu\text{M}$  of cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ), copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ), lead ( $\text{Pb}^{2+}$ ) or zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) in batch experiments. Metals removal performance from artificially-contaminated water samples was evaluated at 0, 2, 4, 6, 10, 24 and 48 h of plants exposition. In addition, a compartmentalization analysis was carried out in order to quantify the amount of metals adsorbed or accumulated into plants. Finally, metals phytotoxicity in *S. biloba* was indirectly assessed by measuring chlorophylls, flavonoids, carotenoids, anthocyanins and soluble carbohydrates content.

Our results showed that under the assayed conditions, *S. biloba* has a greater ability to remove equal concentration of  $\text{Pb}^{2+}$  or  $\text{Cu}^{2+}$ , than  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$ . All the metals were progressively adsorbed and accumulated within plants; however, elimination kinetics from water samples was different for  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  (first order) in comparison with the obtained for  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  (second order). Moreover, physical damage in *S. biloba* tissues and affection of plants physiological parameters probed to be dependent of the

metal/concentration ratio. However, the toxicological damage caused in plants by heavy metals stress seem not to be straight-linked with *S. biloba* metal elimination capacity, indicating that abiotic-stress response mechanisms and the phytoremediation process are independently regulated.

## I. INTRODUCCIÓN

La degradación del medio ambiente es un serio problema del siglo XXI y uno de los grandes flagelos de las sociedades modernas. En especial, la tasa de contaminación del agua se ha visto incrementada en las últimas décadas, evidenciando una profunda crisis en la disponibilidad de este recurso natural para los próximos años, y comprometiendo el cumplimiento de uno de los objetivos propuestos por los Estados Miembros de las Naciones Unidas (ONU) para el “Desarrollo del Milenio” ([Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de Naciones Unidas \(ONU-DAES\), 2015](#)): “*asegurar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y su saneamiento para todos*”, el cual le otorga al agua un carácter prioritario.

Entre los contaminantes del agua de mayor impacto a nivel global se encuentran los metales pesados y los metaloides. En la actualidad, existen diferentes tecnologías para eliminar iones metálicos en aguas residuales e industriales que incluyen métodos de precipitación química, tecnologías de filtración por membranas, extracciones con compuestos orgánicos, intercambio iónico y procesos de adsorción sobre materiales inertes, entre otras ([Azubuike y col., 2016](#)). Sin embargo, los métodos tradicionales para remover metales pesados en matrices acuosas suelen ser altamente costosos y poco eficientes, especialmente cuando se aplican a la remediación de grandes volúmenes ([Barakat, 2011](#)).

En las últimas décadas, se ha incrementado la búsqueda de tecnologías más sustentables y económicas para la eliminación de metales pesados. Entre ellas, la *fitorremediación*, consistente en utilizar plantas vasculares para eliminar sustancias contaminantes en suelos, lodos, sedimentos y agua, ha sido una de las más valoradas.

En especial, la aplicación de técnicas de fitorremediación para recuperar suelos y aguas contaminadas con metales pesados ha demostrado ser rentable, eficiente y de bajo impacto ambiental (Dixit y col., 2015; Azubuiké y col., 2016).

En Argentina, sobre las márgenes del río Paraná, existe una extensa zona de humedales con abundante y diversa vegetación. Entre su flora autóctona, se han detectado diversas especies de plantas que cuentan con un vasto potencial para la captación de contaminantes, y que podrían utilizarse para la eliminación de sustancias tóxicas en sistemas artificiales o como bioindicadores de la contaminación (Wolf y col., 2012; Alonso y col., 2018). Entre ellas, se destacan los helechos acuáticos del género *Salvinia* por su capacidad para la captación de metales pesados (Paris y col., 2005; Suñe y col., 2007; Dhir, 2009; Tello Zevallos y col., 2018; Castillo Loría y col., 2019). Por lo tanto, la presente investigación ha sido propuesta con el objetivo de profundizar el conocimiento científico sobre el potencial que muestran estas macrófitas autóctonas para la eliminación de metales pesados en aguas contaminadas, y avanzar en la comprensión de los mecanismos involucrados durante el proceso de fitorremediación, como así también en la respuesta fisiológica de *Salvinia sp.* frente al estrés abiótico provocado por la exposición a metales tóxicos.

### **I.1. Metales pesados.**

Aunque aún no existe una definición totalmente aceptada por la comunidad científica acerca del término “metal pesado” (Duffus, 2002; Appenroth, 2010), comúnmente se clasifican dentro de este grupo a aquellos elementos químicos que poseen alta densidad (mayor a 4-5 g/cm<sup>3</sup>), masa y peso atómico (superior a 20 g/mol), y que se encuentran asociados con un importante potencial contaminante y ecotoxicidad cuando se hallan en altas concentraciones en el ambiente, así como con una elevada capacidad de acumularse en los organismos vivos (Concon, 2009). Entre ellos, el cadmio (Cd), el plomo (Pb), el

arsénico (As), el mercurio (Hg) y el cromo (Cr) son extensamente reconocidos por su elevada toxicidad hacia diferentes formas de vida (Ali y col., 2013).

Es importante remarcar que, en bajas concentraciones, algunos metales desempeñan un rol fundamental para el desarrollo de los organismos vivos (Cordero y col., 2005). Por el contrario, otros metales no cumplen este rol y, por tanto, no son un requerimiento esencial.

Una de las principales características que hace a la peligrosidad de los metales pesados es su persistencia ambiental, ya que estas sustancias no pueden ser química ni biológicamente degradadas. Por lo tanto, tienden a acumularse en el medio y, una vez que han entrado en los ecosistemas acuáticos, se distribuyen muy fácilmente mediante su unión al material particulado (diámetro  $>0,45 \mu\text{m}$ ), coloidal (diámetro entre  $0,45 \mu\text{m}$  y  $1 \text{ nm}$ ) o a otras sustancias disueltas en el agua (diámetro  $\geq 1 \text{ nm}$ ) (Martorell, 2010). La presencia de material particulado y coloidal en un medio acuoso es de suma importancia ya que de esto depende que la materia orgánica se coagule y sedimente, a la vez que influye en los tiempos de residencia y en la distancia a la cual los compuestos adsorbidos -como los metales pesados- son dispersados.

A continuación, conforme a los objetivos del presente trabajo, se detallan algunas características de cuatro de los metales pesados que han sido objeto de estudio.

### **I.1.1. Cadmio.**

El Cd es un elemento químico perteneciente al grupo IIB de la tabla periódica, con número atómico 48 y peso atómico  $112,4 \text{ g/mol}$ . En la naturaleza suele encontrarse presente junto a otros metales, tales como Zn, Pb y Cu (Nava y Méndez, 2011). Las principales fuentes naturales de incorporación de Cd en el ambiente son las erupciones volcánicas y la meteorización de las rocas; aunque su presencia puede verse marcadamente influenciada por fuentes antropogénicas debido a que este mineral se utiliza en la

fabricación de baterías y pinturas, en la industria microelectrónica, en la fabricación de cemento y en la producción de fertilizantes fosfatados. Adicionalmente, el Cd puede ser liberado al ambiente durante la quema de combustibles fósiles (Pernia y col., 2008; Sánchez y col., 2011).

Debido a su empleo difundido en diversas actividades industriales, el Cd emitido a la atmósfera termina impactando en el suelo y/o en las corrientes de aguas subterráneas y superficiales.

En cuanto a sus características toxicológicas, la ingesta de Cd en humanos ha sido relacionada con serias afecciones a nivel renal, hepático, pulmonar, pancreático, testicular y óseo (Martínez y col., 2013), ocasionando diversas afecciones, tales como osteoporosis, hipertensión arterial, diabetes, enfisema pulmonar y algunos tipos de cáncer como el de próstata, pulmón, vejiga y páncreas (Satarug y col., 2010).

Por otro lado, también se ha demostrado que la exposición a Cd aumenta la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) en organismos vegetales, viéndose inhibidos algunos de sus procesos fisiológicos (*e.g.*, fotosíntesis), causando clorosis de las hojas, y afectando al crecimiento y al enrollamiento foliar (Rodríguez y col., 2008)

### **I.1.2. Cobre.**

El Cu pertenece al grupo de los metales de transición, su número atómico es 29 y su peso atómico 63,54 g/mol. Es un metal relativamente abundante en la naturaleza y de bajo costo de obtención, ya que se encuentra formando parte de numerosos minerales y en diversas combinaciones con otros elementos químicos. Se conocen cerca de 165 tipos de minerales que contienen Cu. Además de ser un elemento transicional, el Cu es un metal noble, por lo tanto, posee propiedades inherentes similares a las de la plata (Ag) y el oro (Au). Entre sus características fisicoquímicas se destacan su excelente conductividad

térmica y eléctrica, maleabilidad, y resistencia mecánica y a la corrosión, lo cual lo convierte en un material muy útil para una gran variedad de aplicaciones. El Cu ha sido históricamente importante para la manufactura de herramientas, utensilios, recipientes, armas y objetos de arte. En la actualidad, se utiliza principalmente en la fabricación de componentes electrónicos, y en las instalaciones domésticas de gas y electricidad.

Como todos los metales pesados, es un elemento de elevada persistencia ambiental, capaz de bioacumularse en los organismos vivos con un elevado grado de toxicidad. Sin embargo, también es un micronutriente y, por ende, es absorbido y retenido por numerosos seres vivos (bacterias, algas), y en especial por las plantas, ya que posee un importante rol biológico en el proceso de la fotosíntesis (Molinari y col., 2015).

El Cu también contribuye a la formación de los glóbulos rojos y al mantenimiento de los vasos sanguíneos, del sistema inmunitario, de los nervios y de los huesos; por lo tanto, es un importante oligoelemento esencial para la vida humana. Existe una gran cantidad de alimentos habituales en la dieta de la población que contiene Cu, tales como ostras, mariscos, legumbres, vísceras y nueces, entre otros; además del agua potable. Por lo tanto, es muy raro que se produzca una deficiencia de este mineral en el organismo. Sin embargo, si se ingieren niveles de Cu más altos que los requeridos puede ocasionar náuseas, vómitos, calambres estomacales, diarrea e incluso la muerte (ATSDR, 2004). El desequilibrio de Cu en el organismo ocasiona una enfermedad hepática conocida como “enfermedad de Wilson”, y algunos autores han relacionado la presencia de altos niveles celulares y séricos de este mineral con el desarrollo de tumores (Lowndes y Harris, 2005). Si bien la EPA (*Environmental Protection Agency*) aún no ha clasificado al Cu en cuanto a su nivel de carcinogenicidad, existen numerosos estudios que sugieren que este metal tiene el potencial para producir cáncer en humanos (Wang y col., 2010).



### **I.1.3. Plomo**

El Pb es un elemento químico de la tabla periódica con número atómico 82 y peso atómico 207,2 g/mol. Entre los metales, probablemente sea el más ampliamente distribuido alrededor del mundo. Se lo ha encontrado en lugares tan inusuales como los hielos fósiles de Groenlandia (Jawrowski, 1968).

Este metal ha sido utilizado durante años para distintos fines debido a su resistencia a la corrosión, ductilidad, maleabilidad y facilidad para formar aleaciones (Nava Ruiz y Méndez Armenta, 2011). A pesar de que su empleo ha disminuido en muchos países del mundo, todavía es ampliamente utilizado en la industria naval, armamentista y automotriz, y para la manufactura y reciclado de baterías, enchapado y acabado de metales, entre otras aplicaciones. Por lo tanto, sigue siendo un elemento frecuente en los efluentes industriales. Además, la extracción minera todavía es una fuente importante de contaminación con Pb, ya que ocasiona su incorporación al ciclo hidrológico y su posterior transporte unido a pequeñas partículas de sedimento (Nava Ruiz y Méndez Armenta, 2011).

La toxicidad del Pb se encuentra determinada por su biodisponibilidad en el medio acuoso, la cual a su vez depende de múltiples factores tales como la composición química del agua, el nivel de salinidad, la solubilidad y el contenido de materia orgánica. En su forma libre de catión divalente, el Pb puede unirse fuertemente a los grupos sulfhidrilos de las proteínas, causando toxicidad crónica y aguda en los organismos acuáticos cuando se halla presente en suficiente cantidad (Needleman, 2004).

Particularmente, en los países subdesarrollados, todavía existen muchos reportes de casos de intoxicación por Pb, tanto en adultos como en niños, vinculados al consumo de agua contaminada. En los humanos, el Pb es capaz de afectar el sistema nervioso, renal y reproductivo, y alterar la producción de células sanguíneas y la conducta. La intoxicación por Pb se denomina “saturnismo” o “plumbosis”, y sus síntomas más

característicos se manifiestan generalmente como fatiga, dolores de cabeza, dolores musculares y de estómago, anorexia, estreñimiento y, en su fase más crítica, “cólico del Pb”, el cual se caracteriza por calambres abdominales intensos, acompañados de náuseas, vómitos y elevada presión arterial. Adicionalmente, también se ha descrito la aparición de “ribetes de Burton” sobre las encías de los pacientes, indicativo de una intoxicación crónica (Verma y Dubey, 2003).

La toxicidad por la acumulación de Pb también ha sido evidenciada en organismos vegetales. En las plantas, este metal se mueve predominantemente dentro del apoplasto de la raíz en una forma radial a través del córtex y se acumula cerca de la endodermis, la cual actúa como barrera parcial al movimiento de Pb entre la raíz y la parte aérea de las plantas. Es por ello que la acumulación de Pb suele ser mayor en la raíz que en las hojas (Jones y col., 1973; Verma y Dubey, 2003), siendo el patrón de distribución en la raíz dependiente de la concentración del metal (Seregin y col., 2004).

Los síntomas visuales más característicos de la intoxicación por Pb en las plantas consisten en una rápida inhibición del crecimiento radicular, reducción del área foliar, clorosis y aparición de manchas pardo-rojizas en los tallos, pecíolos y hojas, además de una marcada necrosis foliar (Castillo Loría y col., 2019).

#### **I.1.4. Zinc**

El Zn es un elemento químico clasificado como “metal de transición”, con número atómico 30 y peso atómico 65,38 g/mol (De la Guardia Peña y col., 2011). Se caracteriza por estar ampliamente distribuido en la naturaleza, pero no es muy abundante, ya que sólo representa el 0,012% de la corteza terrestre (Robert, 1997; Gonzáles y col., 1998). Actualmente, la mayor parte del Zn se emplea en la galvanización del hierro y del acero, así como en la manufactura de latón. Los objetos galvanizados (alambres, clavos, láminas,

etc.) se emplean en la industria automotriz, en la construcción, y como piezas de equipamientos de oficina y utensilios de cocina, entre otras aplicaciones. También se utilizan grandes cantidades de Zn en la obtención de aleaciones. En el laboratorio químico, suele utilizarse Zn en polvo como agente reductor, siendo además el óxido de Zn otro de los compuestos frecuentemente utilizado en determinaciones cuantitativas (Rubio y col., 2007).

Desde el punto de vista biológico, este metal es constituyente de más de 300 metaloproteínas y más de 2000 factores de transcripción. Su participación en el metabolismo abarca una amplia variedad de reacciones, tanto de síntesis como de degradación de casi todas las biomoléculas (De la Guardia Peña y col., 2011).

En los seres humanos, la inhalación de altas concentraciones de Zn puede causar neumonitis, entre otras afecciones de las vías respiratorias. Además, en estudios *in vitro* se ha demostrado que elevados niveles de Zn provocan apoptosis (*i.e.*, muerte celular) debido a la generación de EROs y, en segundo lugar, a la activación de cascadas de señalización moduladas por proteínas MAPK (de sus siglas en inglés, *mitogen-activated protein kinases*) (Daniels y col., 2004).

En las plantas, el Zn es un cofactor esencial para la actividad de enzimas involucradas en la producción de energía, la regulación y síntesis de proteínas, y el mantenimiento de la integridad de la membrana radicular. Además, interviene en la regulación de los procesos fotosintéticos, y en el crecimiento y la fisiología de la planta. Adicionalmente, algunos estudios han sugerido que el Zn estaría involucrado en la resistencia/tolerancia de la planta a ciertos organismos patógenos. Los síntomas de toxicidad por Zn en los organismos vegetales incluyen principalmente clorosis y reducción del crecimiento; ya que actúa inhibiendo la fijación de CO<sub>2</sub>, el transporte de hidratos de carbono en el floema y alterando

la permeabilidad de la membrana celular (Efroymsen y col., 1997; Marschner, 1998; Haslett y col., 2001).

### I.1.5. Contaminación del agua por metales pesados

La industria metalúrgica tiene un rol central en el desarrollo económico de los países debido a su articulación con el resto de la economía. Sin embargo, su creciente actividad es también responsable de la mayoría de los daños a los ecosistemas acuáticos ocasionados por la acumulación de metales tóxicos (Cirtina y col., 2016).

Se estima que valores cercanos a los 109 kg/año de metales traza se depositan en la hidrósfera provenientes de diversas fuentes tales como aguas residuales industriales y domésticas, plantas térmicas, fundiciones y aceras (El Mai, 2013). La Tabla 1 muestra un resumen de las principales actividades generadoras de metales pesados.

**Tabla 1.** Principales actividades generadoras de metales pesados

<b>ACTIVIDAD</b>	<b>METALES</b>	<b>PROCESO Y CONTAMINACIÓN DERIVADA</b>
Aleaciones y aceros	Te, Pb, Ni, Cu, Zn, Cd, As, Mo, U	Fabricación, eliminación y reciclaje de metales. Relaves y escoriales. Contaminación aguas y suelo.
Agricultura y Ganadería	Cd, Cr, Mo, Pb, U, V, Zn, As, Mn, Cu	Producción de agroquímicos. Contaminación de escorrentía, aguas superficiales y subterráneas. La bioacumulación en vegetal y animal.
Baterías	Pb, Sb, Zn, Cd, Ni, Hg	Fluido residual de la pila, la contaminación de aguas subterráneas y del suelo.
Corrosión metálica	Fe, Pb, Ni, Co, Zn	Inestabilidad de los metales expuestos al medio ambiente.

Electrónica	P, Cd, Hg, Pt, Au, Cr, As, Ni, Mn	Residuos metálicos acuosos y sólidos desde el proceso de fabricación y reciclaje. Contaminación atmosférica e hídrica.
Extracción de minerales	As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	Presencia en las menas como subproductos. Contaminación de las aguas superficiales, subterráneas y del suelo.
Fundición	Pb, As, Cd, Tl	Procesado de mineral para obtención de metales. Contaminación atmosférica. Residuos sólidos.
Galvanoplastia	Cr, Ni, Zn, Cu	Los efluentes líquidos de procesos de recubrimiento. Contaminación hídrica.
Gestión de residuos	Zn, Cu, Cd, Pb, Ni, Cr, Hg, Mn	Incineración de residuos o en lixiviados. Contaminación atmosférica de las aguas superficiales, subterráneas y del suelo.
Hidrocarburos	As, Cu, Cr, Fe, Hg, Ni, Pb, Ag, Mn	Proceso de exploración, explotación y refinería generando contaminación de las aguas superficiales, subterráneas y del suelo.
Metalurgia	Cu, Cr, Mn Zn, P, S	Procesado térmico de metales. Contaminación atmosférica.
Minería de metales ferrosos	Cd, Cu, Ni, Cr, Co, Zn	Drenaje ácido de mina, relaves, escombreras, generación de lodos.
Pinturas y pigmentos	Pb, As, Cr, Zn, Ti, Ba	Residuos acuosos procedentes de la fabricación y el deterioro de la pintura vieja.
Servicios y otras actividades	Cd, Cr, Hg, Ag, Pb, Zn, Sn, Fe, Ni, Mo, V, Mn, Co	Atención a servicios de salud. Pompas fúnebres y actividades relacionadas.

**Nota:** Adaptado de “*Tratamientos para la remoción de metales pesados comúnmente presentes en aguas residuales industriales. Una revisión.*”, de Caviedes Rubio y col. (2015). *Ingeniería y Región*, 13, 73-90

La contaminación del agua por metales pesados afecta drásticamente la seguridad alimentaria y la salud pública (Huang, 2014; EFSA, 2015). Numerosos estudios han

reportado la presencia de metales y metaloides (entre ellos, Hg, As, Pb, Cd, Zn, Ni y Cr) en diversas hortalizas como lechuga, repollo, calabaza, brócoli y papa (Sing, 2010; Chen y col., 2013). A nivel global, se han reportado casos que dan cuenta de las afecciones en la salud por causa del consumo de alimentos contaminados con metales pesados (Sánchez, 2010). Uno de los casos más relevantes ocurrió en Japón, en los años 50', en donde la población ubicada en las riberas del río Jintsu, aguas abajo de una zona minera, se vio severamente afectada por el consumo de arroz proveniente de cultivos contaminados con Cd procedente de los vertimientos de las minas. Esta ingesta produjo una enfermedad conocida como *Itai-Itai* (i.e., osteoartritis) que afecta principalmente al tejido óseo (Sánchez, 2010).

#### **I.1.6. Legislación vigente**

En la República Argentina existen diferentes marcos regulatorios que definen parámetros de calidad de aguas de consumo y residuales con el fin de establecer parámetros que protejan la salud de los habitantes y de los ecosistemas. Entre ellas, la Ley 18.284 del *Código Alimentario Argentino* (COA), en sus artículos 982, 983 y 985, establece el contenido de metales en el agua potable para la alimentación y el uso doméstico (sea ésta de suministro público o envasada de origen subterráneo), definiendo las siguientes concentraciones máximas para los metales objeto del presente estudio:

**Cadmio (Cd):** máximo 0,01 mg/L

**Cobre (Cu):** máximo 1,0 mg/L

**Plomo (Pb):** máximo 0,05 mg/L

**Zinc (Zn):** máximo 5,0 mg/L

Adicionalmente, la Resol. N°1089/82 de la *Dirección de Obras Sanitarias* de la Provincia de Santa Fe, reglamenta los parámetros físico-químicos de vuelco que deben cumplir los

líquidos residuales en función del tipo de colectora (*e.g.*, cloacal, desagüe de conducto pluvial abierto o cerrado, curso de agua superficial, pozos o campos de drenaje, etc.), de la distancia de la toma de agua, y de la dilución del efluente en el cuerpo de agua receptor. Para el caso de los metales pesados objeto del presente estudio, sus concentraciones límites varían entre los siguientes márgenes:

**Cadmio (Cd):** 0,02-0,15 mg/L

**Cobre (Cu):** 0,40-1,50 mg/L

**Plomo (Pb):** 0,10-0,45 mg/L

**Zinc (Zn):** 5,0-10,0 mg/L

Es interesante notar que en ambas legislaciones las concentraciones permitidas de estos metales siguen el orden: Cd<Pb<Cu<Zn, en estricta correlación con su grado de toxicidad hacia los sistemas biológicos. Por otro lado, los bajos niveles admitidos para Cd y Pb son consistentes con su inclusión en la lista de los diez productos químicos de mayor preocupación para la salud pública según la *Organización Mundial de la Salud* (WHO, 2010). En este contexto, es esperable que los tratamientos diseñados para recuperar aguas contaminadas con metales pesados sean lo suficientemente efectivos para lograr valores residuales de estos químicos en aguas que se ajusten a los límites establecidos por las leyes vigentes.

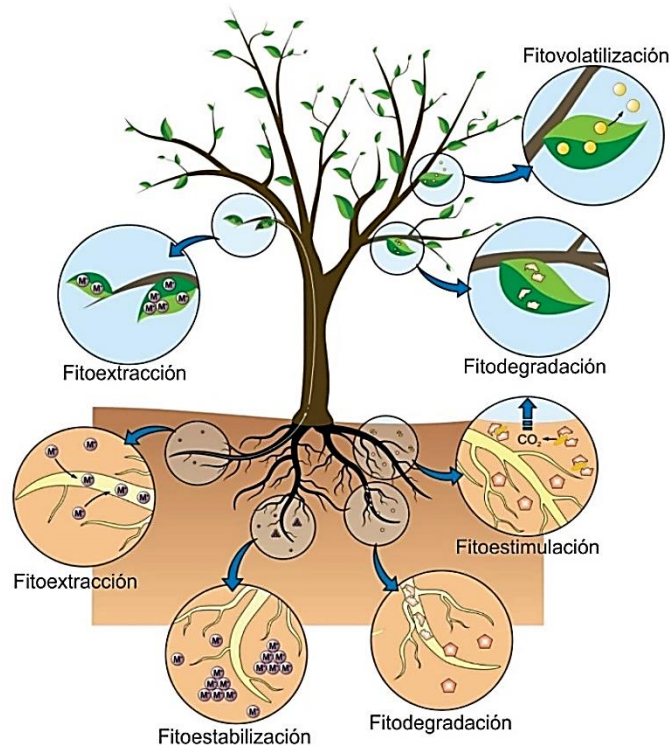
## **I.2. Fitorremediación**

La fitorremediación (*phyto*, planta; *remedium*, limpiar o restaurar) es una de las técnicas más tradicionales de biorremediación, la cual consiste en el uso de plantas vasculares para remover, transferir, estabilizar y/o transformar contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en suelos y aguas, y que ha demostrado ser práctica, económica y eficiente para

un importante número de aplicaciones (Delgadillo y Gonzáles, 2011; Marrero y col., 2012; Andreatza y col., 2015).

La principal ventaja de esta biotecnología es que no utiliza reactivos químicos peligrosos (Carpenta y Bernal, 2007). Adicionalmente, los sistemas de tratamiento basados en el uso de plantas implican en general un bajo costo de implementación, siendo a su vez apropiados para descontaminar grandes volúmenes y/o superficies.

La fitorremediación incluye diferentes bioprocesos, tales como *fitoextracción*, *rizofiltración*, *fitoestabilización*, *fitodegradación*, *rizodegradación* y *fitovolatilización* (Bernal Figueroa, 2014). En la Fig. 1 se muestra un esquema de dichos procesos, y se describen muy brevemente a continuación:



**Fig. 1.** Procesos involucrados en la fitorremediación de contaminantes químicos

- *Fitoextracción*: este fenómeno, también conocido como *fitoacumulación* o *fitoabsorción*, consiste en la captación de contaminantes por las raíces de las plantas,



seguido de su translocación y posterior acumulación en las partes aéreas. Se aplica principalmente para la eliminación de metales pesados, pero también puede ser utilizado para otros elementos químicos (radionucleídos) y compuestos de tipo orgánico. Usualmente se implementa mediante el uso de plantas clasificadas como *metalófitas* o *hiperacumuladoras*, las cuales tienen la capacidad de almacenar altas concentraciones de metales en sus partes aéreas (Rascio y Navari-Izzo, 2011). En general, luego de varias semanas de ser utilizadas para la eliminación de metales pesados, estas plantas son cosechadas e incineradas, y sus cenizas tratadas como residuos peligrosos.

- *Rizofiltración*: la *rizofiltración* o *fitofiltración* implica la adherencia o adsorción superficial de los contaminantes en las raíces de las plantas mediante la formación de quelatos y/o su precipitación química.
  
- *Fitoestabilización*: en este caso se utilizan especies vegetales que desarrollan un denso sistema radicular que inmoviliza a los contaminantes, reduciendo su movilidad y biodisponibilidad por medio de mecanismos físicos de secuestro, evitando así su migración y diseminación en la cadena trófica.
  
- *Fitodegradación*: este fenómeno, también conocido como *fitotransformación*, consiste en aprovechar la capacidad enzimática de las plantas para la degradación de xenobióticos. En este caso, la ruptura de los contaminantes ocurre mediante la acción de enzimas especializadas, generando metabolitos secundarios que pueden ser luego absorbidos por las mismas plantas, retenidos en vacuolas para ser utilizados como nutrientes, o degradados bioquímicamente a productos menos perjudiciales. En

general, este método se limita principalmente al tratamiento de la contaminación con sustancias de tipo orgánico (por ej., hidrocarburos, plaguicidas, detergentes, compuestos clorados, entre otros) ya que estos compuestos pueden ser potencialmente biodegradables.

- *Rizodegradación*: la *rizodegradación* o *fitoestimulación* se refiere a la descomposición de contaminantes orgánicos a causa de los microorganismos presentes en la rizósfera, ya que los exudados de las raíces pueden estimular el crecimiento de microorganismos capaces de mineralizar contaminantes a través de sus actividades metabólicas. Estos exudados contienen carbohidratos, aminoácidos y flavonoides que proporcionan fuentes de carbono y nitrógeno, creando un ambiente rico en nutrientes, propicio para la estimulación de la actividad metabólica de los microorganismos del suelo.
- *Fitovolatilización*: algunas plantas tienen la capacidad de volatilizar contaminantes orgánicos e inorgánicos (tales como mercurio y selenio), convirtiéndolos en sustancias menos tóxicas que el compuesto parental. En este proceso, las plantas captan contaminantes del suelo o de las aguas a través de sus raíces, desde donde son transportados hacia las partes aéreas para ser degradados en sustancias volátiles que luego son liberadas al ambiente mediante la transpiración vegetal.

### **I.2.1. Mecanismos de eliminación de contaminantes**

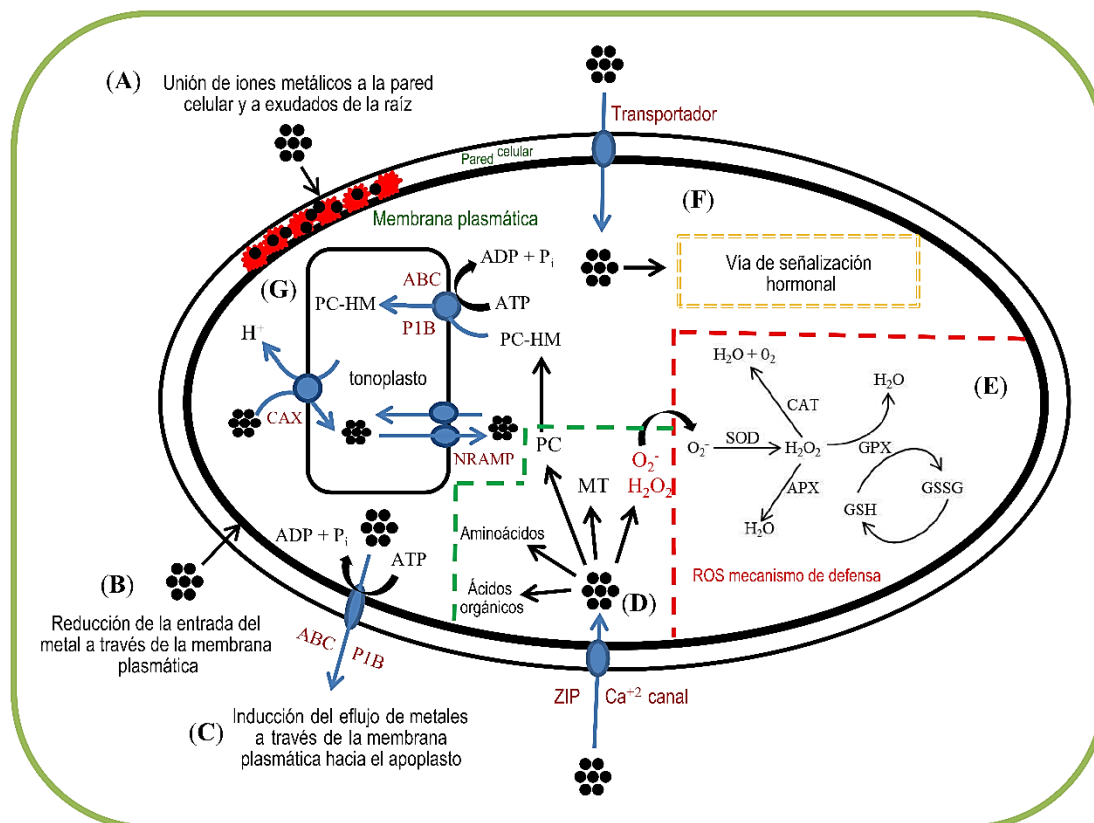
El entendimiento de las estrategias fisiológicas y/o moleculares que adoptan las plantas para lidiar con el estrés generado por la exposición a metales tóxicos es de suma importancia para los estudios de fitorremediación. Estos mecanismos son los que deciden, en gran medida, la eficiencia y el éxito de un sistema de tratamiento basado en la

utilización de plantas acumuladoras para eliminar iones metálicos (Maestri y col., 2010; Anjum y col., 2015).

Entre las distintas estrategias de defensa que utilizan las especies vegetales para lidiar con el estrés metálico (Fig. 2) se encuentran procesos de exclusión, compartimentalización, formación de complejos y síntesis de proteínas de unión a iones metálicos (Clemens, 2001; Seth y col., 2012; Bolan y col., 2014). En particular, la quelación o formación de complejos es el mecanismo intracelular más frecuentemente utilizado por las plantas para el mantenimiento de bajas concentraciones de metales libres en el citoplasma, y para su desintoxicación. Este proceso se realiza, principalmente, mediante el empleo de compuestos que contienen grupos sulfhidrilo/tiol, tales como el tripéptido glutatión (GSH) y proteínas de la familia de las fitoquelatinas (PC) y metalotioneínas (MT); y en menor medida, por compuestos no-tioles como ácidos orgánicos y aminoácidos (Clemens, 2001; Seth y col., 2012; Anjum y col., 2015).

En general, en la fitorremediación de contaminantes se pueden definir principalmente dos procesos: *adsorción* y *bioacumulación*. El primero (*i.e.*, *adsorción*) es un proceso rápido y reversible que ocurre en las raíces, desde donde luego los contaminantes son translocados y dirigidos hacia otras partes de la planta. En el caso de los metales, la adsorción se produce a través de diferentes interacciones que ocurren entre los iones metálicos y distintos grupos funcionales cargados negativamente que se encuentran en las proteínas, lípidos y carbohidratos presentes en la pared celular de las células vegetales.

Por su parte, la *bioacumulación* es un proceso más lento e irreversible que implica el secuestro y la retención intracelular del contaminante en las partes aéreas de la planta (Maestri y col., 2010).



**Fig. 2.** Representación esquemática celular de los diferentes sistemas de defensa que utilizan las plantas expuestas a metales/metaloideos. Las respuestas de las plantas a los metales pesados incluyen: (A) unión de iones metálicos a la pared celular y a exudados de la raíz; (B) reducción de la entrada del metal a través de la membrana plasmática; (C) inducción del eflujo de metales a través de la membrana plasmática hacia el apoplasto mediado por transportadores ATP-dependientes; (D) quelación de metales pesados (HM) en el citosol por ligandos específicos como fitoquelatinas (PC), metalotioneínas (MT), ácidos orgánicos y aminoácidos; (E) inducción de sistemas de defensa antioxidantes (SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, APX: ascorbato peroxidasa, GPX: glutatión peroxidasa, GSH: glutatión reducido y GSSG: glutatión oxidado); (F) vías de señalización hormonal. Las hormonas vegetales (etileno, ácido jasmónico, ácido abscísico, etc.) están implicadas en muchos procesos fisiológicos y de desarrollo de la planta, y desempeñan un papel crucial en la adaptación al estrés abiótico (como, por ejemplo, el ocasionado por la presencia de metales); (G) compartimentalización en vacuolas intracelulares. Nota: los iones metálicos se muestran como puntos negros. Figura tomada con permiso de Tello Zevallos (2016).

### I.2.2. Cinética de eliminación de contaminantes en procesos de fitorremediación.

A partir de los estudios cinéticos se pueden caracterizar las diferentes etapas o procesos por medio de los cuales un contaminante es eliminado de su entorno.

Para una reacción general del tipo:



, la ley de velocidad está dada por la siguiente ecuación:

$$v = - \frac{d[A]}{dt} = - \frac{d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} = k [A]^{\rho_A} [B]^{\rho_B}$$

, donde A y B representan los reactivos, C el producto,  $t$  es el tiempo,  $k$  es la constante de velocidad de la reacción y  $\rho$  es el orden de reacción respecto a cada uno de los reactivos, es decir, los órdenes parciales para A y B. La suma de los órdenes parciales da como resultado el orden total de la reacción, el cual permite comprender la dependencia de ésta con las concentraciones de los reactivos. Así, existen reacciones de *orden cero*, en las cuales la velocidad no depende de la concentración de los reactivos; reacciones de *primer orden*, cuya velocidad se relaciona de manera lineal con la concentración de uno de los reactivos; reacciones de *segundo orden*, en donde se pueden presentar dos casos: *i*) la reacción tiene un único reactivo con una velocidad de reacción que depende del cuadrado de su concentración o, *ii*) la reacción posee dos reactivos y la velocidad depende de manera lineal con cada uno de ellos; y así sucesivamente para órdenes superiores.

El orden se establece de manera empírica graficando la concentración del analito en función del tiempo y determinando matemáticamente la ecuación que mejor se ajusta a los datos experimentales.

En los estudios de fitorremediación generalmente se considera que el biosorbente (*i.e.*, la plantas) se encuentra en exceso y, por lo tanto, lo que se determina es el orden de la reacción respecto al contaminante. Cuando se llevan a cabo estudios de eliminación de metales pesados, por lo general, se encuentra que las cinéticas más comunes para estos procesos son de *primer* o de *segundo* orden (Tello Zevallos y col., 2018).

a. Modelo de cinética de primer orden:

$$-\frac{dC}{dt} = K_1 C$$

Esta expresión matemática se resuelve en su forma lineal como:

$$\ln C = -t K_1 + \ln C_0$$

Donde,  $C_0$  y  $C$  son los valores de la concentración del contaminante (mg/L) en la columna de agua a tiempo cero y a tiempo  $t$ , respectivamente;  $K_1$  es la constante de velocidad ( $\text{h}^{-1}$ ) y  $t$  es el tiempo (h).

b. Modelo de cinética de segundo orden:

$$\frac{dC}{dt} = -K_2 C^2$$

Esta expresión matemática se resuelve en su forma lineal como:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + K_2 t$$

Donde,  $C_0$  y  $C$  son los valores de la concentración del contaminante (mg/L) en la columna de agua a tiempo cero y a tiempo  $t$ , respectivamente;  $K_2$  es la constante de velocidad ( $\text{L mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) y  $t$  es el tiempo (h).

### **I.3. *Salvinia* sp.**

Dentro de las numerosas especies vegetales estudiadas en sistemas acuáticos por su capacidad para eliminar metales pesados se encuentran los helechos acuáticos del género *Salvinia* (Dhir, 2009). Este género integra unas 10 especies de macrófitas de flotación libre ampliamente distribuidas a nivel mundial. En Argentina, es posible encontrar 4 especies del género: *Salvinia minima* Baker, *Salvinia adnata*, *Salvinia auriculata* Aublet y *Salvinia biloba* Raddi (también conocida como *Salvinia herzogii*) (Martínez y Cacharani, 2011).

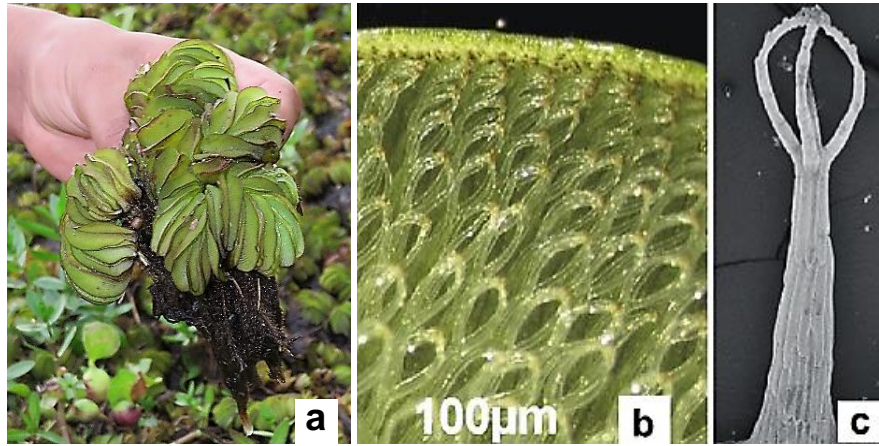
Todas las especies de *Salvinia* se caracterizan por encontrarse en aguas dulces, ricas en nutrientes, y preferentemente en zonas bajas (Salas Pascual y Quintana Vega, 2016).

Por su implicancia para los fines de la presente investigación, a continuación se describe en detalle la especie *Salvinia biloba* Raddi.

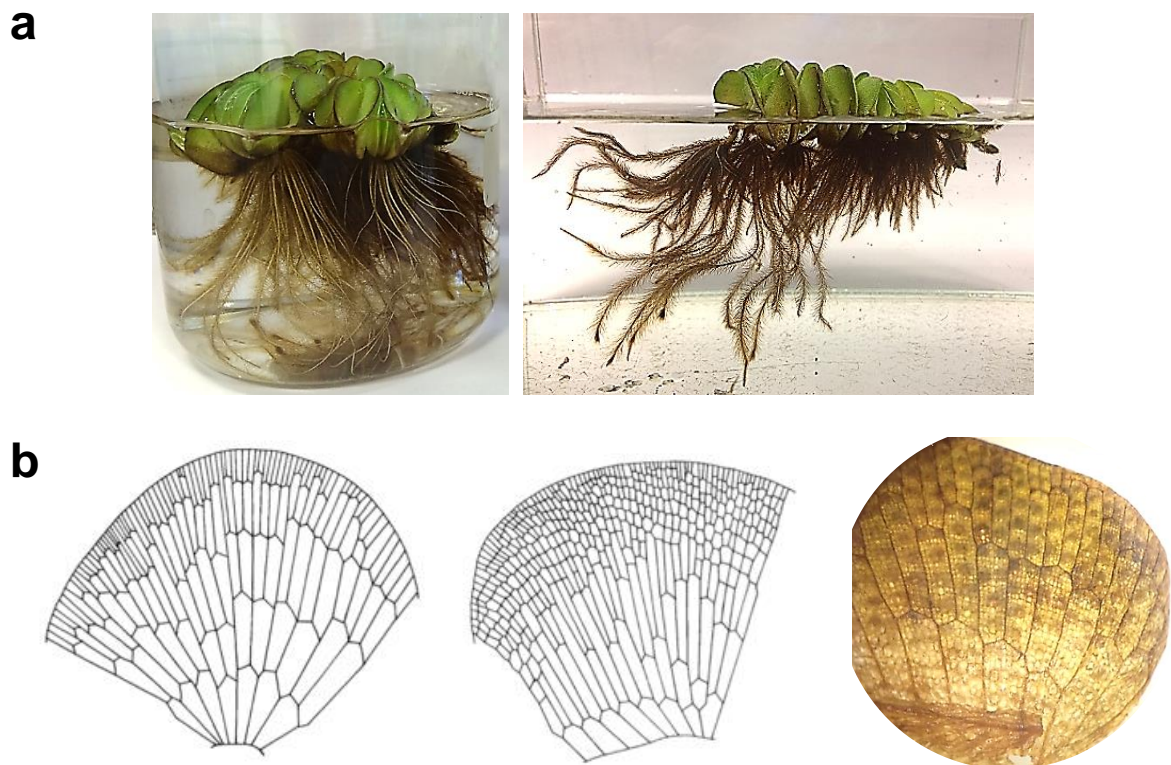
### **I.3.1. *Salvinia biloba* Raddi.**

*Salvinia biloba* Raddi (*S. biloba*) es una de las especies del género *Salvinia* que se encuentra más ampliamente distribuida en la República Argentina. Conocida popularmente como “acordeón de agua”, esta especie se ubica morfológicamente dentro del complejo *auriculata*, el cual incluye también a las especies *S. auriculata* Aublet y *S. molesta* D.S. Mitchel (Salas Pascual y Quintana Vega, 2016). Los individuos de este grupo poseen frondas dispuestas en verticilos de tres, dos de ellas flotantes y enteras (hojas), y la tercera sumergida y dividida en numerosas lacinias filiformes que realizan la función de una raíz (Fig. 3 a y Fig. 4 a), siendo característico del complejo *auriculata* la presencia de papilas con 4 pelos (tricomas) unidos en sus extremos que dan lugar a una estructura muy característica semejante a la de un “batidor de huevos” (Fig. 3 b,c). Además, todos los especímenes de *S. biloba* se caracterizan por poseer un órgano sumergido con un eje primario bien desarrollado, robusto, de 4-7 mm de largo y 1-2 mm de ancho, con 10-30 ejes secundarios pilosos, simples o ramificados de 10-15 cm de longitud y 1,2-1,6 mm de diámetro, cuyo solenostela presenta forma de “U”. Sus láminas u hojas flotantes son de forma bilobada, plegadas, y levemente pecioladas, con lóbulos que se extienden entre los 12-45 mm de largo a los 6-30 mm de ancho (Fig. 4 a). La cara superior (adaxial) se muestra papilosa con tricomas de 90-100 µm de longitud por 40-50 µm de ancho, unidos en el extremo (Fig. 3 b,c), mientras que su cara inferior (envés) es pilosa con tricomas

aciculares de 1-3 mm de longitud y venación anastomosada (Fig. 4 b) (De la Sota, 1962; De la Sota, 1976; De la Sota, 1995; Martínez y Cacharani, 2011).



**Fig. 3.** *S. biloba*. a) aspecto general de la planta (fotografía propia); b) papilas con tricomas; c) tricomas unidos en el extremo adoptando la forma característica de “batidor de huevos”. Fotografías b) y c) adaptadas de Koch y col. (2009).



**Fig. 4.** a) Fotografía representativa de un espécimen de *S. biloba* donde se aprecia el órgano sumergido (lacínias) con los ejes secundarios ramificados de entre 10-15 cm de longitud y sus hojas flotantes (frondas) bilobadas y levemente plegadas. b) *Izquierda*: esquema del patrón de venación característico en las frondas de *S. biloba*. *Derecha*: fotografía del patrón de venación en los especímenes utilizados en la presente investigación.



### **I.3.2. Estudios de eliminación de metales pesados utilizando *S. biloba*.**

Si bien son numerosos los trabajos que han demostrado que el género *Salvinia* posee un excelente potencial para ser utilizado en el saneamiento de aguas contaminadas con metales tóxicos, pocos estudios se han concretado en la Argentina con las especies autóctonas que crecen en las condiciones ambientales locales y, en particular, con especímenes de *S. biloba*.

Entre ellos, [Maine y col. \(2001\)](#) estudiaron la capacidad de macrófitas pertenecientes a esta especie para acumular  $Cd^{2+}$  durante los meses más fríos del año (Junio, Julio y Agosto, para el hemisferio Sur), enfrentando especímenes locales de *S. biloba* a 1 mg/L de este metal. Estos autores observaron una tasa de acumulación de  $Cd^{2+}$  del 84% en un periodo de 21 días, demostrando que el mayor porcentaje de acumulación ocurrió durante las primeras 24 h.

En un estudio posterior, [Maine y col. \(2004\)](#) evaluaron la capacidad de *S. biloba* para eliminar Cr(III) analizando la distribución del metal en la parte aérea (frondas) y en las raíces (lacinias) de las plantas, respecto al tiempo de exposición (0-31 días). Estos autores concluyeron que *S. biloba* también fue eficiente para remover Cr(III) en un rango de concentraciones comprendido entre 1 a 6 mg/L. Adicionalmente, demostraron que el mecanismo de acumulación de Cr(III) en *S. biloba* cursó en dos etapas, una rápida y otra lenta. La adsorción del metal a la raíz fue el proceso más rápido, completándose en las primeras 24 h; mientras que la etapa lenta implicó la translocación del metal al interior de las células vegetales y, más tardíamente, su transporte hacia las hojas.

En un estudio análogo, [Paris y col. \(2005\)](#) evaluaron la eficiencia de eliminación de Cr(III),  $Cd^{2+}$  y  $Pb^{2+}$  en *S. biloba* y *Pistia stratiotes* cultivadas en presencia de 1 mg/L de cada ión en forma independiente, y en una mezcla (sistema mixto) conteniendo los tres metales en igual concentración (1 mg/L de cada metal). Nuevamente, el proceso de

biosorción para Cr(III), Cd<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> se completó en 24 h. Sin embargo, *S. biloba* presentó una mayor tasa de acumulación total de los tres metales (sumando los valores hallados en raíces y en hojas) respecto al alcanzado por *P. stratiotes*. En ambas especies, se evidenció que el contenido de metales en las raíces fue siempre superior al encontrado en las hojas. Notablemente, los metales combinados disminuyeron la tasa de crecimiento de las dos especies, probablemente a causa de un efecto citotóxico sinérgico, pero sin afectar el proceso de acumulación.

Posteriormente, [Suñé y col. \(2007\)](#) estudiaron los procesos de bioacumulación de Cr(III) y Cd<sup>2+</sup> en *S. biloba* y *P. stratiotes*, demostrando que la eliminación de Cd<sup>2+</sup> fue significativamente diferente para las dos especies vegetales, mientras que no se encontraron diferencias significativas en la bioacumulación de Cr(III). Por otro lado, estos autores observaron que los procesos más importantes en la acumulación de Cd<sup>2+</sup> por *S. biloba* fueron de tipo biológico, mientras que en *P. stratiotes* predominaron mecanismos fisicoquímicos como la adsorción superficial, la quelación y el intercambio iónico.

Por su parte, [Hadam y col., \(2007\)](#) evaluaron el efecto de la adición de nutrientes (H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>Cl) en la tolerancia de *S. biloba* a Zn, Ni y Cr(III), concluyendo que la presencia de fuentes de nitrógeno y fósforo adicionales aumentó la resistencia de estas macrófitas a la intoxicación por metales pesados. Asimismo, estos autores demostraron que la tasa de eliminación de Zn, Ni y Cr(III) mejoró en presencia de los nutrientes, principalmente debido a un aumento en la producción de biomasa lo que conlleva a un incremento en la captación de metales por la presencia de una mayor cantidad de sitios activos. Además, fue notoria la preservación de la apariencia general de las plantas en presencia de los nutrientes, indicativo de una actividad biológica más conservada.

Recientemente, [Freitas y col. \(2018\)](#) evaluaron la acumulación de  $\text{Cu}^{2+}$  en especímenes de *S. biloba* sometidos a diferentes concentraciones del metal (1, 3 y 5 mg/L), y en diferentes intervalos de tiempo (0, 7 y 14 días). Los resultados obtenidos por estos autores demostraron que *S. biloba* es capaz de hiperacumular  $\text{Cu}^{2+}$  en su biomasa, variando significativamente esta capacidad en función de la concentración inicial del metal. Los niveles más altos de  $\text{Cu}^{2+}$  acumulado (11861  $\mu\text{g/g}$ ) se observaron a los 14 días de tratamiento con 5 mg/L del metal, concluyendo que esta especie también sería adecuada como agente de remediación en ecosistemas acuáticos impactados con  $\text{Cu}^{2+}$ .

Por su parte, [Tello Zevallos y col. \(2018\)](#), demostraron una gran capacidad para eliminar altas concentraciones de  $\text{Pb}^{2+}$  en especies nativas de *S. biloba* aisladas de humedales naturales locales. En este trabajo, *S. biloba* demostró una elevada eficiencia de remoción (>90%) en 24 h para todas las concentraciones de  $\text{Pb}^{2+}$  ensayadas (4,8±0,3 mg/L; 9,1±0,4 mg/L y 19,6±0,5 mg/L), sin evidenciar síntomas de toxicidad. Además, a partir del cálculo de los factores de bioconcentración, adsorción y acumulación intracelular, estos autores concluyeron que *S. biloba* puede definirse como una especie hiperacumuladora de  $\text{Pb}^{2+}$ , donde la adsorción radicular es el principal mecanismo involucrado en la eliminación de este contaminante.

Más recientemente, [Castillo Loría y col. \(2019\)](#) estudiaron la capacidad de remoción de  $\text{Pb}^{2+}$  en un periodo de 10 días, enfrentado diariamente especies nativas de *S. biloba* a muestras de agua contaminadas artificialmente con diferentes concentraciones de  $\text{Pb}^{2+}$  (1,88±0,15 mg/L; 2,65± 0,07 mg/L; 12,62±0,02 mg/L y 30,57±0,01 mg/L). Estos autores demostraron, por primera vez, la capacidad de *S. biloba* para mantener una elevada eficiencia de remoción de  $\text{Pb}^{2+}$  en condiciones de estrés continuo, siendo esta capacidad dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al metal. En tales condiciones, los parámetros fisiológicos de *S. biloba* se vieron notablemente afectados, tanto a nivel de

las raíces (lacinias) como de las hojas (frondas); siendo el grado de deterioro de las raíces superior al de las hojas. Estos resultados indicarían una mayor implicancia de los órganos sumergidos de la planta en el proceso de remoción de  $Pb^{2+}$ .

Si bien, todos estos antecedentes respaldan el empleo de *S. biloba* como herramienta eficaz para la fitorremediación de aguas contaminadas con metales tóxicos, aún son necesarios más estudios que ahonden en los mecanismos y capacidades que ofrecen especies locales de *S. biloba* para eliminar diferentes iones metálicos.

Asimismo, el grado de afectación provocado por el estrés metálico, su relación con los parámetros fisiológicos y su implicancia en la capacidad fitorremediadora de *S. biloba* aún no han sido profundamente explorados.

Por lo tanto, vemos importante avanzar en el entendimiento de estos mecanismos y en la respuesta metabólica de *S. biloba* frente a la acción de diferentes metales pesados con distinto grado de toxicidad, con el fin de adecuar el diseño de fitotecnologías, que hagan uso de especies autóctonas locales, al tratamiento de cuerpos de aguas residuales fuertemente contaminados con la presencia de metales pesados.

## II. OBJETIVOS

### II.1. Objetivo General

Caracterizar la respuesta fisiológica de especies locales de *Salvinia sp.*, obtenidas de ambientes naturales autóctonos, frente al estrés abiótico provocado por la exposición a diferentes metales pesados, así como su relación con la eficiencia del proceso de fitorremediación.

### II.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar, a lo largo del tiempo (0-48 h), la tasa de remoción de diferentes concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$  en aguas contaminadas artificialmente, tratadas con especímenes locales de *S. biloba*.
- Realizar estudios de compartimentalización en la biomasa vegetal con el fin de analizar los distintos mecanismos (adsorción y acumulación) involucrados en la eliminación de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$  por *S. biloba*.
- Evaluar el estado toxicológico de las plantas luego de 48 h de exposición a diferentes concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$  mediante la cuantificación de parámetros bioquímicos y fisiológicos.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. Recolección del material vegetal.

Los especímenes de *S. biloba* se colectaron en 3 etapas (durante los meses de Febrero, Marzo y Abril de 2019) a orillas de una laguna localizada en el parador conocido como “Isla Verde”, ubicado entre la playa de “La Florida” y la cabecera del puente Rosario-Victoria (latitud 32°52’35” Sur y longitud 60°40’33” Oeste, Entre Ríos, Argentina), en analogía con las muestras vegetales utilizadas en investigaciones previas del grupo de trabajo (Tello Zevallos y col, 2018, Castillo Loría y col, 2019). Los mismos se colectaron en un recipiente plástico, junto con agua del sitio para mantener las características de su ambiente. Luego, se trasladaron a la planta piloto de la Facultad de Química e Ingeniería del Rosario (UCA), donde fueron lavados con abundante agua de grifo (con el objetivo de retirar insectos y otros tipos de agentes externos) y conservados a temperatura ambiente en peceras de vidrio con agua potable y en condiciones de aireación (Fig. 5).



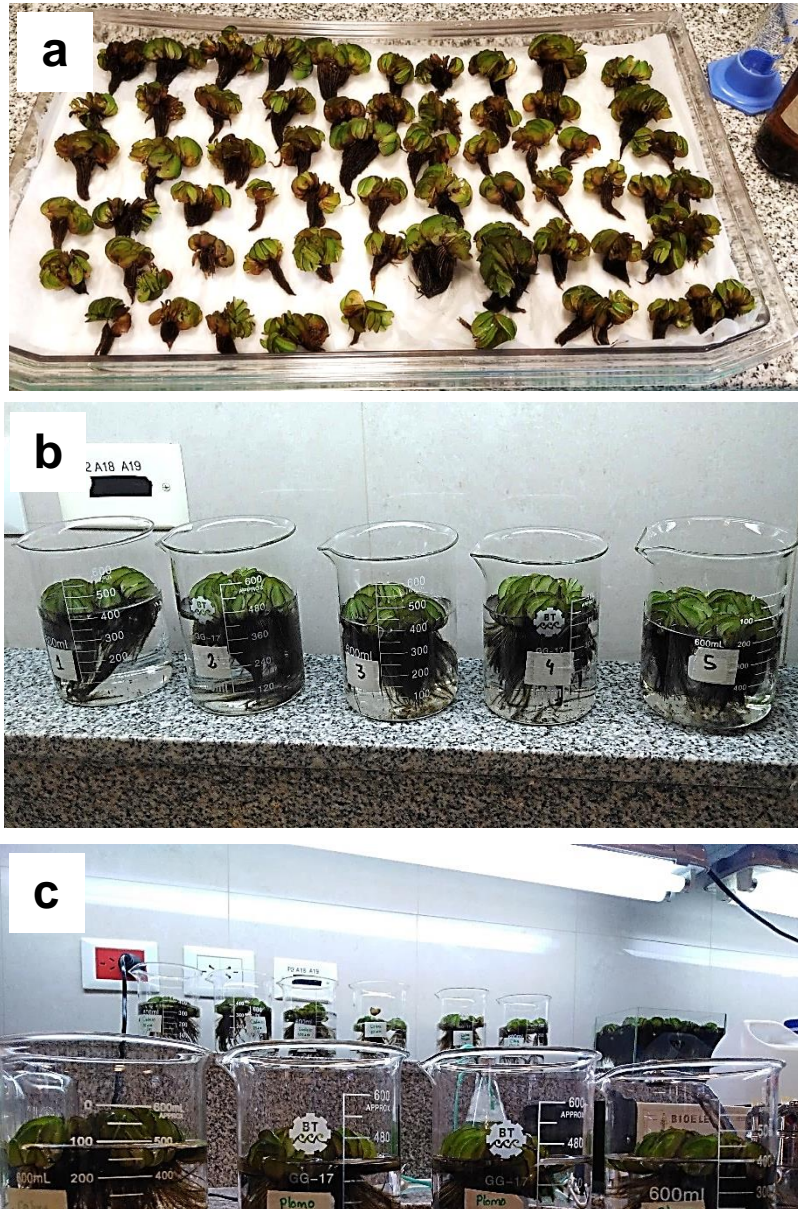
**Fig. 5.** *Izquierda:* laguna natural donde fueron recolectados los especímenes autóctonos de *S. biloba* utilizados en la presente investigación. *Derecha:* peceras utilizadas para el mantenimiento y aclimatación de las macrófitas seleccionadas (Planta Piloto, Facultad de Química e Ingeniería del Rosario, UCA).

### III.2. Preparación de soluciones *stock* de metales pesados.

Las soluciones *stock* de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  se prepararon por dilución de un patrón comercial para absorción atómica (1000 mg/L, SCP Science, Quebec, Canadá). Las soluciones de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  se obtuvieron por pesada y posterior disolución de las respectivas drogas sólidas:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina) y  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina). En todos los casos, se preparó una “solución madre” de concentración 1 mM para cada metal en agua desionizada, y se ajustó el valor de pH a  $6,0 \pm 0,2$  mediante el agregado de ácido clorhídrico (HCl 4N) o hidróxido de sodio (NaOH 6N), empleando un pH-metro digital AD1030 (Adwa, Rumania). Posteriormente, se realizaron diluciones pertinentes en un volumen final de 0,5 L para obtener concentraciones finales de cada metal correspondientes a  $50 \pm 2$  y  $100 \pm 1$   $\mu\text{M}$ .

### III.3. Determinación de la capacidad fitorremediadora de *S. biloba*.

La capacidad de *S. biloba* para remover metales pesados se evaluó en muestras de agua contaminadas artificialmente con  $50 \pm 2$  o  $100 \pm 1$   $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ , de manera independiente. El material vegetal seleccionado fue lavado con abundante agua desionizada para eliminar posibles restos de residuos interferentes, y escurrido durante 15 min. sobre papel absorbente en bandejas de plástico con una inclinación de  $45^\circ$  para facilitar la eliminación del exceso de agua (Fig. 6 a). Finalizado este tiempo, se procedió a pesar 10,0 g de biomasa, y se la agregó sobre 0,5 L de solución (agua ultra pura para el grupo “Control” o solución de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$  para los tratamientos). En cada ensayo, se utilizaron 5 unidades experimentales compuestas por el grupo “Control” y los diferentes tratamientos con cada uno de los metales pesados a igual concentración ( $50 \pm 2$  ó  $100 \pm 1$   $\mu\text{M}$ ), con el fin de poder efectuar estudios comparativos por lotes (Fig. 6 b).



**Fig. 6.** a) Preparación del material vegetal. b) Unidades experimentales utilizadas en los estudios comparativos por lotes. c) Fotografía representativa del modo de incubación de los distintos sistemas bajo condiciones controladas de luz/oscuridad.

Los estudios se llevaron a cabo incubando los diferentes grupos experimentales a temperatura ambiente, bajo luz blanca, controlando el fotoperíodo de luz/oscuridad ( $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 14 h luz y 10 h oscuridad) durante 48 h (Fig. 6 c). Paulatinamente, se tomaron muestras de la columna de agua a las 0, 2, 4, 6, 10, 24 y 48 h, con el objetivo de evaluar la cantidad de metal remanente por espectroscopia de absorción atómica (EAA) empleando



un equipo Varian® AA240FS (Varian Inc., Estados Unidos). Previamente a las determinaciones, se realizaron curvas de calibración con soluciones testigo de  $\text{Cd}^{2+}$  (0,6-3 ppm),  $\text{Cu}^{2+}$  (0,4-7 ppm),  $\text{Pb}^{2+}$  (1-5 ppm) y  $\text{Zn}^{2+}$  (0,075-1,4 ppm) preparadas en agua acidulada ( $\text{HNO}_3$  0,15%). Las longitudes de onda seleccionadas para la determinación cuantitativa de cada metal fueron: 228 nm ( $\text{Cd}^{2+}$ ), 324,8 nm ( $\text{Cu}^{2+}$ ), 217 nm ( $\text{Pb}^{2+}$ ) y 213,9 nm ( $\text{Zn}^{2+}$ ), conforme a las especificaciones indicadas en el “*Manual de Operaciones*” del equipo Varian® AA240FS (Varian Inc., Estados Unidos). Todos los ensayos se realizaron por duplicado ( $n=2$ ).

#### **III.4. Cuantificación del metal adsorbido en la biomasa vegetal.**

El contenido de metal adherido superficialmente a la biomasa de *S. biloba* se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por [Tello Zevallos y col. \(2018\)](#), con leves modificaciones. Brevemente, al finalizar el tiempo de exposición (48 h) se retiró la biomasa y se realizó un lavado con 0,5 L de solución de EDTA (1,7 mM) durante 1 h con agitación orbital (180 rpm) con el objetivo de secuestrar por complejación el metal adsorbido a las raíces de las plantas. Finalizada la agitación, se lavó la biomasa con abundante agua desionizada, y se la dejó escurrir y reposar durante 15 min. sobre papel absorbente con la finalidad de eliminar el exceso de humedad en la parte externa del tejido. El contenido de metal en el agua de lavado fue cuantificado por EAA (ver sección 3.3).

#### **III.5. Cuantificación del metal acumulado intracelularmente.**

La cantidad de metal acumulado intracelularmente se determinó sobre una porción de material vegetal (separadamente, raíces y hojas) previamente secada en estufa a 70°C durante 24 h. Para ello, a 20,0-50,0 mg de biomasa seca triturada se le adiciono 1,0 mL de  $\text{HNO}_3$  cc. (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina). Posteriormente, la muestra se colocó en un

bloque de digestión bajo una campana de extracción, y se calentó a 70°C durante 3 h hasta observar la desaparición de vapores pardos. La biomasa digerida se diluyó hasta 5,0 mL con agua desionizada y se agitó en vórtex durante 10 min. Luego de centrifugar las muestras (15 min., 7500xg), el contenido de metal intracelular fue cuantificado por EAA (ver sección 3.3).

### **III.6. Determinación de parámetros fisiológicos en hojas de *S. biloba*.**

Para determinar la tolerancia de *S. biloba* frente a la exposición a metales pesados se evaluaron diferentes parámetros fisiológicos en las hojas flotantes de las plantas, luego de finalizado el tiempo de exposición (48 h). Estos ensayos se realizaron tanto para el grupo “Control” como para los diferentes tratamientos, a modo de efectuar el análisis comparativo.

#### **III.6.1. Cuantificación del contenido de pigmentos fotosintéticos.**

La extracción de pigmentos fotosintéticos se llevó a cabo macerando 50,0 mg de muestra vegetal -previamente congelada a -20°C y triturada mecánicamente en presencia de N<sub>2</sub> líquido- con 1,0 mL de Etanol 96%, y posterior incubación durante 24 h en oscuridad a temperatura ambiente para favorecer la completa extracción de los pigmentos. Luego, se centrifugó la solución resultante a 4500xg durante 10 min., y se determinó la concentración de clorofilas (*a*, *b* y total) midiendo la absorbancia del sobrenadante a 649 nm y 665 nm, y el contenido de carotenoides (carotenos y xantófilas) a 480 nm, empleando un espectrofotómetro UV/Vis Lambda 25 (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos).

El contenido de pigmentos fotosintéticos se calculó mediante las ecuaciones propuestas por [Wintermans y De Mots \(1965\)](#):

$$\text{Chl } a \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 12,19 (\text{Abs. } 665) - 3,45 (\text{Abs. } 649) \quad (1)$$

$$\text{Chl } b \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 21,99 (\text{Abs. } 649) - 5,32 (\text{Abs. } 665) \quad (2)$$

$$\text{Chl total} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \text{Chl } a + \text{Chl } b \quad (3)$$

$$\text{Carotenoides} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{(1000(\text{Abs } 480) - 2,14 (\text{Chl } a)) - 70,16 (\text{Chl } b)}{220} \quad (4)$$

### III.6.2. Cuantificación de antocianinas y flavonoides totales

La extracción de antocianinas y flavonoides totales se realizó mediante el tratamiento de 100,0 mg de muestra vegetal -previamente congelada a -20°C y triturada mecánicamente en presencia de N<sub>2</sub> líquido- con 0,6 mL de metanol ácido (HCl 1% en metanol), y posterior incubación durante 8 h en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se realizó una segunda extracción con 1,2 mL de cloroformo y 0,6 mL de agua desionizada. La solución resultante se centrifugó a 4500xg durante 5 min., descartándose la fase orgánica. Finalmente, se midió la absorbancia de la fase acuosa a 312 nm y 530 nm (Casati & Walbot, 2005), utilizando un espectrofotómetro UV/Vis Lambda 25 (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos).

### III.6.3. Carbohidratos solubles

Se empleó el método propuesto por Bizzo y col. (2014), con leves modificaciones. Para ello, a 100,0 mg de biomasa vegetal -previamente congelada a -20°C y triturada mecánicamente en presencia de N<sub>2</sub> líquido- se le adicionó 2,0 mL de Metanol (80%). A continuación, las muestras tratadas se calentaron a 70°C durante 30 min. Una vez a temperatura ambiente, se tomó 1,0 mL del extracto y se mezcló con 1,0 mL de Fenol (5% p/v) y 5,0 mL de ácido sulfúrico (95%). La mezcla se dejó reposar por 1 h a

temperatura ambiente y se midió la absorbancia de la muestra a 640 nm empleando un espectrofotómetro UV/Vis Lambda 25 (Perkin Elmer Inc., Estados Unidos). Para el cálculo de la concentración de carbohidratos solubles se utilizó una solución de Glucosa 50 mg/mL como testigo.

### **III.7. Análisis estadístico.**

Para el análisis de los resultados se empleó el programa SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., Estados Unidos). Los datos experimentales fueron analizados aplicando el *test* de ANOVA (análisis de la variancia). Cuando el efecto de los factores estudiados fue significativo ( $p < 0,05$ ) se aplicó la prueba *Honestly Significant Difference* (HSD) de Tukey para efectuar comparaciones múltiples, con un nivel de confianza del 95 %.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

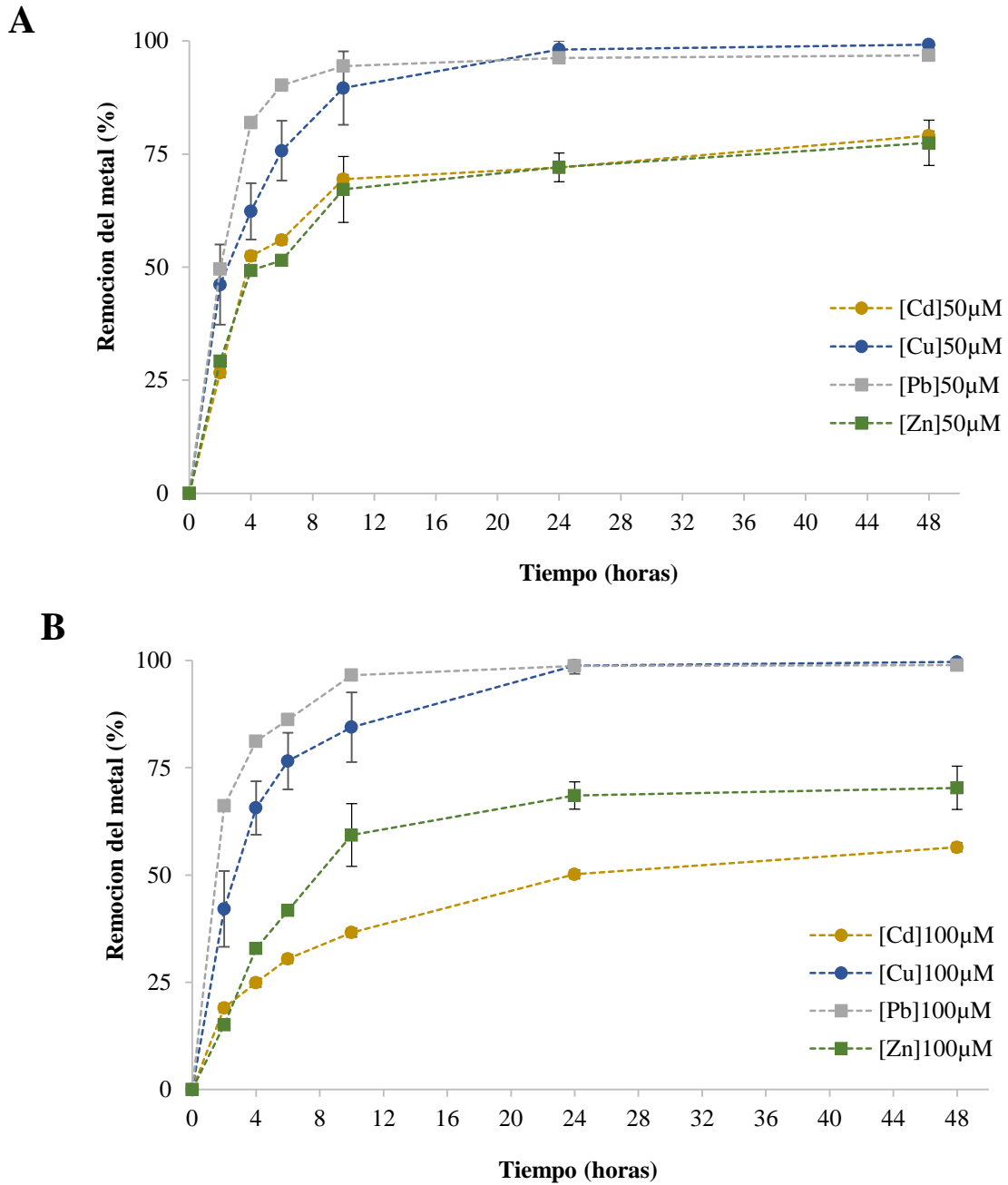
### IV.1. Eliminación de metales pesados en aguas contaminadas empleando *S. biloba*.

La capacidad de *S. biloba* para eliminar iguales concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  en forma independiente, se determinó cuantificando la concentración residual de cada catión metálico en la columna de agua a distintos tiempos de exposición (0, 2, 4, 6, 10, 24, 48 h). En la Fig. 7 se muestran los porcentajes (%) de eliminación alcanzados para cada metal a lo largo del periodo de incubación en presencia de  $50 \pm 2 \mu\text{M}$  (Fig. 7 A) o  $100 \pm 1 \mu\text{M}$  (Fig. 7 B) de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ , como únicos contaminantes presentes en el medio.

En general, para los cuatro metales divalentes se observa una curva de eliminación no lineal, con una fase rápida que abarca aproximadamente las primeras 6 h, y otra más lenta que tiende a saturarse entre las 24-48 h, según el metal y/o su concentración.

La cinética no lineal de desaparición de los cuatro metales analizados, observada para ambas concentraciones ensayadas, sugiere que *S. biloba* utiliza diferentes mecanismos para la remoción de estos metales. En estudios previos realizados con distintos metales pesados y en diferentes especies del género *Salvinia* se ha propuesto que la adsorción a la superficie de la raíz sería probablemente el componente más rápido involucrado en este mecanismo (Olguín y col., 2005; Suñe y col., 2007; Tello Zevallos y col., 2018). La unión de los cationes metálicos a la superficie radicular se realiza a través de una combinación de procesos físicos y químicos, tales como adsorción, quelación e intercambio iónico. De hecho, se ha reportado que iones tales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  son liberados a la solución acuosa durante el proceso de adsorción de  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , y  $\text{Ni}^{2+}$  en diferentes plantas acuáticas, entre ellas, *Spirodela intermedia* (Miretzky y col., 2006),

*Eichhornia crassipes*, *Valisneria spiralis*, *Pistia stratiotes* (Verma y col., 2008) y *Potamogeton lucens* (Schneider y Rubio, 1999).



**Fig. 7.** Cinéticas de eliminación de metales divalentes en la columna de agua a distintos tiempos y concentración: (A)  $50 \pm 2 \mu\text{M}$  y (B)  $100 \pm 1 \mu\text{M}$ . Los valores representan el promedio  $\pm$  E.E. ( $n=2$ ).

Los grupos carboxílicos libres en las raíces de las plantas probablemente sean aquellos que proporcionan la mayor cantidad de sitios de unión para los metales. Además, las proteínas de la pared celular también poseen átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre que se comportan como ligandos y pueden desempeñar un papel importante en la adsorción de metales (Suñe y col., 2007; Tello Zevallos y col., 2018).

Los procesos biológicos que involucran la captación intracelular del metal, ya sea por procesos de transporte activo mediado por proteínas transmembrana o por difusión simple a través de canales iónicos, y su posterior translocación y transporte a las partes aéreas de la planta, serían los pasos responsables de las etapas más lentas del proceso de fitorremediación (Maine y col., 2001; Suñe y col., 2007; Tello Zevallos y col., 2018).

Como se aprecia más detalladamente en los valores informados en la Tabla 2, los porcentajes de remoción alcanzados en las primeras 6 h para  $50 \pm 2 \mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  fueron  $76 \pm 7 \%$  y  $90 \pm 2 \%$ , respectivamente. Al finalizar el ensayo (48 h), tanto el  $\text{Cu}^{2+}$  como el  $\text{Pb}^{2+}$  fueron completamente removidos de la columna de agua (tasas de eliminación  $\geq 99 \%$ ). Estos resultados demuestran una elevada capacidad de *S. biloba* para remover ambos cationes, en correlación con reportes previos que indican tasas de remoción superiores al 95 % en 24 h para concentraciones similares de estos iones en agua (Tello Zevallos y col., 2018; Freitas y col., 2018; Castillo Loría y col., 2019). Sin embargo, la velocidad de eliminación de  $\text{Cu}^{2+}$  fue menor comparada con la de  $\text{Pb}^{2+}$ , ya que para este último metal se alcanzaron valores máximos de remoción en tan sólo 10 h, para ambas concentraciones ensayadas (Fig. 7 A y B). Por lo tanto, estos resultados sugieren la existencia de algunos mecanismos de respuesta diferenciales en *S. biloba* para los distintos metales estudiados. En este sentido, Estrella-Gómez y col. (2009) reportaron una inducción en la expresión de fitoquelatinas en *S. minima* frente a la exposición durante 24 h a  $40 \mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{2+}$ . El aumento en la concentración de estas metaloproteínas estaría involucrado con

la activación de mecanismos de quelación y secuestro de  $Pb^{2+}$ . Por lo tanto, podría suponerse que respuestas metabólicas similares para el  $Pb^{2+}$  se encuentren conservadas entre diferentes especies del mismo género.

Si bien, la existencia de metaloproteínas específicas para  $Cu^{2+}$  (Cu-tioneínas) ha sido reportada en otros organismos vivos, incluyendo bacterias, hongos, moluscos, mamíferos y algunas especies vegetales (por ej., trigo y soja) (Calvo y col., 2017), no existen antecedentes que demuestren la presencia y/o inducción de Cu-tioneínas en *S. biloba*.

Por su parte, durante las primeras 6 h de exposición a  $50\pm 2 \mu M$  de  $Cd^{2+}$  o  $Zn^{2+}$ , los porcentajes de remoción fueron significativamente menores a los obtenidos para  $Cu^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ , alcanzando tan sólo valores de  $56\pm 6 \%$  y  $51\pm 1 \%$  para  $Cd^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , respectivamente (Fig. 7, Tabla 2). Al finalizar el ensayo (48 h), los porcentajes de eliminación de estos cationes fueron inferiores al 80 %, lo cual demuestra que, en las condiciones ensayadas, *S. biloba* posee una menor eficiencia para eliminar iguales concentraciones molares de  $Cd^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  respecto a su capacidad para eliminar  $Cu^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ .

**Tabla 2.** Porcentajes de remoción para  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  a distintos tiempos y concentración de exposición en sistemas operados con *S. biloba*.

Tiempo de exposición (h)	$50\pm 2 \mu M$				$100\pm 1 \mu M$			
	$Cd^{2+}$	$Cu^{2+}$	$Pb^{2+}$	$Zn^{2+}$	$Cd^{2+}$	$Cu^{2+}$	$Pb^{2+}$	$Zn^{2+}$
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	$27\pm 2$	$46\pm 9$	$50\pm 17$	$29\pm 1$	$19\pm 1$	$42\pm 29$	$66\pm 1$	$15\pm 1$
4	$52\pm 2$	$62\pm 6$	$82\pm 1$	$49\pm 1$	$25\pm 6$	$66\pm 10$	$81\pm 3$	$33\pm 4$
<b>6</b>	<b><math>56\pm 6</math></b>	<b><math>76\pm 7</math></b>	<b><math>90\pm 2</math></b>	<b><math>51\pm 1</math></b>	<b><math>30\pm 7</math></b>	<b><math>77\pm 11</math></b>	<b><math>86\pm 1</math></b>	<b><math>42\pm 7</math></b>
10	$69\pm 3$	$90\pm 8$	$97\pm 1$	$67\pm 7$	$37\pm 3$	$84\pm 9$	$94\pm 1$	$59\pm 1$
<b>24</b>	<b><math>72\pm 1</math></b>	<b><math>99\pm 2</math></b>	<b><math>98\pm 1</math></b>	<b><math>72\pm 3</math></b>	<b><math>50\pm 4</math></b>	<b><math>98\pm 1</math></b>	<b><math>96\pm 1</math></b>	<b><math>69\pm 3</math></b>
<b>48</b>	<b><math>79\pm 4</math></b>	<b><math>100\pm 1</math></b>	<b><math>99\pm 2</math></b>	<b><math>77\pm 5</math></b>	<b><math>56\pm 2</math></b>	<b><math>99\pm 1</math></b>	<b><math>97\pm 1</math></b>	<b><math>70\pm 4</math></b>

Los valores informados en la tabla representan el promedio  $\pm$  E.E. ( $n=2$ ).



Notablemente, al duplicar la concentración de exposición de los cuatro metales analizados (*i.e.*,  $100\pm 1 \mu\text{M}$ ), la capacidad fitorremediadora de *S. biloba* para  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  fue igualmente efectiva, alcanzando tasas de remoción superiores al 97% en 24-48 h (Fig. 7; Tabla 2). Adicionalmente, al duplicar la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  en las aguas contaminadas, la velocidad del bioproceso prácticamente no se mostró afectada ya que a las 6 h de exposición se alcanzaron tasas de remoción similares a las obtenidas para ambos metales a su concentración más baja (Tabla 2). Esta observación fue coherente con los valores calculados para las constantes de velocidad ( $K_1$ ) mediante el análisis cinético de los datos experimentales, donde se obtuvieron resultados muy similares para  $50\pm 2 \mu\text{M}$  y  $100\pm 1 \mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  (Tabla 3). Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido para estos cationes, al duplicar la concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  en las muestras de agua, las plantas mostraron aún mayores dificultades para eliminar ambos iones.

Como se aprecia en la Tabla 2, a las 6 h de exposición a  $100\pm 1 \mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$  los valores de remoción alcanzados por *S. biloba* ( $30\pm 7 \%$  y  $42\pm 7 \%$ , respectivamente) fueron significativamente más bajos a los obtenidos al tratar las plantas con  $50\pm 2 \mu\text{M}$  de cada metal ( $56\pm 6 \%$  y  $51\pm 1 \%$  para  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , respectivamente). Estos resultados fueron también consistentes con una marcada disminución (entre 4-7 veces) en los valores de las constantes de velocidad ( $K_2$ ) al duplicar la concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$  en las muestras de agua (Tabla 3). Sin embargo, al finalizar el ensayo (48 h), el porcentaje de remoción alcanzado para el  $\text{Zn}^{2+}$  fue levemente afectado respecto al valor hallado para su concentración más baja, disminuyendo en menos de un 10% ( $77\pm 5 \%$  para  $50\pm 2 \mu\text{M}$  vs.  $70\pm 4 \%$  para  $100\pm 1 \mu\text{M}$ ); mientras que la pérdida de la capacidad fitorremediadora de *S. biloba* frente a la duplicación de la concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  fue bastante más notoria, disminuyendo en más de un 20% ( $79\pm 4 \%$  para  $50\pm 2 \mu\text{M}$  vs.  $56\pm 2 \%$  para  $100\pm 1 \mu\text{M}$ ).

En trabajos análogos realizados por otros autores (Maine y col., 2001; Suñe y col., 2007) se reportaron eficiencias de remoción para el  $\text{Cd}^{2+}$  cercanas al 80% para especímenes de *S. biloba* expuestos durante 24 h a muestras de agua de lago contaminadas artificialmente con 1 a 6 mg/L del metal. Nuestros resultados son consistentes con estos antecedentes (% remoción ~79% para  $50 \mu\text{M Cd}^{2+} = 5,6 \text{ mg/L}$ ). Sin embargo, al aumentar la concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  ( $100 \mu\text{M Cd}^{2+} = 11,2 \text{ mg/L}$ ) los porcentajes de remoción disminuyeron considerablemente (~56%). Esto podría explicarse por una mayor sensibilidad de *S. biloba* frente a la fitotoxicidad del  $\text{Cd}^{2+}$  (Rodríguez y col., 2008), debido a una saturación de sitios activos de unión en la biomasa de la planta, o simplemente porque la velocidad de translocación y transporte de este ión es significativamente menor respecto a otros iones.

Por otro lado, Hadad y col. (2007) reportaron eficiencias de remoción para el  $\text{Zn}^{2+}$  inferiores a 55% en especímenes de *S. biloba* aislados de humedales artificiales luego de 4 días de exposición a 12 mg/L de este metal, aún en presencia de nutrientes nitrogenados y fosforados en el medio de cultivo. Nuestros resultados son más alentadores en cuanto al uso de especies nativas de *S. biloba* para el tratamiento de aguas contaminadas con bajas concentraciones de  $\text{Zn}^{2+}$ , ya que el porcentaje de remoción obtenido para la concentración más alta estudiada ( $100 \mu\text{M Zn}^{2+} = 6,5 \text{ mg/L}$ ) fue del orden del 70%.

Sin embargo, nuestros resultados sugieren que, a iguales concentraciones, *S. biloba* es menos eficiente para eliminar iguales concentraciones de  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Cd}^{2+}$  respecto a lo que ocurre para  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ . En síntesis, estos hallazgos demuestran que la capacidad fitorremediadora de *S. biloba* es diferente para cada metal y podría ser inicialmente explicada a través de la variación en las distintas constantes de equilibrios físico-químicos (adsorción, quelación, intercambio iónico) involucradas en las etapas tempranas del proceso de captación de estos metales por las raíces de las plantas (Suñe y col., 2007; Tello

Zevallos y col., 2018). Adicionalmente, podrían co-existir otras respuestas metabólicas y/o fisiológicas ión-selectivas, no sólo dependientes del tipo de ión metálico sino también de su concentración y, en menor medida, del tiempo de exposición al contaminante.

Finalmente, con el objetivo de determinar la relación existente entre la concentración inicial de los metales y su velocidad de eliminación mediante el uso de *S. biloba*, se aplicaron modelos cinéticos que permiten correlacionar el tiempo de exposición al metal con la concentración residual de los cationes en la columna de agua. Estos datos son interesantes cuando se desea controlar la operación de un sistema de tratamiento de efluentes que utiliza plantas acuáticas, ya que es importante conocer el tiempo necesario para alcanzar cierto grado de remoción de un determinado contaminante. De esta manera, es posible adecuar la periodicidad de las descargas que impactan sobre el sistema, estableciendo un tiempo mínimo de permanencia/reposo que les permita a los organismos recuperar parte de su capacidad fitorremediadora.

En general, en los estudios de eliminación de contaminantes aplicando sistemas biológicos se encuentra que las cinéticas más comunes para estos bioprocesos son de *primer* o *segundo* orden. Además, en los estudios de fitorremediación de metales generalmente se considera que el biosorbente (*i.e.*, la cantidad de biomasa) se encuentra en exceso y, por lo tanto, lo que se determina es el orden de la reacción respecto al metal.

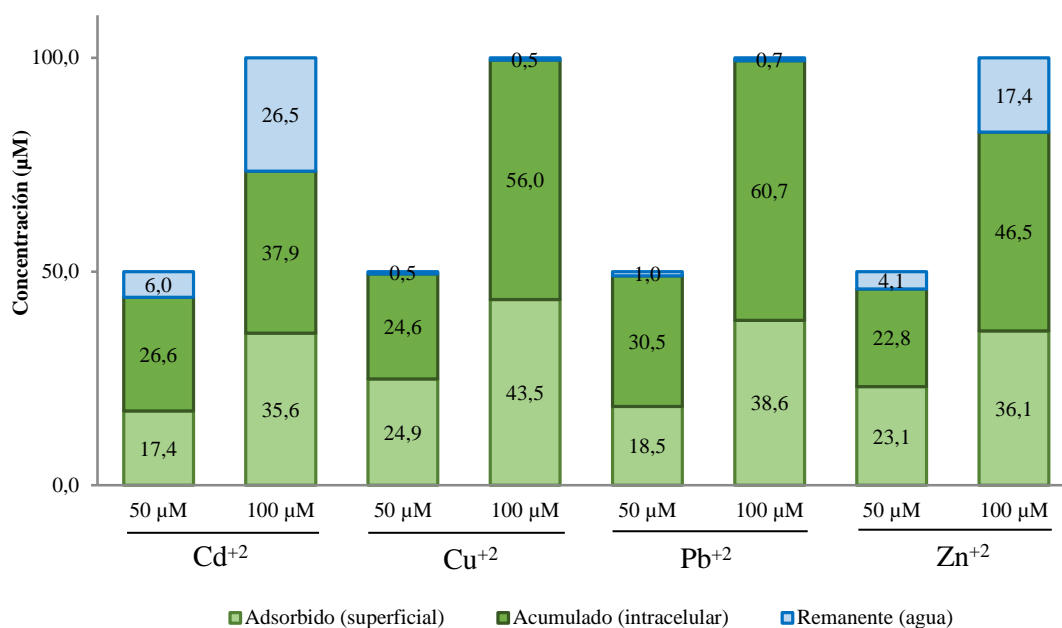
**Tabla 3.** Resultados de la aplicación de modelos cinéticos y cálculo de las constantes de velocidad (K) de eliminación de Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> en muestras de agua contaminada utilizando *S. biloba*.

<i>Tratamiento</i>	[Metal] (μM)	<b>Cinética de primer orden</b>		<b>Cinética de segundo orden</b>	
		<i>K<sub>1</sub></i> (1/h)	R <sup>2</sup>	<i>K<sub>2</sub></i> (L/mg.h)	R <sup>2</sup>
<b>Cd<sup>2+</sup></b>	50±2	0,1163	0,9427	<b>0,0577</b>	<b>0,9822</b>
	100±1	0,0424	0,8921	<b>0,0080</b>	<b>0,9732</b>
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	50±2	<b>0,1859</b>	<b>0,9936</b>	1,3434	0,8932
	100±1	<b>0,1770</b>	<b>0,9905</b>	0,6033	0,8842
<b>Pb<sup>2+</sup></b>	50±2	<b>0,3986</b>	<b>0,9907</b>	0,1991	0,9340
	100±1	<b>0,3173</b>	<b>0,9750</b>	0,0945	0,8399
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	50±2	0,1020	0,9413	<b>0,0939</b>	<b>0,9785</b>
	100±1	0,0928	0,9362	<b>0,0230</b>	<b>0,9846</b>

Como puede observarse en la Tabla 3, nuestros resultados se ajustaron satisfactoriamente a un modelo de cinética de *primer orden* para los metales Cu<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>, y de *segundo orden* para Cd<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>. Las constantes de velocidad *K<sub>1</sub>* y *K<sub>2</sub>* fueron siempre mayores para la menor concentración inicial de metal ensayada, indicando que ésta afecta negativamente a la constante de velocidad, y sugiriendo que la trmoción de los metales se hace más lenta a medida que aumenta la concentración del contaminante en el sistema. Sin embargo, este efecto fue menor para Cu<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> respecto a lo que ocurre para Cd<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>, hecho que se condice con los respectivos modelos cinéticos que indicarían que la velocidad del proceso de fitorremediación se relaciona de manera lineal con la concentración de Cu<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> (primer orden de reacción), mientras que se afectaría exponencialmente al aumentar la concentración de Cd<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> (segundo orden de reacción).

## IV.2. Análisis de compartimentalización

Con el fin de avanzar en el entendimiento de los diferentes mecanismos involucrados en la eliminación de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  por *S. biloba*, se evaluó la distribución del metal en las plantas a través de un análisis de compartimentalización (Olguín y col., 2005; Tello Zevallos y col., 2018). Para ello, se definieron tres destinos o “compartimentos” en donde encontrar al metal: 1) adsorbido superficialmente a la biomasa vegetal, 2) acumulado intracelularmente en la biomasa total (sin discernir entre raíces y hojas) y, 3) remanente en la columna de agua. En la Fig. 8 se muestra la distribución de cada metal en los diferentes compartimentos definidos para *S. biloba* luego de finalizado el proceso de remediación (48 h). Como puede observarse, para los cuatro metales analizados, la mayor cantidad de metal se encontró acumulada intracelularmente para ambas concentraciones ensayadas. Sin embargo, las cantidades molares de los iones acumulados fueron muy diferentes según el metal y la concentración inicial a la que fueron expuestas las plantas, mostrando mayores niveles a medida que aumentó la concentración inicial del metal en la solución. Por ejemplo, se hallaron valores de bioacumulación de  $2050 \mu\text{gCu}^{2+}/\text{g}$  de biomasa luego de 48 h de exposición a  $100 \pm 1 \mu\text{M}$  del metal ( $\sim 6,4 \text{ mgCu}^{2+}/\text{L}$ ).



**Fig. 8.** Distribución de Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> en los tres compartimentos definidos para *S. biloba* luego de 48 h de exposición a distintas concentraciones iniciales de cada metal, en forma independiente. Las barras representan los valores promedio de concentraciones molares (µM).

Por otro lado, se hallaron valores intracelulares de Pb<sup>2+</sup> para la concentración más alta ensayada (100±1 µM) de 4800 µg/g biomasa. Estos resultados son consistentes con la ya mencionada capacidad hiperacumuladora de Cu<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> reportada para *S. biloba* por otros autores (Freitas y col., 2018; Tello Zevallos y col., 2018).

En relación al contenido de Cd<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> hallado en el tejido de *S. biloba* se pudo determinar que, a pesar de las menores eficiencias de remoción obtenidas para estos metales (ver Tabla 2), sus concentraciones molares intracelulares no fueron muy disimiles a las obtenidas para Cu<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> a 50±2 µM. Sin embargo, al duplicar la concentración de estos iones de 50±2 µM a 100±1 µM, se observó una mayor diferencia en la relación adsorbido/acumulado, siendo la cantidad de Cd<sup>2+</sup> acumulada menor que la de Zn<sup>2+</sup>. En este sentido, es interesante notar que al duplicar la concentración de metal en la solución se duplicó la cantidad molar de Cd<sup>2+</sup> adsorbido en la biomasa de *S. biloba*, mientras que su concentración molar intracelular aumentó alrededor de un 40%, observándose

prácticamente una relación opuesta para el  $Zn^{2+}$ . En este caso, la concentración molar intracelular de  $Zn^{2+}$  se duplicó mientras que la concentración de metal adsorbido superficialmente aumentó aproximadamente un 55% (Fig. 8). Sin embargo, esta gran capacidad de bioacumulación de  $Zn^{2+}$  por *S. biloba* no se vería totalmente reflejada si sólo consideráramos la cantidad en gramos de metal acumulado en la biomasa, ya que para la concentración más alta ensayada se obtuvieron valores intracelulares de  $Zn^{2+}$  cercanos a los 1300  $\mu\text{g/g}$  biomasa en comparación con los 2100  $\mu\text{g/g}$  biomasa calculados para el  $Cd^{2+}$ . Estos resultados ponen en evidencia que ponderar la eficiencia de fitorremediación de un metal por una especie vegetal considerando sólo la cantidad en masas del ión acumulado no es siempre representativo de la cantidad real de iones eliminados, ya que para aquellos elementos con bajo peso atómico esta capacidad puede verse subvalorada.

Por otro lado, los aumentos obtenidos en la cantidad molar de iones metálicos adsorbidos superficialmente a la biomasa de *S. biloba* al duplicar su concentración en el medio demuestran y avalan las consideraciones previas mencionadas en cuanto al exceso de biomasa generalmente utilizado en los estudios de fitorremediación. Sin embargo, es evidente que este aumento es diferente para cada metal, sugiriendo que existen múltiples y diferentes sitios de unión en la biomasa de *S. biloba*, y que los mismos poseen distintas afinidades para cada ión metálico. En general, los metales penetran en las plantas principalmente a través del sistema radicular en donde la mayor cantidad de estos iones se encuentran unidos a la pared celular (Samardakiewicz & Wozny, 2000, Antosiewicz, 2005). En ésta, los polisacáridos celulosa, lignina y hemicelulosa juegan un rol esencial en la complejación de los metales (Seregin & Ivanov, 2001; Gardea y col., 2004; Marmioli y col., 2005, Polec y col., 2007). En un estudio reciente, Tello Zevallos y col. (2018) analizaron espectros infrarrojos (FTIR-ATR) obtenidos para las raíces de *S. biloba* reportando la presencia de diferentes grupos funcionales tales como carboxilo, fosfato,

amida, hidroxilo, fosfonato y tiol, que estarían particularmente implicados en la adsorción de metales pesados por estas macrófitas.

Por su parte, la alta capacidad reportada en numerosas especies del género *Salvinia* para acumular metales podría atribuirse, además del contenido de carbohidratos de su raíz, a la síntesis de proteínas con grupos tiol. [Estrella-Gómez y col. \(2009\)](#) reportaron que el  $Pb^{2+}$  induce la producción de péptidos ricos en ácido glutámico y cisteína (fitoquelatinas) en *S. minima*, y que tales proteínas podrían estar involucradas en procesos de desintoxicación como parte de un mecanismo de tolerancia al metal desarrollado por estas plantas. Más aún, estas biomoléculas serían responsables de captar y complejar al metal permitiendo su almacenamiento en vacuolas y compartimentos intracelulares. Adicionalmente, [Olguín y col. \(2005\)](#) han sugerido que la acumulación intracelular de algunos metales divalentes en *S. minima* podría ocurrir a través de canales de calcio. Sin embargo, aún se necesitan más evidencias experimentales que sustenten esta hipótesis.

En conclusión, los resultados obtenidos de nuestros estudios de compartimentalización indican que tanto la cantidad de metal acumulado como adsorbido por *S. biloba* se halla positivamente afectada por la concentración inicial del metal, incrementándose a medida que aumenta la concentración del contaminante en la solución, sugiriendo que la tolerancia de estas macrófitas autóctonas a los distintos metales analizados ocurriría a través de la combinación de, al menos, dos mecanismos coordinados: 1) su unión (*i.e.*, adsorción) a la superficie de las hojas y raíces y, 2) la internalización de los metales a través de las células vegetales. Además, las diferencias observadas para cada catión en los incrementos molares de los iones adsorbidos y acumulados demuestran que existen diferencias en la cantidad de sitios de unión específicos para cada metal, en sus constantes de afinidad y/o en la capacidad de translocación de *S. biloba* para cada ión metálico, la cual podría estar a su vez relacionada con la síntesis de metaloproteínas transportadoras ión-selectivas, con la

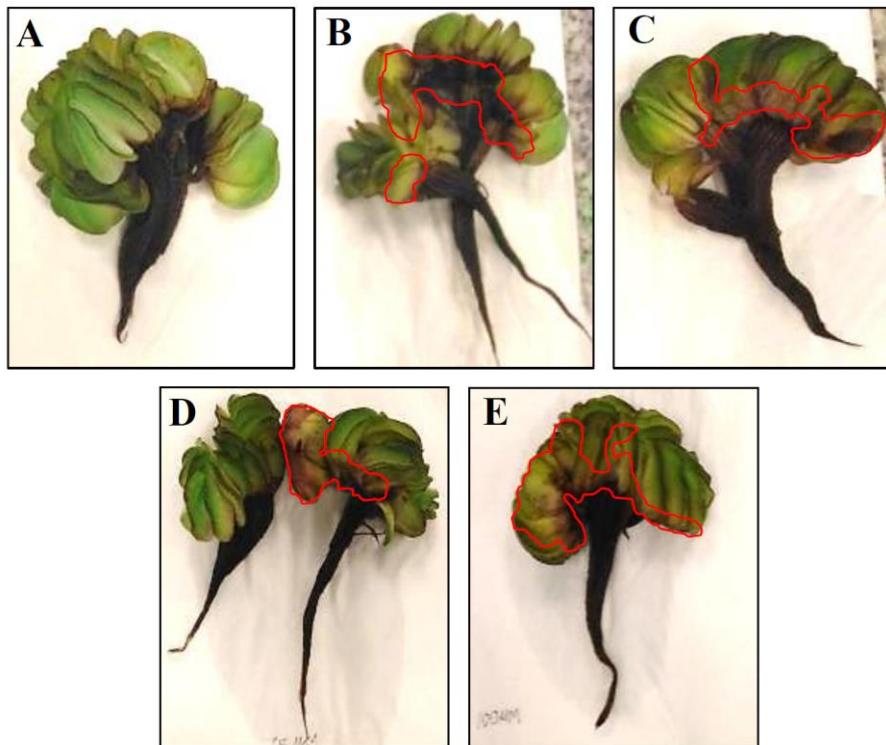


apertura de canales iónicos, con diferencias en la velocidad de migración y/o energía necesaria para el transporte de cada ión a través de estos canales, e incluso con impedimentos estéricos asociados al tamaño de los cationes. Por lo tanto, si bien nuestros resultados son consistentes con reportes previos que indican a la adsorción superficial y a la acumulación intracelular como dos de los mecanismos principales utilizados por plantas acuáticas del género *Salvinia* para la eliminación de metales pesados en aguas contaminadas, aún se necesitan más estudios que permitan dilucidar, a nivel molecular, la complejidad de los mecanismos involucrados en cada uno de estos bioprocesos.

#### **IV.3. Evaluación del grado de fitotoxicidad de los metales pesados en *S. biloba***

Con el objetivo de analizar el nivel de daño ocasionado en los especímenes de *S. biloba* sometidos al tratamiento con los diferentes metales pesados, se evaluaron caracteres fenotípicos y parámetros fisiológicos de la biomasa de las plantas luego de su exposición a  $50\pm 2 \mu\text{M}$  o  $100\pm 1 \mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ , en forma independiente.

Como puede apreciarse en las fotografías representativas mostradas en la Fig. 9, después de 48 h de exposición a  $100\pm 1 \mu\text{M}$  de cada uno de estos metales, fue posible observar a través de una simple inspección visual de los especímenes, algunos síntomas de fitotoxicidad, tales como clorosis (pérdida de coloración verde) y/o necrosis (presencia de áreas marrones) de sus hojas, disminución del tamaño de las raíces y deshidratación de las hojas flotantes (evidenciada principalmente por una disminución en el tamaño de la lámina foliar y en la pérdida de turgencia).



**Fig. 9.** Fotografías ilustrativas de los cambios observados en la biomasa de *S. biloba* luego de 48 h de exposición a: (A) agua desionizada (grupo “Control”); (B)  $\text{Cd}^{2+}$  ( $100 \pm 1 \mu\text{M}$ ); (C)  $\text{Cu}^{2+}$  ( $100 \pm 1 \mu\text{M}$ ); (D)  $\text{Pb}^{2+}$  ( $100 \pm 1 \mu\text{M}$ ); (E)  $\text{Zn}^{2+}$  ( $100 \pm 1 \mu\text{M}$ ). Las áreas en rojo muestran zonas de clorosis y/o necrosis sobre el área foliar de especímenes de *S. biloba* expuestos a diferentes metales pesados.

Si bien, estas observaciones se pudieron correlacionar con alteraciones en algunos de los parámetros fisiológicos evaluados en las hojas flotantes de *S. biloba* (pigmentos fotosintéticos, compuestos antioxidantes y carbohidratos solubles), en general, no fue posible determinar un patrón generalizado de fitotoxicidad para los cuatro metales estudiados.

Como se aprecia en la Tabla 4, las concentraciones de clorofilas *a*, *b* y total resultaron significativamente afectadas ( $p < 0,05$ ) luego de la exposición durante 48 h a ambas concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ . Estos resultados demuestran que tanto el  $\text{Pb}^{2+}$  como el  $\text{Cu}^{2+}$  interfieren con el normal metabolismo de *S. biloba* ya que tanto las clorofilas como los carotenoides juegan un rol importante en la captación de luz solar para los procesos fotosintéticos de las plantas (Leal-Alvarado y col., 2016). Sin embargo, la concentración de

carotenoides sólo se vio afectada frente a la exposición a  $100\pm 1 \mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  respecto de los valores de hallados para el grupo “Control”.

Por el contrario, el contenido de carotenoides aumentó significativamente ante la presencia de  $\text{Cd}^{2+}$ , en ambas concentraciones ensayadas, hecho que podría estar relacionado con algún mecanismo de defensa utilizado por *S. biloba* para contrarrestar el daño oxidativo provocado por la presencia de este ión, con el fin de conservar el contenido de clorofilas (fotosintéticamente más activas). En este sentido, [Ramel y col. \(2013\)](#) reportaron que los carotenoides protegen a las moléculas de clorofila del estrés oxidativo, a la vez que estabilizan la bicapa lipídica de las membranas celulares previniendo la lipoperoxidación provocada por especies reactivas del oxígeno.

Por su parte, la presencia de  $\text{Zn}^{2+}$  no afectó el contenido de clorofilas ni carotenoides en las condiciones ensayadas. Estos resultados son consistentes con su menor toxicidad hacia los organismos vivos. De hecho, el  $\text{Zn}^{2+}$  es un micronutriente esencial para las plantas siendo importante para la producción de hormonas y proteínas de crecimiento vegetal. Además, es esencial para el buen desarrollo de las raíces, así como para la formación de carbohidratos y clorofilas ([Broadley y col. 2007](#)).

Por otro lado, tampoco se evidenciaron cambios significativos en la concentración de compuestos fenólicos (*i.e.*, flavonoides y antocianinas) (Tabla 4). Estos compuestos son metabolitos secundarios derivados de los aminoácidos fenilalanina y tirosina, y se encuentran distribuidos en forma ubicua en las plantas ([Kähkönen y col., 1999](#)). Los mismos protegen a los vegetales del daño ocasionado por diversos agentes pro-oxidantes, razón por la cual se los agrupa bajo la denominación de *pigmentos antioxidantes*. Estudios recientes han sugerido que pueden actuar como agentes quelantes de iones metálicos y también como moléculas antioxidantes para eliminar radicales libres, ayudando a la protección de las células frente al daño oxidativo ([Mierziak y col., 2014](#)).

En nuestro estudio, las concentraciones de flavonoides y antocianinas en las hojas de *S. biloba* no mostraron cambios significativos respecto a los valores hallados para las plantas “Control”, luego de 48 h de exposición a  $50\pm 2 \mu\text{M}$  o  $100\pm 1 \mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ . Por lo tanto, en las condiciones ensayadas, la presencia de los metales analizados no estaría generando, en las partes aéreas de *S. biloba*, un daño oxidativo lo suficientemente importante como para disparar un incremento en la acumulación de estos metabolitos antioxidantes.

Finalmente, tampoco se observaron alteraciones significativas en los niveles de carbohidratos solubles en hojas de plantas expuestas a  $50\pm 2 \mu\text{M}$  y  $100\pm 1 \mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ . Si bien, otros autores han reportado que la presencia de metales pesados en el medio puede afectar la producción de hidratos de carbono en diferentes especies del género *Salvinia*, nuestros resultados indican que la presencia de estos iones, en las concentraciones y tiempos ensayados, no afectaría considerablemente al metabolismo de carbohidratos en los órganos aéreos de *S. biloba*.

Aunque, en general, todos los metales pesados son tóxicos, en mayor o menor medida para los organismos vivos; algunos de ellos, tales como el  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Zn}^{2+}$ , contribuyen a la estabilización de componentes de las membranas celulares, a la estructura y actividad de moléculas biológicas, o actúan como cofactores en una gran variedad de reacciones enzimáticas. Por ello son considerados “elementos esenciales”, en concentraciones muy bajas, tanto para el metabolismo como para el crecimiento celular. En cambio, otros metales, tales como el  $\text{Cd}^{2+}$  y el  $\text{Pb}^{2+}$ , son considerados “no esenciales”, dado que no tienen funciones biológicas conocidas y son extremadamente tóxicos, incluso en muy bajas concentraciones (Kang 1997).

**Tabla 4.** Contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides), antioxidantes (flavonoides y antocianinas) y carbohidratos solubles en hojas de *S. biloba* expuestas a 50±2 o 100±1 µM de Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> o Zn<sup>2+</sup>.

Parámetros fisiológicos	Control	Cd <sup>2+</sup>		Cu <sup>2+</sup>		Pb <sup>2+</sup>		Zn <sup>2+</sup>	
		50±2µM	100±1µM	50±2µM	100±1µM	50±2µM	100±1µM	50±2µM	100±1µM
<b>Chl a</b> (µg/g PF)	156±7 <sup>a</sup> (100%)	151±15 <sup>a</sup> (97 %)	160± 19 <sup>a</sup> (102%)	138±24 <sup>ab</sup> (88%)	102±16 <sup>b</sup> (65%)	123±10 <sup>b</sup> (79%)	113±5 <sup>b</sup> (72%)	156±18 <sup>a</sup> (100%)	166±36 <sup>a</sup> (106%)
<b>Chl b</b> (µg/g PF)	109±6 <sup>a</sup> (100%)	92±8 <sup>a</sup> (84%)	92 ±7 <sup>a</sup> (84%)	78±12 <sup>b</sup> (71%)	65±9 <sup>b</sup> (62%)	82±7 <sup>b</sup> (75%)	81±9 <sup>b</sup> (74%)	109±14 <sup>a</sup> (100%)	105±22 <sup>a</sup> (101%)
<b>Chl total</b> (µg/g PF)	261±14 <sup>a</sup> (100%)	242±24 <sup>a</sup> (93%)	257±11 <sup>a</sup> (98%)	198±35 <sup>b</sup> (76%)	167±25 <sup>b</sup> (64%)	205±16 <sup>b</sup> (78%)	194±14 <sup>b</sup> (74%)	265±25 <sup>a</sup> (102%)	271±41 <sup>a</sup> (104%)
<b>Carotenoides</b> (µg/g PF)	35±2 <sup>a</sup> (100%)	43±3 <sup>b</sup> (123%)	43±2 <sup>b</sup> (123%)	37±2 <sup>a</sup> (106%)	28±2 <sup>b</sup> (80%)	36±3 <sup>a</sup> (103%)	37±2 <sup>a</sup> (106%)	34±2 <sup>a</sup> (97%)	38±4 <sup>a</sup> (108%)
<b>Flavonoides</b> (Abs/g PF)	87±5 <sup>a</sup> (100%)	89 ±4 <sup>a</sup> (102%)	82 ±8 <sup>a</sup> (94%)	91±8 <sup>a</sup> (105%)	84±4 <sup>a</sup> (97%)	95±8 <sup>a</sup> (109%)	86±7 <sup>a</sup> (99%)	93±7 <sup>a</sup> (107%)	83±7 <sup>a</sup> (95%)
<b>Antocianinas</b> (Abs/g PF)	560±46 (100%)	584±45 <sup>a</sup> (104%)	549±75 <sup>a</sup> (98%)	545±8 <sup>a</sup> (97%)	596±37 <sup>a</sup> (106%)	603±78 <sup>a</sup> (108%)	566±45 <sup>a</sup> (101%)	610±60 <sup>a</sup> (109%)	581±50 <sup>a</sup> (104%)
<b>Carbohidratos</b> (mg/g PF)	42±1 <sup>a</sup> (100%)	43±3 <sup>a</sup> (102%)	41±5 <sup>a</sup> (98%)	40±7 <sup>a</sup> (95%)	38±9 <sup>a</sup> (90%)	46±2 <sup>a</sup> (109%)	37±2 <sup>a</sup> (88%)	41±7 <sup>a</sup> (98%)	40±7 <sup>a</sup> (95%)

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores promedio ± E.E. respecto a los hallados para el grupo *control* ( $n=2$ ). Los valores entre paréntesis indican porcentajes respecto al *control*.

Como se discutió en los apartados anteriores, fundamentalmente los iones metálicos pueden entrar en las células vegetales mediante dos mecanismos: *i*) uno no específico, impulsado principalmente por un gradiente quimiosmótico transmembrana; o *ii*) un transporte altamente específico dependiente de energía (Nies 1999).

Una vez dentro de las células, los cationes metálicos, especialmente aquellos con un gran peso atómico (*e.g.*,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ), tienden a unirse y bloquear grupos funcionales específicos de las proteínas (por *ej.*, grupos tiol), inhibiendo su actividad. Otros metales pueden desplazar, ya sea por similitud de tamaño y/o carga, a otros iones esenciales causando alteraciones conformacionales en la estructura de proteínas y ácidos nucleicos, provocando la pérdida de la actividad biológica de estas biomoléculas. Por otro lado, el exceso de metales en el citosol también puede producir, directa o indirectamente (dependiendo del metal), estrés oxidativo, lo cual estimula la formación de especies reactivas del oxígeno y la co-generación de radicales libres (Hall, 2002; Bertin & Averbek 2006; Rico y col., 2009).

Para hacer frente a estos efectos deletéreos, durante las primeras etapas del proceso de fitorremediación, los iones metálicos se adsorben superficialmente y/o incorporan lentamente en las raíces de las plantas donde son atrapados mediante la unión a proteínas y/o secuestrados en vacuolas intracelulares para evitar su diseminación hacia las partes aéreas. Estos mecanismos restringen su translocación y transporte hacia los órganos superiores de las plantas (hojas), fotosintéticamente más activos, protegiéndolos así del daño provocado por la acumulación de metales pesados. Así, la tolerancia de una planta frente al estrés provocado por efecto de la presencia de un metal específico es controlada por una red interrelacionada de mecanismos moleculares y fisiológicos diferentes que coadyuvan para contrarrestar la fitotoxicidad que estos iones producen (Shahid y col., 2018). Sin embargo, una vez que el metal se ha incorporado a nivel intracelular es

igualmente capaz de alterar considerablemente los parámetros fisiológicos afectando directa o indirectamente al metabolismo vegetal (Gardner y Al-Hamdani, 1997; Nichols y col, 2000; Al-Hamdani y Blair, 2004).

En el presente estudio, la acumulación de metales pesados en especímenes autóctonos de *S. biloba* mostró leves alteraciones en los parámetros fisiológicos de las hojas de las plantas expuestas. Sin embargo, se demostró que la capacidad fitorremediadora de estas macrófitas fue diferente para cada metal, sugiriendo respuestas metabólicas y/o fisiológicas ión-selectivas.

En conclusión, los resultados del presente trabajo de tesis concuerdan con otros antecedentes que avalan la capacidad de *S. biloba* para captar iones metálicos del ambiente (Maine y col., 2001, 2004; Paris y col., 2005, Suñe y col., 2007; Hadad y col., 2007; Freitas y col., 2018; Tello Zevallos y col., 2018, Castillo Loría y col., 2019), demostrando que especies nativas obtenidas de ecosistemas locales también poseen esta capacidad, pudiendo ser introducidas como una herramienta biotecnológica eficaz, y de muy bajo costo, para el diseño de sistemas de saneamiento de aguas contaminadas con metales pesados.

## V. CONCLUSIONES

1. Especímenes nativos de *S. biloba*, aislados de ecosistemas naturales autóctonos, mostraron diferentes eficiencias para la eliminación de metales pesados en aguas artificialmente contaminadas, siendo mayor la capacidad para remover  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ , respecto a la hallada para  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .
2. *S. biloba* fue capaz de remover completamente, en 48 h, iguales concentraciones molares de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ , siendo menor esta capacidad para el  $\text{Zn}^{2+}$ , y aún más limitada para el  $\text{Cd}^{2+}$ , indicando que el proceso de fitorremediación de metales pesados por parte de estas macrófitas involucra diferentes mecanismos fisiológicos y/o moleculares ión-selectivos.
3. La eliminación de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  de la columna de agua se correspondió con una cinética de primer orden, indicando que la concentración inicial del metal en el medio es el único parámetro involucrado en la regulación de la velocidad del proceso.  
  
Por el contrario, la eliminación de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  se ajustó a una cinética de segundo orden, implicando que podrían intervenir otros factores, además de la concentración del metal, en la regulación de la velocidad de remoción de estos contaminantes.
4. En todos los casos, la mayor proporción de metal removido de las muestras de agua se encontró acumulada intracelularmente; sin embargo, las concentraciones molares y las cantidades en masa de cada ión fueron diferentes según el metal y las concentraciones iniciales a las que fueron enfrentadas las plantas.



5. La exposición a  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  provocó alteraciones en la apariencia de las plantas, probablemente relacionadas con algún grado de fitotoxicidad provocado por la acumulación de estos metales.
6. La presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  afectó principalmente la concentración de clorofilas en las hojas flotantes de *S. biloba*, demostrando una mayor implicancia de estos iones en los procesos fotosintéticos.
7. La presencia de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  no afectó al contenido de pigmentos antioxidantes (flavonoides y antocianinas) ni de carbohidratos solubles en las hojas de *S. biloba*, aun cuando se hallaron concentraciones importantes de estos metales acumulados en la biomasa vegetal.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia para sustancias toxicas y el registro de enfermedades. (2004). *ATSDR*. Recuperado el 08 de Setiembre de 2019, de Departamento de salud y servicios humanos de los EE.UU: [www.atsdr.Cdc.gov/es](http://www.atsdr.Cdc.gov/es)
- Aksorn, E., & Visoottiviseth, P. (2004). Selection of suitable emergent plants for removal of arsenic from arsenic contaminated water. *ScienceAsia*, *30*, 105-113.
- Al-Hamdani, S., & Blair, S. L. (2004). Influence of copper on selected physiological response in *Salvinia minima* and its potential use in copper remediation. *American Fern Journal*, *94*, 47-56.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals - concepts and applications. *Chemosphere*, *91*, 869-881.
- A Alonso, X., Hadad, H. R., Córdoba, C., Polla, W., Reyes, M. S., Fernández, V., Granados I., Marino L., & Villalba, A. (2018). Macrophytes as potential biomonitors in peri-urban wetlands of the Middle Parana River (Argentina). *Environmental Science and Pollution Research*, *25*, 312-323.
- Andreazza, R., Bortolon, L., Pieniz, S., Bento, F. M., & Camargo, F. A. (2015). Evaluation of two Brazilian indigenous plants for phytostabilization and phytoremediation of copper-contaminated soils. *Brazilian Journal of Biology*, *75*, 868-877.
- Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., Thangavel, P., Roychoudhury, A., Gill, S. S., Rodrigo M. A., Adam, V., Fujita, M., Kizek, R., Duarte, A. C., Pereira, E. & Ahmad, I. (2015). Jaks of metal/metalloid chelation trade in plants - an overview. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 192.
- Antosiewicz, D. M. (2005). Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their. *Environmental Pollution*, *134*, 23-24.
- Appenroth, K. J. (2010). What are "heavy metals" in Plant Sciences? *Acta Physiologiae*, *32*, 615-619.

- Azubuike, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 180-198.
- Barakat, M. A. (2011). New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*, 4, 361-377.
- Bernal Figueroa, A. A. (2014). Fitorremediación en la recuperación de suelos: una visión generak. *Investigación Agraria y Ambiental*, 5, 245-258.
- Bertin, G., & Averbeck, D. (2006). Cadmium: celular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88, 1549-1559.
- Bizzo, A. L., Chaves Intorne, A., Honorio Gomea, P., Satika Suzuki, M., & Santos Esteves, B. (2014). Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 26, 268-277.
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M. B., & Scheckel, K. (2014). Remediation of heavy metal (loid)s contaminated soils-to mobilize or to immobilize? *Journal of Hazardous Materials*, 266, 141-166.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist*, 173, 677-702.
- Burton, K. W., Morgan, E., & Roig, A. (1984). The influence of heavy metals on the growth of sitka-spruce in South Wales forests. II green house experiments. *Plant and Soil*, 78, 271-282.
- Calvo, J., Jung, H., & Meloni, G. (2017). Copper metallothioneins. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 69, 236-245.
- Carpenta, R., & Bernal, M. (2007). Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas Revista Científica y Técnica Ecología y Medio Ambiente*, 16, 1-3.

- Casati, P., & Walbot, V. (2005). Differential accumulation of maysin and rhamnosylorientin in leaves of high altitude landraces of maize after UV-B exposure. *Plant Cell and Environment*, 28, 788-799.
- Castillo Loria, K. (2017). Fitorremediación de Pb<sup>2+</sup> empleando *Salvinia biloba* Raddi en sistemas acuáticos: evaluación de la intensidad y periodicidad de la descarga contaminante sobre la eficiencia del proceso y la fisiología vegetal. *Tesis de maestría*. Rosario, Argentina: Pontificia Universidad Católica Argentina. Facultad de ingeniería Química del Rosario.
- Castillo Loría, K., Emiliani, J., Herrero, M. S., Bergara, C. D., Salvatierra, L. M., & Pérez, L. M. (2019). Effect of daily exposure to Pb-contaminated water into *Salvinia biloba* physiology and phytoremediation performance. *Aquatic Toxicology*, 210, 158-166.
- Caviedes Rubio, D.I., Muñoz Calderón, R.A., Perdomo Gualtero, A., Rodríguez Acosta, D., & Sandoval Rojas, I.J. (2015). Tratamientos para la remoción de metales pesados comúnmente presentes en aguas residuales industriales. Una revisión. *Ingeniería y Región*, 13, 73-90.
- Chen , Y., Hu, W., Huang, B., Weindorf, D. C., Rjan, N., Liu, X., & Niedermann, S. (2013). Accumulation and health risk of heavy metals in vegetables from harmless and organic vegetable production systems of China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 324-330.
- Cirtina, D., Ionescu, N., & Cirtina, L. M. (2016). Environmental impact assessment related to metallurgical industry activities. *Metalurgija -Sisak then Zagreb-(METALURGIJA)*, 55, 481-484.
- Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212, 475-486.
- Clijsters, H., & Van Assche, F. (1985). Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research*, 7, 31-40.
- Código Alimentario Argentino (CAA). (s.f.). Capítulo XII, "Bebidas hídricas, agua y aguas gasificadas" - Agua potable: Art. 982, 983 -Aguas minerales: Art. 985. 2004.
- Concon, J. M. (2009). Heavy metals in food. *Food Toxicology*, 3, 1043-1045.

- Cordero J, Guevara, M., Morales, E., & Lodeiros, C. (2005). Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Revista de Biología Tropical*, 53, 325-330.
- Daniels, W. H., Hendricks, J., Salie, R., & Van Rensburg, S. J. (2004). A mechanism for zinc toxicity in neuroblastoma cells. *Metabolic Brain Disease*, 19, 79-88.
- De la Guardia Peña, O., Ustáriz García, C., García García, M. d., & Morera Barrios, L. (2011). Algunas aplicaciones clínicas del zinc y su acción sobre el sistema inmune. *Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 27, 367-381.
- De la Sota, E. R. (1962). Contribución al conocimiento de las Salviniaceae neotropicales. *Darwiniana*, 12, 465-520.
- De la Sota, E. R. (1976). Sinopsis de las especies argentinas del género *Salvinia* Adanson (Salviniaceae-Pteridophyta). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 17, 47-50.
- De la Sota, E. R. (1995). Nuevos sinónimos en *Salvinia* Ség (Salviniaceae-Pteridophyta). *Darwiniana*, 33, 309-313.
- Delgadillo, A. E., González, C. A., Prieto, F., Villagómez, J. R., & Acevedo, O. (2011). Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14, 597-612.
- Departamento de Asuntos Económicos & Sociales de Naciones Unidas (ONU-DAES). (2015). *Organización de las Naciones Unidas*. Recuperado el 21 de Setiembre de 2019, de ONU: <https://www.un.org/spanish/waterforlifedecade/>
- Dhir, B. (2009). *Salvinia*: An aquatic fern with potential use in phytoremediation. *Environment & We: An International Journal of Science and Technology*, 4, 23-27.
- Dixit, B., Wasiullah, E., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla R., Singh, B. P., Rai, J. P., Sharma, P. K., Lade, H., & Paul, D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7, 2189-2212.
- Duffus, J. (2002). Heavy metal: a meaningful term. *Pure and Applied Chemistry*, 74, 793-807.

- Efroymson, R. A., Will, M. E., Suter, G. W., & Wooten, A. C. (1997). Toxicological benchmarks for screening contaminants of potential concern for effects on terrestrial plants. *Department of Energy, Office of Environmental Management Activities at the East Tennessee Technology Park*, 123.
- El Mai, H. (2013). Técnicas de preconcentración en el análisis de metales traza. Fraccionamiento químico en el control de la contaminación metálica de la bahía de Tánger. *Tesis doctoral*. Cádiz, España: Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias.
- Espinoza-Quiñones, F. R., Da Silva, E. A., de Almeida Rizzutto, M., Palácio, S. M., Módenes, A. N., Szymanski, N., Neiva, M., & Kroumov, A. (2008). Chromium ions phytoaccumulation by three floating aquatic macrophytes from a nutrient medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 3063-3070.
- Estrella-Gómez, N., Mendoza-Cózat, D., Moreno-Sánchez, R., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Martínez-Hernández, A., & Santamaría, J. M. (2009). The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb<sup>2+</sup> by increasing phytochelatin synthesis via changes in SmPCS expression and in phytochelatin synthase activity. *Aquatic Toxicology*, 91, 320-328.
- European Food Safety Authority. (2015). *European Food Safety Authority*. Recuperado el 12 de Setiembre de 2019, de EFSA: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/>
- Flórez Orjuela, Y., & Cotes Cuadro, Á. (2006). Bioabsorción de metales pesados por *Salvinia natans* de los lixiviados del rellenosanitario de Combeima de Ibagué. *Tumbaga*, 1, 89-100.
- Freitas, F., Lunardi, S., Souza, L. B., von der Osten, J. S., Arruda, R., Andrade, R. L., & Battirola, L. D. (2018). Accumulation of copper by the aquatic macrophyte *Salvinia biloba* Raddi (Salviniaceae). *Brazilian Journal of Biology*, 78, 133-139.
- Gardea, J. L., De la Rosa, G., & Peralta, J. r. (2004). Use of phytofiltration technologies in the removal of heavy metals: A review. *Pure and Applied Chemistry*, 76, 801-813.
- Gardner, J. L., & Al-Hamdani, S. H. (1997). Interactive Effects of Aluminium and Humic Substances on *Salvinia*. *Journal of Aquatic Plant Management*, 35, 30-34.

- González Reimers, E., Martínez Riera, A., & Santolaria Fernández, F. (1998). Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on zinc, iron, copper, and manganese contents in different organs and urinary and fetal excretion. *Alcohol*, *16*, 7-12.
- González, C. I., Maine, M. A., Cazenave, J., Sanchez, G. C., & Benavides, M. P. (2014). Physiological and biochemical responses of *Eichhornia crassipes* exposed to Cr (III). *Environmental Science and Pollution Research*, *22*, 3739–3747.
- Hadad, H. R., Maine, M. A., Natale, G. S., & Bonetto, C. (2007). The effect of nutrient addition on metal tolerance in *Salvinia herzogii*. *Ecological Engineering*, *31*, 122-131.
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, *53*, 1-11.
- Haslett, B. S., Reid, R. J., & Rengel, Z. (2001). Zinc mobility in wheat: uptake and distribution of zinc applied to leaves or roots. *Annals of Botany*, *87*, 379-386.
- Huang, Z. (2014). Heavy metals in vegetables and the health risk to population in Zhejiang, China. *Food Control*, *36*, 248-252.
- Jawrowski, Z. (1968). Stable lead in fossil ice and bones. *Nature*, *217*, 152-153.
- Jones, L. H., Clement, C. R., & Hopper, M. J. (1973). Lead uptake from solution by perennial ryegrass and its transport from roots to shoots. *Plant soil*, *38*, 403-414.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauhala, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 3954-3962.
- Kang, Y. J. (1997). Cellular and molecular mechanisms of metal toxicities. *Handbook of Human Toxicology*, 265-268.
- Koch, K., Bhushan, B., & Barthlott, W. (2009). Multifunctional surface structures of plants: an inspiration for biomimetics. *Progress in Materials Science*, *54*, 137-178.
- Lara, T., Soares, A., Pedrosa, M., & Martins, G. (2011). Respostas fisiológicas e anatômicas de plantas jovens de eucalipto expostas ao cádmio. *Árvore*, *35*, 997–1006.

- Laxen, D. P., & Harrison, R. M. (1977). The highway as a source of water pollution: an appraisal of heavy metal lead. *Water Research*, 1-11.
- Leal-Alvarado, D., Espadas, F., Sáenz, L., & Talavera, C. (2016). Lead accumulation reduces photosynthesis in the lead hyper-accumulator *Salvinia minima* Baker by affecting the cell membrane and inducing stomatal closure. *Aquatic Toxicology*, 171, 37-47.
- Lowndes, S. A., & Harris, A. L. (2005). The role of copper in tumour angiogenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10, 1299-1231.
- Maestri, E., Marmioli, M., Visioli, G., & Marmioli, N. (2010). Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental and Experimental Botany*, 68, 1-13.
- Maine, M. A., Duarte, M., & Suñe, N. (2001). Cadmium uptake by floating macrophytes. *Water Research*, 35, 2629-2634.
- Maine, M. A., Suñe, N. L., & Lager, S. C. (2004). Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Waters Research*, 38, 1494-1501.
- Marmioli, M., Antonioli, G., Maestri, E., & Marmioli, N. (2005). Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: An X-ray spectroscopy-based analysis. *Environmental Pollution*, 134, 217-227.
- Marrero Coto, J., Amores Sánchez, I., & Coto Pérez, O. (2012). Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*, 46, 52-61.
- Marschner, H. (1998). Mineral nutrition of higher plants. *Academic Press*, 313-396.
- Martínez, K., Souza, V., Bucio, L., Gómez, L., & Gutiérrez, M. (2013). Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta Toxicológica Argentina*, 21, 33-49.
- Martinez, O. G., & Cacharani, D. (2011). Salviniaceae. *Herbario MCNS*, 1-7.



- Martorell, J. J. (s.f.). Biodisponibilidad de metales pesados en dos ecosistemas acuáticos de la costa Suratlantica andaluza afectados por contaminación difusa. *Tesis Doctoral*. Universidad de Cádiz.
- Mierziak, J., Kamil, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, *19*, 16240-16265.
- Miretzky, P., Saralegui, A., & Cirelli, A. F. (2006). Simultaneous heavy metal removal mechanism. *Chemosphere*, *62*, 247-254.
- Molinari, M., Tucat, G., & Bentivegna, D. (2015). Efecto y concentración del cobre en cultivos regados con sulfato. <https://www.researchgate.net/publication/282086115>.
- Moyad, M. A. (2004). Zinc for prostate disease and other conditions: a little evidence, a lot of hype, and a significant potential problem. *Urologic Nursing*, *24*, 49-52.
- Nava Ruiz, C., & Méndez Armenta, M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Archivos de Neurociencias*, *16*, 140-147.
- Needleman, H. (2004). Lead poisoning. *Annual Review of Medicine*, *55*, 209-222.
- Nichols, P. B., Couch, J. D., & Al-Hamdani, S. H. (2000). Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentration. *Aquatic Botany*, *68*, 313-319.
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *51*, 730-750.
- Olguin, E. J., Sanchez-Galvan, G., Pérez, T., & Pérez, A. (2005). Surface adsorption intracellular accumulation and compartmentalization of Pb(II) in batch-operated lagoons with *Salvinia minima* affected by environmental conditions, EDTA and nutrients. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *32*, 577-586.
- Olguin, E., & Hernandez, M. E. (2002). The Effect of Both Different Light Conditions and the pH Value on the Capacity of *Salvinia minima* Baker for Removing Cadmium. *Acta Biotechnologica*, *22*, 121-131.
- Paris, C., Hadad, H. R., Maine, M. A., & Suñe, A. N. (2005). Eficiencia de dos macrófitas flotantes libres en la absorción de metales pesados. *Limnetica*, *24*, 237-244.

- Pérez, A., García, R., Vázquez, A., Colinas, T., Pérez, M., & Navarro, H. (2008). Concentration of Pb, Cd, Ni, and Zn in Polluted Soils and their Transference to Broccoli Heads. *Terra Latinoamericana*, 26, 215-225.
- Pernia, B., De Sousa, A., Reyes, R., & Castrillo, M. (2008). Biomarcadores de Contaminación por Cadmio en las Plantas. *Interciencia*, 32, 112-119.
- Polec, K., Ruzik, R., Lipiec, E., Ciużyńska, M., & Gawrońska, H. (2007). Investigation of Pb (II) binding to pectin in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 968-972.
- Prado, C., Ponce, S. C., Pagano, E., Prado, F. E., & Rosa, M. (2016). Differential physiological responses of two *Salvinia* species to hexavalent chromium at a glance. *Aquatic Toxicology*, 175, 213-221.
- Ramel, F., Mialoundama, A. S., & Havaux, M. (2013). Nomenclature carotenoid oxidation and photooxidative stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 64, 799-805.
- Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant Science : an International Journal of Experimental Plant Biology*, 180, 169-181.
- Rico, D., Martín-González, A., Díaz, S., de Lucas, P., & Gutiérrez, J. C. (2009). Heavy metals generate reactive oxygen species in terrestrial and aquatic ciliated protozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 149, 90-96.
- Robert, M. (1997). Dégradation de la qualité des sols: risques pour la santé et l'environnement. *Bulletin de L'Académie Nationale de Médecine*, 195, 21-42.
- Rodríguez Serrano, M., Martínez De la Casa, N., Romero Puertas, M., Del Río, L., & Sandalio, L. (2008). Toxicidad del Cadmio en Plantas. *Ecosistemas*, 17, 139-146.
- Rubio, C., González Weller, D., Martín-Izquierdo, R. E., Revert, C., Rodríguez, I., & Hardisson, A. (2007). El zinc: oligoelemento esencial. *Nutrición Hospitalaria*, 22, 101-107.

- Salas Pascual, M., & Quintana Vega, G. (2016). *Salvinia Molesta* D. S. MITCH. (SALVINIACEAE), nueva cita para Canarias y España. *Botánica Macaronésica*, 29, 73-81.
- Samardakiewicz, S., & Woźny, A. (2000). The distribution of lead in duckweed (*Lemna minor* L.). *Plant and Soil*, 226, 107-111.
- Sánchez, C. I. (2010). Perfil sociodemográfico y epidemiológico de la población expuesta a la contaminación por mercurio, plomo y cadmio, ubicada en la vereda Manuel Sur del municipio de Ricaurte y los barrios Brisas del Bogotá y La Victoria del municipio de Girardot. *Investigación en Enfermería*, 93-116.
- Sánchez, N., Subero, N., & Rivero, C. (2011). Determinación de la adsorción de cadmio mediante isothermas de adsorción en suelos agrícolas venezolanos. *Acta Agronómica*, 11, 190-197.
- Sánchez-Galvan, G., Monroy, O., Gómez, J., & Olgún, M. E. (2008). Assessment of the hyperaccumulating lead capacity of *Salvinia minima* using bioadsorption and intracellular accumulation factors. *Water, Air, and Soil Pollution*, 194, 77-90.
- Satarug, S., Garrett, S., Sens, M. A., & Sens, D. (2010). Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environmental Health Perspectives*, 118, 182-190.
- Schneider, I., & Rubio, J. (199). Sorption of Heavy Metal Ions by the Nonliving Biomass of Freshwater Macrophytes. *Environmental Science & Technology*, 33, 2213-2217.
- Seregin, I. V., & Ivanov, V. B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48, 523-544.
- Seregin, I. V., Shpigun, L. K., & Ivanov, V. B. (2004). Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51, 525-533.
- Seth, C. S., Remans, T., Keunen, E., Jozefczak, M., Gielen, H., Opdenakker, K., Weyens, N., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2012). Phytoextraction of toxic metals: a central role for glutathione. *Plant, Cell & Environment*, 35, 334-346.
- Shahid, M. A., Balal, R. M., Khan, N., Zotarelli, L., Liu, G., Ghazanfar, M. U., & Garcia-Sanchez, F. (2018). Ploidy level of citrus rootstocks affects the carbon and nitrogen

- metabolism in the leaves of Chromium-stressed Kinnow mandarin plants. *Environmental and Experimental Botany*, 70-80.
- Sing, A. (2010). Risk assessment of heavy metal toxicity through contaminated vegetables from waste water irrigated area of Varanasi, India. *Tropical Ecology*, 51, 375–387.
- Suñe, N., Sánchez Galván, G., Caffaratti, S., & Maine, M. A. (2007). Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environmental Pollution*, 145, 467-473.
- Tello Zevallos, W. (2016). Determinación de los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de plomo (Pb<sup>2+</sup>) en *Salvinia biloba* Raddi (Acordeon de agua). *Tesis de Maestría*. Rosario, Argentina: Pontificia Universidad Católica de Argentina. Facultad de química e ingeniería.
- Tello Zevallos, W., Salvatierra, L. M., Loureiro, D. B., Morató, J., & Pérez, L. M. (2018). Evaluation of the autochthonous free-floating macrophyte *Salvinia biloba* Raddi for use in the phytoremediation of water contaminated with lead. *Desalination and Water Treatment*, 103, 282-289.
- Verma, S., & Dubey, R. S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164, 645-655.
- Wang, F., Jiao, P., Qi, M., Frezza, M., Dou, Q. P., & Yan, B. (2010). Turning tumorpromoting copper into an anti-cancer weapon via high-throughput chemistry. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 2685-2698.
- World Health Organization. (2010) *WHO*. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization. 20 Avenue Appia, CH-1211 Geneva-27, Switzerland.
- Wintermans, J. F., & De Mots, A. (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophyll a and b and their phaeophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 448-455.
- Wolf, G. I., Pereira, G. C., Castro, E. M., Louzada, J., & Coelho, F. F. (2012). The use of *Salvinia auriculata* as a bioindicator in aquatic ecosystems: biomass and structure dependent on the cadmium concentration. *Brazilian Journal of Biology*, 72, 71-77.

Zeliha, L., Musa, K., & Vesile, Y. (2017). Comparative Study of Cd, Pb, and Ni removal potential by *Salvinia natans* (L.) All. and *Lemna minor* L.: Interactions with Growth Parameters. *Romanian Biotechnological Letters*, 23, 13235-13248.