

Universidad Católica de Santa María

Escuela de Postgrado

Maestría en Química del Medio Ambiente



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FITORREMEDIACIÓN DE
Rosmarinus officinalis L. (ROMERO) EN AGUAS CONTAMINADAS CON
ARSÉNICO.**

Tesis presentada por la Bachiller:

Juyo Salazar, Rosario Belén

Para optar el Grado Académico de:

**Maestro en Química del Medio
Ambiente**

Asesor:

Dr. Jaime Cardénas García

AREQUIPA – PERÚ

2018



Universidad Católica de Santa María

☎ (51 54) 382038 Fax: (51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

**DICTAMEN DE BORRADOR DE TESIS PARA EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO**


Graduando: ROSARIO BELEN JUYO SALAZAR

Título de la Tesis:

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FITORREMIEDIACIÓN DE *Rosmarinus officinalis*
L. (ROMERO) EN AGUAS CONTAMINADAS CON ARSENICO.

Se ha procedido a la revisión de la presente tesis la cual ha logrado obtener los objetivos establecidos y cumple con lo estipulado con la reglamentación vigente por lo que considero que el trabajo está apto para su sustentación

Atentamente,



JAIME CARDENAS GARCIA PHD
COD 0838



Universidad Católica de Santa María

(5154)251210 (5154)251213 ucsm@ucsm.edu.pe http://www.ucsm.edu.pe Apto. 1350
AREQUIPA – PERÚ

"En la Ciencia y en la Fe esta nuestra Fortaleza para mayor Gloria de Dios"

Arequipa, 20 de diciembre del 2017

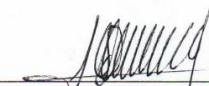
Señor Doctor,
Hugo Tejada Pradell
Director de la Escuela de Postgrado de la UCSM.
Presente.

Ref.: Dictamen de Borrador de Tesis – Expediente 57822

De mi consideración,

Me es grato dirigirme a Ud. con el fin de saludarlo atentamente y en atención al nombramiento como DICTAMINADOR del Borrador de Tesis titulado **"EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE FITORREMEDIACION DE *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO) EN AGUAS CONTAMINADAS CON ARSENICO"** con el que la bachiller **Rosario Belén Juyo Salazar**, pretende optar el Grado Académico de **Magister en Química del Medio Ambiente**, debo mencionar que realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, las mismas que han sido salvadas satisfactoriamente, considero se encuentra **APTO** para continuar con los tramites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela de Postgrado.

Atentamente,



José A. Villanueva Salas, PhD
Docente de la Escuela de Postgrado



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax: (51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

IN SCIENTIA ET FIDE EST FORTITUDO NOSTRA
(En la ciencia y en la fe está nuestra fortaleza)

Arequipa, 21 del Diciembre del 2017

Señor Doctor,
Hugo Tejada Pradell
Director de la Escuela de Postgrado de la UCSM
Presente.

Ref.: DICTAMEN DE BORRADOR DE TESIS PARA EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO

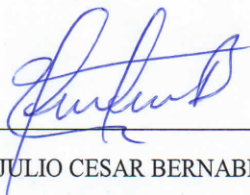
Graduando: ROSARIO BELEN JUYO SALAZAR

Título de la Tesis:

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FITORREMEDIACIÓN DE *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO) EN AGUAS CONTAMINADAS CON ARSENICO.

Se ha procedido a la revisión de la presente tesis la cual ha logrado obtener los objetivos establecidos y cumple con lo estipulado con la reglamentación vigente por lo que considero que el trabajo está apto para su sustentación

Atentamente,



Dr. JULIO CESAR BERNABE ORTIZ

DEDICATORIA

A Dios, por darme la sabiduría y capacidad, por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias nuevas y sobre todo felicidad.

A mis padres Celinda y Hugo, por la educación brindada quienes me apoyaron de forma incondicional en cada etapa de mi vida profesional.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar siempre por derramar sus bendiciones, guiarme por buen camino, por ser mi fortaleza, brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias nuevas y sobre todo felicidad.

A mi familia, en especial a mi madre quien fundó las bases de mi crecimiento por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A la plana docente de la Maestría en Química del Medio Ambiente de la Universidad Católica Santa María, especialmente al Ph.D José Antonio Villanueva Salas por brindarme sus conocimientos y ayuda en momentos determinados.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica por la beca otorgada durante la duración de mis estudios de maestría.

A mis compañeros de Maestría por brindarme su amistad, apoyo incondicional y conocimientos necesarios para superarme como profesional.

Gracias a todos mis amigos y aquellas personas que de una u otra forma han contribuido para el logro de mis objetivos en mi formación profesional.

La presente tesis fue financiada por el

Consejo Nacional de Ciencia,

Tecnología e Innovación Tecnológica

CONCYTEC,

Convenio de Gestión N° 033-2015-

FONDECYT.



ÍNDICE

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. CONTAMINACIÓN DE AGUA.....	1
1.2. METALES PESADOS Y METALOIDES	1
1.3. FITORREMEDIACIÓN.....	2
1.3.1. MECANISMOS DE FITORREMEDIACIÓN	2
1.3.2. FITOEXTRACCIÓN DE METALES Y METALOIDES	6
1.3.3. ABSORCIÓN DE ARSÉNICO EN PLANTAS	7
1.3.4. ACUMULACIÓN Y TRANSPORTE DE ARSÉNICO EN PLANTAS.....	9
1.3.5. MECANISMOS DE ABSORCIÓN, TRANSLOCACIÓN Y DETOXIFICACIÓN DE ARSÉNICO EN PLANTAS.	12
1.3.6. SALIDA ACTIVA DE ARSÉNICO (EFFLUX)	12
1.3.7. SALIDA ACTIVA DE ARSÉNICO (EFFLUX)	14
1.3.8. SINTOMAS VISUALES DE DEFICIENCIA DE NUTRIENTES	15
1.3.9. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA FITORREMEDIACIÓN	17
1.4. <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (ROMERO).....	18
1.4.1. TAXONOMÍA DE <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (ROMERO).....	19
1.4.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ROMERO	20
1.5. ARSÉNICO	23
1.5.1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL ARSÉNICO.....	23

1.5.2. COMPUESTOS DE ARSÉNICO	24
1.5.3. TOXICIDAD DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO	27

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
---------------------------	----

2.1. MATERIALES.....	30
----------------------	----

2.1.1. EQUIPOS	30
----------------------	----

2.1.2. MATERIAL VEGETAL.....	31
------------------------------	----

2.1.3. MATERIAL DE VIDRIO	31
---------------------------------	----

2.1.4. REACTIVOS	31
------------------------	----

2.1.5. OTROS.....	31
-------------------	----

2.2. METODOLOGÍA.....	32
-----------------------	----

2.2.1. RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL.....	32
---	----

2.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL.....	32
--	----

2.2.3. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE CULTIVO HIDROPÓNICO	33
--	----

2.2.4. PROPAGACIÓN DE <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (ROMERO).....	34
---	----

2.2.5. SISTEMA HIDROPÓNICO PARA LA FITORREMEDIACIÓN DE ARSÉNICO	34
--	----

2.2.6. VOLTAMPEROMETRÍA	35
-------------------------------	----

2.2.6.1. CALIBRACIÓN ELÉCTRICA	35
--------------------------------------	----

2.2.6.2. CALIBRACIÓN QUÍMICA.....	36
-----------------------------------	----

2.2.6.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	36
--	----

2.2.7. PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE CLOROFILA “A” DE LAS MUESTRAS DE <i>Rosmarinus Officinalis L.</i> (ROMERO)	43
---	----

2.2.8.	DETERMINACIÓN DE CLOROFILA “A” DE LAS MUESTRAS DE <i>Rosmarinus Officinalis L.</i> (ROMERO) POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.	44
2.2.9.	BIOENSAYO DE TOXICIDAD	44
2.2.10.	TRATAMIENTO Y DIGESTIÓN DE MUESTRAS	46
2.2.11.	DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO DE LAS MUESTRAS DE <i>Rosmarinus Officinalis L.</i> (ROMERO) POR VOLTAMPEROMETRÍA.....	46
2.2.12.	DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA BIOACUMULACIÓN DE ARSÉNICO.....	47
CAPÍTULO III		
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
3.1.	RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL.....	48
3.2.	IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL	48
3.3.	DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE CULTIVO HIDROPÓNICO PARA LA BIOACUMULACIÓN DE ARSENICO	49
3.4.	PROPAGACIÓN DE <i>Rosmarinus officinalis L.</i>	49
3.5.	SISTEMA HIDROPÓNICO PARA LA FITORREMEDIACIÓN DE ARSÉNICO	50
3.6.	VOLTAMPEROMETRÍA	52
3.6.1.	CALIBRACIÓN ELÉCTRICA.....	53
3.6.2.	CALIBRACIÓN QUÍMICA	54
3.6.3.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	55
3.7.	BIOENSAYO DE TOXICIDAD	58
3.8.	BIOACUMULACIÓN DE ARSÉNICO.....	61

3.9. ANALÍISIS DE CLOROFILA “A” DE LAS MUESTRAS DE <i>Rosmarinus Officinalis L.</i> (Romero).....	69
3.10. ANALÍISIS ESTADÍSTICO	75
 CAPITULO IV	
CONCLUSIONES	78
 SUGERENCIAS	80
BIBLIOGRAFÍA	81
ANEXOS	100



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1	Mecanismos de Fitorremediación.....	6
FIGURA 1.2	Estructura de la raíz vegetal.....	8
FIGURA 1.3	Esquema sobre los mecanismos de absorción, translocación y detoxificación de arsénico en plantas.	14
FIGURA 1.4	Imagen de planta romero <i>Rosmarinus officinalis L</i>	20
FIGURA 1.5	Estructura química de ácido carnósico, carnosol, epirosmanol, rosmaridifenol, ácido rosmarínico, compuestos activos encontrados en <i>Rosmarinus officinalis L</i>	22
FIGURA 1.6	Eh (potencial redox) y pH de las especies acuosas de arsénico en un sistema As-O ₂ -H ₂ O a 25 °C y 1 bar de presión total.....	26
FIGURA 1.7	Especiación de a) arsenito y b) arseniato en función del pH.	27
FIGURA 3.1	Diseño de los estanques de vidrio para el cultivo hidropónico	49
FIGURA 3.2	Voltamperograma de la Calibración Química.	54
FIGURA 4.3	Representación gráfica de la linealidad promedio	55
FIGURA 3.4	Bioacumulación de Arsénico en los diferentes tratamientos.	63
FIGURA 3.5	Tratamiento T2: Curva de bioacumulación de arsénico (V) utilizando los promedios de hojas de <i>Rosmarinus officinalis L</i> . (Romero) durante 35 días de experimentación (b) 5 mg.L ⁻¹	65
FIGURA 3.6	Tratamiento T3: Curva de bioacumulación de arsénico (V) utilizando los promedios de hojas de	

	<i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero) durante 35 días de experimentación (b) 10 mg.L ⁻¹	66
FIGURA 3.7	Tratamiento T4: Curva de bioacumulación de arsénico (V) utilizando los promedios de hojas de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero) durante 35 días de experimentación (b) 15 mg.L ⁻¹	67
FIGURA 4.8	Barrido Espectral de la muestra de hojas de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero).	69
FIGURA 3.9	Tratamiento T2: Curva de Clorofila “a” utilizando los promedios de hojas de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero) durante 35 días de experimentación sometidas a (b) 5 mg.L ⁻¹	72
FIGURA 3.10	Tratamiento T3: Curva de Clorofila “a” utilizando los promedios de hojas de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero) durante 35 días de experimentación sometidas a (c) 10 mg.L ⁻¹	72
FIGURA 3.11	Tratamiento T4: Curva de Clorofila “a” utilizando los promedios de hojas de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero) durante 35 días de experimentación sometidas a (d) 15 mg.L ⁻¹	73

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.1	Mecanismos de fitorremediación.	5
TABLA 1.2	Clasificación Taxonómica del <i>Rosmarinus officinalis</i> <i>L.</i>	19
TABLA 2.1	Tratamientos para el bioensayo de toxicidad	45
TABLA 3.1	Evolución de la toxicidad a diferentes concentraciones de Solución Nutritiva La Molina® en <i>Rosmarinus officinalis L.</i> durante 20 días de experimentación.	51
TABLA 3.6	Evolución de la toxicidad a diferentes concentraciones Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7$ H_2O) en <i>Rosmarinus officinalis L.</i> durante 25 días de experimentación.	59
TABLA 3.7	Análisis de arsénico (V) del Bioensayo de Toxicidad en raíces y hojas de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero) a diferentes concentraciones de Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7$ H_2O) durante 25 días de experimentación.	62
TABLA 3.8.	Bioacumulación de arsénico (V) en hojas de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero) a 5, 10 y 15 mg.L^{-1} de Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) durante 35 días de experimentación.	64
TABLA 3.9	Concentración de Clorofila “a” en hojas de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero) a 5, 10 y 15 mg.L^{-1} de Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) durante 35 días de experimentación.	71
TABLA 4.10	Análisis estadístico de los promedios de la concentración de arsénico (V) en las hojas del	

	<i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero) de los diferentes tratamientos.	75
TABLA 4.11	Análisis de Varianza ANOVA de un factor de los promedios de la concentración de arsénico (V) en las hojas del <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero) de los diferentes tratamientos.	75
TABLA 4.12	Prueba de Tukey: Tabla de comparación de la concentración de arsénico (V) en las hojas del <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero) en los diferentes tratamientos.	76
TABLA 4.13	Análisis estadístico de los promedios de la concentración de clorofila “a” en las hojas del <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero) de los diferentes tratamientos.	77
TABLA 4.14	Análisis de Varianza ANOVA de un factor de los promedios de la concentración de clorofila “a” en las hojas del <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero) de los diferentes tratamientos.	77

ABREVIATURAS

% R	Porcentaje de recuperación
AE	Electrodo auxiliar
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemist</i>
C.V	Coefficiente de variación
DCA	Diseño Completamente al Azar
DMA	Ácido dimetilarsínico
DTPA	Dietil-triaminopentacético
GSH	Glutación
HMDE	Electrodo de mercurio de gota colgante
ICH	International Conference of Harmonization
LC	Limite de cuantificación
LD	Limite de detección
MMA	Ácido monometilarsónico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAHs	Hidrocarburos policiclicos aromaticos
RE	Electrodo de referencia
S_{bi}	Estimador correspondiente a la desviación estándar del blanco.
S_d	Desviación estandar
UV	Uv
UV-VIS	Ultravioleta-visible
WE	Electrodo de trabajo
Y_{bi}	Estimador de la respuesta del blanco para calcular el LC y LD.



RESUMEN

El arsénico es un metaloide presente tóxicos presente en el medio ambiente y la especiación de éste depende de diversos factores químicos, físicos y biológicos. La distribución y contaminación del arsénico se debe a procesos naturales y antropogénicos. Las altas concentraciones de arsénico en agua se han convertido en un problema, debido a las exposiciones prolongadas, esta comprobado que causa daños crónicos a la salud. La especie vegetal *Rosamrinus officinalis* (Romero) fue identificada en el HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, la cual acreditó a dicha especie vegetal. La fitorremediación de arsénico se realizó bajo sistema hidropónico de raíz flotante por un periodo de 35 días; utilizando plantas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) contaminados con Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a concentraciones de a 5 mg.L^{-1} (T2), 10 mg.L^{-1} (T3), 15 mg.L^{-1} (T4) y un tratamiento sin contaminante (T1). Para realizar la cuantificación de arsénico en hojas se realizó un proceso de digestión por microondas utilizando ácido nítrico HNO_3 al 12%, se validó el método por voltamperometría catódica de pulso diferencial utilizando la estación voltamperométrica (797 VA Computrace de Metrohm) que constaba de un

electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3 mol.L⁻¹. Como resultados de bioacumulación de arsénico (V), se obtuvo que a una concentración máxima para 5 mg.L⁻¹ (T2), 10 mg.L⁻¹ (T3), 15 mg.L⁻¹ (T4) fue 117.662 ± 0.591 mg.Kg⁻¹, 274.105 ± 0.937 mg.Kg⁻¹, 330.136 ± 0.013 mg.Kg⁻¹, respectivamente. Las hojas presentaron clorosis a medida que el tiempo transcurría debido a la presencia del contaminante se determinó por espectrofotometría clorofila "a" que fue decreciendo significativamente, la concentración final para 1mg.L⁻¹ (T1), 5 mg.L⁻¹ (T2), 10 mg.L⁻¹ (T3), 15mg.L⁻¹ (T4) fue respectivamente 6.760 ± 0.056 mg.L⁻¹, 3.058 ± 0.039 mg.L⁻¹, 2.759 ± 0.025 mg.L⁻¹, 1.078 ± 0.021 mg.L⁻¹. Según los resultados obtenidos, el *Rosmarinus officinalis* tiene el potencial para acumular arsénico dentro de sus hojas por un periodo de 35 días, siendo una técnica de fitorremediación viable para eliminar arsénico en medios contaminados.

Palabras claves: Arsénico, *Rosmarinus officinalis*, Solución nutritiva, Bioacumulación, Voltamperometría, Espectrofotometría.

ABSTRACT

Arsenic is a toxic present metalloid present in the environment and the speciation of this depends on various chemical, physical and biological factors. The distribution and contamination of arsenic is due to natural and anthropogenic processes. High concentrations of arsenic in water have become a problem, due to prolonged exposures, it is proven to cause chronic damage to health. The plant species *Rosmarinus officinalis* (Romero) was identified in the HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA) of the University of San Agustín, which accredited said vegetable species. The phytoremediation of arsenic was carried out under a floating root hydroponic system for a period of 35 days; using plants of *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) contaminated with disodium arsenate heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) at concentrations of 5 mg.L^{-1} (T2), 10 mg.L^{-1} (T3), 15 mg.L^{-1} (T4) and a treatment without contaminants (T1). To perform the quantification of arsenic in leaves, a microwave digestion process using 12% nitric acid HNO_3 was carried out, the method was validated by differential pulse cathodometry using the voltammetric station (797 VA Computrace de Metrohm) which included of a mercury droplet drop electrode (HMDE), an auxiliary platinum electrode and a reference electrode of $\text{Ag} / \text{AgCl} / \text{KCl}$ 3 mol.L^{-1} .

As a result of bioaccumulation of arsenic (V), it was obtained that at a maximum concentration for 5 mg.L⁻¹ (T2), 10 mg.L⁻¹ (T3), 15 mg.L⁻¹ (T4) was 117.662 ± 0.591 mg.Kg⁻¹, 274.105 ± 0.937 mg.Kg⁻¹, 330.136 ± 0.013 mg.Kg⁻¹, respectively. The leaves presented chlorosis as time elapsed due to the presence of contaminants was determined chlorophyll "a" that was significantly decreasing, the final concentration for 1mg.L⁻¹ (T1), 5 mg.L⁻¹ (T2), 10 mg.L⁻¹ (T3), 15mg.L⁻¹ (T4) was respectively 6.760 ± 0.056 mg.L⁻¹, 3.058 ± 0.039 mg.L⁻¹, 2.759 ± 0.025 mg.L⁻¹, 1.078 ± 0.021 mg.L⁻¹. According to the obtained results, Rosmarinus officinalis has the potential to accumulate arsenic (III) in its leaves for a period of 35 days, being a viable phytoremediation technique to eliminate arsenic in continy media.

Key words: Arsenic, Rosmarinus officinalis, Nutrient solution, Bioaccumulation, Voltammetry, Spectrophotometry.

INTRODUCCIÓN

El principal problema que existe en nuestra región es la contaminación del agua con metales pesados y metaloides, en el año 2014 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un estudio sobre la contaminación por arsénico de las aguas subterráneas y superficiales en Perú, el cual muestra una contaminación por arsénico generalizada que supera el límite de arsénico establecido por la OMS en la región Arequipa y supone una amenaza para la salud pública.¹ Actualmente se han realizado monitoreos en aguas superficiales en la región donde los valores de concentración de arsénico superan el límite establecido. La contaminación antropogénica en nuestra región es uno de nuestros principales problemas, las actividades mineras liberan arsénico a partir de sulfuros minerales durante las tareas de excavación.^{2,3} El escurrimiento de arsénico proveniente de lugares contaminados afecta las reservas de agua dulce y sus ecosistemas asociados, la contaminación de aguas subterráneas como resultado de la actividad humana es poco común porque el arsénico tiene una fuerte tendencia a adherirse a las partículas de tierra y los sedimentos.² Por el contrario, la liberación natural de arsénico de materiales geológicos se ha convertido en una amenaza para las fuentes de agua potable del mundo.⁴ Las emisiones de arsénico

hacia la atmósfera producto de la fundición del cobre constituyen, con mucho, la mayor fuente de arsénico de la industria minera y metalúrgica y han sido el objetivo de las tecnologías para el control de la contaminación y de regulaciones cada vez más exigentes.^{3,5,6} Nuestro país se encuentra como uno de los principales productores de arsénico a nivel mundial (4,500 toneladas).⁷

Es conocido desde hace años que la exposición crónica al arsénico por la ingestión de agua puede causar efectos adversos a la salud humana, se tienen los primeros antecedentes históricos que relacionaron la presencia de arsénico en el agua y lesiones en la piel como hiperpigmentación, hiperqueratosis y cáncer cutáneo.⁸ Su toxicidad depende de la forma química; así, del arsénico inorgánico (As) la forma trivalente (As^{3+}) es más tóxica que la pentavalente (As^{5+}) y ambas más que sus compuestos metilados.

Algunos estudios in vitro sugieren que la absorción celular del As (III) es mayor que la del As (V).^{9,10} Aproximadamente el 95% de una dosis ingerida de compuestos de arsénico trivalente se absorbe en el tracto digestivo.¹¹ Por medio de numerosos estudios se sabe que una exposición a largo plazo causa lesiones características en la piel, incluyendo modificaciones en la pigmentación, principalmente en el tronco y las extremidades, queratosis en las palmas de las manos y plantas de los pies, hiperqueratosis, hiperpigmentación y cáncer a la piel.^{12,13} Poblaciones expuestas al arsénico muestran esas lesiones en la piel, siendo éstas una manifestación tardía de su toxicidad. La prevalencia de estas lesiones cutáneas no cancerosas ha sido relatada en más del 80% de las poblaciones estudiadas.¹⁴ La ingestión de agua con arsénico puede llevar a un incremento de abortos espontáneos y de recién nacidos muertos. Una exposición prolongada a concentraciones de arsénico inorgánico dentro del valor sugerido por la OMS en el agua de bebida puede causar efectos cardiovasculares, incluyendo arritmias, hipertensión, isquemia cardíaca y cerebral, diabetes mellitus y alteraciones arteriales periféricas como la enfermedad del "pie negro" que resulta en gangrena. Los estudios sobre el potencial neurotóxico y desarrollo de efectos reproductivos adversos asociados con la ingestión de arsénico en el agua de bebida son inconclusivos.¹⁵ Actualmente se utilizan varias tecnologías

para eliminar arsénico y otros metales pesados, como tratamientos fisicoquímicos con óxidos de hierro, revestimientos de arcilla y filtros de carbón activado. El aumento de costos y la limitada eficacia en los métodos convencionales pueden afectar de manera irreversible las propiedades del suelo, agua y de los seres vivos que en ellos habitan.¹⁶ Por lo que es necesario investigar alternativas de tratamientos económicos, eficientes y sencillos. El desarrollo de tecnologías alternativas para el tratamiento de aguas, como la fitorremediación ofrece numerosas ventajas en relación con los métodos fisicoquímicos. La fitorremediación representa una alternativa sustentable y de bajo costo para la rehabilitación de ambientes afectados por contaminantes naturales y antropogénicos.¹⁷ El Perú tiene una extraordinaria diversidad de especies, 25000 especies de flora (10% del total mundial) de las cuales un 30% son endémicas.¹⁸ Recientemente se están desarrollando investigaciones y estudios de plantas que tienen un alto potencial para remediar aguas y suelos contaminados, sin embargo son escasos. Para el caso del romero *Rosmarinus officinalis L.* no existen trabajos de investigación acerca de su potencial remediador. Por lo que en este trabajo se evaluó la capacidad de fitorremediación de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) en aguas contaminadas con arsénico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad de fitorremediación de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) en aguas contaminadas con arsénico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la especie vegetal y determinar las condiciones óptimas para el desarrollo de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero).
- Realizar la validación analítica voltamperométrica para determinar arsénico en *Rosmarinus officinalis L.* (Romero),
- Realizar el bioensayo de toxicidad y determinar el nivel de tolerancia del *Rosmarinus officinalis L.* (Romero).
- Realizar la bioacumulación de arsénico en *Rosmarinus officinalis L.* (Romero).
- Determinar la máxima capacidad de acumulación de arsénico en *Rosmarinus officinalis L.* (Romero).
- Determinar la concentración de clorofila “a” en *Rosmarinus officinalis L.* (Romero).

HIPÓTESIS

Dado que existen estudios acerca de la capacidad de fitorremediación de algunas plantas para tolerar, absorber, acumular y degradar contaminantes, es probable que *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) sea eficiente para remediar aguas contaminadas con arsénico.

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1.1. CONTAMINACIÓN DE AGUA

El vertimiento de efluentes procedente de las actividades agropecuarias, mineras, industriales y petroquímicas generan una serie de impactos negativos sobre los ecosistemas acuáticos.²² El agua es uno de los elementos naturales que se encuentra en mayor cantidad en el planeta Tierra. También es gran responsable de la posibilidad de desarrollo de las distintas formas de vida: vegetales, animales y el ser humano. Los organismos de todos los seres vivos están compuestos de agua en una alta proporción, siendo que ésta es la que compone los músculos, órganos y los diferentes tejidos. Por esto, sin agua no es posible la vida.

²³

1.2. METALES PESADOS Y METALOIDES

El vertimiento de efluentes procedente de las actividades agropecuarias, mineras, industriales y petroquímicas generan una serie de impactos negativos sobre los ecosistemas acuáticos.²² El agua es uno de los elementos naturales que se encuentra en mayor cantidad en el planeta Tierra. También es gran responsable de la posibilidad de desarrollo de

las distintas formas de vida: vegetales, animales y el ser humano. Los organismos de todos los seres vivos están compuestos de agua en una alta proporción, siendo que ésta es la que compone los músculos, órganos y los diferentes tejidos. Por esto, sin agua no es posible la vida.

23

1.3. FITORREMEDIACIÓN

Las fitotecnologías se basan en los mecanismos fisiológicos básicos que tienen lugar en las plantas y en los microorganismos asociados a ellas, tales como: transpiración, fotosíntesis, metabolismo y nutrición. Dependiendo del tipo de contaminante, las condiciones del sitio y el nivel de limpieza requerido; las tecnologías de fitorremediación se pueden utilizar como medio de contención (rizofiltración, fitoestabilización y fitoinmovilización) o eliminación (fitodegradación, fitoextracción y fitovolatilización).²⁹

1.3.1. MECANISMOS DE FITORREMEDIACIÓN

La fitoestabilización permite inmovilizar contaminantes en el suelo a través de su absorción y acumulación en las raíces o bien, por precipitación en la zona de la rizosfera. Este proceso reduce la movilidad de los contaminantes y evita su migración a las aguas subterráneas o al aire.³⁰

La **fitoestabilización** es efectiva en suelos de textura fina con alto contenido de materia orgánica.³¹ Se aplica principalmente en terrenos extensos en donde existe contaminación superficial. Esta tecnología tiene como ventajas, sobre otros métodos de remediación de suelos, que es de menor costo, fácil de aplicar y estéticamente agradable.

Algunas plantas empleadas con fines de fitoestabilización son:

- *Hyparrhenia hirta* (Pb);
- *Zygophyllum fabago* (Zn);
- *Lupinus albus* (Cd,As);
- *Anthyllis vulneraria* (Zn, Pb, Cd);
- *Deschampsia cespitosa* (Pb, Cd, Zn);
- *Cardaminopsis arenosa* (Cd, Zn);
- *Horedeum vulgare*, *Lupinus angustifolius* y *Sécale cereale* (As);
- *Lolium italicum* y *Festuca arundinaceae* (Pb, Zn);
- *Brassica júncea* (Cd, Zn, Cu, Mn, Fe, Pb).³²⁻³⁶

La **rizofiltración** utiliza las plantas para eliminar del medio hídrico contaminantes a través de la raíz.³⁷ En la rizofiltración estas plantas se cultivan de manera hidropónica. Cuando el sistema radicular está bien desarrollado, las plantas se introducen en el agua contaminada con metales, en donde las raíces los absorben y acumulan. A medida que las raíces se van saturando, las plantas se cosechan y se disponen para su uso final.³⁸⁻⁴⁰ Existe una gran cantidad de estudios relacionados con la capacidad de acumulación de contaminantes de diversas plantas acuáticas, algunos ejemplos de ellas son:

- *Scirpus lacustris* (Cd, Cu, Pb, Mg, Fe, Se, Cr),
- *Lemna gibba* (Pb, As, Cu, Cd, Ni, Cr, Al, Fe, Zn, Mn),
- *Azolla caroliniana* (Hg, Cr Sr, Cu, Cd, Zn, Ni, Pb, Au, Pt),
- *Elatine Manda* (As),
- *Wolffia papulifera* (Cd),
- *Polygonum punctatum* (Cu, Cd, Pb, Se, As, Hg, Cr, Mn),
- *Myriophyllum aquaticum*, *Ludwigina palustris* y *Mentha aquatic* (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni)⁴¹⁻⁵⁸

La **fitoextracción o fitoacumulación** consiste en la absorción de metales contaminantes mediante las raíces de las plantas y su acumulación en tallos y hojas. El primer paso para la aplicación de esta técnica es la selección de las especies de planta más adecuada para los metales presentes y las características del emplazamiento. Una vez completado el desarrollo vegetativo de la planta el siguiente paso es cortarlas y proceder a su incineración y traslado de las cenizas a un vertedero de seguridad. La fitoacumulación se puede repetir ilimitadamente hasta que la concentración remanente de metales en el suelo esté dentro de los límites considerados como aceptables.⁵⁹

Algunas plantas empleadas para esta técnica fitocorrectiva son:

- *Thlaspi caerulescens* (Cd);
- *Sedum alfredii*, *Viola baoshanensis* y *Vertiveria zizanioides* (Zn, Cd, Pb);
- *Alyssum múrale*, *Trifolium nigriscens*, *Psychotria douarrei*, *Geissois pruinosa*, *Homalium guillainii*, *Hybanthus floribundus*, *Sebertia acuminata*, *Stackhousia tryonii*, *Pimelea leptospermoides*, *Aeollanthus biformifolius* y *Haumaniastrum robertii* (Ni);
- *Brassica júncea*, *Helianthus annuus*, *Sesbania drummondii* (Pb); *Brassica napus* (Cu, Pb, Zn); y *Pistia stratiotes* (Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn).⁶⁰⁻⁷¹ La fitovolatilización se produce a medida que los árboles y otras plantas en crecimiento absorben agua junto con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Algunos de estos pueden llegar hasta las hojas y evaporarse o volatilizarse en la atmósfera.⁷² Mediante este proceso se han eliminado contaminantes como: compuestos orgánicos volátiles (benceno, nitrobenceno, tolueno, etilbenceno y *m*-xileno), As, Se y Hg.^{73,74} En la fitodegradación las plantas y

los microorganismos asociados a ellas degradan los contaminantes orgánicos en productos inofensivos, o bien, mineralizarlos hasta CO₂ y H₂O. En este proceso los contaminantes son metabolizados dentro de los tejidos vegetales y las plantas producen enzimas como la dehalogenasa y la oxigenasa, que ayudan a catalizar la degradación.⁷⁵ La fitodegradación se ha empleado para la remoción de explosivos como el TNT, hidrocarburos halogenados, Bisfenol A, PAHs y pesticidas organoclorados y organofosforados⁷⁶⁻⁷⁹ La fitoinmovilización provoca la sujeción y reducción de la biodisponibilidad de los contaminantes mediante la producción de compuestos químicos en la interfaz suelo-raíz, los que inactivan las sustancias tóxicas, ya sea por procesos de absorción, adsorción o precipitación.⁸⁰

TABLA 1.1 *Mecanismos de fitorremediación.*⁸¹

PROCESO	MECANISMO	CONTAMINANTES
FITOESTABILIZACIÓN	Complejación	Orgánicos e Inorgánicos
FITOEXTRACCIÓN	Hiperacumulación	Inorgánicos
FITOVOTALIZACIÓN	Volatilización a través de las hojas	Orgánicos e Inorgánicos
FITOINMOVILIZACIÓN	Acumulación en la rizosfera	Orgánicos e Inorgánicos
FITODEGRADACIÓN	Uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes	Orgánicos
RIZOFILTRACIÓN	Uso de raíces para absorber y adsorber contaminantes del agua	Orgánicos e Inorgánicos

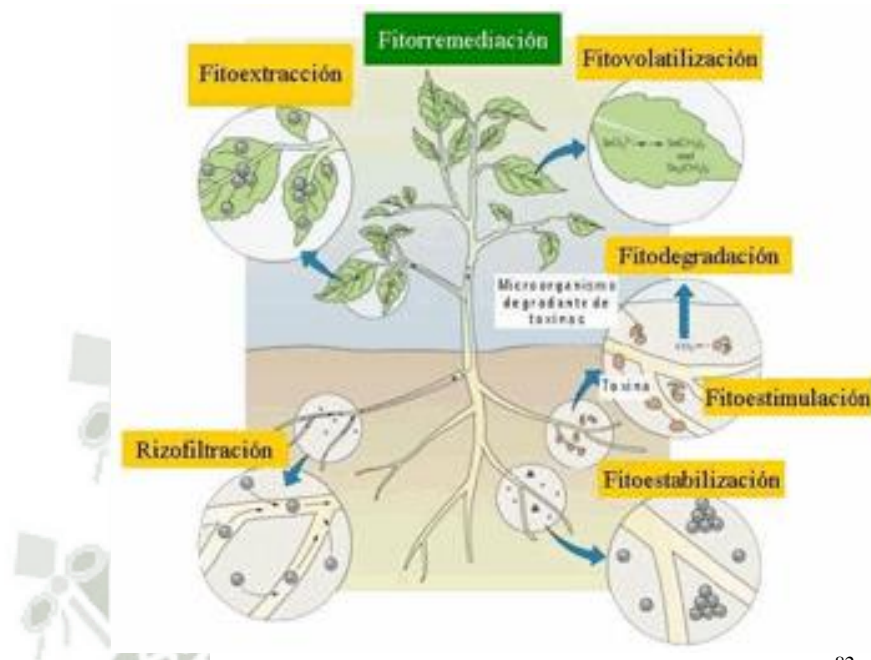


FIGURA 1.1 Mecanismos de Fitorremediación.⁸²

1.3.2. FITOEXTRACCIÓN DE METALES Y METALOIDES

El término fitoextracción se refiere principalmente a la eliminación de metales pesados o radionúclidos del suelo por medios de las capacidades de absorción de las plantas. Las plantas pueden acumular metales pesados esenciales para el crecimiento y el desarrollo como Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo y Ni. Además, algunos de ellos tienen la capacidad de acumular metales pesados que no se conocen sus funciones biológicas tales como As, Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se y Hg.⁸³

La fitoextracción de metales pesados representa uno de las mayores oportunidades económicas para la fitorremediación debido al tamaño y alcance de problemas asociados con el suelo contaminado con metales y la ventaja competitiva que ofrece la tecnología de remediación.⁸⁴ La eficiencia de la fitoextracción

depende de muchos factores como la biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo, las propiedades del suelo, la especiación de los metales pesados en el suelo y las especies predominantes para absorción en la plantas. Las plantas adecuadas para fitoextracción deberían tener las siguientes características ⁸⁵⁻⁸⁹

- Alta tasa de crecimiento y desarrollo.
- Alta producción de biomasa.
- Ampliamente distribuida y sistema radicular muy ramificado.
- Capacidad de acumulación de metales pesados.
- Translocación de metales pesados de raíz a parte aérea de la planta.
- Tolerancia a los efectos tóxicos de los metales pesados.
- Resistencia a patógenos y plagas.
- Fácil de cultivar y cosechar.
- Repulsión a los herbívoros para evitar la contaminación a la cadena alimenticia.

1.3.3. ABSORCIÓN DE ARSÉNICO EN PLANTAS

La absorción radicular es la vía mayoritaria de entrada a la planta de muchos elementos y es necesario que el elemento en cuestión se encuentre disuelto para ser absorbido por la planta.⁹⁰

Los iones solubilizados en la zona de la raíz entran en ella gracias al movimiento del flujo del agua o por difusión entre la solución que hay dentro del apoplasto de la raíz y la circundante.

Estructura simplificada del corte de una raíz vegetal tipo. (FIGURA 1.2).

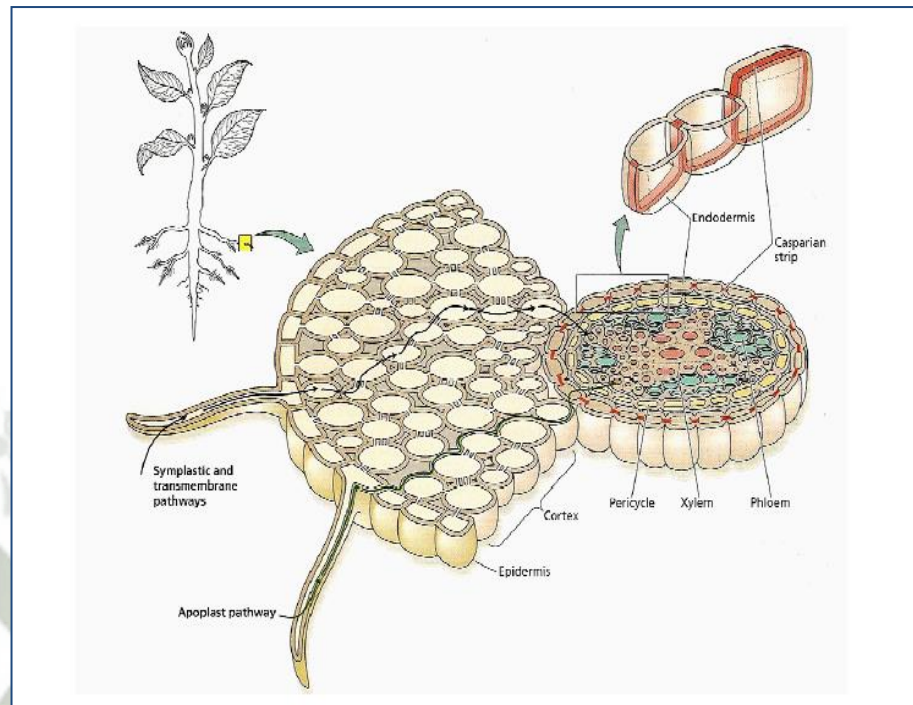


FIGURA 1.2 Estructura de la raíz vegetal. Se detallan con flechas las vías de absorción por la raíz apoplástica y simplástica.⁹¹

La solución y los iones disueltos pueden entrar directamente vía simplástica (entrada dentro de las células) o apoplástica, en un flujo desde la epidermis hasta la Banda de Caspari a través del espacio libre intercelular.

La Banda de Caspari obliga a los elementos químicos a continuar el camino por la vía simplástica, es decir, a penetrar en el interior de las células vegetales. A nivel de la membrana celular la entrada de los iones (absorción) se produce de forma general mediante proteínas transportadoras. El paso de los iones se puede producir por transporte pasivo (difusión facilitada a favor de gradiente) o activo (en contra de gradiente con gasto de energía). Aunque hay distintos tipos de transportadores de membrana, en el caso del arsénico hay dos que tienen un papel fundamental en su absorción: las acuaporinas y los transportadores de fosfato.

Las acuaporinas son canales de entrada de agua por los que pueden entrar otras moléculas no cargadas, como el ácido arsenioso.

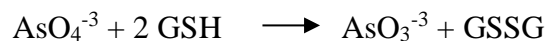
Varios autores han comprobado la implicación de las acuaporinas en la absorción de arsenito.^{92,93}

Experimentalmente se ha comprobado también que el arsenito comparte vías de entrada y transporte con el silicio en plantas de arroz,⁹⁴ debido a que existe un grupo de acuaporinas (NIPs) que juegan un papel fundamental en la absorción de moléculas sin carga como glicerol, amoníaco y ácido bórico, silícico y arsenioso.⁹⁵ Mientras, los transportadores de fosfato (de los que hay distintos tipos con distinta afinidad) pueden permitir la entrada de arseniato en muchas especies vegetales. Estudios fisiológicos han demostrado el papel principal de estos canales fosfato para la absorción de arseniato por las raíces vegetales.^{96,97}

El mecanismo de absorción de fosfato/arseniato implica un cotransporte del anión y protones, con una estequiometría de 2 H⁺ por cada anión.⁹⁵ Hasta el momento no se ha descrito ningún transportador específico para la absorción de arsénico.

1.3.4. ACUMULACIÓN Y TRANSPORTE DE ARSÉNICO EN PLANTAS

Una vez en el interior de la célula, el arseniato es reducido a arsenito gastando glutatión reducido:



Catalizado por la actuación de arseniato reductasas.⁹⁸ Así se ha comprobado que la mayoría del arsénico en tejidos vegetales está presente en la forma de arsenito,⁹⁹ independientemente de lo que hubiese en la solución de cultivo.

Esta forma tiene una alta afinidad por los grupos tiol $-SH$ y suele ser complejada y almacenada en la vacuola, pero también puede transportarse vía xilema a otros tejidos vegetales. El movimiento xilemático está gobernado por el flujo de agua creado por la corriente de transpiración, pero también está mediado por proteínas transportadoras de membranas. Recientemente se ha descrito un transportador localizado entre la exodermis y endodermis vegetal (Lsi2), inicialmente implicada en la nutrición de silicio, que permite la entrada de arsenito hacia el xilema.⁹⁴

El transporte de arsénico en la mayoría de especies vegetales no es generalmente muy efectivo y suele permanecer en las raíces, excepto en aquellas plantas con una capacidad excepcional de acumular arsénico en parte aérea. La acumulación de arsenito en vacuola puede influir en la baja tasa de llegada del arsénico al xilema,⁹⁵ lo que puede proteger a zonas sensibles de la parte aérea de la llegada del elemento tóxico. El transporte xilemático de arsénico tiene gran importancia porque va a determinar la distribución y localización del metaloide en la planta. Dicho transporte ha sido estudiado intensamente en los últimos años con resultados interesantes, aunque contradictorios en algunos aspectos. La reducción de $As(V)$ a (III) en la raíz parece un proceso clave para bloquear el transporte de As en muchas especies vegetales.

El fosfato es un anión altamente móvil en planta, por lo que cabría esperar por analogía que el arseniato lo sea también.

Dicha hipótesis fue comprobada en plantas mutantes de *A. thaliana* cuya arseniato reductasa había sido silenciada, que tuvieron un ratio $[As]_{\text{Parte Aérea}}:[As]_{\text{Raíz}}$ 25 veces mayor que las plantas silvestres.¹⁰⁰

Dichos autores sugirieron que el aumento de dicha relación se debía a la mayor proporción de $As(V)$ en la raíz disponible para

el transporte vía xilema, presumiblemente a través de las vías del fosfato.

La mayoría del arsénico en plantas no acumuladoras se encuentra en forma de As(III), ¹⁰¹⁻¹⁰³ por lo que dicha reducción a nivel radicular podría estar relacionada con algún mecanismo fisiológico en las plantas que limite el flujo del As en el xilema y proteja la parte aérea del metaloide. Adicionalmente, la mayoría del arsénico en raíz se encuentra en forma complejada en plantas, ¹⁰⁴ y se ha observado una correlación negativa entre el porcentaje de arsénico complejado por grupos -SH en la raíz y la translocación del arsénico hacia la parte aérea.¹⁰⁵ A este respecto, ¹⁰⁶ postulan que el arsénico complejado no es transportado por la vía xilemática.

En cualquier caso, tanto en plantas no acumuladoras como acumuladoras parece que el arsénico se almacena en la vacuola vegetal una vez dentro del citoplasma celular, para impedir su interferencia en el normal funcionamiento celular.⁹⁸

Aunque para arsénico no se ha descrito ningún mecanismo similar hasta la fecha, cabe destacar que para otros elementos traza se ha descrito como hay tejidos menos activos metabólicamente que son susceptibles de almacenar el elemento tóxico de forma menos dañina para la planta, como son tejidos epidérmicos¹⁰⁷ o senescentes.¹⁰⁸

Las concentraciones de arsénico en parte aérea excepcionalmente superan 2 mg.g⁻¹ de arsénico. ¹⁰⁹ Desde el punto de vista agrícola, existe un problema en las zonas que son inundadas con aguas cargadas con arsénico ya que los cultivos pueden contener cantidades del metaloide que los hacen peligrosos para la alimentación.¹¹⁰

1.3.5. MECANISMOS DE ABSORCIÓN, TRANSLOCACIÓN Y DETOXIFICACIÓN DE ARSÉNICO EN PLANTAS.

Las plantas toman el arseniato y arsenito a través de los transportadores de fosfato o acuagliceroporinas respectivamente. Las plantas pueden absorber pequeñas proporciones de arsénico orgánico, pero no se conoce a través de qué transportadores. El arseniato se reduce mayoritariamente en la raíz mediante la acción de arseniato reductasas y la presencia de GSH reducido. El arsenito radicular puede ser bombeado hacia el exterior. Solo una pequeña parte del arsénico absorbido es transportado vía xilema en la mayoría de las especies vegetales, aunque los hiperacumuladores consiguen translocar efectivamente el arsénico. El arsénico es complejado en planta por compuestos ricos en azufre como glutatión y fitoquelatinas. Estos complejos y/o el As (III) libre pueden secuestrarse en la vacuola. El transporte de raíz a parte aérea (marcado en rojo y azul) es un punto diana sobre el que trabajar en biología molecular para la mejora de cultivos (impedir la translocación) o la hiperacumulación (mejorar el transporte en la planta).

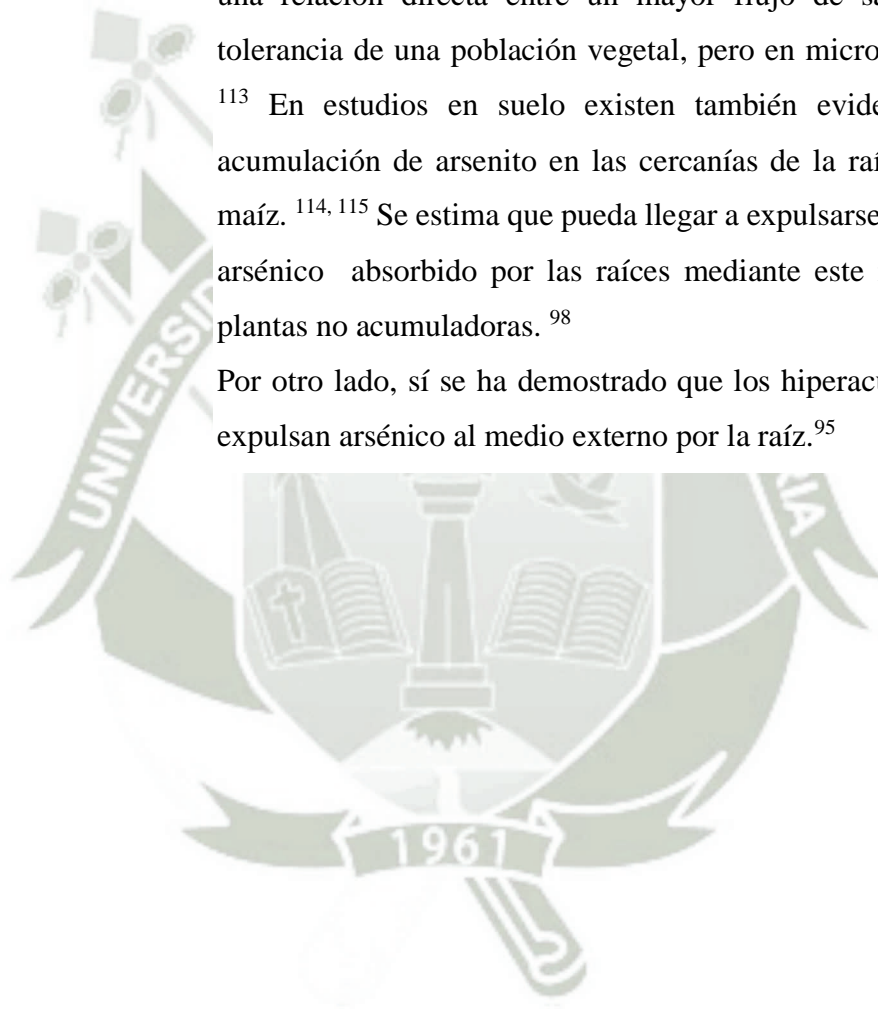
1.3.6. SALIDA ACTIVA DE ARSÉNICO (EFFLUX)

El arseniato que entra en las células puede ser parcialmente expulsado¹⁰³ de modo similar a lo que sucede con el fosfato a altas concentraciones.¹¹¹ Sin embargo, conviene recordar que una vez ha entrado en la planta, el arseniato se reduce rápida y mayoritariamente a arsenito. Por tanto, independientemente de la forma de entrada, una vez en las células de la raíz el As (III) es mayoritario.¹¹² Aunque este mecanismo no ha sido completamente

establecido, ⁹⁵ en una reciente revisión han recopilado la información existente acerca de este tema.

La salida activa de arsenito se ha observado en varias especies vegetales crecidas en hidroponía: trigo, cebada, maíz, tomate, *H. lanatus* o *Arabidopsis thaliana*. Las evidencias fisiológicas indican que la salida es activa y dependiente de un gradiente de protones del metabolismo celular. Todavía no se ha demostrado una relación directa entre un mayor flujo de salida y mayor tolerancia de una población vegetal, pero en microorganismos sí. ¹¹³ En estudios en suelo existen también evidencias de una acumulación de arsenito en las cercanías de la raíz de girasol y maíz. ^{114, 115} Se estima que pueda llegar a expulsarse el 50-80% del arsénico absorbido por las raíces mediante este mecanismo en plantas no acumuladoras. ⁹⁸

Por otro lado, sí se ha demostrado que los hiperacumuladores no expulsan arsénico al medio externo por la raíz. ⁹⁵



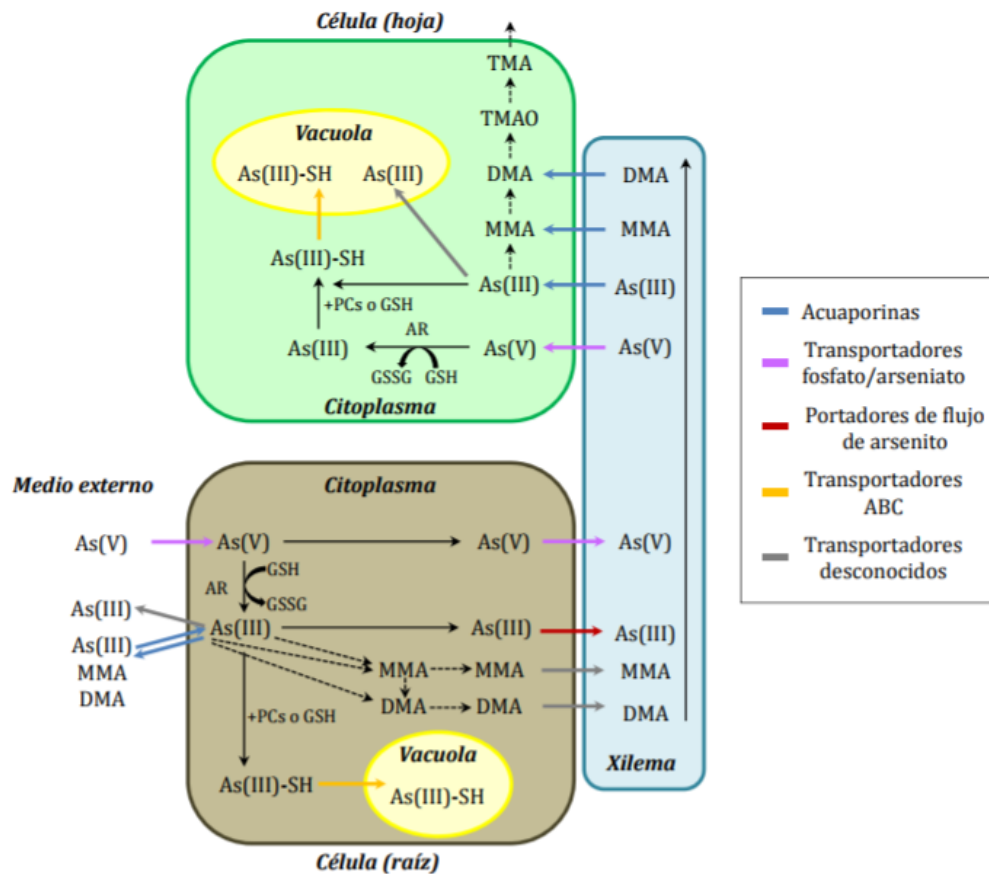


FIGURA 1.3 Esquema sobre los mecanismos de absorción, translocación y detoxificación de arsénico en plantas.⁹⁹

1.3.7. SALIDA ACTIVA DE ARSÉNICO (EFFLUX)

El arseniato que entra en las células puede ser parcialmente expulsado¹⁰³ de modo similar a lo que sucede con el fosfato a altas concentraciones.¹¹¹ Sin embargo, conviene recordar que una vez ha entrado en la planta, el arseniato se reduce rápida y mayoritariamente a arsenito. Por tanto, independientemente de la forma de entrada, una vez en las células de la raíz el As (III) es mayoritario.¹¹² Aunque este mecanismo no ha sido completamente establecido,⁹⁵ en una reciente revisión han recopilado la información existente acerca de este tema.

La salida activa de arsenito se ha observado en varias especies vegetales crecidas en hidroponía: trigo, cebada, maíz, tomate, *H. lanatus* o *Arabidopsis thaliana*. Las evidencias fisiológicas indican que la salida es activa y dependiente de un gradiente de protones del metabolismo celular. Todavía no se ha demostrado una relación directa entre un mayor flujo de salida y mayor tolerancia de una población vegetal, pero en microorganismos sí.¹¹³ En estudios en suelo existen también evidencias de una acumulación de arsenito en las cercanías de la raíz de girasol y maíz.^{114, 115} Se estima que pueda llegar a expulsarse el 50-80% del arsénico absorbido por las raíces mediante este mecanismo en plantas no acumuladoras.⁹⁸

Por otro lado, sí se ha demostrado que los hiperacumuladores no expulsan arsénico al medio externo por la raíz.⁹⁵

1.3.8. SINTOMAS VISUALES DE DEFICIENCIA DE NUTRIENTES

La reducción del crecimiento es uno de los síntomas visuales que se atribuyen al arsénico. Tanto arseniato como arsenito provocaron la reducción del crecimiento en especies vegetales cultivadas en hidroponía como *Holcus lanatus*, *Lupinus albus* o *Triticum aestivum*.^{116, 104, 118} En el caso del arseniato algunos autores han relacionado esta reducción con la disminución de la concentración de fósforo provocada por altas dosis de arsénico. Los síntomas que provoca el arseniato son la reducción de la elongación radicular,¹¹² la falta de ramificación radicular, clorosis en las hojas,^{119, 120} marchitamiento foliar, o el achaparramiento e incluso la necrosis en la parte aérea. Los daños producidos en la raíz y las hojas dificultan el flujo normal de agua en la planta.

La nutrición mineral vegetal se ve afectada de forma inespecífica por muchos elementos tóxicos mediante la alteración de los procesos de transporte a través de la membrana celular, además de por los efectos sobre la transpiración vegetal. El efecto más destacable producido por el arsénico es aquel derivado de las similitudes que tienen los aniones arseniato y fosfato. El suministro de arseniato provoca un descenso de los niveles de fósforo en las plantas, debido a que ambos iones entran por el mismo transportador de membrana.^{96,104} Adicionalmente se han detectado otras alteraciones nutricionales derivadas de la presencia de arsénico en el medio en que vivían las plantas como descenso de Mn, Cu, N, Zn y Mg^{117,119}

Como ya se ha dicho, el arsénico provoca clorosis en las hojas. El suministro de arsénico causó la disminución de los niveles de clorofilas.¹¹⁹ Aunque hay muchos motivos para esta clorosis (como deficiencia de Fe), en el caso del arsénico se atribuye directamente a la inhibición de la síntesis del pigmento. En dicho estudio, las causas de dicha inhibición son una limitada disponibilidad del ácido δ -aminolevulínico (que es un precursor de la clorofila) y las alteraciones producidas sobre las proteínas ricas en grupos tioles. Alteración del metabolismo y alteraciones genéticas Teóricamente el arseniato puede sustituir al fosfato en metabolitos y procesos metabólicos. Así, dentro del citoplasma el arseniato compite con el fosfato por en las reacciones de fosforilación, por ejemplo en la síntesis de ATP, pudiendo formar ADP-As altamente inestable que altera el ciclo energético celular.⁹⁸

El arsenito tiene una alta afinidad por los grupos -SH de las biomoléculas (enzimas y proteínas), puede unirse fácilmente a ellos e inhibir su función.¹¹² Tanto As (III) como As (V) son mutagénicos y pueden dañar el genoma. Se ha sugerido que la

presencia de biomoléculas reparadoras de la cromatina son capaces de aumentar la tolerancia de las plantas a arsénico.⁹⁸

1.3.9. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA FITORREMEDIACIÓN

VENTAJAS:

- Se puede realizar in situ y ex situ.
- Se realiza sin necesidad de transportar el sustrato contaminado, con lo que se disminuye la diseminación de contaminantes a través del aire o del agua.
- Es una tecnología sustentable.
- Es eficiente tanto para contaminantes orgánicos como inorgánicos.
- Es de bajo costo.
- No requiere personal especializado para su manejo.
- No requiere consumo de energía.
- Sólo requiere de prácticas agronómicas convencionales.
- Es poco perjudicial para el ambiente.
- Actúa positivamente sobre el suelo, mejorando sus propiedades físicas y químicas, debido a la formación de una cubierta vegetal.
- Tiene una alta probabilidad de ser aceptada por el público, ya que es estéticamente agradable.
- Evita la excavación y el tráfico pesado.
- Se puede emplear en agua, suelo, aire y sedimentos.
- Permite el reciclado de recursos (agua, biomasa, metales).¹²¹

LIMITACIONES:

- En especies como los árboles o arbustos, la fitorremediación es un proceso relativamente lento.

- Se restringe a sitios de contaminación superficial dentro de la rizósfera de la planta.
- El crecimiento de las plantas está limitado por concentraciones tóxicas de contaminantes, por lo tanto, es aplicable a ambientes con concentraciones bajas de contaminantes.
- En el caso de la fitovolatilización, los contaminantes acumulados en las hojas pueden ser liberados nuevamente al ambiente.
- Los contaminantes acumulados en maderas pueden liberarse por procesos de combustión.
- No todas las plantas son tolerantes o acumuladoras.
- La solubilidad de algunos contaminantes puede incrementarse, resultando en un mayor daño ambiental o migración de contaminantes.
- Se requieren áreas relativamente grandes.
- En sistemas acuáticos se puede favorecer la diseminación de plagas, tales como los mosquitos.¹²¹

1.4. *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO)

Conocido como romero, es una especie de planta perenne, silvestre en la cuenca mediterránea.¹²² Debido a sus actividades antibacterianas y antioxidantes, los aceites esenciales de romero son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia.^{123,124} Por otra parte, la gente del Mediterráneo comúnmente lo utilizaba para cocinar como hierba, así como té de hierbas y algunos de ellos utilizan su aceite esencial para tratamientos terapéuticos entre las actividades antiespasmódicas, diuréticas y coleréticas.

Durante la edad media, se pensaba que el romero poseía propiedades mágicas. De hecho, en el siglo XIV, esta planta fue registrada como uno de los componentes principales de la fórmula acuática de la Reina de Hungría, pensada para mantener la apariencia juvenil mucho más allá del tiempo normal.¹²⁵ El aceite esencial de romero también se utiliza

comúnmente en la mejora de los alimentos.¹²⁶ Generalmente se encuentra de forma silvestre en zonas rocosas y arenosas cercanas al mar pero debido a su adaptabilidad y poca exigencia para cultivarse se reproduce con facilidad en otras zonas. El romero pertenece a la familia Lamiaceae (Labiatae Labiadas), es una planta arbustiva con tallos prismáticos, las hojas son estrechas, agudas y pequeñas, tienen forma de espigas de color verde brillante con márgenes revolutos y tallos leñosos y ramificados.^{127, 128} El tamaño varía de 0.5 a 1 metro de altura, florece dos veces al año en primavera y otoño, las flores se caracterizan por un color azul claro con pequeñas manchas violetas.¹²⁹

1.4.1. TAXONOMÍA DE *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO)

Rosmarinus officinalis fue descrita por Carlos Linneo y publicado en *Species Plantarum*.¹³⁰

TABLA 1.2 Clasificación Taxonómica del *Rosmarinus officinalis* L.¹³⁰

NOMBRE COMÚN	Romero
NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Rosmarinus Officinalis</i>
FAMILIA	Lamiaceae
CLASE	Magnoliopsida
GÉNERO	Rosmarinus
ORDEN	Lamiales

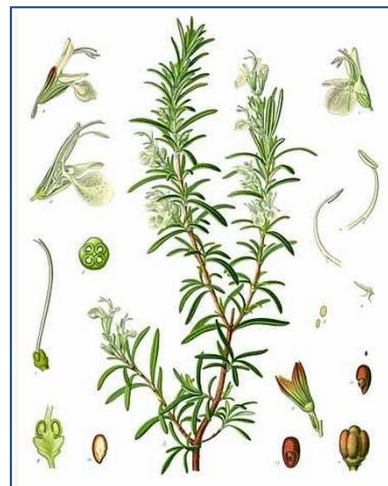


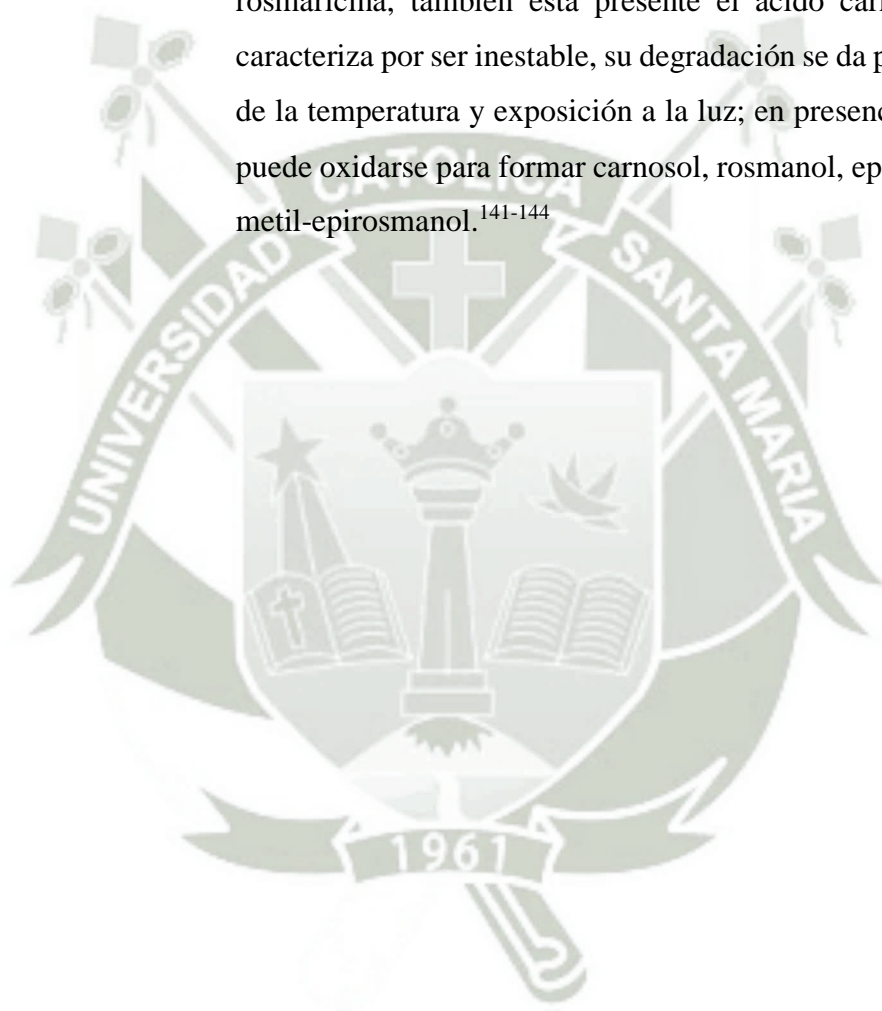
FIGURA 1.4 Imagen de la planta de romero *Rosmarinus officinalis* L.¹³¹

1.4.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ROMERO

En la planta se han reportado diversos compuestos químicos los cuales han sido agrupados de manera general por diversos autores en ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos.¹³²⁻¹³⁴ el aceite esencial de romero es el componente más estudiado cualitativamente, algunas de las principales estructuras químicas activas se muestran en la (FIGURA 1.5).

Diferentes trabajos de investigación afirman que dependiendo del lugar geográfico donde crezcan las plantas bajo condiciones de tipo de suelo, clima y altura sobre el nivel del mar generan diferentes cambios en cantidad y tipos de moléculas bioactivas presentes, por ejemplo las variedades de romero originarias de Portugal se caracterizan por poseer altas cantidades de mircenol, mientras que en Francia es el alcanfor y en Marruecos el cineol los que se encuentran en mayor concentración.^{135, 136} De manera general, la composición química del aceite esencial de romero ha sido descrita en trabajos que indican el tipo de moléculas activas presentes. Se ha identificado la presencia de α -pineno, β -pineno,

canfeno, ésteres terpénicos como el 1,8-cineol, alcanfor, linalol, verbinol, terpineol, carnosol, rosmanol, isorosmanol, 3-octanona, isobanil-acetato y β -cariofileno; los ácidos vanílico, caféico, clorogénico, rosmarínico, carnósico, ursólico, oleanólico, butilínico, betulínico, betulina, α -amirina, β -amirina, borneol, y acetato de bornilo.^{137, 138} En el caso de las hojas del romero prevalece un alto contenido de ácido rosmarínico y su derivado rosmaricina, también está presente el ácido carnósico que se caracteriza por ser inestable, su degradación se da por incremento de la temperatura y exposición a la luz; en presencia de oxígeno puede oxidarse para formar carnosol, rosmanol, epirosmanol y 7-metil-epirosmanol.¹⁴¹⁻¹⁴⁴



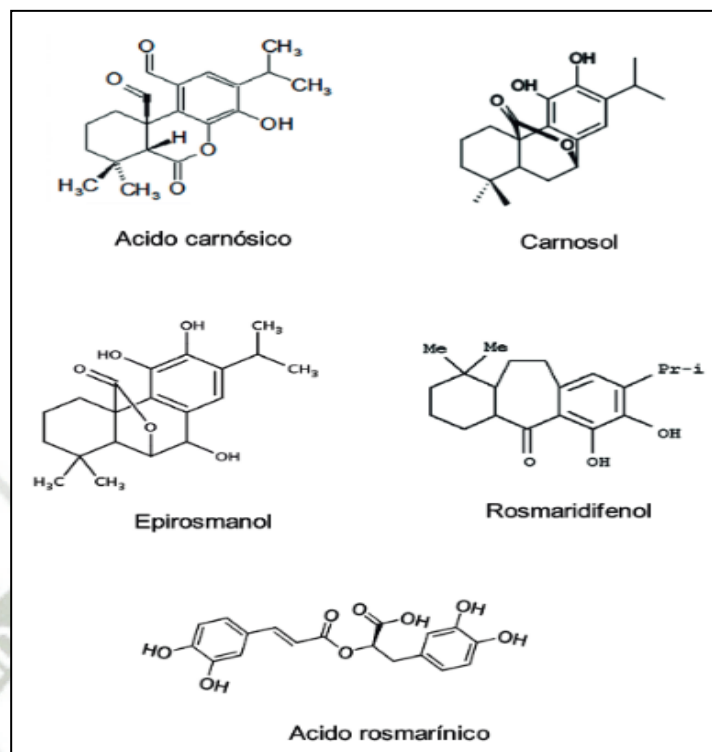


FIGURA 1.5 Estructura química de ácido carnósico, carnosol, epirosmanol, rosmaridifenol, ácido rosmarínico, compuestos activos encontrados en *Rosmarinus officinalis* L. ^{139,140}

1.5. ARSÉNICO

El arsénico (As) ocupa el lugar 20 en abundancia de los elementos en la corteza terrestre y se distribuye de manera no uniforme por todo el mundo, dependiendo de la región geográfica, características geoquímicas del suelo y actividad industrial.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷

Alrededor de un tercio del arsénico presente en la atmósfera proviene de fuentes naturales como reacciones ambientales, actividad biológica, emisiones volcánicas, y el resto proviene de un amplio rango de actividades antropogénicas.^{148, 149}

El arsénico se encuentra presente en la atmósfera, suelo, rocas, cuerpos de agua, minerales y organismos de formas inorgánica, orgánica y metilada.¹⁵⁰⁻¹⁵²

La problemática del arsénico es el resultado de su fácil movilización bajo condiciones naturales. Sin embargo, el hombre ha tenido un importante impacto en la generación de formas tóxicas del arsénico a través de la actividad minera, uso de combustibles fósiles, de pesticidas orgánicos, herbicidas y desecantes agrícolas, así como el uso del arsénico como un aditivo de alimentos para ganado y aves de corral.^{148,151, 153,154}

1.5.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ARSÉNICO

El arsénico es el 53° elemento más abundante de los 92 que se encuentran de forma natural en la corteza terrestre.¹⁵⁵

Pertenece al grupo 15 de la Tabla Periódica. Sus propiedades se encuentran entre las de los metales y las de los no metales, por lo que es considerado como un elemento semimetálico o metaloide. Tiene un número atómico de 33, una configuración electrónica $[\text{Ar}]3d^{10}4s^24p^3$, y presenta cuatro estados de oxidación (-III, 0, III y V). Existe un único isótopo natural y estable de arsénico, el

75As. El arsénico es un sólido que presenta dos formas alotrópicas cristalinas a presión ordinaria. La más importante es el arsénico gris, una forma metálica estable, frágil, quebradiza, de brillo metálico, de estructura romboédrica y conductora del calor y de la electricidad.

Tiene una densidad de $5,72 \text{ g cm}^{-3}$ y sublima a 603 °C , con un punto triple de 817 °C a $3,70 \text{ MPa}$. El arsénico gris recién cortado posee un característico brillo metálico, pero se torna opaco al exponerlo al aire. Al calentarse, se oxida rápidamente a óxido de arsénico (III), que es muy venenoso. La segunda forma alotrópica, el arsénico amarillo, se obtiene por enfriamiento brusco del vapor procedente de la sublimación del arsénico gris, constituido por moléculas tetraédricas de arsénico.

El arsénico amarillo presenta estructura cúbica, no conductora, inestable, traslúcida y de baja densidad ($1,97 \text{ g cm}^{-3}$), que revierte a la forma gris al exponerlo a la luz o al calor. Además de estas dos formas cristalinas, se conoce una variedad amorfa, el arsénico negro, que es un sólido no metálico que presenta tres modificaciones diferentes dependiendo de la temperatura, y que da lugar al arsénico gris si se calienta por encima de 270 °C .¹⁵⁶

1.5.2. COMPUESTOS DE ARSÉNICO

El arsénico se puede encontrar en diferentes estados de oxidación: arseniato As (V), arsenito As (III), As elemental (0) y arseniuro As (-III);¹⁵⁰ encontrándose más frecuentemente como arsenito o arseniato. El arsenito es 70 veces más tóxico que las especies metiladas y 10 veces más tóxico que el arseniato, el cual es poco soluble en agua y, por tanto, menos biodisponible.^{151,157}

Cuando el arsénico se encuentra en formas insolubles, como un mineral en combinación con sulfuro y hierro: oropimente (por

ejemplo: trisulfuro de arsénico As_2S_3) y rejalgar (por ejemplo: Arsenopirita FeAsS), no se considera tóxico. En cambio, cuando se encuentra en formas solubles, como As (III) y As (V), es tóxico para los organismos vivos.¹⁴⁶

La presencia de As (V) y As (III) depende de factores físicos, químicos y biológicos, en este último, los microorganismos juegan un papel fundamental, ya que muchas bacterias son capaces de transformar As (III) a As (V) y viceversa, como un mecanismo de defensa de algunas especies bacterianas.^{158, 159} El estado de oxidación del arsénico y su movilidad se controlan fundamentalmente por las condiciones redox (potencial redox Eh) y el pH (**FIGURA 1.6**).

En sistemas acuosos, el arsénico se encuentra, en general, como especie disuelta, formando oxianiones. El As (III) se encuentra como H_3AsO_3 y sus correspondientes productos de disociación (H_4AsO_3^+ , H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-} y AsO_3^{3-}), los cuales, en condiciones oxidantes, son dominantes a pH alcalinos.

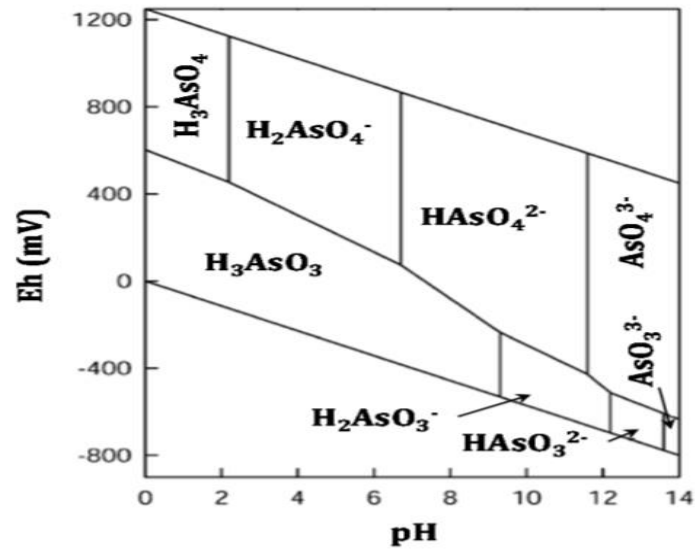


FIGURA 1.6 Eh (potencial redox) y pH de las especies acuosas de arsénico en un sistema As-O₂-H₂O a 25 °C y 1 bar de presión total.¹⁶⁰

Sin embargo la forma sin carga del As (III) [As(OH)₃] es dominante en ambientes reducidos y anóxicos, siendo así el más tóxico y difícil de eliminar.

Por su parte el As (V) está presente en la forma H₃AsO₄ y sus correspondientes productos de disociación (H₂AsO₄⁻, HAsO₄²⁻ y AsO₄³⁻), siendo dominante bajo condiciones oxidantes a pH ácidos en ambientes acuosos y aeróbicos.^{148, 150, 161, 162} **(FIGURA 1.7).**

La comprensión del comportamiento geoquímico del arsénico y su movilización es importante para el desarrollo de estrategias que ayuden en la descontaminación de agua y suelo afectados por la contaminación de arsénico.¹⁶³

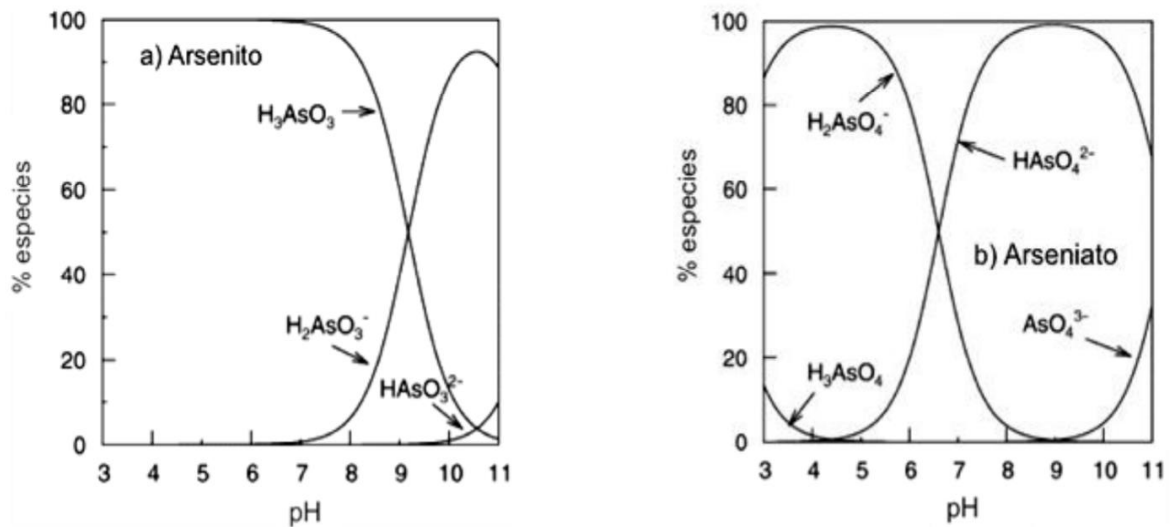


FIGURA 1.7 Especiación de a) arsenito y b) arseniato en función del pH. Las condiciones redox se han elegido de tal manera que el estado de oxidación indicado domina la especiación en ambos casos.¹⁶⁰

1.5.3. TOXICIDAD DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO

El arsénico (As) es considerado dentro de las toxinas esenciales porque se requiere en pequeñas cantidades para el crecimiento y el metabolismo, pero es tóxico en altas concentraciones.¹⁶⁴ La toxicidad para los humanos de un compuesto con arsénico depende en gran medida de su forma química, diferenciándose dos grupos de compuestos: inorgánicos y orgánicos. Los compuestos inorgánicos del arsénico son los más tóxicos y aparecen, sobre todo, en aguas, donde se encuentran principalmente en forma de pentóxido de arsénico (As_2O_5) o trióxido de arsénico (As_2O_3).

La toxicidad de estos compuestos depende del estado de oxidación, estado físico, solución o tamaño de las partículas de polvo, la velocidad de absorción en las células, la velocidad de eliminación y la solubilidad en el medio biológico. Además, la exposición a compuestos de arsénico inorgánico se ha asociado a diversos tipos de cánceres como de hígado, pulmones y piel, así como a diabetes.¹⁵² Por otra parte, los compuestos orgánicos de arsénico se encuentran frecuentemente en alimentos y suponen la vía principal de exposición de la población al arsénico.^{165,166}

La escala de toxicidad de los compuestos de arsénico decrece en el siguiente orden: arsina (H_3As) > arsenito (As III) > arseniato (As V) > compuestos arsenicales > arsénico elemental. El arsénico elemental no es común y las arsinas orgánicas solo se encuentran en ambientes muy reducidos.^{145,150, 167} De todos los compuestos de arsénico, el gas arsina se considera la forma más tóxica, seguida del arsenito, arseniatos y los compuestos orgánicos del arsénico. La arsina es un gas incoloro más denso que el aire, el cual se forma al contacto del hidrógeno con el arsénico. El gas ingresa al organismo por vía respiratoria y pasa directo a la circulación, donde actúa enzimáticamente sobre la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de los eritrocitos, oxidando la hemoglobina y formando metahemoglobinuria, reduciendo en forma drástica el contenido de glutación de los glóbulos rojos, lo que la convierte en uno de los agentes hemolíticos más potentes.¹⁶⁸ El As (III) entra en las células a un pH neutro por acuagliceroporinas (proteínas de transporte de glicerol) en bacterias, levaduras y mamíferos, y su toxicidad reside en su capacidad para unirse a los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína en las proteínas, lo que las inactiva y lo hace altamente tóxico.

También actúa como disruptor endócrino mediante la unión a receptores hormonales e interfiere con la señalización de las células.^{146,150, 164} Por su parte, la toxicidad del As (V) se debe principalmente a que puede sustituir al fosfato, pues posee una estructura análoga y, por consiguiente, puede inhibir la fosforilación oxidativa y entrar a las células a través del sistema de transporte del fosfato.^{146,150, 169}



CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. EQUIPOS

- Bombas de aire SB-108) Sobo[®]
- Balanza analítica OhausPioneer[®] Tm
- Centrifuga
- Digestor microondas MARS 6 CEM[®]
- Equipo Easy Purell Merck[®] (agua 18.2 MΩ)
- Equipo ultrasonida Brandson[®] 2510-E
- Estufa de esterilización
- Estación voltamperométrica 979 VA Computrace Metrohm[®]
- Espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 Agilent[®]
- Pipetas automáticas de 20 μL, 200 μL y 1000 μL (Eppendorf)
- pHmetro digital (827 pH, Metrohm)
- Refrigeradora
- Licuadora Oster[®]

2.1.2. MATERIAL VEGETAL

- *Rosmarinus officinalis L.* (Romero)

2.1.3. MATERIAL DE VIDRIO

- Bagueta
- Estanques de vidrio
- Fiolas (10 mL, 25 mL y 1000 mL)
- Pipetas graduadas (1 mL, 2 mL y 10 mL)
- Pipetas volumétricas (1 mL, 2 mL y 10 mL)
- Probeta graduada (50 mL)
- Tubos de ensayo (13 x 100 mm)
- Vaso precipitado (100 mL y 250 mL)

2.1.4. REACTIVOS

- Ácido clorhídrico 60% suprapuro (cc). Merck®
- Ácido nítrico 65% suprapuro (cc). Merck®
- Agua destilada
- Agua potable
- Agua ultrapura (18.2 MΩ)
- Cloruro de potasio 3M
- Metanol p.a. Merck®
- Nitrógeno UHP (99,9999%)
- Solución estándar de selenio suprapuro. Merck®
- Solución estándar de cobre suprapuro. Merck®
- Solución estándar de arsénico suprapuro. Merck®
- Solución hidropónica nutritiva La Molina®

2.1.5. OTROS

- Bandejas de poliestireno expandido (tecnopor)
- Balde de plástico

- Espátula de plástico
- Gradilla para tubo de ensayo
- Guantes de látex
- Mortero
- Papel aluminio
- Papel kraft
- Piedras difusoras expandidas
- Polietileno (20 mm)
- Recipientes de plástico grandes (38 cm x 75 cm x 14 cm)
- Recipientes de plástico pequeños
- Tips de 5-20 μL y de 100-1000 μL
- Vasos de digestión de teflón

2.2. METODOLOGÍA

2.2.1. RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

La especie vegetal *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) será recolectada de la huerta familiar ubicado en el distrito de Cayma, provincia de Arequipa, región Arequipa.

2.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL

La identificación de la especie vegetal será realizada en HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA) ubicado en la ciudad de Arequipa, para su respectiva clasificación taxonómica.

2.2.3. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE CULTIVO HIDROPÓNICO

Se diseñará y construirá estanques de vidrio que contendrán la solución nutritiva. Se realizará un sistema de cultivo hidropónico de raíz flotantes, las plantas se encontrarán en una lámina de tecnopor que flota sobre la solución nutritiva, de modo que sus raíces se encontrarán sumergidas dentro de la solución. A través de una bomba de aire acoplado con piedras difusoras se proporcionará homogéneamente a las raíces el oxígeno necesario para su óptimo desarrollo.



2.2.4. PROPAGACIÓN DE *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO).

La técnica de propagación para obtener nuevos ejemplares que se utilizará es la división.¹⁷⁰ Consistirá en dividir una planta en dos o más ejemplares, se utilizarán ejemplares que se encuentren en buen estado fisiológico y vegetativo. El primer paso que se realizará en el proceso de división de una planta es quitar el ejemplar del lugar donde está plantado. Para ello conviene retirar, si no el cepellón entero, al menos buena parte de él, para no dañar las raíces, deberá encontrarse el sustrato húmedo. Es fundamental tener el mayor cuidado para no dañar la planta al quitarla. Se debe sostener desde la base del tallo, que es la parte más fuerte y resistente. Para sacar las plantas hay que sostenerla desde la base del tallo, que es la parte más fuerte y resistente del ejemplar. Una vez que la planta esté fuera, se debe retirar con los dedos la tierra que cubre las raíces principales, con cuidado de que estas no resulten dañadas. Proceder rápidamente debido al estrés que sufre la planta al momento de retirarla. Las raíces en mal estado tendrán que ser cortados, desenredar las raíces si es que están muy enmarañadas.

Se realizará la división correspondiente se separan los tallos y las raíces a partir de las cuales se obtendrán los nuevos ejemplares. Enjuagar las plantas con agua potable posteriormente se tomaran muestras homogéneas para su análisis químicos.

2.2.5. SISTEMA HIDROPÓNICO PARA LA FITORREMEDIACIÓN DE ARSÉNICO

Posteriormente se procederá a colocarlas en un tipo de sistemas nutritivo hidropónico a diferentes concentraciones para su adaptación y desarrollo durante un periodo de 30 días.

Se realizará tres tratamientos empleándose la Solución Nutritiva La Molina®.

- Primer tratamiento T1 al 75 % de la concentración de la solución nutritiva La Molina®.
- Segundo tratamiento T2 al 50 % de la solución de la concentración de la solución nutritiva La Molina®.
- Tercer tratamiento T3 al 25 % de la solución de la concentración de la solución nutritiva La Molina®.

2.2.6. VOLTAMPEROMETRÍA

2.2.6.1. CALIBRACIÓN ELÉCTRICA

Test de la linealidad

Se conectará la celda al soporte 797 VA uniendo el cable del electrodo auxiliar AE al conector AE, el cable del electrodo de referencia RE al conector RE, el cable del electrodo de trabajo WE al conector WE-L. Se utilizará el método (Test 797_L del directorio de métodos e iniciar el método). Se registrará una línea diagonal.

Test de desempeño del pico

Se conectará la celda al soporte 797 VA uniendo: el cable del electrodo auxiliar AE al conector AE, el cable del electrodo de referencia RE al conector RE, el cable del electrodo de trabajo WE al conector WE-D. Se utilizará el método (Test 979_D del directorio de métodos e iniciar el método). Se registrará la curva y se analizará.

2.2.6.2. CALIBRACIÓN QUÍMICA

En la celda electroquímica se añadirá 20 mL de agua ultrapura, 0.5. mL de KCl a 3 mol.L^{-1} y 100 μL de solución estándar de Pb (1.000 g.L^{-1}). Seguidamente se cargará el método (Test Pb in ion estándar solution.mth) desde el directorio métodos e iniciar el modo DME.

2.2.6.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

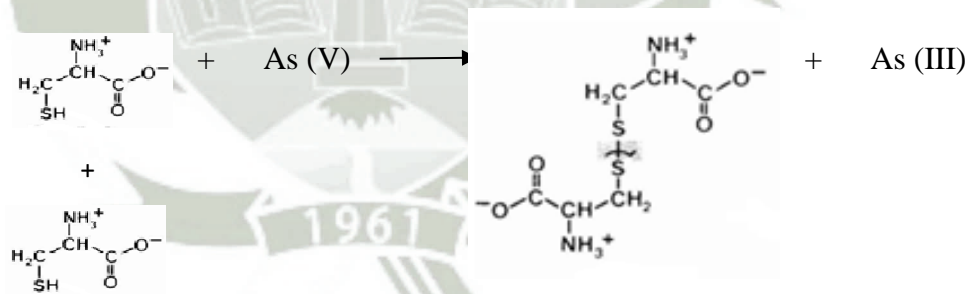
La validación del método analítico nos garantizará las características de desempeño del método reuniendo los requisitos para las aplicaciones analíticas concebidas. Mediante los parámetros que serán tomados nos quedará demostrado que se puede confiar en un método para producir el resultado esperado dentro de límites definidos. El tipo de validación que será usado es la Revalidación o postvalidación puesto que este método ya ha sido validado en el Laboratorio de Investigación del Proyecto Mercurio de la Universidad Católica de Santa María, solo se modificarán algunos pasos del procedimiento establecido para el análisis correcto, validando logremos que las

modificaciones de las condiciones normales de ensayo y medio ambiente operacional no afecten negativamente el resultado final.

PROCESO DE REDUCCIÓN DE ARSÉNICO (V) a ARSÉNICO (III)

La especie que se medirá será As (III) ya que el As (V) no es electroactivo, es decir, no tiene la capacidad de adsorberse en el electrodo de mercurio, el As (III) tiene la capacidad de formar complejos intermetálicos con el cobre y selenio adsorberse en el electrodo de mercurio, es por eso que se realizará un proceso de reducción de As (V) a As(III), por lo que se revalidará un método para la determinación de esta última especie.

Arsénico (V) puede ser reducido a Arsenico (III) por L-cisteína de la siguiente manera:¹⁷¹



Debido a que el As (V) es la especie presente en el estándar que se utilizará. Se determinará un procedimiento para la reducción de este.

En un tubo de teflón se añadirá 5 μL de estándar As (V) a partir de H_3AsO_4 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 2 mL de L- Cisteína 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 25 μL de HCl concentrado, el tubo será colocado en el equipo de digestión por microondas MARS 6 CEM[®] a 90 ° C durante 15 min. Posteriormente los tubos serán enfriados por el mismo equipo, se aforarán con agua ultrapura en fioles de 10 mL para obtener una concentración de 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de estándar de arsénico (III).

Se empleará la estación voltamperométrica 797 VA Computrace de Metrohm[®], cuyos componentes son; potenciostato, celda voltamperométrica, electrodo de trabajo: electrodo de mercurio de gota colgante (HMDE), electrodo de referencia: Ag/AgCl saturado con KCl 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y electrodo auxiliar de platino.

En la preparación de la celda voltamperométrica se utilizará como electrolito 10 mL de HCl 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, además, se adicionará 50 μL de Estándar de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y 15 μL de Estándar SeO_2 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y 25 μL de Estándar (Arsénico reducido As(III)) 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

- **Linealidad** ¹⁷²

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados que son directamente proporcionales o mediante una transformación matemática bien definida se convierten directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado.

La linealidad generalmente se expresa en función de la varianza alrededor de la pendiente de la recta de regresión calculada, según una relación matemática establecida, a

partir de los resultados obtenidos mediante el análisis de muestra con diferentes concentraciones de analito.

Este procedimiento analítico se realizará por triplicado y cada medición constará de 6 adiciones estándar de 100 µL de una solución estándar de As (III).

La concentración final fue determinada aplicando la siguiente ecuación:

$$CF = \frac{CE \times VE}{VF} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

CF: Concentración final (mg.L⁻¹)

CE: Concentración del estándar utilizado (mg.L⁻¹)

VE: Volumen estándar adicionado (L)

VF: Volumen final (L)

- **Precisión** ¹⁷²

La ICH (International Conference of Harmonization), ha utilizado tres componentes para definir la precisión:

- Repetibilidad o Capacidad de repetición
- Precisión Intermedia
- Reproducibilidad o Capacidad de reproducción

Repetibilidad o Capacidad de Repetición expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por un mismo analista bajo condiciones iguales como equipo, reactivo e intervalos de tiempo. La repetibilidad mide las variaciones dentro de un mismo laboratorio. Se determina analizando un número significativo de muestras tomando de un lote homogéneo. La medición constará de 2 adiciones estándar de 100 µL de una solución estándar de

As (III) a 0.5 mg.L^{-1} . Registrar intensidades emitidas por el equipo a las cuales se calculará su promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

- Desviación estándar:

La desviación estándar (Sd) se determina por medio de:

$$Sd = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

Sd: Desviación estándar

n: Número de medidas

X_i : Valor medido en el ensayo i

\bar{X} : Estimador de la media poblacional μ , calculado como:

$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$, donde:

- Coeficiente de variación (%): Se determina en base al promedio (\bar{X}) y la desviación estándar (Sd).

$$CV = \frac{\bar{X}}{Sd} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

\bar{X} : Promedio de los factores respuesta

Sd: Desviación estándar de los factores respuesta

- **Exactitud** ¹⁷²

La exactitud puede a menudo expresarse como un porcentaje de recuperación, por medio de la valoración de cantidades conocidas agregadas de analitos.

Representa el grado en que un método analítico es exacto para los fines propuestos. A partir de los resultados obtenidos luego de aplicar el método propuesto, se calcula la exactitud como el porcentaje de analito recuperado por medio de la valoración.

La exactitud se expresó en términos de porcentaje de recuperación, para lo cual se procederá a realizar un proceso a digestión microondas. En un tubo de teflón se añadirá utilizando 20 ± 0.1 mg de muestra de hoja, 2 mL de ácido nítrico suprapuro HNO_3 al 12 % y se añadirá 5 μL de estándar de As (V) H_3AsO_4 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Después se procederá a la reducción con 2 mL de L- Cisteína 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, y 25 μL de HCl concentrado, el tubo será colocado en el equipo de digestión por microondas MARS 6 CEM[®]

Después de la reducción se enrazará en una fiola de 10 mL para obtener 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de estándar de As (III), realizar la lectura voltamperométrica.

Para determinar el porcentaje de recuperación se utilizó la siguiente fórmula:

$$R = \frac{\bar{X}}{\hat{X}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde:

R: Recuperación (%)

\bar{X} : Valor medido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

\hat{X} : Valor verdadero ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

- **Límites de detección y cuantificación** ¹⁷²

Límite de detección

Es un parámetro de pruebas de límite. Es la concentración más baja de analito que pueda detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas. De esta manera, las pruebas de límites solamente fundamentan que la concentración del analito está por encima o por debajo de un nivel de seguridad. Este parámetro hace referencia a la mínima concentración del compuesto en estudio que es posible detectar con certeza, es decir que se puede diferenciar la respuesta dado por un blanco, el cual contiene todos los componentes de la muestra menos el compuesto de estudio. El límite de detección se calcula mediante la fórmula:

$$LD = \frac{Yb_i + 3 S b_i}{b \times \sqrt{n}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

Yb_i: Estimador de la respuesta del blanco para calcular el LC y LD.

Sb_i: Estimador correspondiente a la desviación estándar del blanco.

b: pendiente de la recta.

n: número de muestras.

Límite de cuantificación

Se define como la mínima concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud aceptable en una muestra, bajo las condiciones establecidas. Una característica del funcionamiento del método que suele

expresarse como señal del valor (verdadero) de la medición que producirá estimaciones con una desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (%) generalmente de 10 % o 6 %. Para ello se utiliza la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{Yb_i + 10 Sb_i}{b \times \sqrt{n}} \quad (\text{Ecuación 6})$$

donde:

Ybi: Estimador de la respuesta del blanco para calcular el LC y LD.

Sbi: Estimador correspondiente a la desviación estándar del blanco.

b: pendiente de la recta.

n: número de muestras.

2.2.7. PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE CLOROFILA “A” DE LAS MUESTRAS DE *Rosmarinus Officinalis L.* (ROMERO)

Cortar las hojas en segmentos de los diferentes tratamientos se realizará por triplicado, se pesará 0.5 g de hojas frescas de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) se colocará en un frasco y se licuará con 15 mL de metanol p.a, reposar por 24 horas hasta lograr un líquido de color verde intenso. Después de la extracción, se procederá a la filtración, el papel filtro se colocará sobre el embudo y éste sobre el tubo de ensayo. Desechar el papel de filtro con su contenido y recoge el filtrado que contendrá la clorofila “a” y otros pigmentos fotosintéticos.

2.2.8. DETERMINACIÓN DE CLOROFILA “A” DE LAS MUESTRAS DE *Rosmarinus Officinalis L.* (ROMERO) POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.

El contenido de clorofila “a” se medirá por espectrofotometría UV-Vis. Los tubos de ensayo que contienen el filtrado obtenido, se calientan en un baño de agua a 70 ° C durante 10 minutos. Se centrifugará a 5000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se medirá a una longitud de onda de 665 nm y 750 nm. El contenido de clorofila a se calculará utilizando la siguiente ecuación:¹⁷⁴

$$Chla (mg. L^{-1}) = 13.9 \times (AB_{665} - AB_{750})$$

(Ecuación 7)

2.2.9. BIOENSAYO DE TOXICIDAD

Después de definir a que porcentaje de la concentración nutritiva La Molina® se adaptará la especie vegetal *Rosmarinus Officinalis L.* (Romero) Se realizarán 4 tratamientos

TABLA 2.1 *Tratamientos para el bioensayo de toxicidad*

<i>Tratamientos</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>
Concentración de As (V) (mg.L⁻¹)	0	5	10	20

Se preparará las concentraciones (0, 5, 10 y 20 mg.L⁻¹) de Arseniato disódico heptahidratado Na₂HAsO₄.7 H₂O en 2 L de la solución nutritiva de La Molina®. (10 mL de solución “A” y 4 mL solución “B”). Las plantas de romero, se introducirán en una plancha de poliestireno (tecnopor) durante un periodo de 25 días. Posteriormente para cada tratamiento se utilizaran 3 plantas.

Cálculos para la preparación de Arseniato disódico heptahidratado Na₂HAsO₄. 7 H₂O

- $5 \text{ mg.L}^{-1}: \frac{312.01 \text{ g de Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O} \times 0.05 \text{ g}}{74.92 \text{ g de As} \times 1 \text{ L}} \times 2$

$$L = 0.0416 \text{ g de Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$$

- $10 \text{ mg.L}^{-1}: \frac{312.01 \text{ g de Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O} \times 0.01 \text{ g}}{74.92 \text{ g de As} \times 1 \text{ L}} \times$

$$2 \text{ L} =$$

$$0.0833 \text{ g de Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$$

- $20 \text{ mg.L}^{-1}: \frac{312.01 \text{ g de Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O} \times 0.02 \text{ g}}{74.92 \text{ g de As} \times 1 \text{ L}} \times$

$$2 \text{ L} =$$

$$0.1666 \text{ g de Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$$

2.2.10. TRATAMIENTO Y DIGESTIÓN DE MUESTRAS

Secado de muestras:

Se realizará el muestreo homogéneo de las hojas de las plantas, se realizará un cuarteo representativo, las muestras se colocarán en papel kraft y se trasladarán al Laboratorio. Se pondrán a secar las muestras en la estufa a una temperatura no mayor a 60°C por un periodo de 24 horas.

Digestión por microondas:

Posteriormente las muestras secas se triturarán con ayuda de un mortero, posteriormente se pesará 20 ± 0.1 mg de las hojas en tubos de digestión. Después de ello se agregará 2 mL de ácido nítrico suprapuro (HNO_3) al 12 % , cada tubo será colocado en el carrusel del digestor microondas MARS 6 utilizando el método programado de arsénico que tendrá los siguientes parámetros: 15 minutos con una potencia de 1500 W y 15 minutos con una irradiación 1500 W.

2.2.11. DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO DE LAS MUESTRAS DE *Rosmarinus Officinalis* L. (ROMERO) POR VOLTAMPEROMETRÍA

Para la lectura del Estándar de As (III):

En la celda voltamperométrica se utilizará como electrolito 10 mL de HCl 1mol.L^{-1} , además, se adicionará 50 μL de Estándar de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 1000mg.L^{-1} y 15 μL de Estándar SeO_2 en HNO_3 1mg.L^{-1} y 25 μL de Estándar de As(III) 0.5mg.L^{-1} .

Para la lectura de las hojas del *Rosmarinus Officinalis L.* (Romero):

En la celda voltamperométrica se utilizará como electrolito 10 mL de HCl 1 mol.L⁻¹, además se adicionará 50 µL de estándar de Cu(NO₃)₂ 1000 mg.L⁻¹ y 15 µL de estándar SeO₂ en HNO₃ 1 mg.L⁻¹ y 25 µL de la muestra reducida.

2.2.12. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA BIOACUMULACIÓN DE ARSÉNICO

Después de realizar el bioensayo de toxicidad. El diseño estadístico que se utilizará será el Diseño Completamente al Azar (DCA), el cual tendrá 4 tratamientos y 3 repeticiones, teniendo así un total de 12 unidades experimentales; cada unidad experimental está constituido por 10 plantas de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero). Se preparará las concentraciones (0, 5, 10 y 20 mg.L⁻¹) de Arseniato disódico heptahidratado Na₂HAsO₄ · 7 H₂O en 40 L de la solución nutritiva de La Molina (10 mL de solución “A” y 4 mL solución “B”). Las plantas de romero, se introducirán en una plancha de poliestireno (tecnopor) durante un periodo de 30 días.

Los análisis estadísticos serán procesados utilizando el Microsoft Excel 2013. Se realiza análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de TUKEY a un nivel de $\alpha=0,05$ para determinar si existe diferencia significativa entre tratamientos.



CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

La especie vegetal *Rosmarinus officinalis L. (Romero)* fue recolectada de la huerta familiar ubicado en el distrito de Cayma, provincia de Arequipa, región Arequipa.

3.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL

Se acreditó por HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, que la especie vegetal fue identificada como *Rosmarinus Officinalis L. (Romero)*.
(ANEXO 1)

3.3. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE CULTIVO HIDROPÓNICO PARA LA BIOACUMULACIÓN DEL ARS

Se diseñó y construyó 4 estanques de vidrio con un espesor de 12 mm con las siguientes dimensiones: 40 cm de largo, 30 cm de ancho y 40 cm de alto. Cada estanque de vidrio fue diseñado para una capacidad de 72 Litros.

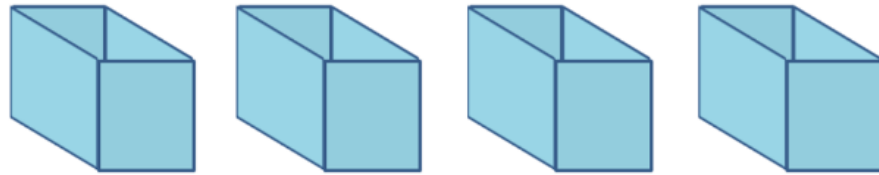


FIGURA 3.1 Diseño de los estanques de vidrio para el cultivo hidropónico

Se realizó un sistema de cultivo hidropónico de raíz flotante, antes de realizar el experimento, en cada estanque de vidrio se añadió 40 litros de agua potable, se colocó a cada tratamiento una bomba de aire de potencia de 2.5 W, cada bomba de aire (SB-108) Sobo[®] tenía dos salidas en modo High que proporcionaron 3 L.min⁻¹ de aire, las salidas contaban con mangueras de 4 mm de diámetro, en la parte final de cada manguera se acoplo piedras difusoras logrando distribuirse el oxígeno por toda la cubeta. Se comprobó que todo el sistema de cultivo hidropónico desarrollo óptimo de la fitorremediación hidropónica

3.4. PROPAGACIÓN DE *Rosmarinus officinalis L.*

La técnica de propagación para obtener nuevos ejemplares que se utilizó fue la división. Se desenterró 50 ejemplares de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) de la huerta familiar, retirándolos de cepellón entero

(conjuntamente con la tierra que rodea las raíces), logrando así no dañar las raíces. Posteriormente se limpiaron las raíces y se desenredaron de forma cuidadosa. Se realizó la división correspondiente de los 50 ejemplares se propagaron 90 nuevas plantas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)

Se enjuagó las plantas con agua potable, luego se realizó un muestreo representativo de hojas y raíces muestras homogéneas para su análisis químico.

3.5. SISTEMA HIDROPÓNICO PARA LA FITORREMEDIACIÓN DE ARSÉNICO

Se utilizó un tipo de solución nutritiva, solución hidropónica La Molina[®] de la Universidad Agraria La Molina; cuya composición química es nitrato de amonio, nitrato de potasio, superfosfato triple, sulfato de magnesio, quelato de hierro, sulfato de magnesio, ácido bórico, sulfato de zinc, sulfato de cobre y molibdato de amonio. La presentación de la solución hidropónica de La Molina[®] fue de tipo simple (1.0 L de solución A y 0.4 L de solución B) Se realizaron tres tipos de tratamientos para evaluar la concentración más adecuada y eficiente para la adaptación y desarrollo normal de las plantas; durante un periodo de 30 días.

Para cada tratamiento se utilizaron 6 plantas T1 al 75 %, T2 al 50 %, T3 al 25% de la concentración de la solución nutritiva La Molina[®]. Las plantas fueron observadas durante 1, 10, 20 días (**TABLA 3.1**)

TABLA 3.1 Evolución de la toxicidad a diferentes concentraciones de Solución Nutritiva La Molina® en *Rosmarinus officinalis* L. durante 20 días de experimentación.

TIEMPO (DIAS)	T1 ^(a)		T2 ^(b)		T3 ^(c)	
	Raíz	Hojas	Raíz	Hojas	Raíz	Hojas
0	G1	G1	G1	G1	G1	G1
1	G1	G1	G1	G1	G1	G1
5	G2	G2	G2	G2	G1	G1
10	G3	G3	G2	G2	G1	G1
15	G4	G4	G3	G2	G1	G1
20	G4	G4	G3	G3	G1	G1

(a): 75 % de solución nutritiva, (b): 50 % de solución nutritiva, (c): 25% de solución nutritiva

- **Grado 1 (G1)**

Raíz: No se observaron síntomas.

Hojas: No se observaron síntomas.

- **Grado 2 (G2)**

Raíz: Ligeras manchas necróticas.

Hojas: En tercio inferior con áreas cloróticas sobre la lámina de las hojas. En el tercio medio y superior no se observaron síntomas.

- **Grado 3 (G3)**

Raíz: Necrosis en avance.

Hojas: Tercio inferior con clorosis generalizada y/o arrugamiento de hojas. El tercio medio y superior con áreas cloróticas sobre la lámina de las hojas, con la diferencia que el tercio superior se empezó a manifestar deformación de las hojas en el ápice.

- **Grado 4 (G4)**

Raíz: Necrosis y senescencia de raíces.

Hojas: Tercio inferior con necrosis y/o arrugamiento de hojas. El tercio medio y superior con clorosis generalizada, arrugamiento y deformación de hojas en el ápice.

Los tratamientos empezaron a manifestar cambios externos a partir del día 5; en T1 y T2 se inició con ligeras manchas necróticas a nivel de la raíz y áreas cloróticas en hojas del tercio inferior. Se observó que a partir del día 10 continuó el avance de la necrosis e inicio de senescencia en raíces y la clorosis empezó a generalizarse. Finalmente el día 20 las raíces lucieron necrosadas, quebradizas y con inicios de senescencia; mientras que la aparición de necrosis, senescencia, acortamiento y deformación de hojas se inicia desde el tercio inferior.

Según la descripción del grado de toxicidad, se comparan tratamientos, observamos que en el T1 se encontró constante en G1 a los 20 días porque no presentó toxicidad en hojas y raíces, en esta concentración a 25 % la plantas se adaptaron y se desarrollaron con total normalidad.

3.6. VOLTAMPEROMETRÍA

Se empleó la estación voltamperométrica 797 VA Computrace de Metrohm®, cuyos componentes son; potenciostato, celda voltamperométrica, electrodo de trabajo: HMDE, electrodo de referencia: Ag/AgCl saturado con KCl 3 mol.L⁻¹ y electrodo auxiliar de platino.

3.6.1. CALIBRACIÓN ELÉCTRICA

La calibración eléctrica es necesaria para la determinación del Test de la linealidad y el Test del pico, estando el resultado en función de la intensidad de corriente (A) y el voltaje (V).

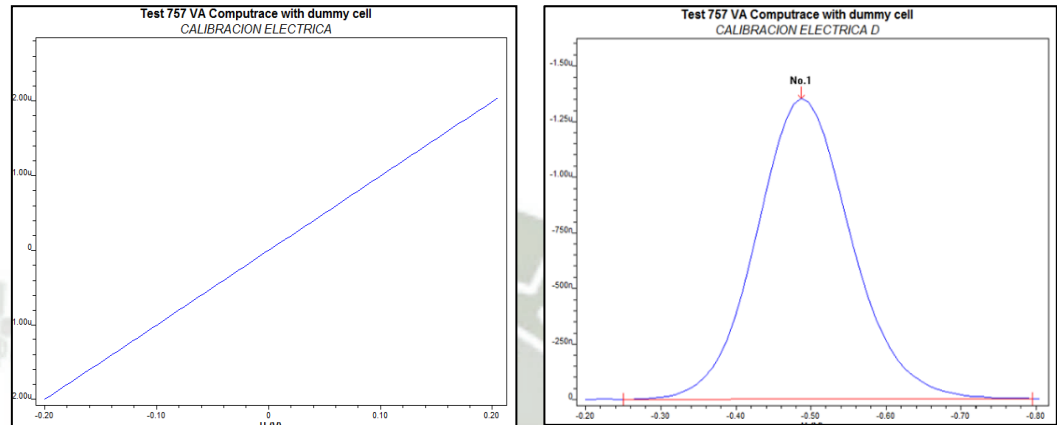


FIGURA 3.1 Gráfico lineal y un voltemperograma expresado en función de la intensidad de corriente I (A) y la rampa de voltaje U (V).

En el Test de linealidad se obtuvo una intensidad de corriente mínima de $-2 \mu\text{A}$ y una máxima de $2 \mu\text{A}$ frente a una rampa de voltaje mínima de -200 mV y una máxima de 200 mV . La grafica lineal para la calibración eléctrica que se observa en la **FIGURA 3.1** nos indicó que la rampa de voltaje es apta para la utilización del equipo.

Los parámetros establecidos para la estación voltamperométrica por Metrohm® indica que la tolerancia para el voltaje es de -450 mV a -550 mV y para la intensidad de corriente de $-2 \mu\text{A}$ a $4 \mu\text{A}$. El voltamperograma mostró un voltaje máximo de -499 mV y una intensidad de corriente máxima de $-1.47 \mu\text{A}$. Por lo que la calibración eléctrica del equipo fue óptima. El equipo se encontró en buen funcionamiento.

3.6.2. CALIBRACIÓN QUÍMICA

La calibración química se procedió utilizando el protocolo de Metrohm®, se colocó en la celda electroquímica del voltamperómetro 20 mL de agua ultrapura, 100 μL de solución estándar del ión Pb como $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y de 500 μL electrolito de cloruro de potasio (KCl) a $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

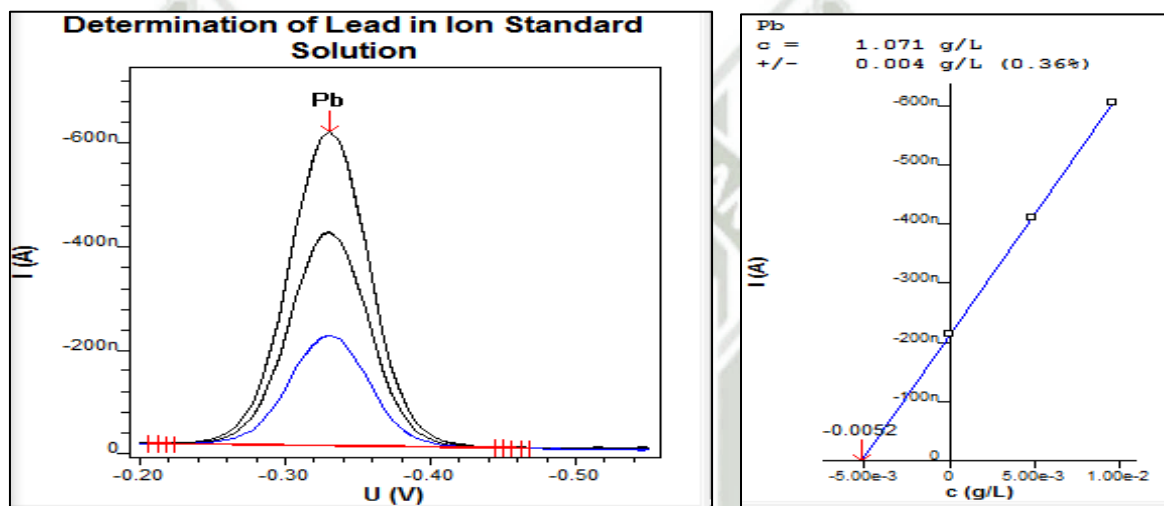


FIGURA 3.2 Voltamperograma de la Calibración Química.

El voltamperograma en función de la intensidad de corriente (A) y la rampa de voltaje (V), contiene picos simétricos, los cuales se intensificaron hasta alcanzar una intensidad de corriente máxima de -600 nA frente a una rampa de voltaje mínima de -200 mV y una máxima de -500 mV . La gráfica lineal nos muestra además se observa una gráfica lineal la concentración de analito ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en función a la intensidad de corriente (A), la cual llega a una intensidad de corriente máxima de -600 nA frente a un rango de concentraciones de $0.005 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $0.01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Se determinó la

concentración de plomo el cual fue 1.071 g.L^{-1} Dentro de tolerancia debe estar en un rango de 0.95 a 1.05 g.L^{-1} según los parámetros establecidos por Metrohm[®], por lo cual la calibración química es óptima.

3.6.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

LINEALIDAD

En (ANEXOS: TABLA 3.2) muestra los valores de las concentraciones finales (C_f) de As (III) calculadas para cada adición estándar, las mediciones de cada concentración se realizaron por triplicado y se obtuvieron las intensidades promedio y las desviaciones estándar.

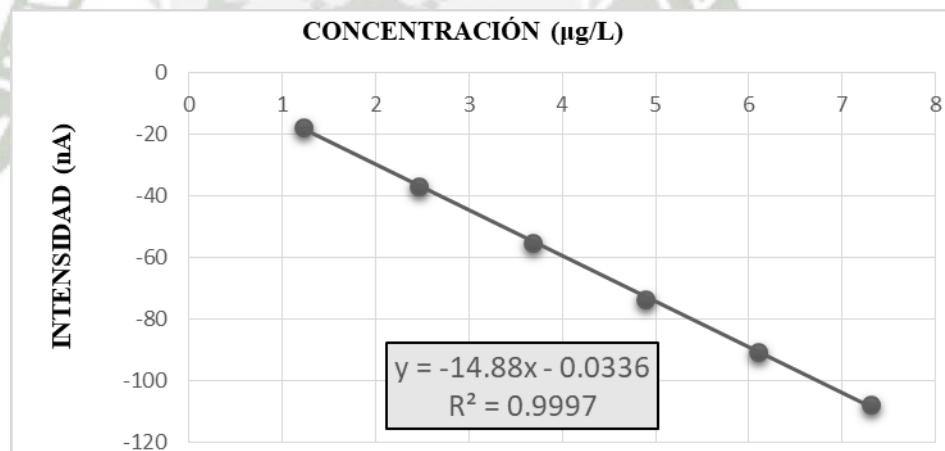


Figura 4.3 Representación gráfica de la linealidad promedio

Para el análisis de la linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación (r) tiene un valor de $0,999$ que es muy cercano a la unidad, mostrando así un alto grado de correlación entre la variable “x” concentración ($\mu\text{g.L}^{-1}$) y la variable “y” intensidad

(nA). El coeficiente de correlación ajustado (r^2 ajustado) con un valor de 0.999. Al comparar nuestro coeficiente de correlación con la *Association of Official Analytical Chemist* AOAC, que estipula que el coeficiente de correlación debe ser ≥ 0.995 , demostramos la linealidad del método.

PRECISIÓN

Según la AOAC, 2002; la precisión se refiere al grado de concordancia de

una serie de medidas tomadas a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones lo más constante posible. Se tomo la repetibilidad como parte de la precisión del método

- **Repetibilidad:** Se realizaron repeticiones simultáneas en diferentes momentos (pero el mismo día), en el mismo laboratorio y por un mismo analista siguiendo las normas de las AOAC, 2002. La precisión se puede expresar en términos de desviación estándar (s) y desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV).

En (ANEXOS: TABLA 3.3) se muestran los valores de intensidades promedio junto a su respectiva desviación estándar (s) a partir de los cuales se calculó el Coeficiente de Variación (CV). El rango del coeficiente de variación (CV) fue de 1.77 a 4.75 se encuentran dentro de los criterios de aceptación establecidos por la *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC), donde se establece un valor límite del 7.3%.

EXACTITUD

La exactitud se define como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia (AOAC, 2002).

Para determinar la exactitud se calculó el porcentaje de recuperación, se realizó determinaciones por triplicado de: estándar ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), muestra y muestra más estándar de la misma concentración, el promedio de los valores obtenidos se resumen en (**ANEXOS: TABLA 3.5**)

El porcentaje de recuperación en hojas de *Rosmarinus officinalis L.* obtenida fue 97.120 %; estos resultados fueron comparados con los que establece la AOAC, que estipula que el porcentaje de recuperación para deben tener porcentaje de recuperación entre 80% y 110%, por lo que se encuentra dentro del rango establecido.

LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se determinaron los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOC) los datos para las regresiones lineales fueron obtenidos de la (**ANEXOS: TABLA 3.4**) nos muestra como el LOD el valor de $0.1113 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ y de LOC de $0.3706 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ y desviación estándar del blanco S_{bl} fue 1.2815 de tal manera que nos permitió determinar concentraciones bajas de As (III) presente en las hojas del *Rosmarinus officinalis L.* Según la AOAC, el límite de detección (LOD) es la mínima concentración o masa del analito que puede ser detectada en un método dado. Mientras que el límite de cuantificación (LOC) es la mínima concentración o masa del analito de un método determinado que se puede cuantificar. Se deduce que el método es capaz de detectar mínimas cantidades de arsénico en una muestra, considerando que la concentración este por encima de 0.1113

$\mu\text{g.L}^{-1}$; además el método es confiable ya que cuantifica cantidades mayores o iguales a $0.3706 \mu\text{g.L}^{-1}$

3.7. BIOENSAYO DE TOXICIDAD

Los bioensayos in vitro han tomado una aceptación en las estrategias de biomonitoreo, fundamentalmente porque suministran resultados confiables, simples, rápidos y costos efectivos. En las últimas décadas se han desarrollado bioensayos rápidos con el uso de especies vegetales como organismos de prueba que funcionan como una buena herramienta de trabajo para el monitoreo ambiental. La especie vegetal *Rosmarinus Officinalis L.* se adaptó a 25% de la solución nutritiva La Molina[®]. Se realizó los siguientes tratamientos; T1; donde la concentración de arsénico fue 0 mg.L^{-1} , para T2, T3, T4, se preparó las siguientes concentraciones respectivamente 5, 10 y 20 mg.L^{-1} de Arseniato disódico heptahidratado $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ en 2 L de la solución nutritiva de La Molina[®]. (10 mL de solución “A” y 4 mL solución “B”). Se utilizaron 3 plantas de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) para cada tratamiento durante 25 días, evaluando cada 5 días los cambios presentados en la especie. En este bioensayo se realizó una escala evolutiva de toxicidad descrita en un envase a una escala de grado de toxicidad (**TABLA 3.6**)

TABLA 3.6 Evolución de la toxicidad a diferentes concentraciones Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) en *Rosmarinus officinalis* L. durante 25 días de experimentación.

TIEMPO (DIAS)	T1 ^(a)		T2 ^(b)		T3 ^(c)		T4 ^(d)	
	Raíz	Hojas	Raíz	Hojas	Raíz	Hojas	Raíz	Hojas
0	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1
1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1
5	G1	G1	G2	G2	G2	G2	G2	G2
10	G1	G1	G2	G2	G3	G3	G4	G4
15	G1	G1	G2	G3	G4	G4	G4	G5
20	G1	G1	G3	G3	G4	G4		
25	G1	G1	G3	G3	G5	G5		

(a): testigo, (b): 5 mg.L^{-1} , (c): 10 mg.L^{-1} , (d): 20 mg.L^{-1} .

- **Grado 1 (G1)**

Raíz: No se observaron síntomas.

Hojas: No se observaron síntomas.

- **Grado 2 (G2)**

Raíz: Ligeras manchas necróticas.

Hojas: En tercio inferior con áreas cloróticas sobre la lámina de las hojas. En el tercio medio y superior no se observaron síntomas.

- **Grado 3 (G3)**

Raíz: Necrosis en avance.

Hojas: Tercio inferior con clorosis generalizada y/o arrugamiento de hojas. El tercio medio y superior con áreas cloróticas sobre la lámina de las hojas, con la diferencia que el tercio superior se empezó a manifestar deformación de las hojas en el ápice.

- **Grado 4 (G4)**

Raíz: Necrosis y senescencia de raíces.

Hojas: Tercio inferior con necrosis y/o arrugamiento de hojas. El tercio medio y superior con clorosis generalizada, arrugamiento y deformación de hojas en el ápice.

- **Grado 5 (G5)**

Raíz: Necrosis, senescencia y raíces quebradizas.

Hojas: Tercio inferior con inicios de senescencia, acortamiento y deformación de hojas. Y el tercio medio y superior con necrosis e inicios de senescencia.

Según la descripción del grado de toxicidad, se comparan tratamientos, observamos que en el T1 se encontró constante en G1 porque no presentó toxicidad en hojas y raíces, debido al no estar sometidas en Arseniato disódico heptahidratado $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

Los tratamientos empezaron a manifestar cambios externos a partir del día 5; en T2, T3 y T4 se inició con ligeras manchas necróticas a nivel de la raíz y áreas cloróticas en hojas del tercio inferior. Se observó que a partir del día 10 continuó el avance de la necrosis e inicio de senescencia en raíces y la clorosis empieza a generalizarse con arrugamiento de hojas desde el tercio inferior al superior. Finalmente del día 15 al 25, las raíces lucieron necrosadas, quebradizas y con inicios de senescencia; mientras que la aparición de necrosis, senescencia, acortamiento y deformación de hojas se inicia desde el tercio inferior; los nuevos brotes axilares generados en el tercio medio lucen necrosados; y la senescencia generalizada y abscisión de hojas es inminente en el tercio superior.

Se observó que en el tratamiento T4 se manifestaron síntomas en hojas y raíces como clorosis, necrosis, abscisión y senescencia debido a la

toxicidad del arsénico. El ciclo vital de la planta *Rosmarinus officinalis* L. fue de 15 días con respecto a la concentración de 20 mg.L⁻¹

3.8. BIOACUMULACIÓN DE ARSÉNICO

3.8.1. ANÁLISIS PRELIMINAR

Se secaron las muestras de hojas del *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) en la estufa a una temperatura menor a 60°C por 24 horas. Posteriormente las muestras se trituro, se pesó 20 ± 0.1 mg de las hojas y raíces en tubos de digestión. Se agregó 2 mL de ácido nítrico suprapuro (HNO₃) al 12 %, Luego se procedió a realizar la reducción con L- cisteína 0.1 mol. L⁻¹, y se analizó por voltamperometría. Se analizaron las hojas y raíces de las plantas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) antes de proceder a realizar el Bioensayo de toxicidad como la Bioacumulación de arsénico. En los resultados de los análisis por voltamperometria no se encontró la presencia de arsénico.

Se analizó las muestras del bioensayo de toxicidad a diferentes concentraciones de Arseniato disódico heptahidratado (Na₂HAsO₄·7 H₂O) durante 25 días de experimentación.

Los análisis de arsénico (V) se muestran en la **TABLA 3.7**

TABLA 3.7 *Análisis de arsénico (V) del Bioensayo de Toxicidad en raíces y hojas de Rosmarinus officinalis L. (Romero) a diferentes concentraciones de Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) durante 25 días de experimentación.*

PARTE DE PLANTA	CONCENTRACIONES ^(a)	CONCENTRACIONES DE ARSÉNICO (V) ^(b)
RAIZ	5	86.558 ± 1.288
	10	55.433 ± 1.0958
	20	77.668 ± 1.030
HOJAS	5	123.684 ± 1.075
	10	244.696 ± 1.054
	20	307.758 ± 1.050

n=3 (tres muestras por tratamiento), (a): $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (b): $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}+s$, s: Desviación estándar.

Se realizó el análisis de las hojas y raíces del *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) del T4 a una concentración de 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), en la **TABLA 3.7** se observó la máxima absorción de arsénico (V), sin embargo el tiempo de tolerancia del contaminante fue de 15 días, el ciclo vital de la planta se paralizó debido a los síntomas en hojas y raíces que presentó **TABLA 3.6**. La capacidad de absorción de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) fue mayor en hojas que en raíces, también se observó que los resultados de los análisis de arsénico (V) fueron muy dispersos en las raíces, sin embargo en las hojas se observó que a medida que la concentración del tóxico aumentaba la planta absorbía mayor concentración de arsénico (V). Por tal motivo se decidió realizar el experimento final, utilizando solamente las hojas para determinar la máxima absorción de arsénico.

3.8.2. EXPERIMENTO FINAL

Se diseñó y construyó 4 estanques de vidrio con un espesor de 12 mm con las siguientes dimensiones: 40 cm de largo, 30 cm de ancho y 40 cm de alto **FIGURA 1.8** , para 30 L de solución nutritiva La Molina[®] (150 mL de solución “A” y 60 mL de solución “B”) , se añadió Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y se completó con agua potable, se colocó a cada tratamiento una bomba de aire. Se realizaron 4 tratamientos de 0, 5, 10 y 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Finalmente 8 plantas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) de 10-25 cm de altura fueron colocadas sobre una bandeja de poliestireno (**FIGURA 3.4**)

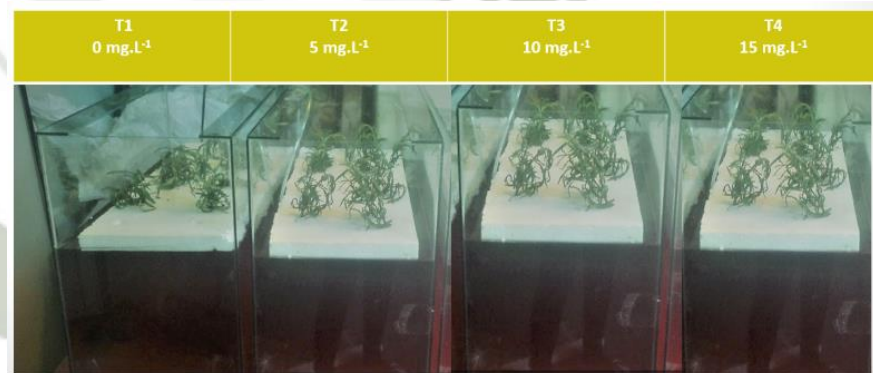


FIGURA 3.4 Bioacumulación de Arsénico en los diferentes tratamientos.

➤ TRATAMIENTO T1

El tratamiento (T1), denominado blanco debido a que solo contuvo la solución nutritiva La Molina[®]. Tuvo una concentración inicial de 0.000 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ durante los 35 días de experimentación, es decir que no estuvo sometida al contaminante Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

➤ **TRATAMIENTO T2, T3, T4**

Los tratamientos T2, T3, T4 se encontraron sometidos al contaminante Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). A las siguientes concentraciones 5 mg.L^{-1} , 10 mg.L^{-1} y 15 mg.L^{-1} . Los valores de acumulación de arsénico (V) en *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) se muestran en el **TABLA 3.8**

TABLA 3.8. Bioacumulación de arsénico (V) en hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) a 5, 10 y 15 mg.L^{-1} de Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) durante 35 días de experimentación.

T ^(a)	T2 ^(b)	T3 ^(c)	T4 ^(d)
	HOJAS ^(e)		
0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
5	24.993 ± 0.579	57.126 ± 0.466	126.125 ± 0.586
10	67.144 ± 0.167	155.186 ± 0.549	211.986 ± 0.429
15	117.662 ± 0.591	201.910 ± 0.312	265.855 ± 0.201
20	89.953 ± 0.181	274.105 ± 0.937	330.136 ± 0.013
25	121.934 ± 0.704	246.160 ± 0.506	300.510 ± 0.338
30	168.943 ± 0.227	287.685 ± 0.487	359.350 ± 0.533
35	155.709 ± 0.343	267.882 ± 0.513	334.936 ± 0.954

$n=3$ (tres muestras por tratamiento), (a): tiempo expresado en días, (b)= 5 mg.L^{-1} , (c)= 10 mg.L^{-1} , (d)= 15 mg.L^{-1} , (e)= $\text{mg.Kg}^{-1} \pm s$, s: Desviación estándar.

En el tratamiento T2; en hojas (**TABLA 3.8.** y **FIGURA 3.5**) se observó que la concentración se va incrementando hasta el día 15, la cantidad máxima de acumulación en el T2 es de $117.662 \pm 0.591 \text{ mg.Kg}^{-1}$, en el

dia 20 se observa que disminuye la concentración levemente siendo de $89.953 \pm 0.181 \text{ mg.Kg}^{-1}$. Después del día 20 se observó que se incrementó nuevamente hasta el día 30 con una concentración de $168.943 \pm 0.227 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y al día 35 se observó que la concentración empezó a disminuir.

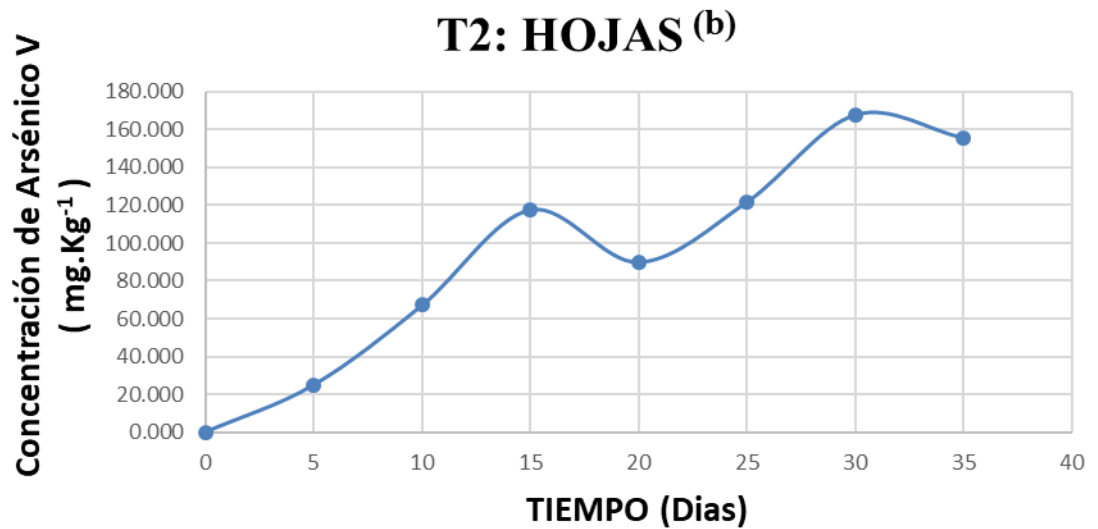


FIGURA 3.5 Tratamiento T2: Curva de bioacumulación de arsénico (V) utilizando los promedios de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) durante 35 días de experimentación (b) 5 mg.L^{-1} .

En el tratamiento T3; (TABLA 3.8. y FIGURA 3.6) la acumulación de arsénico en hojas se dio a partir del día 5 en donde la concentración se incrementa hasta el día 20, donde se observó la concentración máxima de acumulación que fue de $274.105 \pm 0.937 \text{ mg.Kg}^{-1}$, después del día 20 se observó que la concentración disminuye en el día 25 se observó una concentración de $246.160 \pm 0.506 \text{ mg.Kg}^{-1}$ En el día 30 incrementa la concentración y en el día 35 disminuye levemente con una concentración de $334.936 \pm 0.954 \text{ mg.Kg}^{-1}$, probablemente este suceso se deba a la toxicidad y volatilización del arsénico.

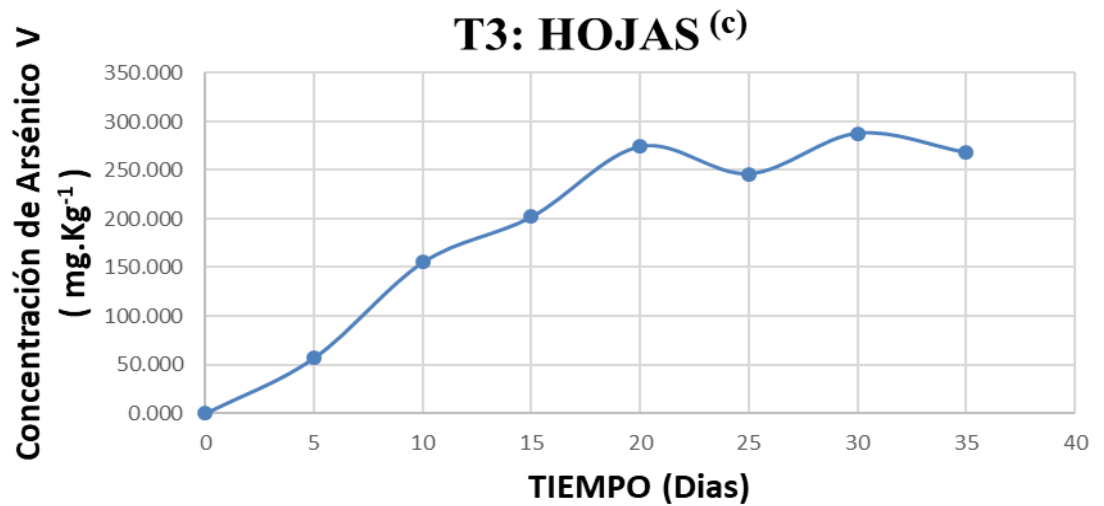


FIGURA 3.6 Tratamiento T3: Curva de bioacumulación de arsénico (V) utilizando los promedios de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) durante 35 días de experimentación (b) 10 mg.L⁻¹.

En el tratamiento T4; (TABLA 3.8. y FIGURA 3.7) la acumulación de arsénico en hojas se dio a partir del día 5 en donde la concentración se incrementa hasta el día 20, donde se observó la concentración máxima de acumulación que fue de 330.136 ± 0.013 mg.Kg⁻¹, después del día 20 se observó que la concentración disminuye en el día 25 se observó una concentración de 300.510 ± 0.338 mg.Kg⁻¹ En el día 30 incrementa la concentración y en el día 35 disminuye levemente con una concentración de 267.882 ± 0.513 mg.Kg⁻¹, probablemente este suceso se deba a la toxicidad y volatilización del selenio.

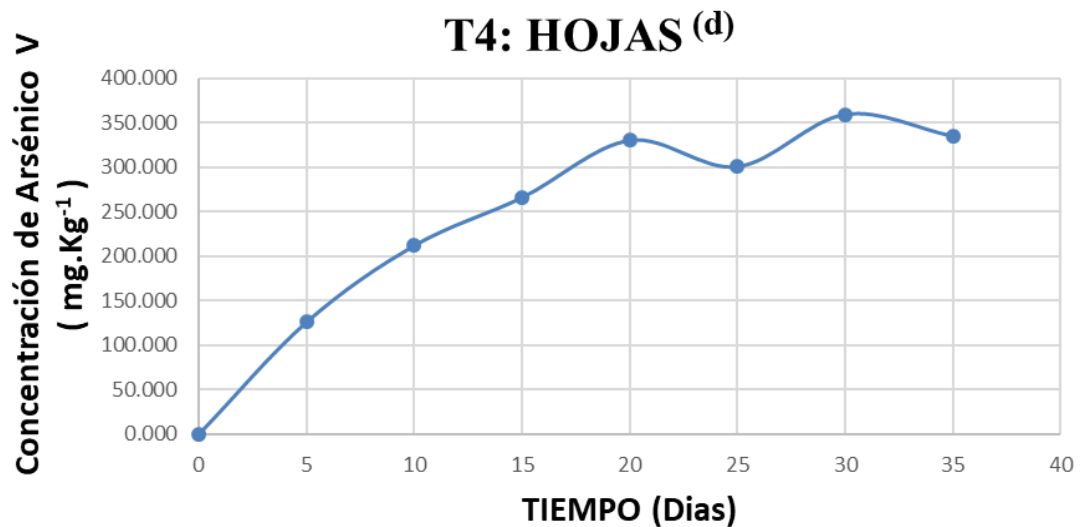


FIGURA 3.7 Tratamiento T4: Curva de bioacumulación de arsénico (V) utilizando los promedios de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) durante 35 días de experimentación (b) 15 mg.L⁻¹.

En algunos el siguiente artículo Investigación de la acumulación de arsénico y la respuesta bioquímica de plantas de *Vetiveria zizanoides* desarrolladas in vitro,¹⁷⁷

Se ha encontrado que el pasto vetiver (*Vetiveria zizanoides* L. Nash) es un candidato adecuado para la fitorremediación de metales pesados. Se realizó una investigación de la acumulación, translocación y tolerancia al arsénico (As) en plántulas de *V. zizanoides* tras la exposición a diferentes concentraciones de arsénico 0.75, 3.5, 7.5 y 15 mg.L⁻¹ durante 7 y 14 días. Se encontró que las plantas de *V. zizanoides* eran efectivas en la remediación de As, siendo el máximo de 15 mg.L⁻¹ después de 14 días de exposición.

Las plantas no experimentaron toxicidad significativa en todas las concentraciones de As después de 7 días, sin embargo, se encontró un aumento en su nivel después de 14 días. Tomados en conjunto, los resultados indicaron que las plantas desarrolladas in vitro de *V.*

zizanoides tienen el potencial de remediar y tolerar niveles variables de As.

Como se observa *V. zizanoides* tolera como máximo $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de igual forma que el *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) sin embargo el tiempo que *V. zizanoides* esta sometida al contaminante es de 14 días siendo mucho mucho menor que el *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) el cual resiste hasta 30 días. Otros estudios afirman la eficiencia de las plantas para la remoción de arsénico en

El potencial de fitorremediación de *Arundo donax* en aguas residuales sintéticas contaminadas con arsénico según Nosheen Mirza ¹⁷⁹

El presente estudio informa el potencial de *Arundo donax* para la fitoextracción de arsénico a partir de aguas residuales sintéticas. Las plantas de *A. donax* se cultivaron en condiciones de invernadero en macetas que contenían una solución nutritiva modificada con dosis crecientes de As ($0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.6$ y $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) durante 21 días en un diseño completamente al azar. La producción de materia seca, los parámetros de crecimiento, el arsénico y las concentraciones de tejido de nutrientes se midieron al final del experimento. El aumento de la concentración de As en la solución nutritiva provocó un aumento en la biomasa de los brotes y las raíces sin síntomas de toxicidad en *A. donax* que crece en un rango de concentración de As de 0.05 a $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Se observó un estrés oxidativo elevado a un nivel suministrado de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Las dosis de As hasta $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ no afectaron el crecimiento de *A. donax*. Se sugiere que las plantas de *A. donax* se puedan emplear para tratar aguas contaminadas que contienen concentraciones de arsénico de hasta $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Rosmarinus officinalis L. (Romero) tolera concentraciones elevadas hasta $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 30 días comparada con *A. donax* que lo máximo de concentración que tolera es $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 15 días.

3.9. ANÁLISIS DE CLOROFILA “A” DE LAS MUESTRAS DE *Rosmarinus Officinalis L. (Romero)*

El contenido de clorofila “a” se midió por espectrofotometría UV- Vis.
El sobrenadante se midió una longitud de onda de 665 nm y 750 nm.

➤ BARRIDO ESPECTRAL

Realizando el barrido espectral se buscó determinar la longitud de onda máxima, donde el analito absorbe más luz. Se utilizó el Espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 Agilent®. Se seleccionó la función SCAN, click en PREPARAR y se seleccionaron los siguientes parámetros: Longitud de onda, absorbancia, velocidad de barrido medio, el rango de 200 a 800 nm. Se colocó el blanco metanol en la celda, hasta que estuvo en cero. Finalmente se colocó la muestra en la celda y seguidamente se realizó el barrido espectral. (FIGURA 4.8)

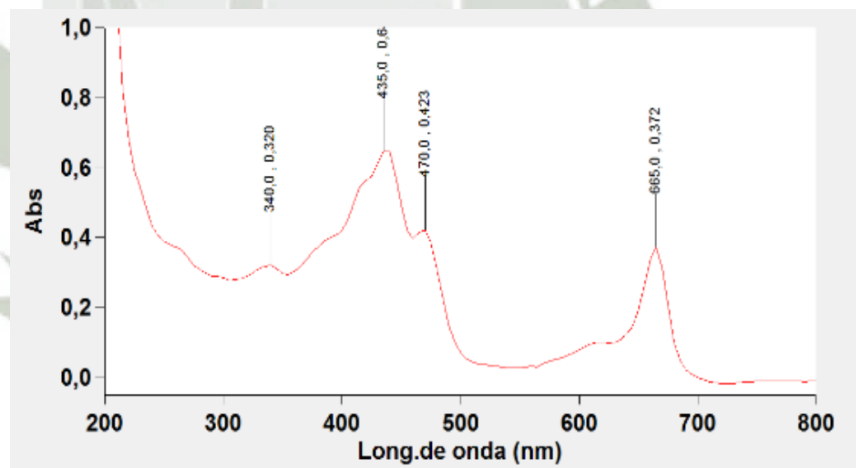


FIGURA 4.8 Barrido Espectral de la muestra de hojas de *Rosmarinus officinalis L. (Romero)*.

Los barridos espectrales son propios de cada sustancia, nos permitió visualizar la variación de la absorbancia con la longitud de onda de la

radiación electromagnética, mediante el análisis se obtuvo una longitud de onda de 665 nm que es la óptima para realizar los análisis de clorofila "a" de las muestras de hojas de *Rosmarinus officinalis L. (Romero)*.

DETERMINACIÓN DE CLOROFILA "A" POR ESPECTROFOTOMETRÍA

➤ TRATAMIENTO T1

El tratamiento (T1), fue denominado blanco debido a que solo contuvo la solución nutritiva La Molina[®]. Tuvo una concentración inicial de 0.000 mg.Kg⁻¹ durante los 35 días de experimentación, es decir que no estuvo sometida al contaminante Arseniato disódico heptahidratado (Na₂HAsO₄. 7H₂O).

➤ TRATAMIENTO T2, T3, T4

Los tratamientos T2, T3, T4 se encontraron sometidos al contaminante Arseniato disódico heptahidratado (Na₂HAsO₄. 7H₂O). Durante la experimentación de 35 días se observaron cambios en las hojas de los *Rosmarinus officinalis L. (Romero)*.

La clorosis es la carencia de clorofila, que es lo que da a las hojas su característico color verde y que interviene en el proceso de la fotosíntesis. La clorosis comenzó como un aclaramiento ligero en el color de la hoja, al pasar los días empezó a amarillear completamente la hoja, a secarla.

(TABLA 3.9)

TABLA 3.9 Concentración de Clorofila “a” en hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) a 5, 10 y 15 mg.L⁻¹ de Arseniato disódico heptahidratado (Na₂HAsO₄ · 7 H₂O) durante 35 días de experimentación.

T ^(a)	T1 ^(b)	T2 ^(c)	T3 ^(d)	T4 ^(d)
	HOJAS ^(e)			
0	6.984 ± 0.058	6.964 ± 0.038	6.550 ± 0.045	6.625 ± 0.037
5	6.962 ± 0.035	6.454 ± 0.040	5.765 ± 0.037	5.833 ± 0.054
10	6.801 ± 0.067	5.655 ± 0.035	5.241 ± 0.044	4.564 ± 0.019
15	6.721 ± 0.028	5.239 ± 0.034	4.951 ± 0.044	3.664 ± 0.036
20	6.932 ± 0.045	4.851 ± 0.044	4.549 ± 0.046	2.748 ± 0.042
25	6.892 ± 0.032	4.655 ± 0.048	3.965 ± 0.038	2.373 ± 0.027
30	6.656 ± 0.023	3.7473 ± 0.037	3.077 ± 0.019	1.863 ± 0.010
35	6.760 ± 0.056	3.058 ± 0.039	2.759 ± 0.025	1.078 ± 0.021

n=3 (tres muestras por tratamiento), (a): tiempo expresado en días, (b)= 0 mg.L⁻¹, (c)= 5 mg.L⁻¹, (d)= 10 mg.L⁻¹, (e)= 15 mg.L⁻¹ ± s, s: Desviación estándar.

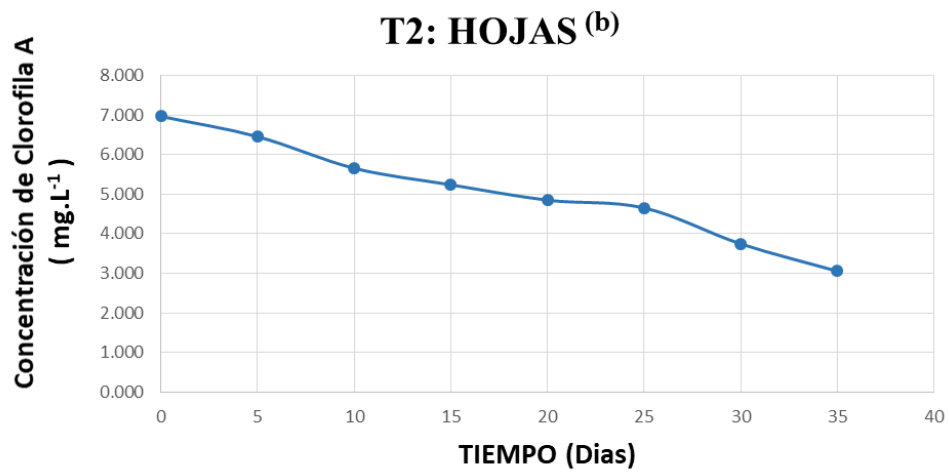


FIGURA 3.9 Tratamiento T2: Curva de Clorofila “a” utilizando los promedios de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) durante 35 días de experimentación sometidas a (b) 5 mg.L⁻¹.

Como se observa en las graficas, en el T2 a 5 mg.L⁻¹ (**FIGURA 3.9**) la concentración de clorofila “a” va disminuyendo a medida que el tiempo transcurre la concentración final fue de 3.058 ± 0.039 mg.L⁻¹. Las plantas en el T2 se observaron con una clorosis leve hasta el día 35.

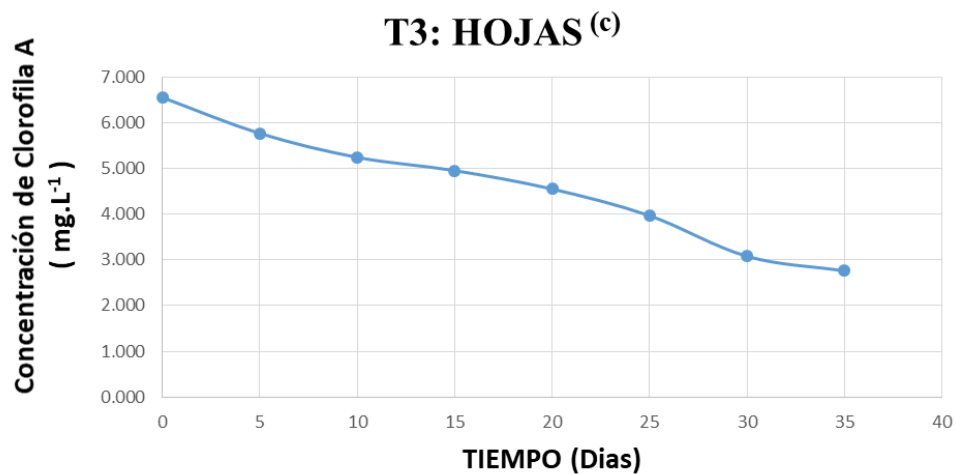


FIGURA 3.10 Tratamiento T3: Curva de Clorofila “a” utilizando los promedios de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) durante 35 días de experimentación sometidas a (c) 10 mg.L⁻¹.

En T3 a 10 mg.L^{-1} (**FIGURA 3.10**) la concentración de clorofila “a” disminuye moderadamente la concentración final fue de $2.759 \pm 0.025 \text{ mg.L}^{-1}$. Las plantas en el T3 se observaron con clorosis leve a moderada hasta el día 35.

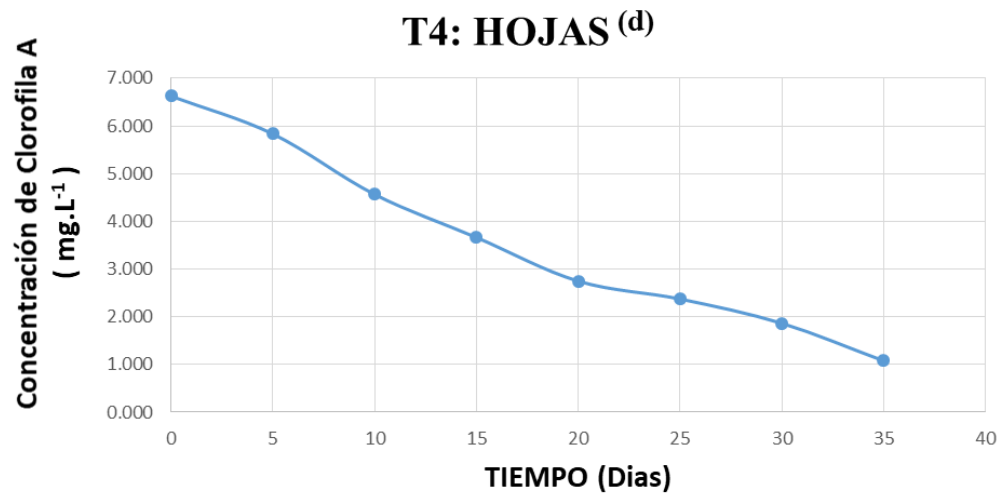


FIGURA 3.11 Tratamiento T4: Curva de Clorofila “a” utilizando los promedios de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) durante 35 días de experimentación sometidas a (d) 15 mg.L^{-1} .

En T4 a 15 mg.L^{-1} (**FIGURA 3.11**) la concentración de clorofila “a” disminuye en forma significativa a medida que el tiempo transcurre la concentración final fue de $2.759 \pm 0.025 \text{ mg.L}^{-1}$. Las plantas en el T4 se observaron con clorosis y necrosis en las hojas. La causas de la clorosis es el exceso de elementos tóxicos, en este caso el arsénico, al estar presente el metaloide en concentraciones elevadas en el medio de crecimiento de las plantas (sistema hidropónico) al transcurrir los días las hojas absorbían mayor concentración arsénico y estas a su vez presentaban problemas fisiológicos como la clorosis debido a que el follaje dejo de producir suficiente clorofila a causa del contaminante, las hojas no tenían la coloración normal verde; presentaron una coloración verde pálido, amarillo y otras amarillo blanquecina. En el T4 debido a que la planta

estuvo sometido a concentraciones elevadas del contaminante 15 mg.L^{-1} las hojas además de presentar clorosis algunas presentaron necrosis en hojas es decir la muerte celular de las hojas del *Rosmarinus officinalis L.* (Romero),

Como se observa en las **FIGURAS 3.9; 3.10; 3.11** la concentración de clorofila “a” de las hojas de *Rosmarinus officinalis L.* no existe diferencia significativa en los tratamientos Según (Conklin 2001).¹⁷⁵

Las plantas muestran que la producción de clorofila en las plantas expuestas a diferentes concentraciones de metales pesados fue distinta dependiendo de la especie vegetal y el tiempo, la planta presenta mecanismo de defensa ocasionando una mayor producción de enzimas con actividad peroxidasa, como por ejemplo, la ascorbato peroxidada, una enzima importante en los mecanismos antioxidantes de la planta, en *H. psittacorum* presentó una mayor producción de clorofila en los tratamientos pero no superó a las plantas control, esta respuesta fisiológica pudo representar el máximo esfuerzo de esta especie para sobrevivir ante las condiciones de estrés a la cual fue sometida.

En *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) el arsénico provoca clorosis en las hojas. El suministro de arsénico causó la disminución de los niveles de clorofilas según (Mascher y col., 2002).

Aunque hay muchos motivos para esta clorosis (como deficiencia de Fe), en el caso del arsénico se atribuye directamente a la inhibición de la síntesis del pigmento (Jain y Gadre, 1997). En dicho estudio, las causas de dicha inhibición son una limitada disponibilidad del ácido b-aminolevulínico (que es un precursor de la clorofila) y las alteraciones producidas sobre las proteínas ricas en grupos tioles.

3.10. ANALÍISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis estadístico para comprobar las diferencias honestamente significativas existentes entre los tratamientos T1 (5 mg.L⁻¹), T2 (10 mg.L⁻¹), T3 (15 mg.L⁻¹) de las concentraciones de arsénico (V) cuntificadas en las hojas de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) en cada tratamiento. (TABLA 4.10 y TABLA 4.11).

TABLA 4.10 *Análisis estadístico de los promedios de la concentración de arsénico (V) en las hojas del Rosmarinus officinalis L. (Romero) de los diferentes tratamientos.*

TRATAMIENTOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA
TRATAMIENTO 2	8	745.438	93.180	3565.807
TRATAMIENTO 3	8	1490.054	186.257	11547.546
TRATAMIENTO 4	8	1928.897	241.112	15293.413

TABLA 4.11 *Análisis de Varianza ANOVA de un factor de los promedios de la concentración de arsénico (V) en las hojas del Rosmarinus officinalis L. (Romero) de los diferentes tratamientos.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre tratamientos	89483.843	2	44741.921	4.414	0.025	3.466
Dentro de los tratamientos	212847.366	21	10135.588			
Total	302331.21	23				

La **TABLA 4.11** nos muestra que al realizar la prueba F, de las concentraciones de arsénico (V) en hojas del *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) en el T2, T3 y T4 existió diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de $\alpha=0.05$ debido a que el F calculado > F crítico.

TABLA 4.12 Prueba de Tukey: Tabla de comparación de la concentración de arsénico (V) en las hojas del *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) en los diferentes tratamientos.

	T2 ^(a)	T3 ^(b)	T4 ^(c)
T2 ^(a)		93.077	147.932
T3 ^(b)	93.077		54.855
T4 ^(c)	147.932	54.855	

(a)= 5 mg.L⁻¹, (b)= 10 mg.L⁻¹, (c)= 15 mg.L⁻¹

Se determinó la prueba de TUKEY. Se calculó la diferencia honestamente significativa (HSD) la cual fue de 138.818 a un 95% de confiabilidad. Existe diferencia significativa entre el T2 y el T4, no existe diferencia significativa entre el T2 y T3. No existe diferencia significativa entre el T3 y los tratamientos T2 y T4. Si hay diferencia significativa del T4 con el T2.

Se realizó el análisis estadístico para comprobar las diferencias honestamente significativas existentes entre los tratamientos T1 (0 mg.L⁻¹), T2 (5 mg.L⁻¹), T3 (10 mg.L⁻¹) y T4 (15 mg.L⁻¹) de las concentraciones de la clorofila “a” en las hojas de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) en cada tratamiento.

Los resultados se observan en la (TABLA 4.13 y TABLA 4.14)

TABLA 4.13 *Análisis estadístico de los promedios de la concentración de clorofila “a” en las hojas del Rosmarinus officinalis L. (Romero) de los diferentes tratamientos.*

TRATAMIENTOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA
TRATAMIENTO 1	8	54.708	6.839	0.015
TRATAMIENTO 2	8	40.623	5.078	1.699
TRATAMIENTO 3	8	36.858	4.607	1.687
TRATAMIENTO 4	8	28.749	3.594	3.811

TABLA 4.14 *Análisis de Varianza ANOVA de un factor de los promedios de la concentración de clorofila “a” en las hojas del Rosmarinus officinalis L. (Romero) de los diferentes tratamientos.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre tratamientos	44.046	3	14.681	8.150	0.0004681	2.946
Dentro de los tratamientos	50.436	28	1.801			
Total	94.482	31				

La **TABLA 4.14** nos muestra que al realizar la prueba F, de las concentraciones de clorofila “a” en hojas del *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) entre tratamientos no existió diferencia estadística significativa, se acepta la hipótesis nula a un nivel de confianza de $\alpha=0.05$ debido a que el F calculado < F crítico.



CAPÍTULO IV CONCLUSIONES

- Se determinó las condiciones óptimas para el desarrollo de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero), la propagación se dio por división y se adaptaron las plantas en un sistema hidropónico de raíz flotante.
- Se realizó la validación analítica voltamperométrica para determinar arsénico en hojas de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) siendo lineal con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.999, con un límite de detección de $0.113 \mu\text{g.L}^{-1}$ y límite de cuantificación de $0.3706 \mu\text{g.L}^{-1}$ además de ser preciso y tener una exactitud aceptable.
- Se realizó el bioensayo de toxicidad en un sistema hidropónico, se determinó el nivel de tolerancia del *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) al ser expuesta a una concentración de 20 mg.L^{-1} , muestra menor ciclo vital, con problemas fisiológicos como clorosis, necrosis, senescencia y abscisión de hojas; mientras

que a una concentración igual o mayor de 10 mg.L^{-1} muestra un mayor ciclo vital y un retraso en la aparición de sintomatología de toxicidad en raíces y hojas.

- Se realizó los experimentos finales de bioacumulación de arsénico, realizando un análisis preliminar donde se analizaron las concentraciones de arsénico (V) de raíz y hojas del *Rosmarinus officinalis* (Romero) del Bioensayo de Toxicidad, donde se observó que la concentración de arsénico (V) en las raíces fue muy disperso, sin embargo en las hojas se observó que era uniforme.
- Se concluye que el *Rosmarinus officinalis* (Romero) es una planta con capacidad de fitorremediación para ambientes contaminados con arsénico (V) es capaz de absorber en hojas como máximo $330.136 \pm 0.013 \text{ mg.Kg}^{-1}$ con un ciclo vital de 35 días.
- La concentración de clorofila “a” en hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero), que estuvieron sometidas al contaminante arseniato disodico heptahidratado, la concentración de clorofila “a” va disminuyendo a medida que el tiempo transcurre la concentración final fue de $1.078 \pm 0.021 \text{ mg.L}^{-1}$, debido al contaminante las plantas en el T4 se observaron con clorosis y necrosis en las hojas.

SUGERENCIAS

- Sería recomendable determinar la capacidad de fitorremediación de *Rosmarinus officinalis L. (Romero)* para suelos contaminados con arsénico.
- Realizar la fitorremediación de *Rosmarinus officinalis L. (Romero)* bajo condiciones de campo, es decir ensayos en sitios contaminados con arsénico.
- *Rosmarinus officinalis L. (Romero)* demostró ser eficiente para bioacumular arsénico (V) en aguas contaminadas con dicho metaloide, sería importante desarrollar los mecanismos de reacción química del arsénico en *Rosmarinus officinalis L. (Romero)*.
- Realizar el proyecto de investigación en diferentes estaciones del año para analizar si existe diferencia significativa en cada estación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] George, C. M., Sima, L., Jahaira Arias, H., Mihalic, J., Cabrera, L., Danz, D., ... & Gilman, R. (2014). Exposición al arsénico en el agua potable: una gran amenaza inadvertida para la salud en Perú. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*, 92(8), 545-620.
- [2] Wang, S., C.N, Mulligan. (2006) Occurrence of Arsenic Contamination in Canada: Sources, Behavior and Distribution, *Science of The Total Environment* 366, 701-721.
- [3] Matschullat, J. (2000) *Arsenic in the Geosphere A Review. The Science of the Total Environment* 249, 16.
- [4] International Groundwater Resources Assessment Centre. (2012) *Arsenic in Groundwater: A World Problem*.
- [5] Williams, M. (2001) *Arsenic in Mine Waters: An International Study. Environmental Geology* 40, 12.
- [6] US National Toxicology Program. *Arsenic* (2012)
- [7] Brooks, W.E. (2011) *Minerals Yearbook: Arsenic. Minerals Yearbook*..
- [8] Stöhrer, G. (1991) Arsenic: opportunity for risk assessment. *Arch. Toxicol* 65, 525-531.
- [9] Klaassen, CD., Watkins JB. (2010) Eds. Casarett and Doull's Essentials of Toxicology ed. McGraw- Hill.
- [10] Williams Wilkins. (1997) *Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning. Ed. Baltimore 2*
- [11] Rossman T. (2007) Arsenic. In: Rom W and Markowitz S eds. *Environmental and occupational medicine*, 4th ed. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 1006-1017.
- [12] Shannon, r. L., Strayer, D. S. (1989) Arsenic-induced skin toxicity. *Hum. Toxicol.* 8, 99-104,

- [14] Meek, M. E., Hughes, K. (1992) Arsenic in the general environment evaluation of risks to health. In: international seminar proceeding. Arsenic in the environment and its incidence on health, Universidad de Chile, 173-181.
- [15] Buchet, J. P.; Lison, D. (2000) Clues and uncertainties in the risk assessment of arsenic in the drinking water. *Food Chem Toxicol* 38, 81- 85.
- [16] Padmavathiamma, P. K., Li, L. Y. (2007). Phytoremediation Technology: Hyperaccumulation Metals in Plants. *Water, Air, & Soil Pollution* 184, 105-126.
- [17] Reichenauer, T.G., Germida, J. J. (2008) Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. *ChemSusChem*. 1: 708-717.
- [18] Biodiversidad de especies (2017) Ministerio de Agricultura Perú.
- [19] Bart Sylvain. (2016) Phytostabilization of As, Sb and Pb by two willow species (*S. viminalis* and *S. purpurea*) on former mine technosols, *CATENA* 136, 44–52
- [20] Marie-Cécile Affholdera, Pascale Prudenta. (2013) Transfer of metals and metalloids from soil to shoots in wild rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) growing on a former lead smelter site: Human exposure risk, *Science of The Total Environment* 454–455, 1, 219–229
- [21] Santosh Kumar, Yadav-Asha A.Juwarkar. (2009) Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L., Impact of dairy sludge and biofertilizer, *Bioresource Technology* 100, 4616-4622
- [22] Daskalakis, K.D. and O'Connor, T.P., (1995) Normalization and elemental sediment contamination in the coastal United States. *Environ. Sci. Technology* 29, 470–477.
- [23] Vazquez, E. (2017). Contaminación del agua: causas, consecuencias y soluciones. Retrieved from <https://agua.org.mx/contaminacion-del-agua-causas-consecuencias-soluciones/>
- [24] Lucho-Constantino, C. A., Prieto-García, F., Del Razo, L. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Poggi-Varaldo, H. M. (2005). Chemical fractionation of

- boron and heavy metals in soils irrigated with wastewater in central Mexico. *Agriculture, ecosystems & environment*, 108(1), 57-71.
- [25] Singh, O. V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., & Jain, R. K. (2003). Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(5-6), 405-412.
- [26] Angelova, V., Ivanova, R., Delibaltova, V., & Ivanov, K. (2004). Bioaccumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial crops and products*, 19(3), 197-205.
- [27] García, I., & Dorronsoro, C. (2005). Contaminación por Metales Pesados en Tecnología de Suelos. Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola.
- [28] Kabata-Pendias, A. 2000. Trace elements in soils and plants. Third Edition. CRC Press, Inc. Boca Raton. USA, 365- 413.
- [29] Thangavel, P., & Subbhuraam, C. V. (2004). Phytoextraction: role of hyperaccumulators in metal contaminated soils. *PROCEEDINGS-INDIAN NATIONAL SCIENCE ACADEMY PART B*, 70(1), 109-130.
- [30] Barton, C., Marx, D., Adriano, D., Koo, B. J., Newman, L., Czapka, S., & Blake, J. (2005). Phytostabilization of a landfill containing coal combustion waste. *Environmental Geosciences*, 12(4), 251-265.
- [31] Padmavathiamma, P. K., & Li, L. Y. (2007). Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution*, 184(1-4), 105-126.
- [32] Bolan, N. S., Adriano, D. C., & Naidu, R. (2003). Role of phosphorus in (im) mobilization and bioavailability of heavy metals in the soil-plant system. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 1-44). Springer New York.
- [33] Kucharski, R., Sas-Nowosielska, A., Małkowski, E., Japenga, J., Kuperberg, J. M., Pogrzeba, M., & Krzyżak, J. (2005). The use of indigenous plant species and calcium phosphate for the stabilization of highly metal-polluted sites in southern Poland. *Plant and Soil*, 273(1), 291-305.

- [34] Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Dos Santos, A., & Escarré, J. (2006). Specific interactions between local metallophilous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant and Soil*, 282(1-2), 53-65.
- [35] Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M. J., Esteban, E., Penalosa, J. M., & Carpena, R. O. (2006). Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 177(1), 349-365.
- [36] Conesa, H. M., Faz, Á., & Arnaldos, R. (2007). Initial studies for the phytostabilization of a mine tailing from the Cartagena-La Union Mining District (SE Spain). *Chemosphere*, 66(1), 38-44.
- [37] Dushenkov, V., Kumar, P. N., Motto, H., & Raskin, I. (1995). Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental science & technology*, 29(5), 1239-1245.
- [38] Nedelkoska, T. V., & Doran, P. M. (2000). Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(5), 607-615.
- [39] Eapen, S., Singh, S., & D'souza, S. F. (2007). Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnology Advances*, 25(5), 442-451.
- [40] Cherian, S., & Oliveira, M. M. (2005). Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environmental science & technology*, 39(24), 9377-9390.
- [41] Zhao, M., & Duncan, J. R. (1998). Removal and recovery of nickel from aqueous solution and electroplating rinse effluent using *Azolla filiculoides*. *Process biochemistry*, 33(3), 249-255.
- [42] Boniardi, N., Rota, R., & Nano, G. (1999). Effect of dissolved metals on the organic load removal efficiency of *Lemna gibba*. *Water Research*, 33(2), 530-538.
- [43] Fogarty, R. V., Dostalek, P., Patzak, M., Votruba, J., Tel-Or, E., & Tobin, J. M. (1999). Metal removal by immobilised and non-immobilised *Azolla filiculoides*. *Biotechnology Techniques*, 13(8), 533-538.

- [44] Antunes, A. P. M., Watkins, G. M., & Duncan, J. R. (2001). Batch studies on the removal of gold (III) from aqueous solution by *Azolla filiculoides*. *Biotechnology letters*, 23(4), 249-251.
- [45] Groudeva, V. I., Groudev, S. N., & Doycheva, A. S. (2001). Bioremediation of waters contaminated with crude oil and toxic heavy metals. *International Journal of Mineral Processing*, 62(1), 293-299.
- [46] Cohen-Shoel, N., Barkay, Z., Ilzyker, D., Gilath, I., & Tel-Or, E. (2002). Biofiltration of toxic elements by *Azolla* biomass. *Water, Air, & Soil Pollution*, 135(1), 93-104.
- [47] Suseela, M. R., Sinha, S., Singh, S., & Saxena, R. (2002). Accumulation of chromium and scanning electron microscopic studies in *Scirpus lacustris* L. treated with metal and tannery effluent. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 68(4), 540-548.
- [48] Lin, Z. Q., & Terry, N. (2003). Selenium removal by constructed wetlands: quantitative importance of biological volatilization in the treatment of selenium-laden agricultural drainage water. *Environmental science & technology*, 37(3), 606-61.
- [49] Zheng, J., Hintelmann, H., Dimock, B., & Dzurko, M. S. (2003). Speciation of arsenic in water, sediment, and plants of the Moira watershed, Canada, using HPLC coupled to high resolution ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(1), 14-24.
- [50] Bennicelli, R., Stępniewska, Z., Banach, A., Szajnocha, K., & Ostrowski, J. (2004). The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg (II), Cr (III), Cr (VI)) from municipal waste water. *Chemosphere*, 55(1), 141-146.
- [51] Chandra, P., & Kulshreshtha, K. (2004). Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants. *The Botanical Review*, 70(3), 313-327.
- [52] Kamal, M., Ghaly, A. E., Mahmoud, N., & Cote, R. (2004). Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environment international*, 29(8), 1029-1039.

- [53] Maleva, M. G., & Nekrasova, G. F. (2004). The response of hydrophytes to environmental pollution with heavy metals. *Russian Journal of Ecology*, 35(4), 230-235.
- [54] Weis, J. S., & Weis, P. (2004). Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environment international*, 30(5), 685-700.
- [55] Mkandawire, M., Taubert, B., & Dudel, E. G. (2005). Resource manipulation in uranium and arsenic attenuation by *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing water of a former uranium mine. *Water, Air, & Soil Pollution*, 166(1), 83-101
- [56] Vardanyan, L. G., & Ingole, B. S. (2006). Studies on heavy metal accumulation in aquatic macrophytes from Sevan (Armenia) and Carambolim (India) lake systems. *Environment international*, 32(2), 208-218.
- [57] Yilmaz, D. D. (2007). Effects of salinity on growth and nickel accumulation capacity of *Lemna gibba* (Lemnaceae). *Journal of Hazardous Materials*, 147(1-2), 74-77.
- [58] Li, M. S., Luo, Y. P., & Su, Z. Y. (2007). Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mineland in Guangxi, South China. *Environmental pollution*, 147(1), 168-175.
- [59] Kumar, P. N., Dushenkov, V., Motto, H., & Raskin, I. (1995). Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental science & technology*, 29(5), 1232-1238.
- [60] Begonia, G. B., Davis, C. D., Begonia, M. F. T., & Gray, C. N. (1998). Growth responses of Indian Mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern.] and its phytoextraction of lead from a contaminated soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(1), 38-43.
- [61] Reeves, R. D. (2003). Tropical hyperaccumulators of metals and their potential for phytoextraction. *Plant and Soil*, 249(1), 57-65
- [62] Schwartz, C., Echevarria, G., & Morel, J. L. (2003). Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant and soil*, 249(1), 27-35.

- [63] Wenzel, W. W., Unterbrunner, R., Sommer, P., & Sacco, P. (2003). Chelate-assisted phytoextraction using canola (*Brassica napus* L.) in outdoors pot and lysimeter experiments. *Plant and soil*, 249(1), 83-96.
- [64] Odjegba, V. J., & Fasidi, I. O. (2004). Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: implications for phytoremediation. *Ecotoxicology*, 13(7), 637-646.
- [65] Sharma, N. C., Gardea-Torresdey, J. L., Parsons, J., & Sahi, S. V. (2004). Chemical speciation and cellular deposition of lead in *Sesbania drummondii*. *Environmental toxicology and chemistry*, 23(9), 2068-2073.
- [66] Boonyapookana, B., Parkpian, P., Techapinyawat, S., DeLaune, R. D., & Jugsujinda, A. (2005). Phytoaccumulation of lead by sunflower (*Helianthus annuus*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), and vetiver (*Vetiveria zizanioides*). *Journal of Environmental Science and Health*, 40(1), 117-137.
- [67] Sekhar, K. C., Kamala, C. T., Chary, N. S., Balaram, V., & Garcia, G. (2005). Potential of *Hemidesmus indicus* for phytoextraction of lead from industrially contaminated soils. *Chemosphere*, 58(4), 507-514.
- [68] Zhuang, P., Ye, Z. H., Lan, C. Y., Xie, Z. W., & Shu, W. S. (2005). Chemically assisted phytoextraction of heavy metal contaminated soils using three plant species. *Plant and Soil*, 276(1-2), 153-162.
- [69] Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J. L., & Mullai, A. (2007). In-situ phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). *Plant and Soil*, 293(1-2), 79-89.
- [70] Wu, Q. T., Wei, Z. B., & Ouyang, Y. (2007). Phytoextraction of metal-contaminated soil by *Sedum alfredii* H: effects of chelator and co-planting. *Water, Air, and Soil Pollution*, 180(1-4), 131-139.
- [71] Zhuang, P., Yang, Q. W., Wang, H. B., & Shu, W. S. (2007). Phytoextraction of heavy metals by eight plant species in the field. *Water, Air, and Soil Pollution*, 184(1-4), 235-242.
- [72] Vara Prasad, M. N., & de Oliveira Freitas, H. M. (2003). Metal hyperaccumulation in plants: biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic journal of biotechnology*, 6(3), 285-321.

- [73] Burken, J. G., Ma., X. 2006. Phytoremediation of volatile organic compounds. En: *Phytoremediation Rhizoremediation. Springer Netherlands (ed)*. ISBN 978-1-4020-4952-1. 199-216.
- [74] Padmavathiamma, P. K., Li, L. Y. 2007. Phytoremediation Technology: Hyperaccumulation Metals in Plants. *Water, Air, & Soil Pollution*. 184: 105-126.
- [75] Singh, S., Melo, J. S., Eapen, S., & D'souza, S. F. (2006). Phenol removal using *Brassica juncea* hairy roots: role of inherent peroxidase and H₂O₂. *Journal of biotechnology*, 123(1), 43-49.
- [76] Hannink, N., Rosser, S. J., French, C. E., Basran, A., Murray, J. A., Nicklin, S., & Bruce, N. C. (2001). Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. *Nature biotechnology*, 19(12), 1168-1172.
- [77] Chaudhry, Q., Schröder, P., Werck-Reichhart, D., Grajek, W., & Marecik, R. (2002). Prospects and limitations of phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 9(1), 4.
- [78] Denys, S., Rollin, C., Guillot, F., & Baroudi, H. (2006). In-situ phytoremediation of PAHs contaminated soils following a bioremediation treatment. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus*, 6(3), 299-315.
- [79] Zhang, B., Wu, Z., Cheng, S., He, F., Wang, Y., & Gao, Y. (2007). Primary study on phytodegradation of Bisphenol A by *Elodea nuttallii*. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 12(6), 1118-1124.
- [80] Carpena, R. O., & Bernal, M. P. (2007). Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Revista Ecosistemas*, 16(2).
- [81] Ghosh, M., & Singh, S. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian J Energy Environ*, 6(4), 18.
- [82] Biorremediación: organismos que limpian el ambiente. (2017) Retrieved from <https://porquebiotecnologia.com.ar>

- [83] Baker, A. J. M., & Brooks, R. R. (1989). Terrestrial Higher Plants which Hyperaccumulate Metallic Elements. A Review of Their Distribution, Ecology and Phytochemistry. *Biorecovery*, 1, 81-126. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 64, 489-496.
- [84] Raskin, I., Smith, R. D., & Salt, D. E. (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current opinion in biotechnology*, 8(2), 221-226.
- [85] Mejáre, M., & Bülow, L. (2001). Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *TRENDS in Biotechnology*, 19(2), 67-73.
- [86] Tong, A. H. Y., Lesage, G., Bader, G. D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., ... & Chen, Y. (2004). Global mapping of the yeast genetic interaction network. *science*, 303(5659), 808-813.
- [87] Adesodun, J. K., Atayese, M. O., Agbaje, T. A., Osadiaye, B. A., Mafe, O. F., & Soretire, A. A. (2010). Phytoremediation potentials of sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*) for metals in soils contaminated with zinc and lead nitrates. *Water, air, and soil pollution*, 207(1-4), 195-201.
- [88] Sakakibara, M., Ohmori, Y., Ha, N. T. H., Sano, S., & Sera, K. (2011). Phytoremediation of heavy metal-contaminated water and sediment by *Eleocharis acicularis*. *CLEAN-Soil, Air, Water*, 39(8), 735-741.
- [89] Shabani, N., & Sayadi, M. H. (2012). Evaluation of heavy metals accumulation by two emergent macrophytes from the polluted soil: an experimental study. *The Environmentalist*, 32(1), 91-98.
- [90] Mengel, K. and Kirkby, E.A., 1987. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute. p. 687. Bern: Int. Potash Inst.
- [91] Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- [92] Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. J. (2008). The Arabidopsis thaliana aquaglyceroporin AtNIP7; 1 is a pathway for arsenite uptake. *Febs Letters*, 582(11), 1625-1628.

- [93] Meharg, A. A., & Jardine, L. (2003). Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytologist*, *157*(1), 39-44.
- [94] Madejón, E., De Mora, A. P., Felipe, E., Burgos, P., & Cabrera, F. (2006). Soil amendments reduce trace element solubility in a contaminated soil and allow regrowth of natural vegetation. *Environmental Pollution*, *139*(1), 40-52.
- [95] Zhao, F. J., Ma, J. F., Meharg, A. A., & McGrath, S. P. (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, *181*(4), 777-794.
- [96] Meharg, A. A., & Macnair, M. R. (1992). Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *Journal of Experimental Botany*, *43*(4), 519-524.
- [97] Esteban, E., Carpena, R. O., & Meharg, A. A. (2003). High-affinity phosphate/arsenate transport in white lupin (*Lupinus albus*) is relatively insensitive to phosphate status. *New Phytologist*, *158*(1), 165-173.
- [98] Verbruggen, N., Hermans, C., & Schat, H. (2009). Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current opinion in plant biology*, *12*(3), 364-372.
- [99] Tripathi, R. D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D. K., & Maathuis, F. J. (2007). Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *TRENDS in Biotechnology*, *25*(4), 158-165. (May col., 2008).
- [100] Dhankher, O. P., Rosen, B. P., McKinney, E. C., & Meagher, R. B. (2006). Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(14), 5413-5418.
- [101] Pickering, I. J., Prince, R. C., George, M. J., Smith, R. D., George, G. N., & Salt, D. E. (2000). Reduction and coordination of arsenic in Indian mustard. *Plant Physiology*, *122*(4), 1171-1178.
- [102] Dhankher, O. P., Li, Y., Rosen, B. P., Shi, J., Salt, D., Senecoff, J. F., & Meagher, R. B. (2002). Engineering tolerance and hyperaccumulation of

- arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. *Nature biotechnology*, 20(11), 1140-1145.
- [103] Xu, X. Y., McGrath, S. P., & Zhao, F. J. (2007). Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytologist*, 176(3), 590-599.
- [104] Vázquez Reina, S., Esteban, E., & Goldsbrough, P. (2005). Arsenate-induced phytochelatins in white lupin: influence of phosphate status. *Physiologia Plantarum*, 124(1), 41-49.
- [105] Huang, Z. C., Chen, T. B., Lei, M., Liu, Y. R., & Hu, T. D. (2008). Difference of toxicity and accumulation of methylated and inorganic arsenic in arsenic-hyperaccumulating and-hypertolerant plants. *Environmental science & technology*, 42(14), 5106-5111.
- [106] Raab, A., Schat, H., Meharg, A. A., & Feldmann, J. (2005). Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. *New phytologist*, 168(3), 551-558.
- [107] Vázquez, M. D., Barceló, J., Poschenrieder, C. H., Madico, J., Hatton, P., Baker, A. J. M., & Cope, G. H. (1992). Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *Journal of Plant Physiology*, 140(3), 350-355.
- [108] Ernst, W. H., Nelissen, H. J., & Ten Bookum, W. M. (2000). Combination toxicology of metal-enriched soils: physiological responses of a Zn-and Cd-resistant ecotype of *Silene vulgaris* on polymetallic soils. *Environmental and Experimental Botany*, 43(1), 55-71.
- [109] Horswell, J., Speir, T., 2006. Arsenic phytotoxicity. En: Naidu, R., y col. Eds. Managing Arsenic in the Environment. *From Soils to Human Health*. CSIRO Pub., Collingwood, 183- 208.
- [110] Bhattacharya, P., Welch, A. H., Stollenwerk, K. G., McLaughlin, M. J., Bundschuh, J., & Panaullah, G. (2007). Arsenic in the environment: biology and chemistry.

- [111] Mimura, T. (1999). Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *International Review of Cytology*, 191, 149-200.
- [112] Meharg, A. A., & Hartley-Whitaker, J. (2002). Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*, 154(1), 29-43.
- [113] Bhattacharjee, H., & Rosen, B. P. (2007). Arsenic metabolism in prokaryotic and eukaryotic microbes. In *Molecular microbiology of heavy metals* (pp. 371-406). Springer Berlin Heidelberg.
- [114] ULTRA, V. U., Tanaka, S., Sakurai, K., & Iwasaki, K. (2007). Arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus aggregatum*) influences biotransformation of arsenic in the rhizosphere of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Soil Science & Plant Nutrition*, 53(4), 499-508.
- [115] Vetterlein, D., Szegedi, K., Ackermann, J., Mattusch, J., Neue, H. U., Tanneberg, H., & Jahn, R. (2007). Competitive mobilization of phosphate and arsenate associated with goethite by root activity. *Journal of environmental quality*, 36(6), 1811-1820.
- [116] Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., & Meharg, A. A. (2001). Copper-and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. *Plant, Cell & Environment*, 24(7), 713-722.
- [117] Vázquez, S., Moreno, E., & Carpena, R. O. (2008). Bioavailability of metals and As from acidified multicontaminated soils: use of white lupin to validate several extraction methods. *Environmental geochemistry and health*, 30(2), 193-198
- [118] Geng, C. N., Zhu, Y. G., Tong, Y. P., Smith, S. E., & Smith, F. A. (2006). Arsenate (As) uptake by and distribution in two cultivars of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere*, 62(4), 608-615.
- [119] Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., & Bergmann, H. (2002). Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science*, 163(5), 961-969.

- [120] Moreno-Jiménez, E., Penalosa, J. M., Carpena-Ruiz, R. O., & Esteban, E. (2008). Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere*, 71(3), 466-473.
- [121] Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., & Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical Agroecosystems*, 14(2), 597-612.
- [122] Zaouali, Y., Messaoud, C., & Boussaid, M. (2003). Genetic diversity of wild populations of *Rosmarinus officinalis* L.(Lamiaceae) in Tunisia. *Ecologia Mediterranea (France)*.
- [123] Al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M., & Sena, P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials.
- [124] Cheung, S., & Tai, J. (2007). Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology reports*, 17(6), 1525-1531.
- [125] Lopez-Munoz F, Alamo C, Garcia-Garcia P. The herbs that have the property of healing: the phytotherapy in Don Quixote. *J Ethnopharmacol* 2006; 106 :429–41. Sullivan, C. (1994). Searching for nineteenth-century Florida water bottles. *Historical Archaeology*, 28(1), 78-98.
- [126] Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive oil composition. *Olive oil: Chemistry and technology*, 4.
- [127] Sardans, J., Rodà, F., & Peñuelas, J. (2005). Effects of water and a nutrient pulse supply on *Rosmarinus officinalis* growth, nutrient content and flowering in the field. *Environmental and Experimental Botany*, 53(1), 1-11.
- [128] Sotelo-Felix, J. I., Martinez-Fong, D., Muriel, P., Santillan, R. L., Castillo, D., & Yahuaca, P. (2002). Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(2), 145-154.
- [129] Khorshidi, J., Mohammadi, R., Fakhr, T. M., & Nourbakhsh, H. (2009). Influence of drying methods, extraction time, and organ type on essential oil

content of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Natural Science*, 7(11), 42-44.

- [130] Linnaeus, C. (1799). *Species plantarum* (Vol. 2). Impensis GC Nauk.
- [131] Köhler, E. (1988). *Köhler's Medizinal-Pflanzen*.
- [132] Campos, J. M., & Caribé, J. (1991). *Plantas que ayudan o homem: guia pratico para a época atual*. Editora Pensamento.
- [133] Botsaris, A. S. (1995). *Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras*. Icone Editora.
- [134] Atti-Santos, A. C., Rossato, M., Pauletti, G. F., Rota, L. D., Rech, J. C., Pansera, M. R & Moyna, P. (2005). Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(6), 1035-1039.
- [135] Al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M., & Sena, P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials.
- [136] Guerrero, C.M., H. Rodriguez & J. Brito, 2007. Essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. effect of harvesting dates growing media and fertilizers. *Greece*. 24(2): 65-70.
- [137] Ruiz, O.M. 2000. *Tratado de Botánica*, 3a. ed., Porrúa, México D.F., 1256 pp
- [138] Almela, L., Sánchez-Munoz, B., Fernández-López, J. A., Roca, M. J., & Rabe, V. (2006). Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120(1), 221-229.,
- [139] Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition*, 32(1), 67-103.
- [140] Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(11), 5165-5170.
- [141] Arévalo, Y., Robledo, S., Muñoz, L., Granados-Falla, D., Cuca, L. E., & Delgado, G. (2009). Evaluación in vitro de la actividad de aceites esenciales

- de plantas colombianas sobre *Leishmania braziliensis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 38(2), 131-141.
- [142] Djeddi, A., N. Bauchenah & I. Settar. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algerian *Chemistry of Natural Compounds*, 43(4): 487-490.
- [143] Peyman, S. & F.A. Reza. (2007) Rapid essential oil screening of *Rosmarinus officinalis* L., by hydrodistillationhead space solvent microextraction. *Journal of Flavour and Fragrance*, 10(5): 1002-1007.
- [144] Mierlici, I.D. (2009). Phytochemical study of some active principles with antioxidant action from the *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* species. *Analele Stiintifice ale Universitatii Alexandru Ioan Cuza. Génova Italia*.
- [145] Mandal, B. K., Suzuki, K. T., Anzai, K., Yamaguchi, K., & Sei, Y. (2008). A SEC-HPLC-ICP MS hyphenated technique for identification of sulfur-containing arsenic metabolites in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 874(1), 64-76.
- [146] Santini, J. M. vanden Hoven RN. 2004. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J Bacteriol*, 186(6), 1614-1619.
- [147] Heinrich-Salmeron, A., Cordi, A., Brochier-Armanet, C., Halter, D., Pagnout, C., Abbaszadeh-Fard, E., & Arsène-Ploetze, F. (2011). Unsuspected diversity of arsenite-oxidizing bacteria revealed by a widespread distribution of the *aoxB* gene in prokaryotes. *Applied and environmental microbiology*, AEM-02884.
- [148] Campos, V., Valenzuela, C., Alcorta, M., Escalante, G., & Mondaca, M. A. (2007). Aislamiento De Bacterias Resistentes A Arsénico Desde Muestras De Rocas Volcanicas De La Quebrada Camarones, Región Parinacota: Chile. *Gayana (Concepción)*, 71(2), 150-155.
- [149] Alam, M. S., Wu, Y., & Cheng, T. (2014). Silicate minerals as a source of arsenic contamination in groundwater. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(11), 2201.

- [150] Tsai, S. L., Singh, S., & Chen, W. (2009). Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 659-667.
- [151] Valenzuela, C., Campos, V. L., Yañez, J., Zaror, C. A., & Mondaca, M. A. (2009). Isolation of arsenite-oxidizing bacteria from arsenic-enriched sediments from Camarones River, Northern Chile. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 82(5), 593-596.
- [152] Basu, A., Saha, D., Saha, R., Ghosh, T., & Saha, B. (2014). A review on sources, toxicity and remediation technologies for removing arsenic from drinking water. *Research on Chemical Intermediates*, 40(2), 447-485.
- [153] Garelick, H., Jones, H., Dybowska, A., & Valsami-Jones, E. (2009). Arsenic pollution sources. In *Reviews of Environmental Contamination Volume 197* (pp. 17-60). Springer New York.
- [154] Shankar, S., & Shanker, U. (2014). Arsenic contamination of groundwater: A review of sources, prevalence, health risks, and strategies for mitigation. *The Scientific World Journal*, 2014.
- [155] Reimann, C., Matschullat, J., Birke, M., & Salminen, R. (2009). Arsenic distribution in the environment: the effects of scale. *Applied Geochemistry*, 24(7), 1147-1167.
- [156] Lide, D.R. (Ed.) Handbook of Chemistry and Physics, 85th edition, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2004-2005.
- [157] Kumaresan, M., & Riyazuddin, P. (2001). Overview of speciation chemistry of arsenic. *Current Science*, 837-846.
- [158] Macur, R. E., Jackson, C. R., Botero, L. M., Mcdermott, T. R., & Inskip, W. P. (2004). Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. *Environmental science & technology*, 38(1), 104-111.
- [159] Stolz, J. F., Basu, P., & Oremland, R. S. (2010). Microbial arsenic metabolism: new twists on an old poison. *Microbe*, 5(2), 53-59.

- [160] Smedley, P. L., & Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied geochemistry*, 17(5), 517-568.
- [161] Oremland, R. S., & Stolz, J. F. (2003). The ecology of arsenic. *Science*, 300(5621), 939-944.
- [162] Bowell, R. J., Alpers, C. N., Jamieson, H. E., Nordstrom, D. K., & Majzlan, J. (2014). The Environmental Geochemistry of Arsenic—An Overview—. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 79(1), 1-16.
- [163] Sarkar, A., Kazy, S. K., & Sar, P. (2013). Characterization of arsenic resistant bacteria from arsenic rich groundwater of West Bengal, India. *Ecotoxicology*, 22(2), 363-376.
- [164] Krumova, K., Nikolovska, M., & Groudeva, V. (2008). Isolation and identification of arsenic-transforming bacteria from arsenic contaminated sites in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 22(2), 721-728.
- [165] Aragonés Sanz, N., Palacios Diez, M., Avello de Miguel, A., Gómez Rodríguez, P., Martínez Cortés, M., & Rodríguez Bernabeu, M. J. (2001). Nivel de arsénico en abastecimientos de agua de consumo de origen subterráneo en la Comunidad de Madrid. *Revista Española de Salud Pública*, 75(5), 421-432.
- [166] Ferrer, A. (2003). Intoxicación por metales. In *Anales del sistema sanitario de Navarra* (Vol. 26, pp. 141-153). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- [167] Cavalca, L., Corsini, A., Zaccheo, P., Andreoni, V., & Muyzer, G. (2013). Microbial transformations of arsenic: perspectives for biological removal of arsenic from water. *Future microbiology*, 8(6), 753-768.
- [168] Bucio Jurado, W. (2005). Intoxicación por arsina. Información y presentación de un caso. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 43(1).

- [169] Rosen, B. P., A. A. Ajees, and T. R. McDermott. 2011. Life and death with arsenic. Arsenic life: an analysis of the recent report “A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus”. *Bioessays* 33: 350-357.
- [170] La multiplicación de plantas por división (2017). Retrieved from <http://www.consumer.es/web/es/bricolaje/jardin/2003/06/19/62633.php>
- [171] Feng, Y. L., & Cao, J. P. (1994). Simultaneous determination of arsenic (V) and arsenic (III) in water by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using reduction of arsenic (V) by L-cysteine and a small co-centric hydride generator without a gas-liquid separator. *Analytica chimica acta*, 293(1), 211-218
- [172] Castro, M., Gaston, S., & Pujol, M. (1999). Validación de métodos analíticos. (AEFI) Sección catalana.
- [173] Chen, X., Goh, Q. Y., Tan, W., Hossain, I., Chen, W. N., & Lau, R. (2011). Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. *Bioresource technology*, 102(10), 6005-6012.
- [174] Oncel, S., & Sukan, F. V. (2008). Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). *Bioresource technology*, 99(11), 4755-4760.
- [175] Conklin, P. L. (2001). Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell & Environment*, 24(4), 383-394.
- [176] Peña, EJ, Palacios, ML, Ospina ,N., (2005). Algas como indicadoras de contaminación. Colección Ciencia Físicas, Exactas y Naturales. 1ed. Cali: Universidad del Valle - Programa Editorial.
- [177] Singh, S., Sounderajan, S., Kumar, K., & Fulzele, D. P. (2017). Investigation of arsenic accumulation and biochemical response of in vitro developed *Vetiveria zizanoides* plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 145, 50-56.

- [178] Kumar, D., Tripathi, D. K., Liu, S., Singh, V. K., Sharma, S., Dubey, N. K., ... & Chauhan, D. K. (2017). *Pongamia pinnata* (L.) pierre tree seedlings offer a model species for arsenic phytoremediation. *Plant Gene*.
- [179] Mirza, N., Mahmood, Q., Pervez, A., Ahmad, R., Farooq, R., Shah, M. M., & Azim, M. R. (2010). Phytoremediation potential of *Arundo donax* in arsenic-contaminated synthetic wastewater. *Bioresource Technology*, 101(15), 5815-5819.



ANEXOS

ANEXO 1: CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA 27- 2017-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Se hace constar que las muestras frescas de hojas y tallos de la planta traída al laboratorio por la Srta: Rosario Belén Juyo Salazar, para el análisis botánico corresponde a la especie *Rosmarinus officinalis* "Romero" de la familia Lamiaceae. Dicha muestra fue obtenida de los Mercados de Arequipa, para realizar el trabajo de investigación "Evaluación de la capacidad fitoremediadora de *Rosmarinus officinalis* L. "Romero" en aguas contaminadas con arsénico.

Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
CLASE: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE: ASTERIDAE
ORDEN: LAMIALES
FAMILIA: LAMIACEAE
GENERO: Rosmarinus
ESPECIE: *Rosmarinus officinalis* L.

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que se estime conveniente.

Arequipa 7 de Setiembre del 201




Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 984248674
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ

ANEXO 2

Tabla 3.2 Linealidad

<i>N° de adición</i>	C_f ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	I_1 (nA)	I_2 (nA)	I_3 (nA)	\bar{I} (nA)
0	1.23	-18.23	-16.79	-17.77	-17.60 \pm 0.735
1	2.46	-38.19	-36.48	-35.84	-36.84 \pm 1.215
2	3.68	-57.52	-56.02	-52.57	-55.37 \pm 2.535
3	4.89	-73.20	-77.01	-70.11	-73.44 \pm 3.459
4	6.10	-94.11	-92.02	-86.01	-90.71 \pm 4.206
5	7.30	-113.76	-107.4	-103.04	-108.07 \pm 5.388

TABLA 3.3 Repetibilidad

<i>N° de adición</i>	I_1 (nA)	I_2 (nA)	I_3 (nA)	$\bar{I} \pm ds$ (nA)	CV (%)
0	-15.64	-16.99	-16.51	-16.38 \pm 0.78	4.75
1	-33.40	-36.2	-34.47	-34.69 \pm 1.61	4.64
2	-52.52	-54.84	-50.98	-52.78 \pm 1.98	3.75
3	-69.84	-70.65	-69.89	-70.14 \pm 1.01	1.44
4	-86.82	-86.27	-86.99	-86.69 \pm 1.65	1.90
5	-101.23	-102.81	-100.98	-101.67 \pm 1.80	1.77

Tabla 3.4 Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Valores obtenidos para LOD($\mu\text{g. L}^{-1}$) y LOC($\mu\text{g. L}^{-1}$)

b	-14.122
Y_{bl}	0.0053
S_{bl}	1.2815
LOD	0.1113
LOC	0.3706

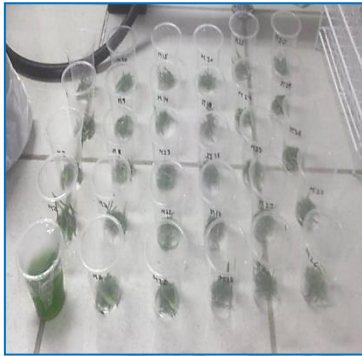
Tabla 3.5 Valores obtenidos para el Porcentaje de Recuperación % R de las Hojas del *Rosmarinus officinalis L.*

Volumen añadido (μL)	Concentración teorica (mg.L^{-1})	Concentración determinada (mg.L^{-1})	Recuperación (%)
5	0.500	0.4856 \pm 0.011	97.12

ANEXO 3

IMÁGENES DEL PROCEDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE
CLOROFILA DE LAS HOJAS DEL *Rosmarinus officinalis L. (Romero)*

Se pesaron las muestras de
hojas de *Rosmarinus*



Se licuaron las muestras con
metanol.



Se almacenaron 24
horas con metanol.



Se filtró el extracto metanólico



Se colocaron en tubos para centrifugar



Se llevaron a temperatura de 90 °C



Se centrifugaron a
500 r.p.m



Se determinó la clorofila
por espectrofotometría.



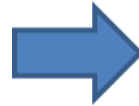
ANEXO 4

IMÁGENES DE LAS HOJAS DEL *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)

Recolección de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)



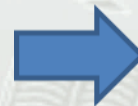
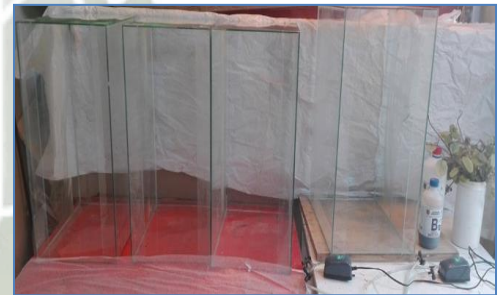
Rosmarinus officinalis L. (Romero)



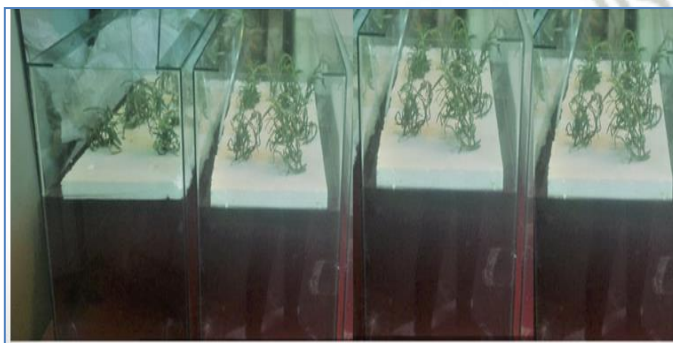
Limpieza y división de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)



Cubetas de vidrio diseñadas para la Bioacumulación de Arsénico (III) en *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)



Bioacumulación de Arsénico (III) en *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)



Clorosis en *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)

