Captura de Fluoroquinolonas por *Leucaena Leucocephala*: Estudios Electroquímicos y Cromatográficos

por

Marielys Crespo-Medina

Tesis sometida como requisito parcial al grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Química Aplicada

Universidad de Puerto Rico
Recinto de Mayagüez
2017

Aprobado por:

_____	_____
Carmen A. Vega-Olivencia, Ph.D. Presidente, Comité graduado	Fecha
_____	_____
Juan López-Garriga, Ph.D. Miembro, Comité graduado	Fecha
_____	_____
Martha Laura López-Moreno, Ph.D. Miembro, Comité graduado	Fecha
_____	_____
Paul Sundaram, Ph.D. Representante Escuela Graduada	Fecha
_____	_____
EnriqueMeléndez, PhD. Director de Departamento	Fecha

RESUMEN

La contaminación del agua por antibióticos es un serio problema ambiental. El mal manejo de los medicamentos no utilizados y la descarga a través de los residuos corporales aumentan este problema, especialmente porque la mayoría de las plantas de tratamiento de aguas residuales y los sistemas sépticos no fueron diseñados para tratar este tipo de contaminantes. En diversos estudios, los científicos han reportado en aguas residuales las principales categorías de contaminantes como son los contaminantes orgánicos persistentes (POPs), pesticidas, productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs). Los PPCP son contaminantes emergentes que representan una gran preocupación, estos se encuentran las aguas superficiales y potable. Esta investigación se basa en la remoción de dos antibióticos en agua utilizando la planta *Leucaena Leucocephala* como una alternativa para remediar los cuerpos de agua y suelo de contaminantes. Los antibióticos en estudio son del grupo de la fluoroquinolona y son ampliamente utilizado para tratar infecciones. La determinación de Ciprofloxacina y Levofloxacina en los extractos de *L. Leucocephala* se realizó mediante las técinas de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa y voltametría cíclica. Los resultados de esta investigación demuestran que los contaminantes están siendo absorbidos por la planta *L. Leucocephala*. Se encontró que en toda la planta se acumuló un 15.8% de Ciprofloxacina y un 26.6% de Levofloxacina.

ABSTRACT

Water contamination due to antibiotics is a serious environmental problem. Flushing of unused medications and discharge through body waste increase this problem, especially since most of sewage treatment plants and septic systems were not designed to deal with such contaminants. In several studies, scientists have reported presence of major pollutants like persistent organic pollutants (POPs), pesticides, pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). PPCPs represent pollutants of emerging concern, these contaminants are in surface water and drinking water. This research is intended to remove two antibiotics by *Leucaena Leucocephala* plant as an alternative to remediate water contaminated with antibiotics. The antibiotics studied in this research belong to the group of fluoroquinolones and are widely used for infections. Ciprofloxacin and Levofloxacin determinantion in *L. Lecucocephala* extract was made by reversed-phase high-performance liquid chromatography and cyclic voltammetry. Results show that contaminants are entering in the *L. Leucocephala* plant. It was found that was accumulated a 15.8% for Ciprofloxacin and 26.6% for Levofloxacin in the plant.

A mis abuelos,
Aida y Traslación

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo le doy gracias a Dios por darme fuerza y paciencia para poder cumplir ésta meta. También le doy gracias por la bendición de poner en mi vida a las personas que menciono más adelante.

A mi madre Ana Awilda por apoyarme en todas mis decisiones y estar siempre a mi lado en los momentos de dificultad y enseñarme a luchar por mis sueños.

A mis abuelos Aida y Traslación, sin ellos este sueño no sería posible. Gracias por tanto amor.

A Héctor Iván, gracias por creer en mí aun cuando yo misma no lo hacía, por animarme a enfrentar las dificultades, por sus consejos, apoyo, ayuda y paciencia. Gracias por ser mi soporte en todo momento.

A la Dra. Carmen A Vega, gracias por creer y confiar en mí y darme la oportunidad, le estaré eternamente agradecida. Le agradezco a los miembros de mi comité: Dra. Martha L. López, Dr. Juan López Garriga y al director del departamento, Dr. Enrique Meléndez. Además, quiero dar un agradecimiento especial a la Dra. Aidalú Joubert, por haber confiado en mí y darme todo su apoyo.

A mis compañeros, Tairy Acevedo, Efraín Salas, Gabriela Padilla, John Estela, Ivette Roldán, gracias por estar siempre apoyándome.

TABLA DE CONTENIDO

Página

I. Introducción 1

1.1 Objetivos:..... 1

1.2 Fluoroquinolonas 3

1.2.1 Ciprofloxacina..... 5

1.2.2 Levofloxacina..... 6

1.3 Fitorremediación..... 7

II. Análisis electroquímico para el monitoreo de Ciprofloxacina y Levofloxacina 11

2.1 Introducción..... 11

2.2 Materiales y Métodos 15

2.2.1 Preparación de soluciones 15

2.2.3 Limpieza de los electrodos 17

2.2.4 Germinación de las semillas..... 17

2.3 Resultados y Discusión 18

III. Análisis Cromatográfíco para la detección y comparación cuantitativa de Ciprofloxacina y Levofloxacina 32

3.1 Introducción..... 32

3.2 Materiales y métodos 36

3.2.1 Preparación de soluciones 36

3.2.2 Procedimiento de remoción de antibióticos 37

3.3 Análisis cromatográfico..... 37

3.4 Resultados y discusión..... 41

IV. Conclusión..... 54

V. Referencias..... 56

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES

PPCP'S	Pesticidas y productos farmacéuticos y de cuidado personal.
POP'S	Contaminantes orgánicos persistentes.
Cipro	Ciprofloxacina
Levo	Levofloxacina
L. Leucocephala	Leucaena Leucocephala
CV	Voltametría Cíclica
HPLC	Cromatografía Líquida de alta resolución
HPLC-MS	Cromatrografía Líquida de alta resolución acoplado a detector de masas
PTAR	Planta de tratamiento de agua residual
WE	Electrodo de trabajo
RE	Electrodo de referencia
CE	Electrodo auxiliar (Contador)
UV	Ultra Violeta

LOQ	Límite de cuantificación
LOD	Límite de detección
STD	Estándar
GC	Glassy Carbon (Electrodo de carbono vítreo)
TEA	Trietilamina
IR	Infrarrojo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Std	Estándar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de las Fluoroquinolonas 4
Figura 2. Estructura química de Ciprofloxacina 5
Figura 3. Mecanismo propuesto de la reacción de Ciprofloxacina con el cloro libre en agua[20]. 6
Figura 4. Estructura química de Levofloxacina 7
Figura 5. Mecanismos de trabajo de los procesos de las plantas fitorremediadoras.[24] 9
Figura 6. Potenciostato[28] 12
Figura 7. a) barrido lineal del potencial aplicado en voltametría cíclica con respecto al tiempo (s). b) Voltamograma cíclico en un proceso reversible.[29] 14
Figura 8. Voltamograma de Ciprofloxacina en solución Hoagland a pH 5.4 con electrodo de GC vs Ag/AgCl, 1200mV/s. 20
Figura 9. Voltamograma de Levofloxacina en solución Hoagland a pH 5.4 con electrodo de GC vs Ag/AgCl, 1200mV/s. 21
Figura 10. Curva de calibración de Ciprofloxacina en solución Hoagland a pH 5.4 23
Figura 11. Curva de calibración de Levofloxacina en solución Hoagland a pH 5.4 24
Figura 12. Voltamograma de Ciprofloxacina en contacto con L. Leucocephala en función al tiempo de exposición 26
Figura 13. Concentración promedio de Ciprofloxacina en solución Hoagland en contacto con L. Leucocephala. 27
Figura 14. Voltamograma de solución Hoagland con Levofloxacina en presencia de Leucaena Leucocephala en función al tiempo de exposición. 29
Figura 15. Concentración promedio de Levofloxacina en solución Hoagland en contacto con L. Leucocephala. 30
Figura 16. Componentes principales de un instrumento de HPLC.[29] 33

Figura 17. a) Método de separación genérico de una columna cromatográfica. b) Señal obtenida del detector, separada por variación en la afinidad con el empaque de la columna.[29] 35
Figura 18. Espectro obtenido para la determinación de la longitud de onda máxima de distintos fármacos. 38
Figura 19. Cromatograma para Ciprofloxacina y Levofloxacina a 286nm para obtención del tiempo de retención para las sustancias puras. 40
Figura 20. Curva de calibración de Ciprofloxacina a 286nm 42
Figura 21. Curva de calibración para Levofloxacina a 286nm. 43
Figura 22. Cromatograma del análisis del extracto de la hoja de L. leucocephala. a) Estándar de Ciprofloxacina. b) extracto control de la planta. c) extracto de la planta en contacto con Ciprofloxacina. 45
Figura 23. Cromatograma del análisis del tallo de L. leucocephala. a) Estándar de Ciprofloxacina. b) tallo control de la planta. c) Tallo de la planta en contacto con Ciprofloxacina. 46
Figura 24. Cromatograma del análisis del extracto de la raíz de L. leucocephala. a) Estándar de Ciprofloxacina. b) Extracto control de la planta. c) Extracto de la planta en contacto con Ciprofloxacina. 47
Figura 25. Cromatograma del análisis del extracto de la hoja de L. leucocephala. a) Estándar de Levofloxacina. b) Extracto control de la planta. c) Extracto de la planta en contacto con Levofloxacina. 48
Figura 26. Cromatograma del análisis del extracto del tallo de L. leucocephala. a) Estándar de Levofloxacina. b) Extracto control de la planta. c) Extracto de la planta en contacto con Levofloxacina. 49
Figura 27. Cromatograma del análisis del extracto de la raíz de L. leucocephala. a) Estándar de Levofloxacina. b) Extracto control de la planta. c) Extracto de la planta en contacto con Levofloxacina preconcentrada. 50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripición de los procesos de fitorremediación que puede llevar a cabo la planta según el medio en que se encuentre. 8
Tabla 2. Descripción de solución Hoagland 16
Tabla 3. Corriente de los estándares de Ciprofloxacina y Levofloxcina para la construcción de la curva de calibración. 22
Tabla 4. Concentraciones promedio obtenidas de los antibióticos en presencia de la planta L. Leucocephala en función al tiempo de exposición. 31
Tabla 5. Datos experimentales para la curva de calibración de Ciprofloxacina y Levofloxacina. Área bajo la curva promedio en triplicado 41
Tabla 6. Resultados obtenidos de la pre-concentración de los extractos de las plantas en sus respectivas partes. 51
Tabla 7. Resultados obtenidos teniendo en cuenta la pre-concentración de los extractos de las plantas en sus respectivas partes. 52
Tabla 8. Porciento promedio de remoción aproximado de los antibióticos en la planta en sus respectivas partes. 53

I. Introducción

1.1 Objetivos:

Este trabajo se centra en el análisis electroquímico y cromatográfico de dos fluoroquinolonas: ciprofloxacina y levofloxacina, absorbidos por la planta de Leucaena leucocephala. El origen de este trabajo surge de la preocupación que existe por el gran aumento en la contaminación por fármacos y pesticidas y productos farmacéuticos y de cuidado personal en cuerpos de agua, y la falta de procesos industriales para eliminarlos.[1-3]

Los fármacos utilizados en el tratamiento médico son predominantemente solubles en agua, y entran en el medio ambiente acuático por excreción de humanos y animales, descargas industriales o mal manejo al descartarlos, los cuales finalmente son liberados en el medio acuático local circundante.[4-6] Entre el 45% y el 62% de la mayoría de la dosis administrada de antibióticos a los seres humanos y los animales son excretados en la orina como la sustancia activa del fármaco, estos porcientos varían dependiendo de la droga sumistrada.[7] Estudios recientes indican que las aguas descargadas por las plantas industriales de tratamiento de aguas residuales (PTAR) contienen residuos de los fármacos. Estos estudios han detectado antibióticos en los efluentes finales de planta de tratamiento de aguas residuales, lo que indica la ineficiencia de la purificación en los procesos de estas aguas.[7-8] Los antimicrobiales incluyendo los antibióticos son reconocidos como microcontaminantes emergentes.[9]

La exposición prolongada del ambiente con bajas dosis de antibióticos conduce a

la proliferación selectiva de las bacterias resistentes, lo que podría transferir los genes de resistencia a otras especies bacterianas. De acuerdo con Costanzo, los antibióticos liberados en el medio ambiente acuático son una preocupación por las siguientes razones: (1) la contaminación de agua cruda, tratada y reciclada utilizada para beber, irrigación y recreación; (2) el potencial generalizado para acelerar la resistencia bacteriana a los antibióticos; y (3) efecto negativo sobre las bacterias importantes de los ecosistemas a través de la muerte o inhibición.[10]

Existen varias técnicas para la eliminación de drogas de las aguas residuales, pero muchas de estas técnicas representan un problema grave por el costo de energía, tales como la nanofiltración o el almacenamiento de estas sustancias, lo que genera un problema para disponer de ellas. Los procesos de oxidación que forman subproductos o degradación pueden ser, más tóxicos que los compuestos que son tratados para eliminar los contaminantes.[11]

El tratamiento con carbón activado ha demostrado ser un método eficaz para la eliminación de los fármacos; sin embargo, esta técnica sólo se utiliza en el tratamiento de las plantas industriales. En los cuerpos de aguas naturales, en los que están presentes estos contaminantes, no es posible eliminarlos. Por otro lado, el compostaje puede ser útil para remover muchos contaminantes, pero los antibióticos como las fluoroquinolonas son persistentes a ese proceso, esto podría causar un problema ecológico y de la salud.[12]

El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de Leucaena Leucocephala para eliminar antibióticos presentes en aguas o corrientes naturales. La cantidad de absorción que poseen estas plantas son una alternativa para la eliminación

de drogas de las aguas mediante un tratamiento simple y de bajo costo. Los antibióticos utilizados en tratamientos médicos o veterinarios eventualmente pasan a ser contaminantes al ambiente, ya sea por excreción o por el desecho de los mismos al no ser utilizados. Estos pasan al sistema de alcantarillado, los cuales finalmente llegan a los entornos acuáticos.

Los antibióticos estudiados fueron la ciprofloxacina (Cipro) y la levofloxacina (Levo). El antibiótico ciprofloxacina es excretado en la orina en un 50 a 70% sin sufrir alteraciones.

El estudio se realizó utilizando las técnicas de Voltametría Cíclica (CV) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Este tipo de análisis es de bajo costo y con una buena detección y reproducibilidad. Estas técnicas permiten detectar concentraciones hasta un límite de $10^{-6}M$.

Estudios recientes describen la Voltametría como el desarrollo de un método sencillo y rápido para determinar directamente la concentración de ciprofloxacina y levofloxacina en muestras de orina.[13] Se han reportado varios métodos de HPLC en la literatura para la determinación de ciprofloxacina en los fluidos corporales, en particular, en plasma y el suero sanguíneo que dan paso a la oportunidad de comparar los resultados obtenidos en las muestras contaminadas.[14]

1.2 Fluoroquinolonas

Los antibióticos utilizados en este trabajo son de la familia de las fluoroquinolonas. Estos compuestos son agentes antibacterianos del grupo de las quinolonas de segunda

generación que se han utilizado ampliamente en el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias y urinarias. El uso generalizado de las fluoroquinolonas en la práctica clínica se debe a que los antibióticos que tienen actividad de amplio espectro contra bacterias Gram-negativas, microorganismos Gram-positivas, anaeróbicos, y mycobacteria.[15] Fluoroquinolonas consisten en una estructura de anillo bicíclico y diferentes grupos funcionales sustituidos en la posición N-R, C-R y C-R' como se muestra en la Figura 1.

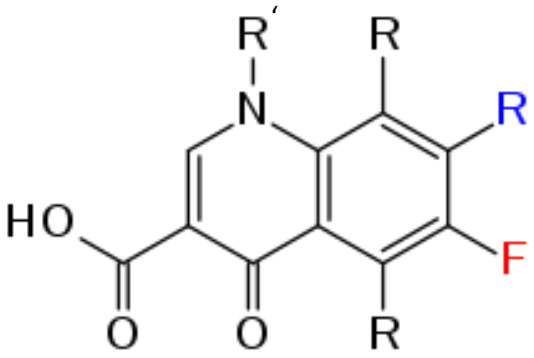

Figura 1. Estructura general de las Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas tiene una sustitución de un grupo carboxilo en la posición C-2, un grupo funcional cetona en la posición C-3. Estas sustuciones en la estructura de las quinolonas y la introducción de un átomo de flúor en C-6 y piperazina en C-7 forman derivados de segunda generación, tales como ciprofloxacina y norfloxacina. El desarrollo adicional de los derivados de segunda generación con la introducción de nuevos anillos en C-7 o resolución quiral de los agentes existentes conducen a derivados de tercera generación, tales como levofloxacina. La presencia de diferente grupo funcional en las posiciones N-1 o en C-7 influyen tanto en propiedades microbiológicas y farmacocinéticas.[16-17]

1.2.1 Ciprofloxacina

La ciprofloxacina es un antibiótico utilizado para el tratamiento de muchas infecciones bacterianas. Entre el 30% y 90% de una dosis administrada de la mayoría de antibióticos a los seres humanos y animales se excretan en la orina como sustancia activa.[18] El Cipro ha sido clasificado como uno de los antibióticos prevalentes en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y afecta a las comunidades microbianas.

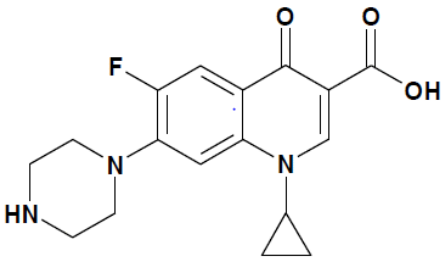

Figura 2. Estructura química de Ciprofloxacina

La Figura 2. muestra la estructura molecular de ciprofloxacina. El nombre químico de ciprofloxacina es 1-ciclopropil-6-fluoro-1, 4-di-hidro-4-oxo-7- (1-perazinyl) ácido carboxílico-3-quinolina.[19] Es un antibiótico familia de las fluoroquinolonas, es un fármaco importante, que ha sido ampliamente utilizado como antibacteriano para el tratamiento de muchas infecciones bacterianas, urinaria, la fiebre tifoidea, la tuberculosis, la diarrea del viajero, sinusitis, neumonía, prostatitis y muchas otras más.[20] Por ejemplo, la Ciprofloxacina (Cipro) ha sido clasificada como uno de los antibióticos prevalentes en los efluentes de las planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR), y afecta a las comunidades microbianas y actividades en suelos.[11]

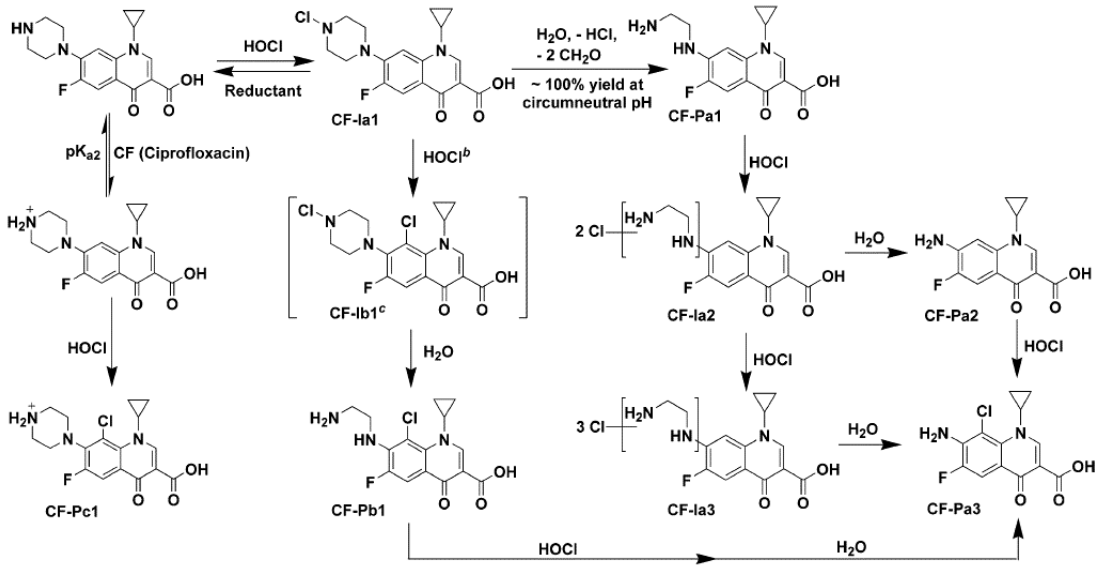

Figura 3. Mecanismo propuesto de la reacción de Ciprofloxacina con el cloro libre en agua[20].

La Figura 3 muestra el mecanismo para la reacción de Ciprofloxacina con cloro libre disponible en agua.[21] Los metabolitos de la Ciprofloxacina tienen efectos significativos en los procesos ambientales y en los ecosistemas. Los efectos de estos compuestos sobre los procesos específicos del suelo son la disponibilidad de una cantidad menor de nutrientes necesarios para el ciclo del carbono, y la adaptación de la comunidad microbiana al medio ambiente.[7]

1.2.2 Levofloxacina

El nombre químico de levofloxacina es (-) - (S) -9-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10- (4-metil-1-piperazinil) -7-oxo-7H pirido [1,2,3- de] -1,4-benzoxazin-6 - ácido carboxílico

hemihidrato (Figura 4). Este antibiótico pertenece a la tercera generación de las fluoroquinolonas.[22] La Levofloxacina es un antibiótico de amplio espectro farmacológico de actividad contra diversas bacterias, incluyendo microorganismos gram-positivos y gram-negativos. La Levofloxacina ha sido ampliamente utilizada para la cura de enfermedades infecciosas, como la neumonía y la exacerbación aguda de la bronquitis crónica.[22]

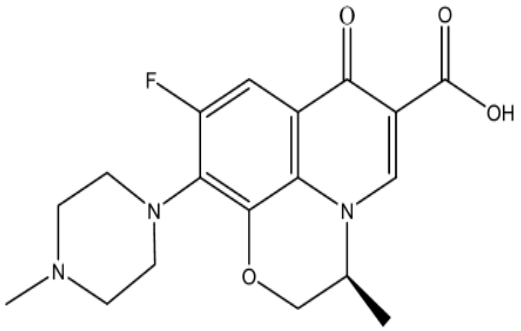

Figura 4. Estructura química de Levofloxacina

1.3 Fitorremediación

Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas para eliminar los contaminantes utilizando plantas. Estas técnicas se conocen como fitorremediación, y se basan en la capacidad de ciertas plantas de tolerar, absorber, acumular y/o degradar los contaminantes. En la actualidad la fitorremediación se está aplicando en varios países para la recuperación de suelos contaminados tanto con compuestos orgánicos, como los inorgánicos.[23] Es una tecnología ecológica emergente que utiliza las plantas biológicas para degradar algunos productos químicos tóxicos en suelos, sedimentos, agua

subterránea, agua superficial y aire. El uso de las plantas es ~10-50% menos costoso en términos de inversión de capital y utiliza menos mecánica intensiva, aunque tiene como limitación que requiere una mayor cantidad de tiempo para la remoción de estos contaminantes.[24]

La captura de contaminantes por las plantas es afectada por varios factores, entre los que se encuentran:[24]

- Especie de la planta biológica
- Propiedades físicas
- Largo de la raíz
- Agentes quelantes
- Biomasa de la planta biológica

Existen varios tipos de procesos de fitorremediación, los cuales indican que proceso utiliza la planta para remover esos contaminantes. La tabla 1 ilustra los distintos procesos que pueden llevar a cabo durante la fitorremediación de acuerdo a Dhir.[24]

Tabla 1. Descripición de los procesos de fitorremediación que puede llevar a cabo la planta según el medio en que se encuentre.

Procesos	**Descripción**	**Medio**
Rizodegradación/ Fitodegradación	Degradación microbial en la rizosfera estimulada por la planta	Suelo, sedimento y lodo.
Fitoestabilización	Estabilización de los contaminantes por un enlace/complejo.	Suelo, sedimento y lodo.

Fitoextracción	Captura de contaminantes por acumulación en la raíz.	Suelo, sedimento y lodo.
Rizofiltración	Remoción de contaminantes por la raíz de la planta.	Agua subterránea, aguas superficiales y aguas residuales
Fitovolitilización	Volatilización de contaminantes por las hojas de la planta.	Suelos y sedimentos.

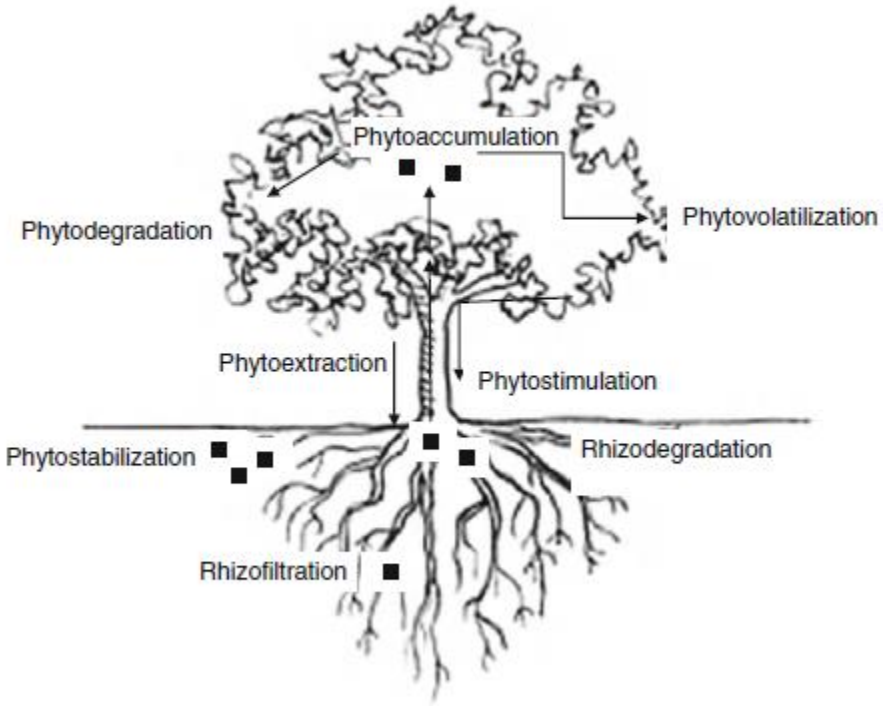

Figura 5. Mecanismos de trabajo de los procesos de las plantas fitorremediadoras.[24]

Leucaena leucocephala es una planta colonizadora que se ha extendido a una amplia gama de lugares que son más o menos libre de temporadas heladas, y se ha naturalizado en muchas áreas, algunos de estos muy lejos de los trópicos. Para su crecimiento óptimo, estas plantas requieren temperaturas cálidas (25-30°C). Estudios recientes muestran que *L. leucocephala* se ha utilizado para la eliminación de

contaminantes, y colorantes utilizando un pulverizado de las semillas de *L. leucocephala*.[25-26]

Otras investigaciones muestran que la acumulación de cobre elemental (Cu) en la planta fue mayor en sus tallos más que en sus hojas, y se ha asociado con la reducción de su concentración en el suelo.[27]

II. Análisis electroquímico para el monitoreo de Ciprofloxacina y Levofloxacina

2.1 Introducción

El análisis electroquímico consiste en la aplicación de un potencial que genera una respuesta de corriente. Un potenciostato es un dispositivo de retroalimentación negativa que aplica el potencial requerido al electrodo de trabajo; este potencial se mide con respecto a un electrodo de referencia. El potenciostato es uno de los instrumentos más ampliamente utilizados en estudios electroquímicos, y hace posible la realización de técnicas tales como la Voltametría Cíclica (CV) y Amperometría, entre otros. El potenciostato acoplado a una computadora permite establecer los parámetros de control del experimento, tales como velocidad de barrido (mV/s) y sensitividad (µA/V). Su propósito es imponer a un electrodo (el electrodo de trabajo) un barrido de potencial lineal o cíclico, resultando en una curva de corriente-potencial.[28]

En la figura 6 se muestra un esquema general de los componentes principales de un potenciostato. Donde WE es el electrodo de trabajo, RE el electrodo de referencia y CE el electrodo auxiliar.[28]

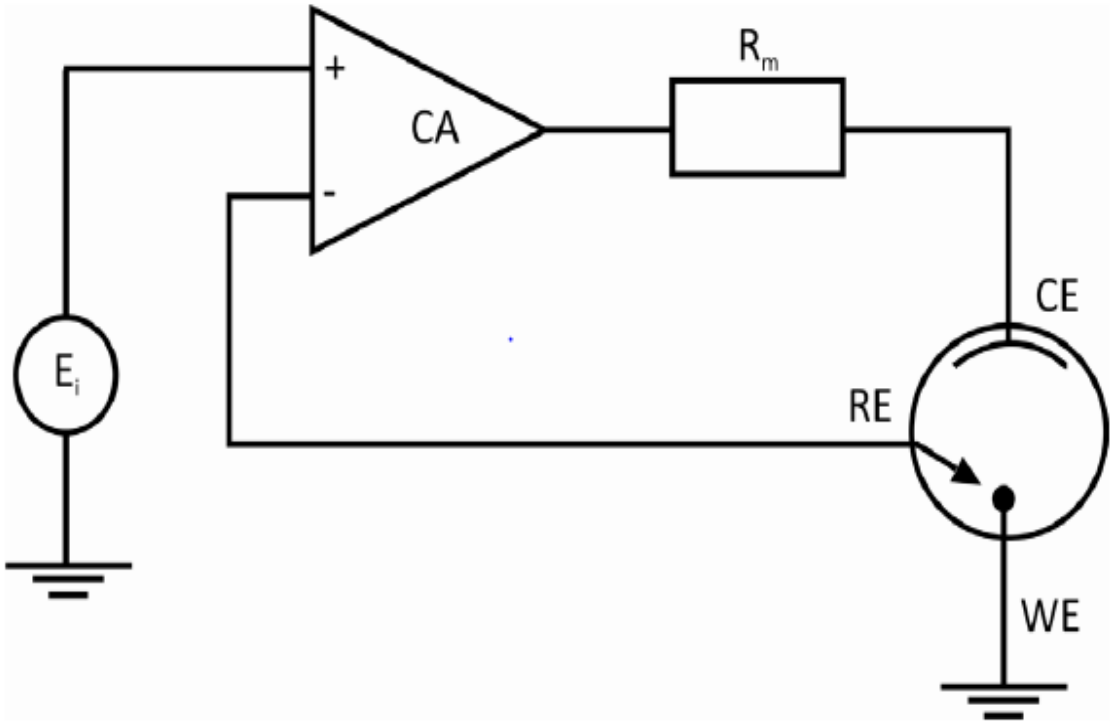

Figura 6. Potenciostato[28]

La Voltametría Cíclica (CV) es una técnica electroquímica en la que se controla el potencial. Un barrido de potencial cíclico se impone a un electrodo y se mide la respuesta de corriente. El análisis de la respuesta en el cambio de la corriente proporciona información acerca de la termodinámica y la cinética de transferencia de electrones en la interfase electrodo-electrolito, así como la cinética y los mecanismos de las reacciones químicas iniciadas por la transferencia de electrones, donde la corriente generada en proporcional a la concentración de la especie electroactiva estudiada. Una especia electroactiva, es aquella que gana o pierde electrones al aplicar un potencial negativo o positivo al electrodo de trabajo con respecto a un electrodo de platino utilizado como electrodo auxiliar.[29]

Los eventos principales en la mayoría de los experimentos de voltametría cíclica son procesos de oxidación y reducción de especies electroactivas en solución. Para que ocurra una reacción REDOX, la especie electroactiva tiene que difundirse a través de la solución y llegar a la interfaz electrodo-solución.[28] En la CV el potencial del electrodo de trabajo se barre linealmente entre dos valores, un potencial inicial (E_1) hasta un potencial máximo (E_2) invirtiendo este potencial a la dirección contraria hasta llegar al potencial E1. Este barrido de potencial se lleva a cabo a una velocidad conocida y constante (ej. 100mV/s).

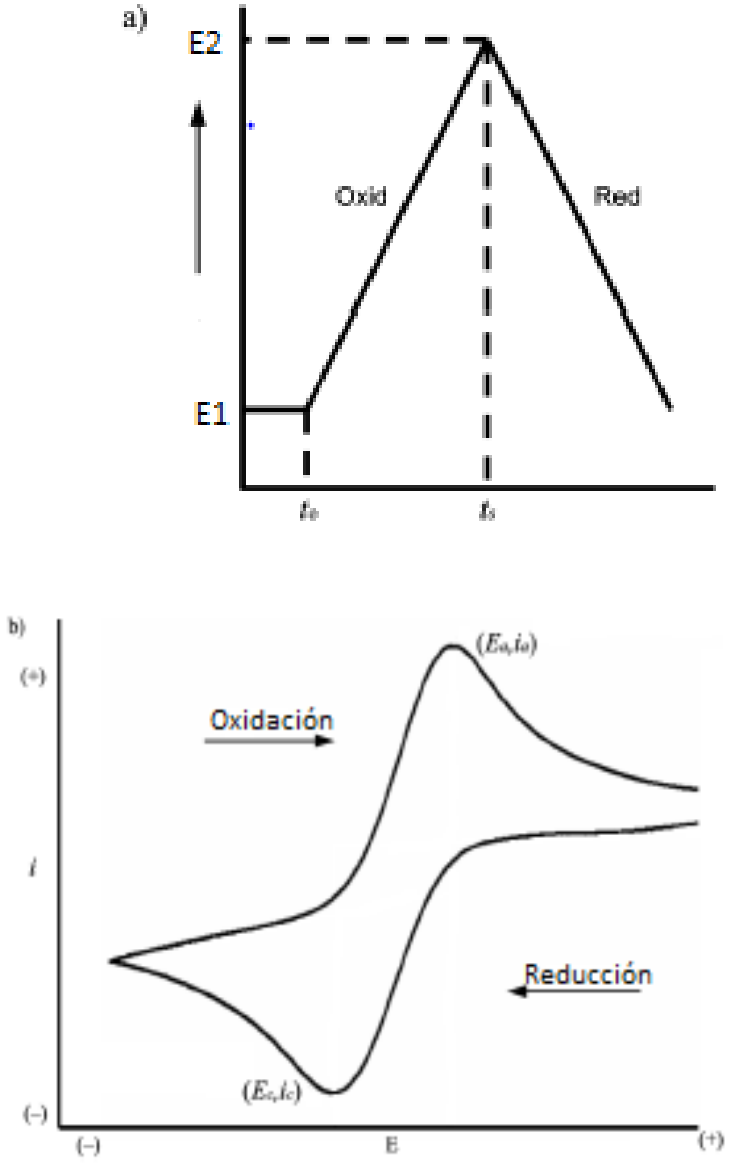

Figura 7. a) barrido lineal del potencial aplicado en voltametría cíclica con respecto al tiempo (s). b) Voltamograma cíclico en un proceso reversible.[29]

Para un proceso simple y reversible, es posible calcular el número de electrones que están envueltos en la reacción. La mayoría de las moléculas complejas, como lo son los productos farmacéuticos, explosivos, pesticida, etc., en su mayoría no le ocurre reacciones REDOX reversibles. Estas solamente exhiben corriente anódicas o catódicas dependiendo de su tendencia a oxidarse o reducirse.[28]

Este proceso se produce en el electrodo de trabajo que emplea la configuración clásica de 3 electrodos. En éste sistema se mide el potencial aplicado entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, cualquier corriente observada se deberá a una reducción u oxidación de la sustancia electroactiva en solución, ya que el electrodo de referencia está diseñado para que no le ocurran cambios en su composición. La corriente observada es el resultado del proceso REDOX que ocurre entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar. Si en el electrodo de trabajo ocurre una reducción en el auxiliar estará ocurriendo una oxidación y viceversa.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Preparación de soluciones

Los reactivos ciprofloxacina y levofloxacina fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co. con una pureza de 98% HPLC. Se preparó la solución madre de Cipro y Levo separadamente a $1.0x10^{-4}M$ en solución Hoagland. Esta solución consiste en una mezcla de sales (las cuales se ilustran en la Tabla 2), y que provee los nutrientes necesarios para el crecimiento favorable de las plantas. El pH es ajustado de acuerdo al pH favorable para el desarrollo de la planta bajo estudio. En este trabajo el pH utilizado fue de 5.4 y el cual fue ajustado con una solución de NaOH. Para el análisis de CV se prepararon

soluciones a partir de la solución madre en un rango de concentración desde $1.0x10^{-5}M$ hasta $10.0x10^{-5}M$, de ambos antibióticos, diluidos con la solución Hoagland.

Tabla 2. Descripción de solución Hoagland

Solución	Concentración (M)
$Mg(NO_3)_2$. $6H_2O$*	0.104
KNO_3**	0.0255
$CaCl_2.6H_2O$***	0.0214
$Zn(NO_3)_2$. $6H_2O$**	0.001
KH_2PO_4*	0.01
$Cu(NO_3)_2$. $2.5H_2O$*	0.001
$Ca(NO_3)_2$. $4H_2O$*	0.0357
$FeCl_3$. $6H_2O$***	0.00683
$MnSO_4$. H_2O*	0.000769
MoO_3* H_3BO_3	0.001

*Disuelto en ácido nítrico 0.01M, **Disuelto en agua destilada, *** Disuelto en ácido clorhídrico 0.01M

2.2.2 Análisis electroquímico

Se utilizó un potenciostato-galvanostato modelo Epsilon de la compañía Bioanalytical Systems, Inc., para llevar a cabo los experimentos de voltametría cíclica. Para las mediciones se utilizó un electrodo de trabajo de carbono vitroso (*glassy carbon*) con un diámetro de 3.0 mm, Ag / AgCl (0.222 V vs. NHS a 25ºC) como el electrodo de referencia, en una solución 3 M de NaCl. Un alambre de platino (Pt) se utilizó como electrodo auxiliar. El arreglo de tres electrodos se colocó en la celda electroquímica que contenía las

soluciones de interés. El sistema se purgó con gas nitrógeno ultra puro para eliminar el oxígeno que pudiera causar interferencia en la señal. Se utilizó un barrido de potencial desde 1700 mV/s hasta 0 mV/s a una razón de escaneo de 100mV/s y una sensitividad de 10µA/V.

2.2.3 Limpieza de los electrodos

Para la limpieza de los electrodos se siguió el procedimiento estándar de pulido sobre alúmina en material de tres porosidades diferentes.

2.2.4 Germinación de las semillas

Las semillas de *Leucaena Leucocephala* fueron recogidas en Aguadilla, Puerto Rico. Las semillas fueron colocadas en ácido sulfúrico al 98% por 5 minutos, para remover la capa de latencia y favorecer la hidratación de las mismas. Las semillas se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 4% por media hora y luego se dejaron 24 horas en agua destilada para hidratar las semillas. Las semillas hidratadas se enrollaron en papel de germinación, los grupos de papeles se colocaron en una porción de agua sin tocar la parte donde se encontraban las semillas para evitar contaminación y se dejaron reposar por 7 días evitando contacto con la luz.

Al pasar los 7 días los brotes de las plantas se colocaron en una estación de cultivo hidropónico en 250mL de solución Hoagland. Se colocaron 5 brotes por cada agujero en el frasco, para un total de 25 brotes por frasco. Luego de dos semanas se añadieron de forma individual las sustancias bajo estudio: Cipro y Levo. Ambas a una concentración de 1.0×10^{-4}M.

2.3 Resultados y Discusión

El análisis electroquímico nos brinda la información sobre las especies que se oxidan y se reducen que están presentes en la solución bajo estudio. No todas las especies pueden ser estudiadas por CV, deben ser electroactivas cuando se les aplica un potencial que sea capaz de generar una oxidación y/o reducción. Las especies estudiadas en este trabajo, son de la familia de las fluoroquinolonas, y poseen la electroactividad necesaria para poder ser analizadas con esta técnica.

Al realizar el análisis de Voltametría se pudo observar un pico de oxidación a un potencial de 1200mV (vs Ag/AgCl). En la Figura 8 y 9 se muestra el voltamograma de Ciprofloxacina y Levofloxacina, en los cuales se observa un pico de oxidación en un potencial de 1200mV y una ausencia de pico de reducción. Con esta técnica se demostró que el comportamiento de los dos antibióticos es un proceso irreversible cuando se utiliza un electrodo de carbono vítreo. Estudios anteriores de compuestos similares en estructura a Cipro y Levo se ha encontrado un comportamiento similar en la señal.[30]

Se sugiere que ésta señal se debe a la presencia del anillo de piperazina en la posición siete de los compuestos estudiados, ocurriendo así una oxidación con carácter irreversible en uno de los nitrógenos, debido a la facilidad que tienen estos en perder electrones en comparación con los oxígenos que son elementos más electronegativos. Por lo que es más difícil que ocurra un proceso de oxidación en uno de los oxígenos. En adición, la cercanía de un anillo aromático al nitrógeno del anillo de piperazina le brindaría la estabilidad, por resonancia, al compuesto en caso de sufrir una oxidación en el nitrógeno.

Este comportamiento se puede observar al analizar distintas concentraciones de los compuestos como se demuestran en las figuras 8 y 9.

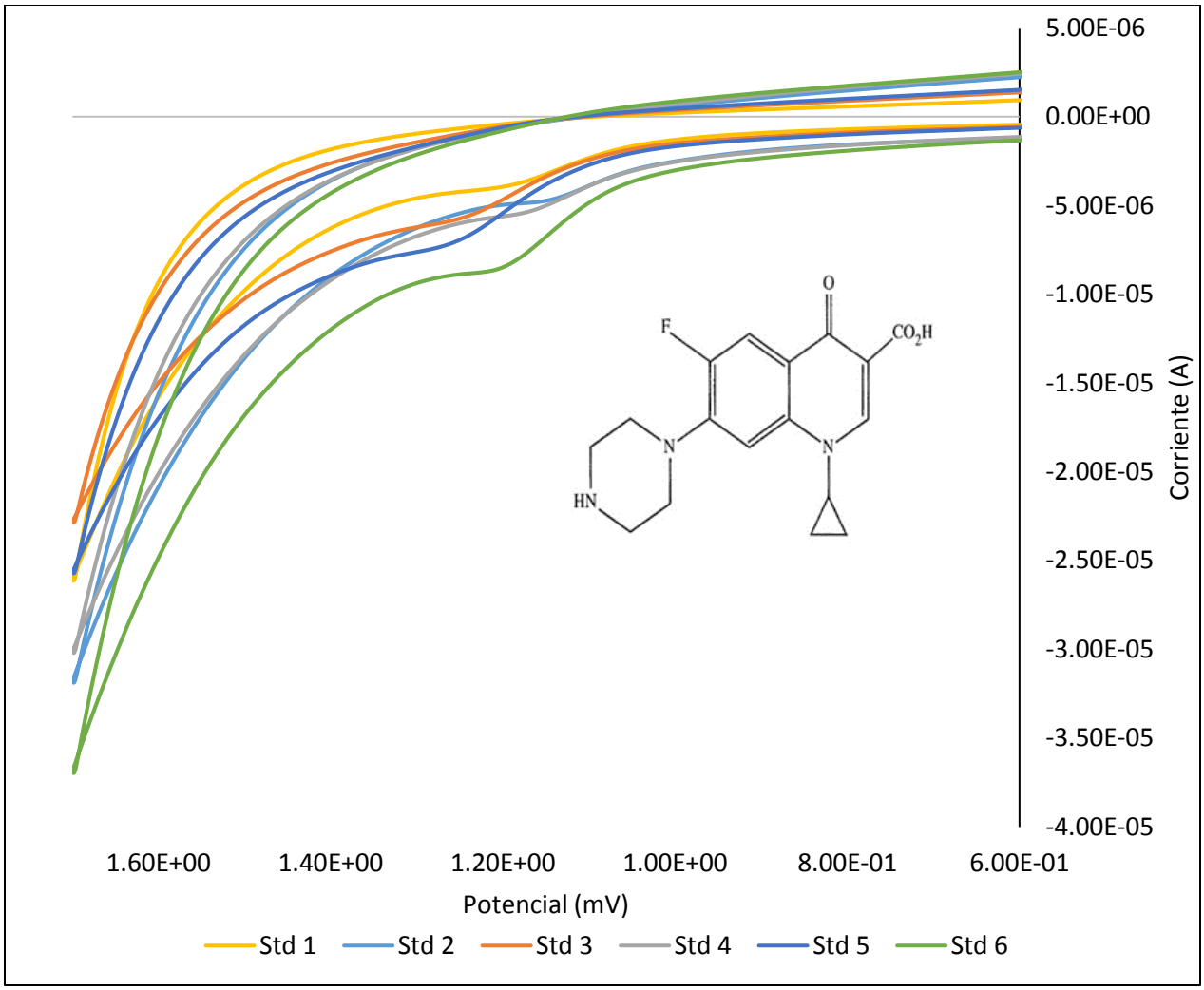

Figura 8. Voltamograma de Ciprofloxacina en solución Hoagland a pH 5.4 con electrodo de GC vs Ag/AgCl, 1200mV/s.

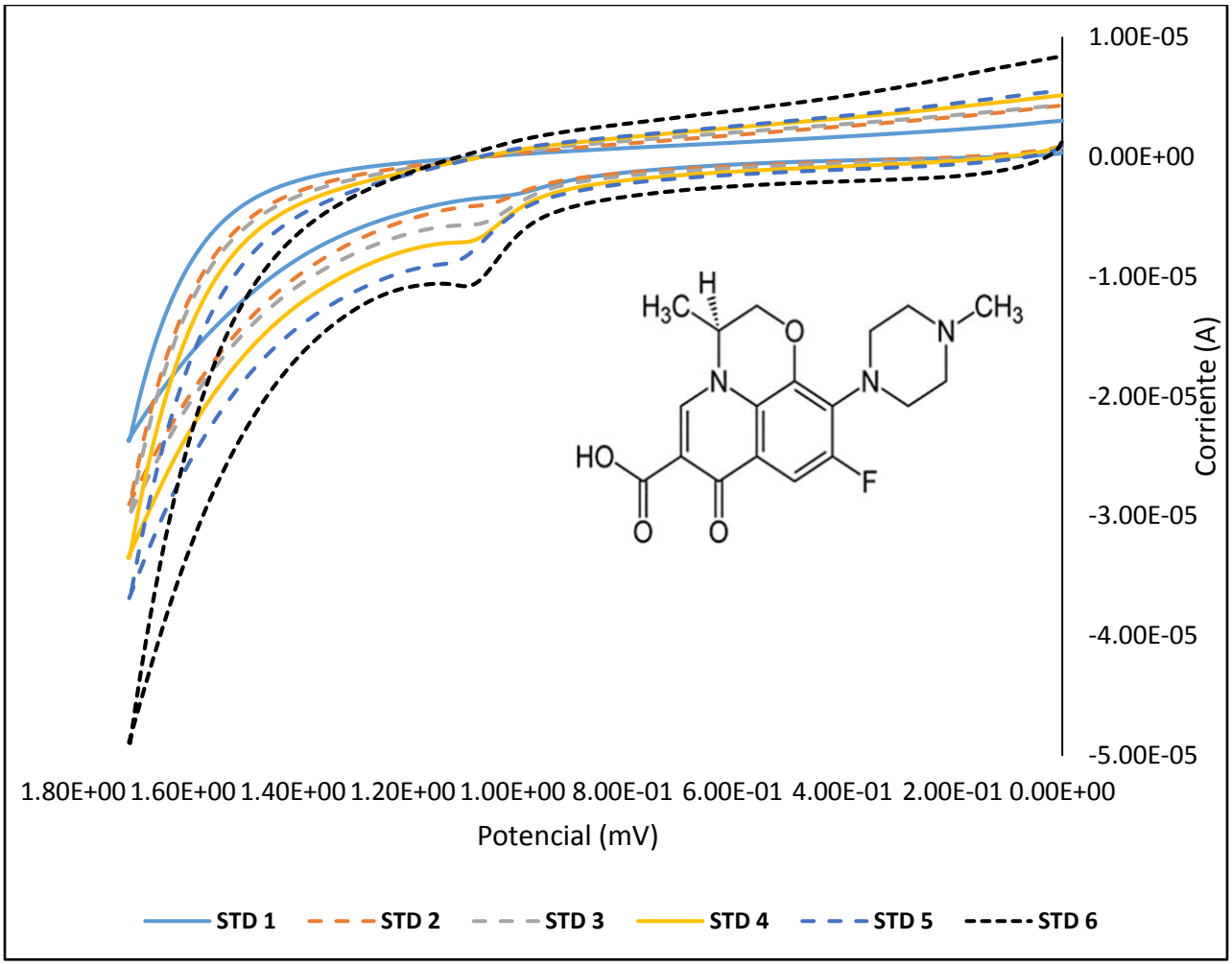

Figura 9. Voltamograma de Levofloxacina en solución Hoagland a pH 5.4 con electrodo de GC vs Ag/AgCl, 1200mV/s.

Para determinar la concentración de Cipro y Levo se preparó una curva de calibración con seis estándares en un rango de concentración de $1.0x10^{-5}M$ a $10.0x10^{-5}M$ en solución Hoagland para cada antibiótico en triplicado (Figura 10 y Figura 11**)**. La curva de calibración se preparó usando la corriente (µA) observada para cada concentración en dicho potencial 1200mV/s (refiérase a la Tabla 3).

Tabla 3. Corriente de los estándares de Ciprofloxacina y Levofloxcina para la construcción de la curva de calibración.

Estándar	Concentración (M)	Cipro Corriente promedio (µA)	Levo Corriente promedio (µA)
Std 1	$1.00x10^{-5}$	-4.45	-3.30
Std 2	$2.00x10^{-5}$	-4.83	-4.14
Std 3	$4.00x10^{-5}$	-5.67	-5.93
Std 4	$6.00x10^{-5}$	-6.24	-6.90
Std 5	$8.00x10^{-5}$	-7.75	-8.67
Std 6	$10.00x10^{-5}$	-8.84	-10.73

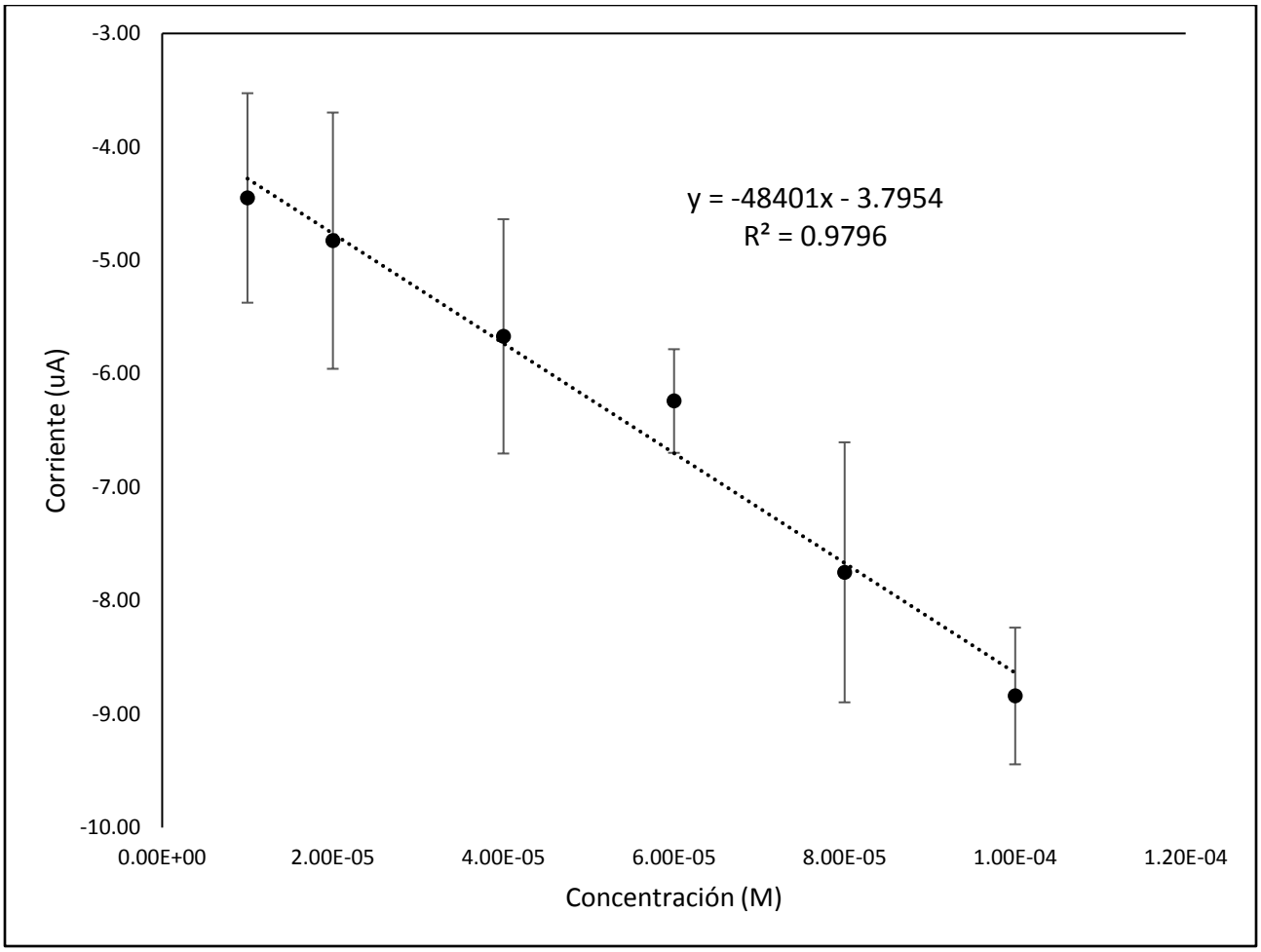

Figura 10. Curva de calibración de Ciprofloxacina en solución Hoagland a pH 5.4

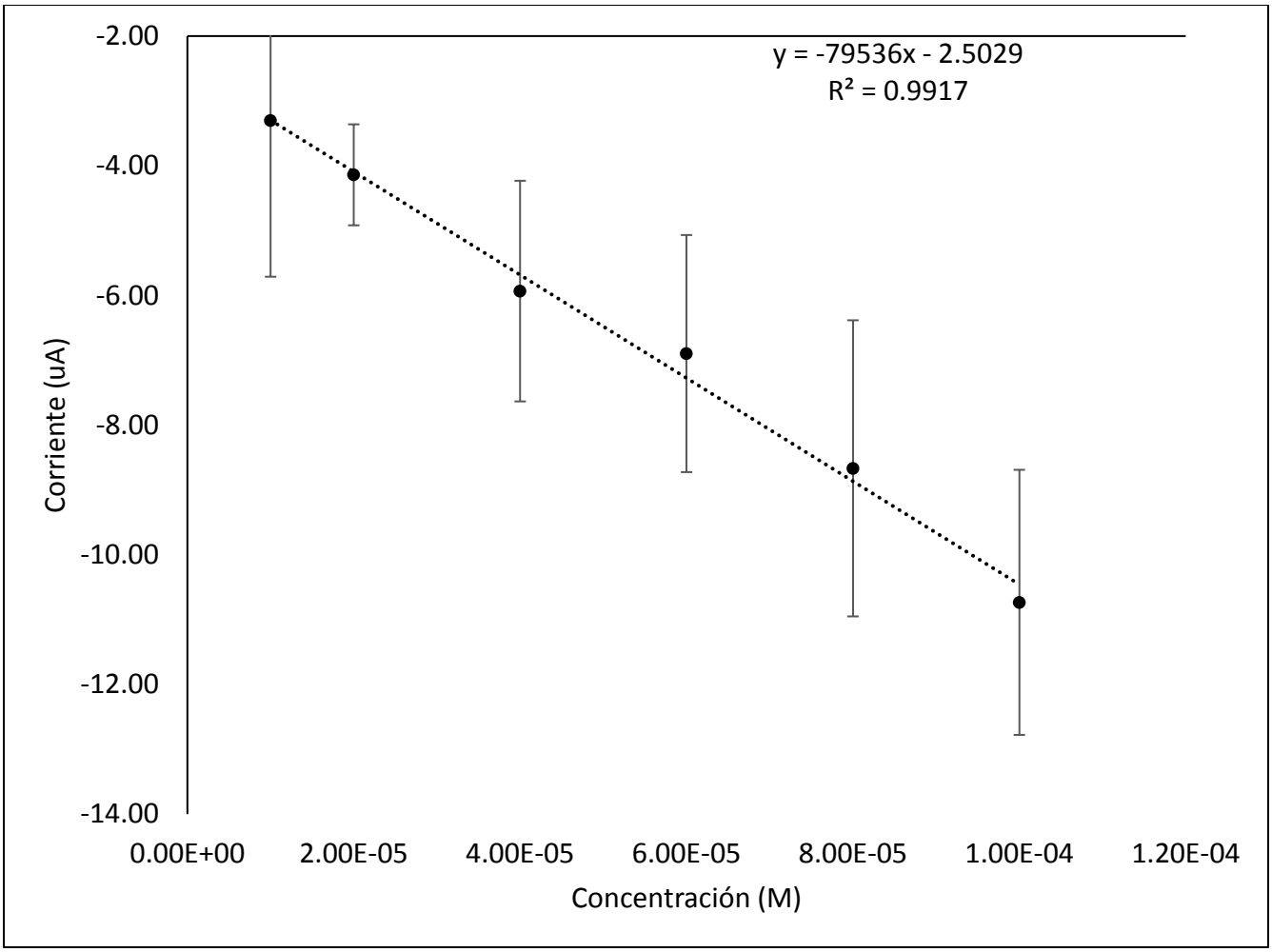

Figura 11. Curva de calibración de Levofloxacina en solución Hoagland a pH 5.4

Una vez contaminadas las plantas con las soluciones de Cipro y Levo $10.00x10^{-5}M$ se procedió a analizar la solución con el objetivo de observar la disminución en la señal del antibiótico a medida que la planta absorbía el contaminante presente en la solución Hoagland. La solución de las plantas se analizó cada dos días manteniendo el nivel de la solución Hoagland constante, por un total de seis días.

En la figura 12 se muestra el voltamograma de la solución Hoagland contaminada con Cipro. A esta solución se le midió la señal del Cipro en intervalos de un día para determinar el consumo o degradación del Cipro por la planta. Se puede observar como la señal de la corriente del pico de oxidación disminuye en función del tiempo. Esto se debe a que la planta absorbe el antibiótico que se encuentra en la solución. Se realizó un control con el fin de descartar cualquier degradación del antibiótico a causa del tiempo de exposición al ambiente. Como se observa en la figura 13 la concentración del control no sufrió cambios mayores en comparación con la concentración del analito bajo estudio.

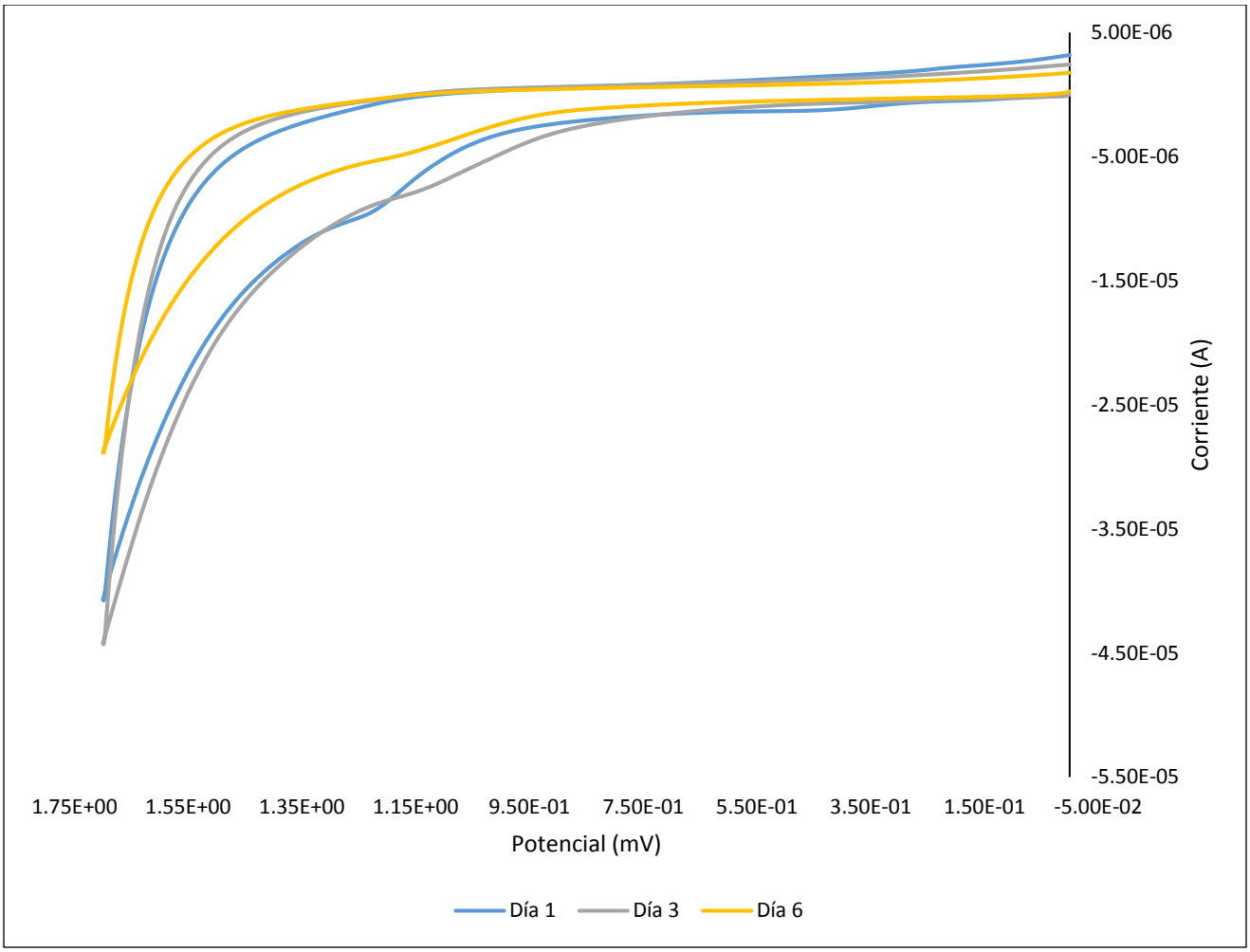

Figura 12. Voltamograma de Ciprofloxacina en contacto con *L. Leucocephala* en función al tiempo de exposición

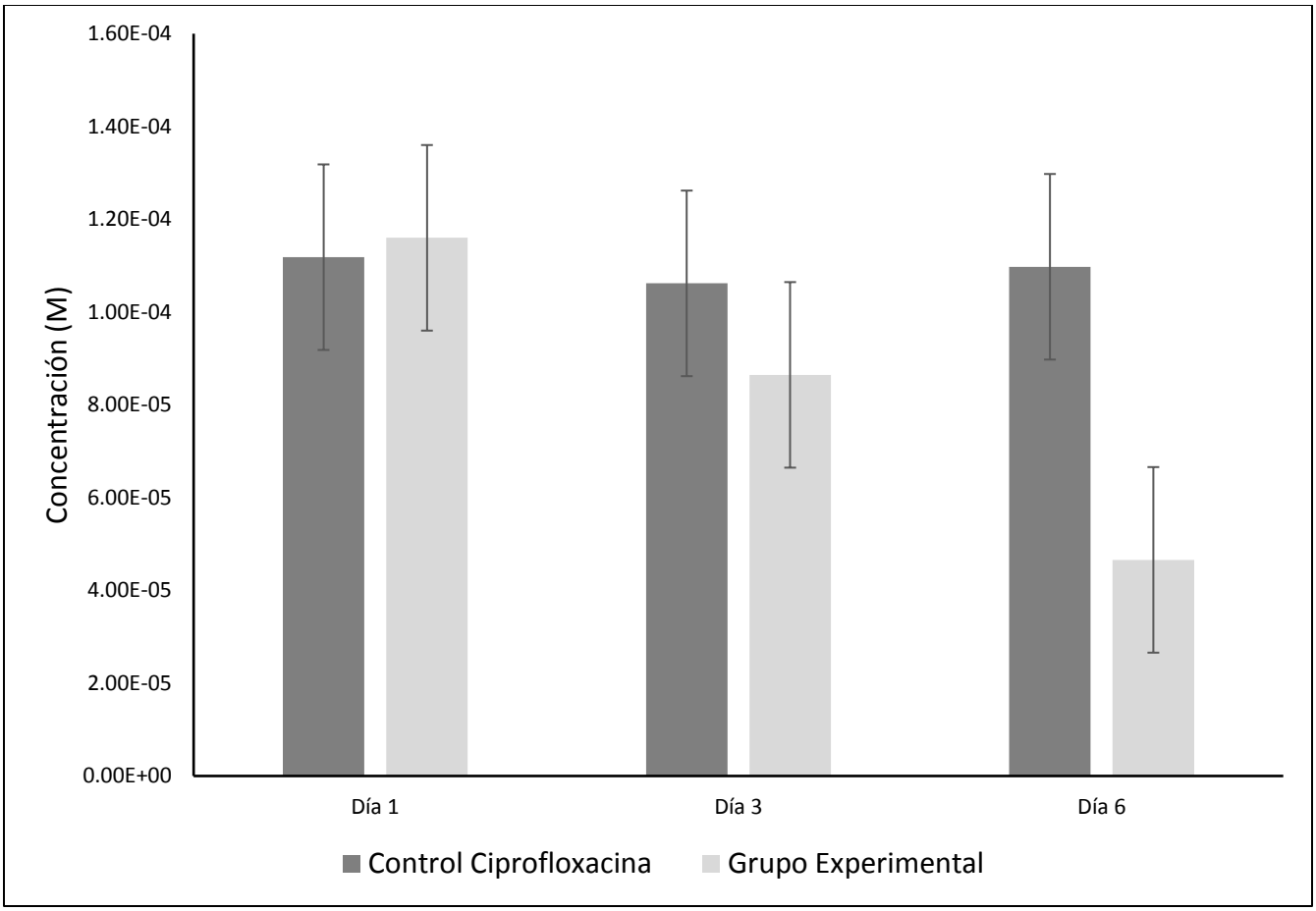

Figura 13. Concentración promedio de Ciprofloxacina en solución Hoagland en contacto con *L. Leucocephala.*

Se realizó el mismo procedimiento para el análisis de Levo. Se observó que el comportamiento fue muy similar al de Cipro. Al observar la figura se puede ver como disminuye la señal de oxidación de Levo en función del tiempo de contacto. En las figuras 14 y 15, se pueden apreciar la disminución de levo obteniendo el mismo comportamiento de disminución con respecto al Cipro.

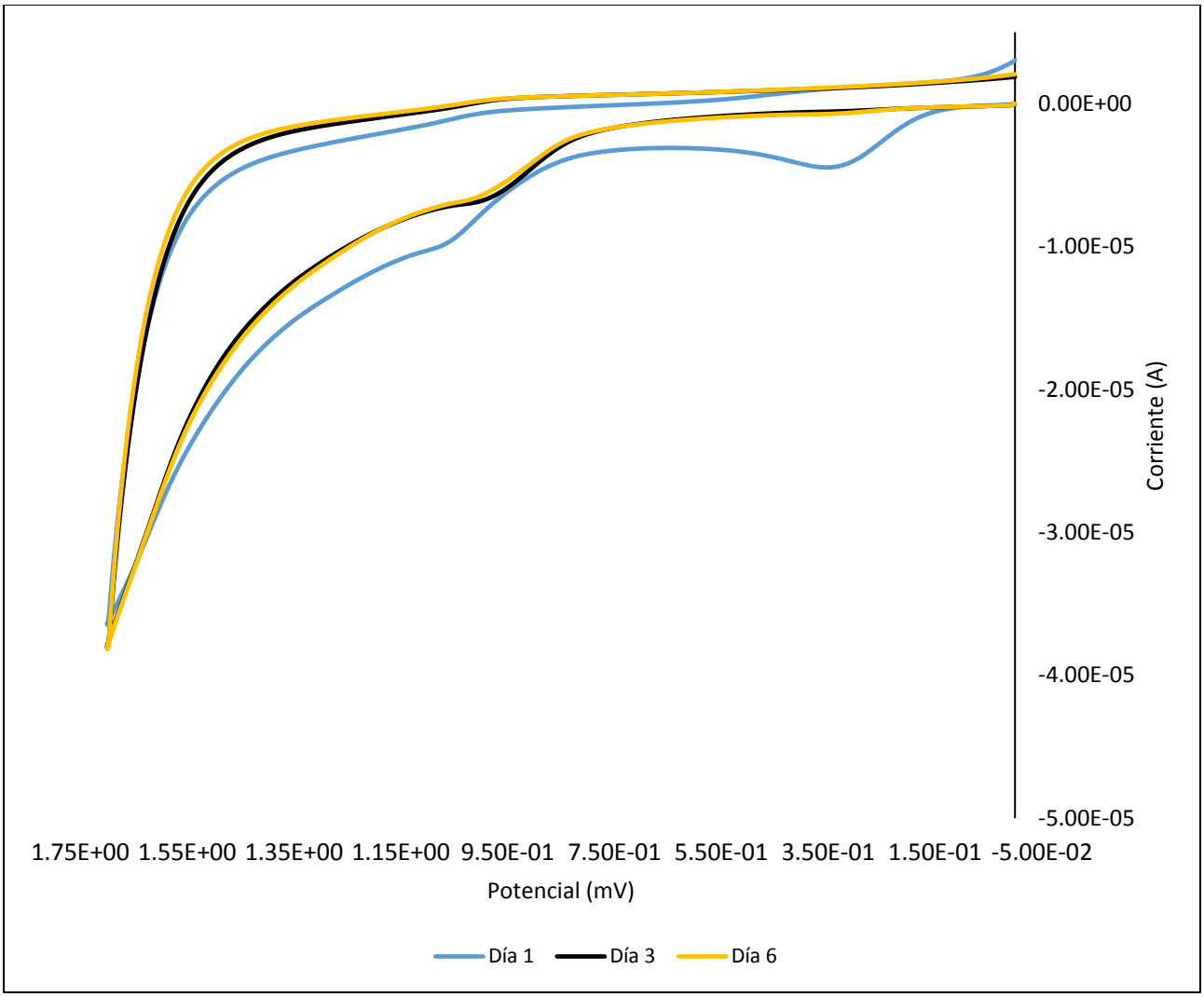

Figura 14. Voltamograma de solución Hoagland con Levofloxacina en presencia de *Leucaena Leucocephala* en función al tiempo de exposición.

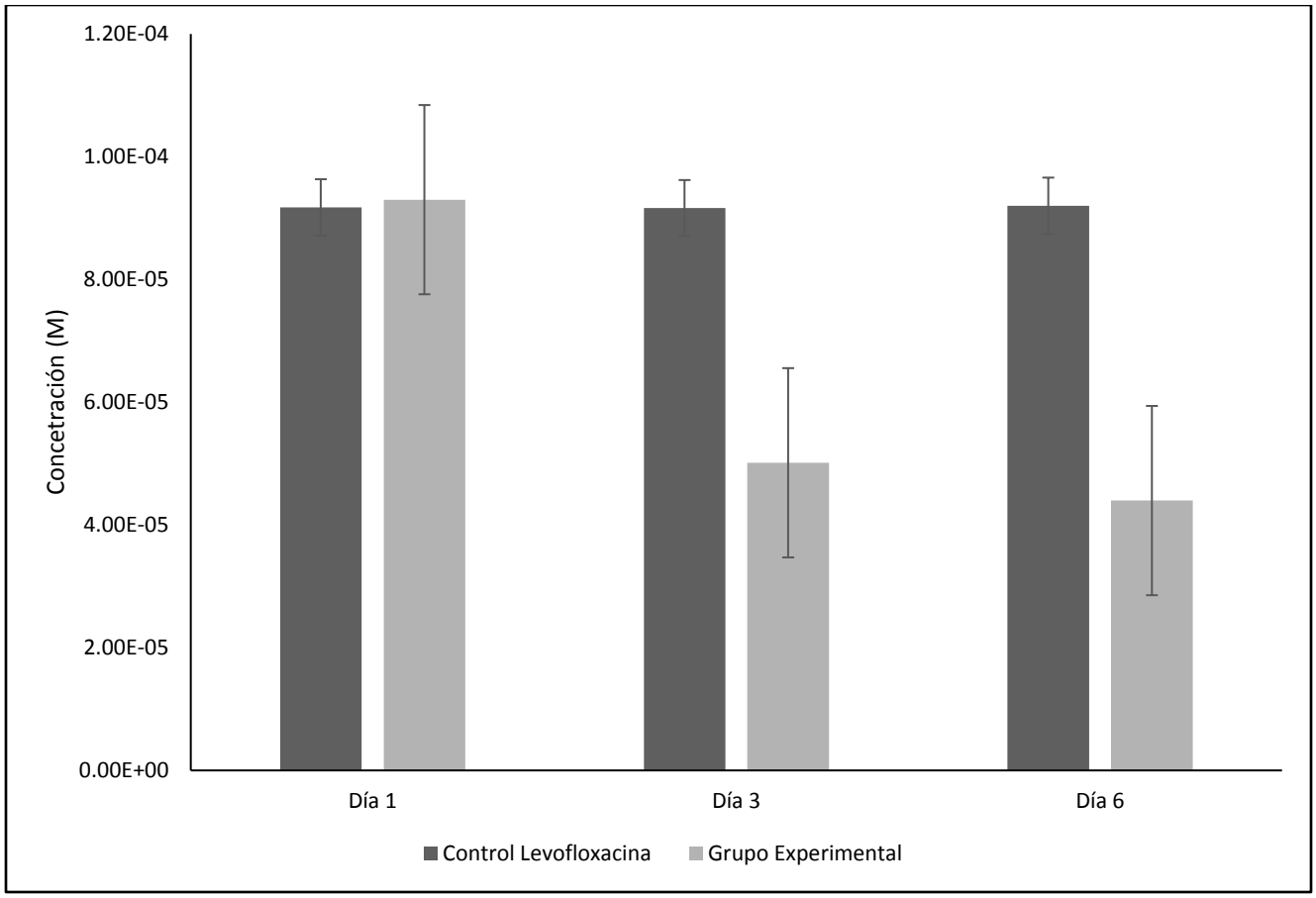

Figura 15. Concentración promedio de Levofloxacina en solución Hoagland en contacto con *L. Leucocephala.*

En la Tabla 4 se muestran las concentraciones obtenidas para comparar la disminución de los dos antibióticos. Se puede observar que la disminución fue muy similar para los dos antibióticos, por lo que la planta tiene afinidad hacia los antibióticos. Sin embargo, hay una mayor disminución para el día 3, una posible explicación es que la solubilidad de Levo en agua es mayor que la de Cipro. Para validar que la planta capturó el medicamento y en que parte del tejido se puedo acumular se realizó el estudio de HPLC.

Tabla 4. Concentraciones promedio obtenidas de los antibióticos en presencia de la planta *L. Leucocephala* en función al tiempo de exposición.

Antibiótico	Concentración (M) Día 1	Concentración (M) Día 3	Concentración (M) Día 6
Ciprofloxacina	$1.16(\pm 0.06)\text{x}10^{-4}$	$8.65(\pm 0.4)\text{x}10^{-5}$	$4.66(\pm 0.4)\text{x}10^{-5}$
Levofloxacina	$9.30(\pm 0.2)\text{x}10^{-5}$	$5.01(\pm 0.2)\text{x}10^{-5}$	$4.40(\pm 0.2)\text{x}10^{-5}$

III. Análisis Cromatográfíco para la detección y comparación cuantitativa de Ciprofloxacina y Levofloxacina

3.1 Introducción

En el capítulo anterior se evaluó la concentración de Cipro y Levo absorbida por la planta *L. leucocephala*. Se observó una disminución significativa en la señal de oxidación en los voltamogramas de ambos medicamentos. Sin embargo, es importante lograr determinar si la disminución observada de la señal de oxidación era debido a la capacidad que tuvo la planta de remover los contaminantes Cipro y Levo. Se realizó el análisis cromatográfico del sistema bajo estudio. Con esta técnica se pretende determinar si la planta captura el medicamento, en qué parte del tejido había mayor concentración de éstos o si se llevó a cabo algún tipo de degradación del fármaco dentro de la planta.

El análisis cromatográfico se utiliza como un método para la separación de mezclas complejas. Los métodos cromatográficos se clasifican basados en el tipo de fase móvil y estacionaria utilizadas. Las técnicas cromatográficas son: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos. Si el detector responde a la concentración del soluto analizado, se obtienen una serie de picos en función del tiempo y de la concentración, como se ilustra en la figura 17.[29] Existen varios tipos de detectores tales como: de masa (MS), ultravioleta (UV) y de fluorescencia.[31] El detector mayormente utilizado para HPLC es el de ultra-violeta (UV), lo que permite el análisis de moléculas orgánicas complejas.

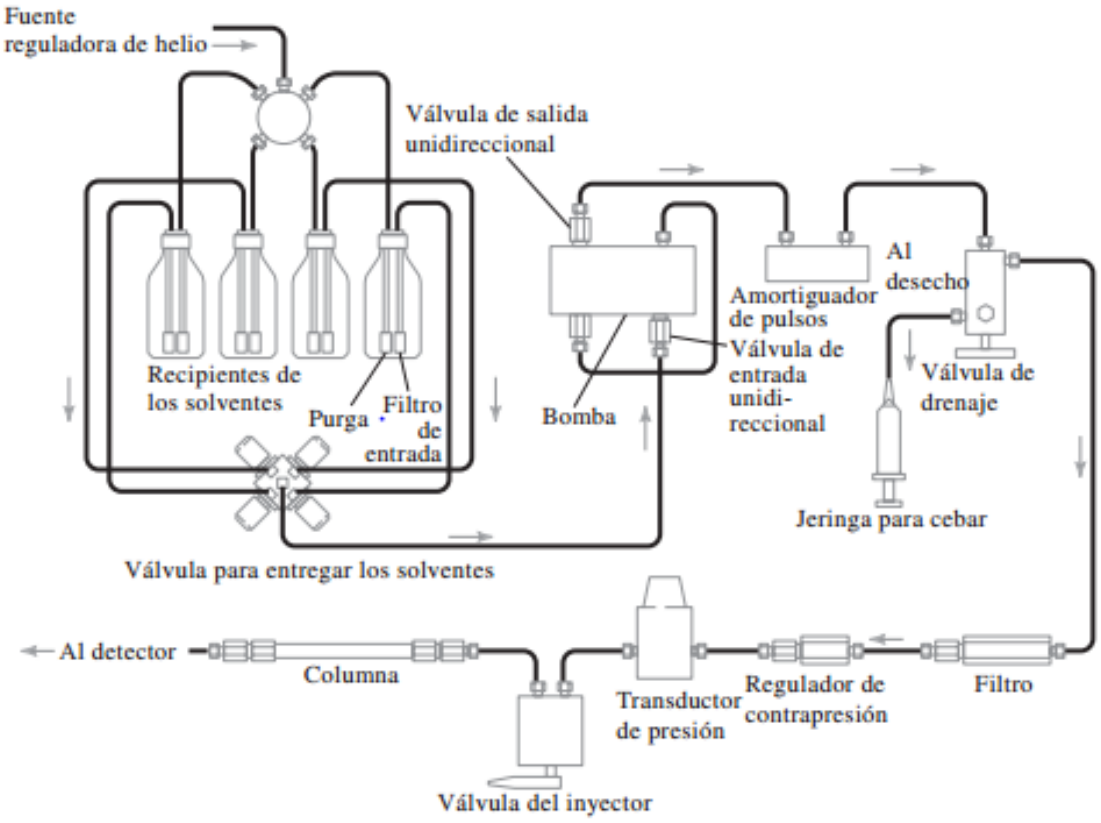

Figura 16. Componentes principales de un instrumento de HPLC.[29]

La cromatografía separa una muestra en sus partes constituyentes debido a la diferencia en las afinidades relativas de las distintas moléculas bajo estudio con la fase móvil y la fase estacionaria utilizada para la separación. Aquellas moléculas que tengan más afinidad a la fase estacionaria tendrán un tiempo de retención más largo.[32] La cuantificación de las sustancias se lleva a cabo utilizando el área bajo la curva que genera la señal de cada compuesto en función de la concentración.

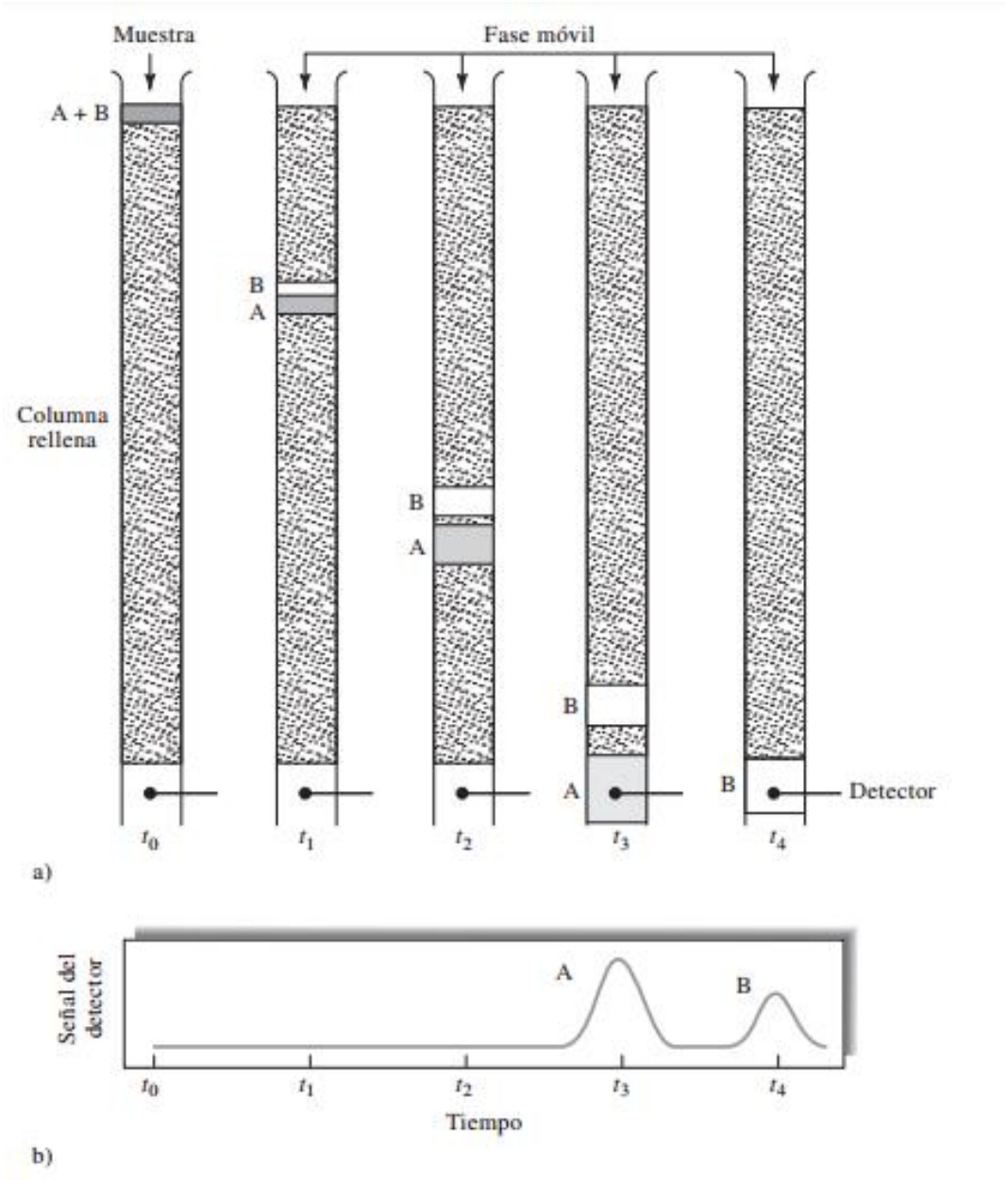

Figura 17. a) Método de separación genérico de una columna cromatográfica. b) Señal obtenida del detector, separada por variación en la afinidad con el empaque de la columna.[29]

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica analítica utilizada para la separación de compuestos solubles utilizando un disolvente particular. Es una técnica de alta sensibilidad y de fácil adaptación. Se utiliza ampliamente para la determinación y cuantificación de productos farmacéuticos y veterinarios. Cipro y Levo son moléculas de alta conjugación lo que permite su cuantificación por cromatografía líquida.

Se han reportado varios estudios en los que se utiliza el análisis con la técnica de HPLC para muestras contaminadas con fármacos y/o productos químicos. Un estudio reciente en el Centro Ambiental Tecnológico de Canadá reportó la detección de una concentración de 0.65µg/L de fluoroquinolonas en aguas urbanas en China, utilizando HPLC con detector de UV y de florescencia. [31]

En el Centro de Investigación y Colegio Médico de la India emplearon el análisis de HPLC para analizar los efluentes de un hospital en el Sur de ese país. Los resultados obtenidos demostraron la presencia de Ciprofloxacina, Enrofloxacina, Oxitetraciclina, Trimetropina y Ampicilina, siendo el 90% de las muestras obtenidas agentes antimicrobiales.[33]

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Preparación de soluciones

Los reactivos ciprofloxacin y levofloxacin fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co. con una pureza de 98% HPLC. Para el análisis de HPLC se preparó una solución madre de Cipro y la de Levo $1.0\text{x}10^{-4}\text{M}$ disueltas en agua deionizada. A partir de la solución

madre se prepararon unos estándares a concentraciones de $1.0x10^{-5}M$ a $10.0x10^{-5}M$, de ambos antibióticos, diluidos en agua deionizada.

3.2.2 Procedimiento de remoción de antibióticos

Para el análisis de HPLC es necesario realizar un método de remoción de los antibióticos presentes en los tejidos de la planta. Para esto las 50 plantas para cada antibiótico se separaron en: hoja, tallo y raíz. Las partes fueron trituradas en un mortero en presencia de agua deionizada. Se dejaron reposar durante 24 horas para luego filtrar el particulado. El filtrado se colocó en un rotavapor hasta alcanzar aproximadamente 10mL de solución. Para remover cualquier particulado presente en las muestras las soluciones resultantes de los extractos se pasaron por un filtro de 0.45µm antes de ser inyectadas al equipo,

3.3 Análisis cromatográfico

Para el análisis mediante HPLC se utilizó el intrumento Agilent 1100 con VWD, a una razón de flujo de 1.5 mL/min. La temperatura y longitud de onda de onda utilizados fueron 40°C y 286 nm respectivamente. Se utilizó una columna tipo Zorbax Rx-C18 (Agilent Co.) La fase móvil fue preparada con 800mL de agua deionizada, 10mL de tiertilamina (TEA) (Sigma Aldrich), se ajustó el pH a 3.0 con HNO_3 y se le añadieron 200ml de MetOH. Se utilizó metanol, ya que es menos costoso y menos tóxico que el acetonitrilo. La trietilamina se utilizó para mejorar el pico de la señal. En la figura 18 se muestra el espectro UV de un estudio previo para determinar la longitud de onda de distintos fármacos, entre ellos

Cipro y Levo.[34] Estas condiciones permiten la detección adecuada de Cipro y Levo en las muestras estudiadas.

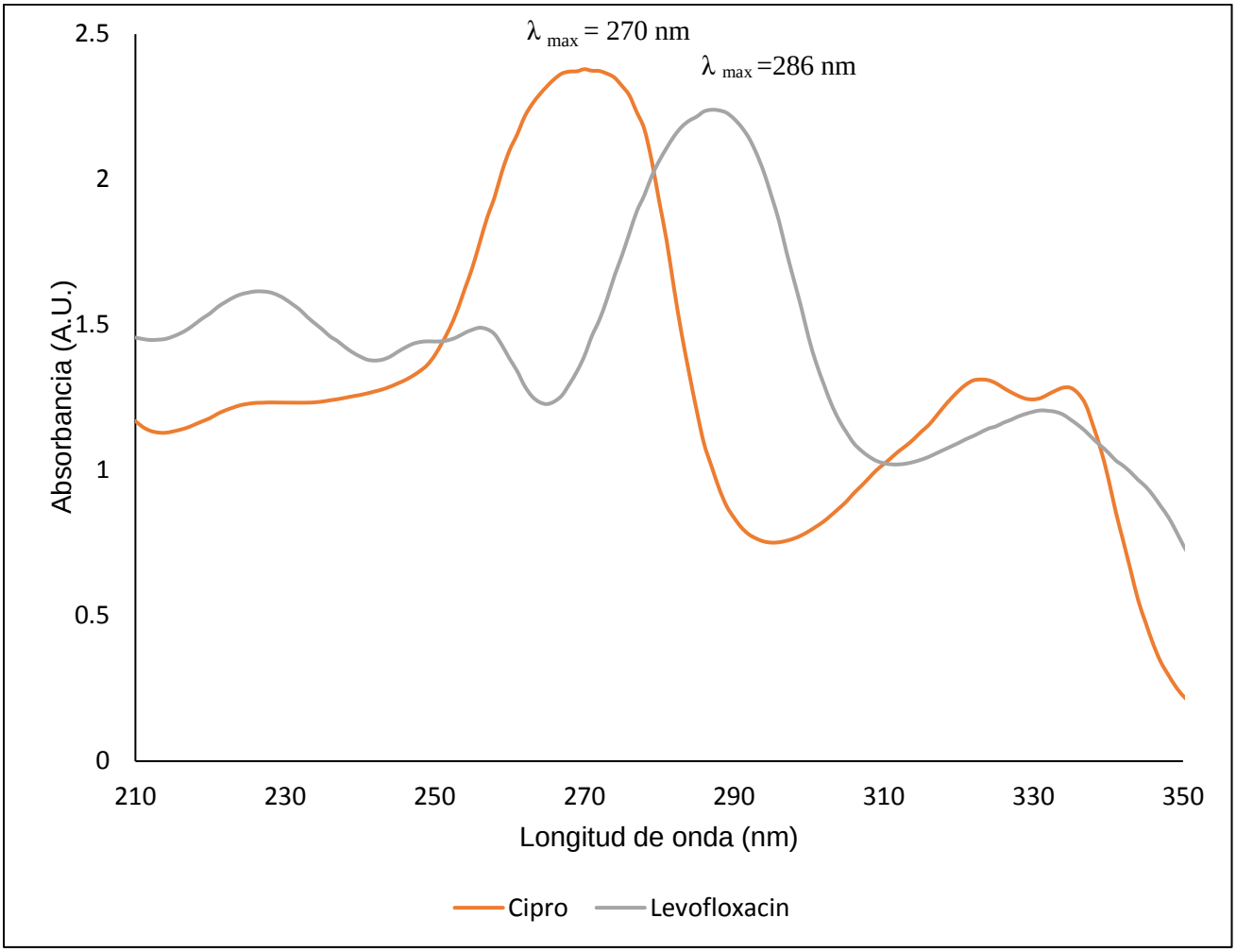

Figura 18. Espectro obtenido para la determinación de la longitud de onda máxima de distintos fármacos.

El tiempo de flujo se determinó luego de analizar las soluciones estándar de Cipro y Levo por separado. En la figura 19 se observa el cromatograma obtenido de estos fármacos. El cromatograma muestra que el tiempo de retención para Cipro es de 13.56 minutos y de 9.54 minutos para Levo.

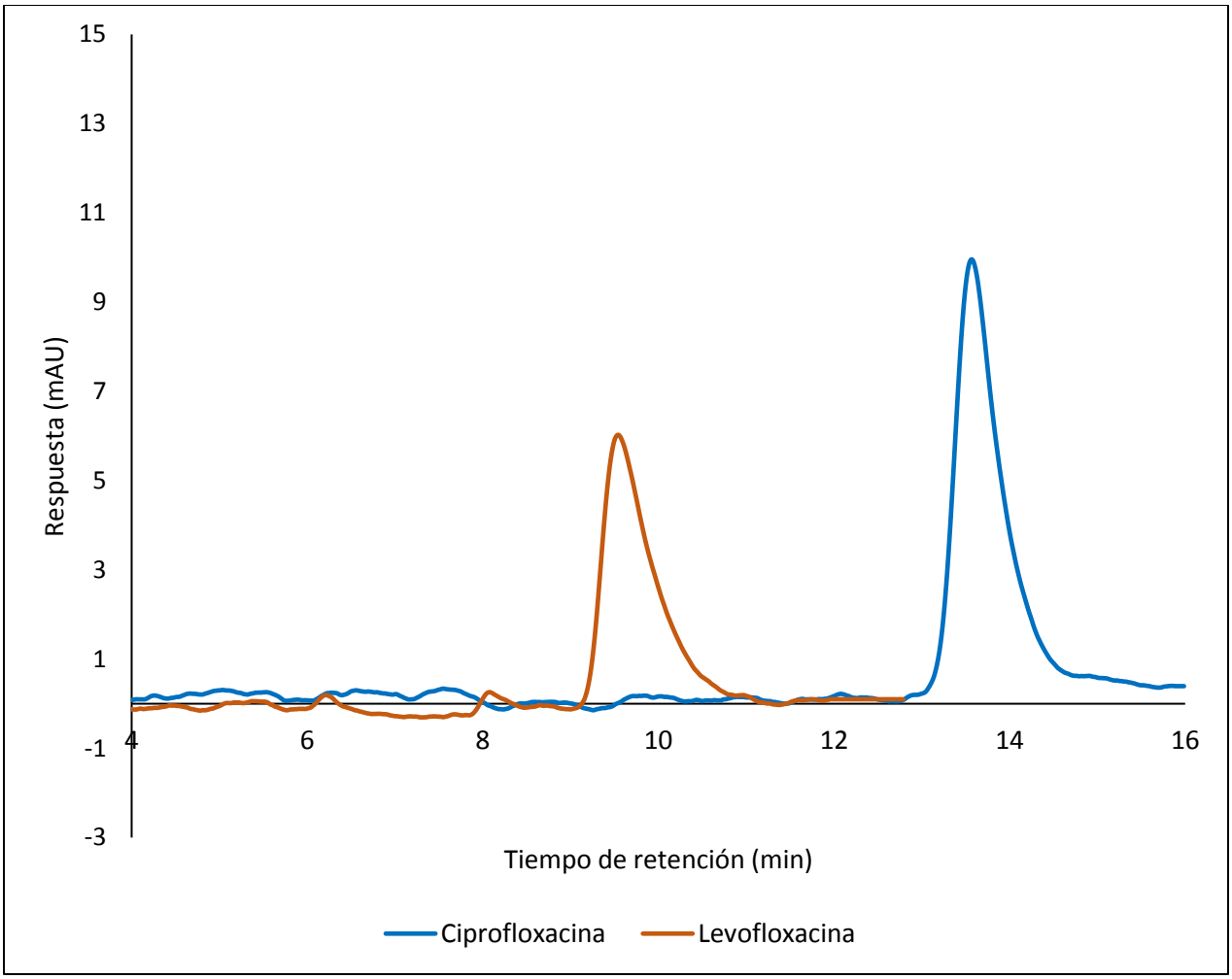

Figura 19. Cromatograma para Ciprofloxacina y Levofloxacina a 286nm para obtención del tiempo de retención para las sustancias puras.

3.4 Resultados y discusión

Para corroborar que la planta capturó los antibióticos se realizó una técnica de separación de compuestos y así determinar en qué parte de la planta se encontraba el fármaco. Para poder cuantificar la concentración de los antibióticos en las distintas partes de la planta, se realizó una curva de calibración para cada uno en un rango en concentración de $1.0x10^{-5}M$ a $10.0x10^{-5}M$ en triplicado. Los cromatogramas muestran un pico en el tiempo de retención de 13.56min para Cipro y un tiempo de retención de 9.54 min para Levo.

La curva de calibración se construyó graficando el área bajo la curva vs la concentración de los estándares. En la tabla 5 se muestran los datos utilizados para realizar las curvas de calibración.

Tabla 5. Datos experimentales para la curva de calibración de Ciprofloxacina y Levofloxacina. Área bajo la curva promedio en triplicado

Estándar	Concentración (M)	Área promedio Cipro (mAu)	Área promedio Levo (mAu)
Std 1	$1.00x10^{-5}$	92.26	59.32
Std 2	$2.00x10^{-5}$	162.30	128.05
Std 3	$4.00x10^{-5}$	386.58	260.44
Std 4	$6.00x10^{-5}$	618.96	448.75
Std 5	$8.00x10^{-5}$	830.35	608.81
Std 6	$10.00x10^{-5}$	1017.*91*	811.95

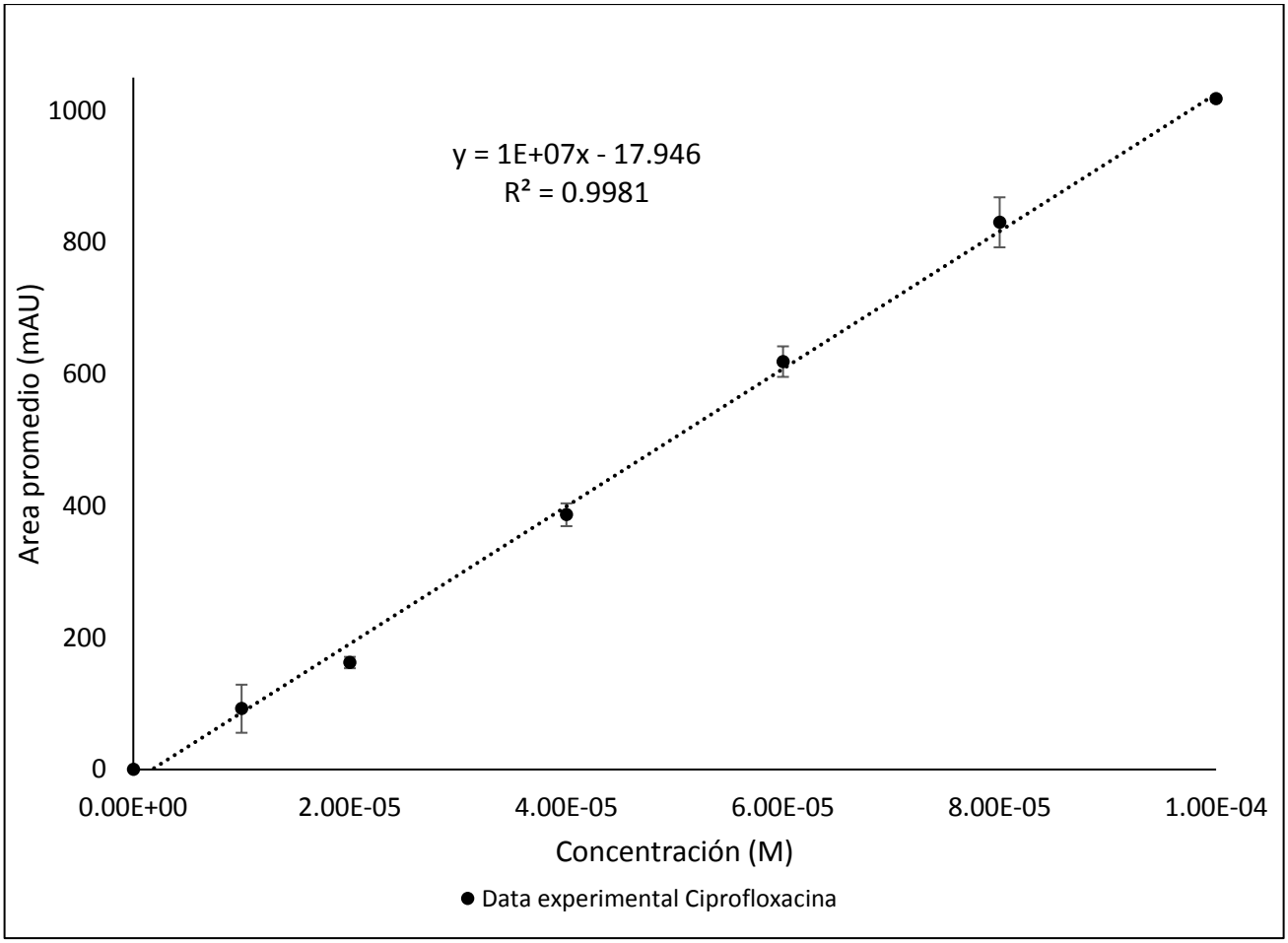

Figura 20. Curva de calibración de Ciprofloxacina a 286nm

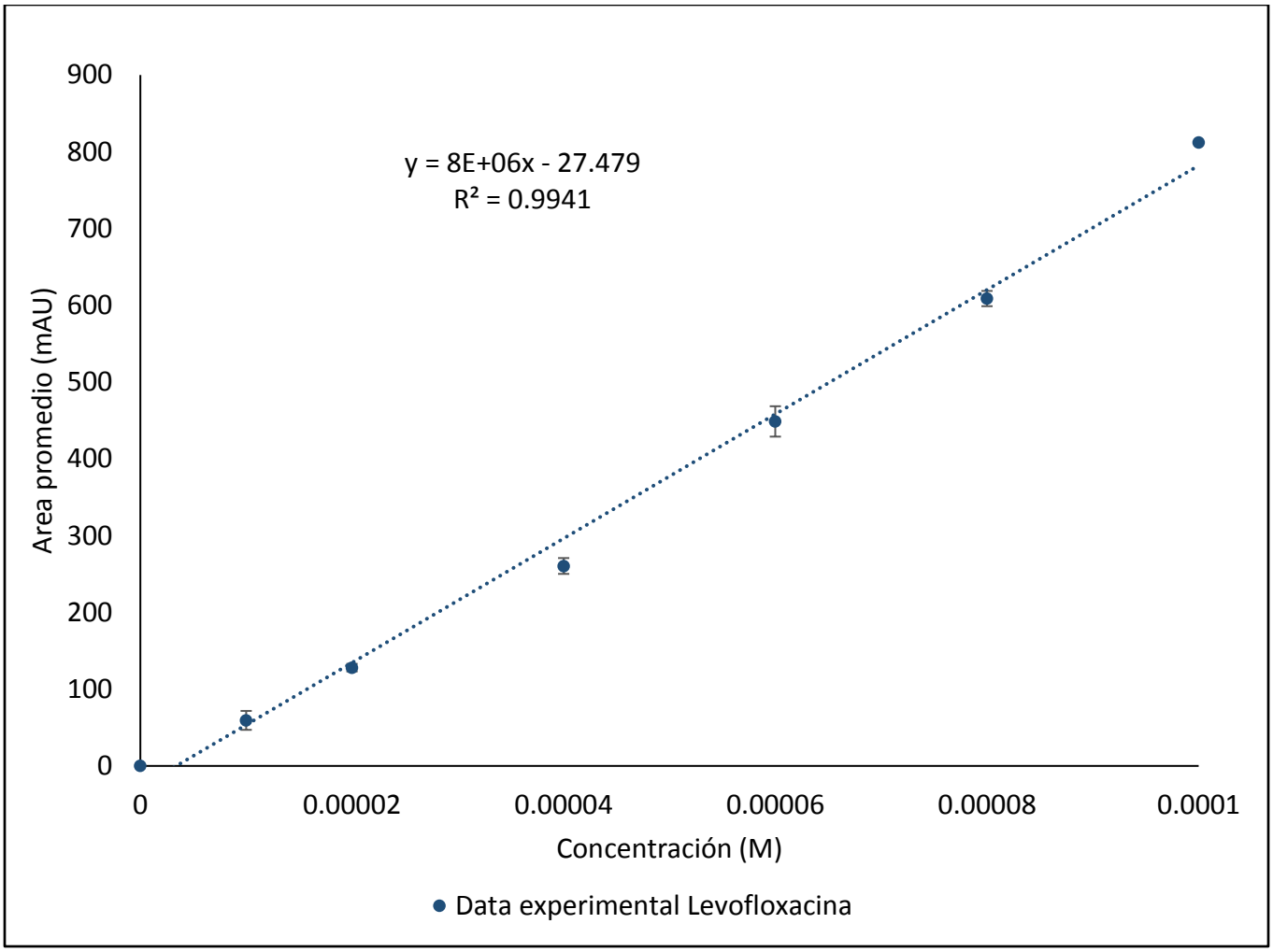

Figura 21. Curva de calibración para Levofloxacina a 286nm.

Utlizando la pendiente de las dos curvas de calibriación se calculó el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) para ambos antibióticos. El LOD para Ciprofloxacina fué de 3.26$x10^{-6}M$, y el LOQ 1.08$x10^{-5}M$,concentración que se encuentra por encima del STD1, por lo que ese valor no es completamente confiable, lo que justifica la magnitud de la barra de error. Para Levofloxacina el comportamiento es muy similar teniendo un LOD de 5.78$x10^{-6}M$ y un LOQ de 1.93$x10^{-5}M$.

Luego de realizar la curva de calibración se analizaron las partes de la planta por separado con el fin de determinar si la planta absorbió los antibióticos, y en qué tejidos pueden estar acumulando éstos medicamentos, o si la planta *L. leucocephala* lo está degradando. Cada parte se analizó en triplicado y se calculó el promedio.

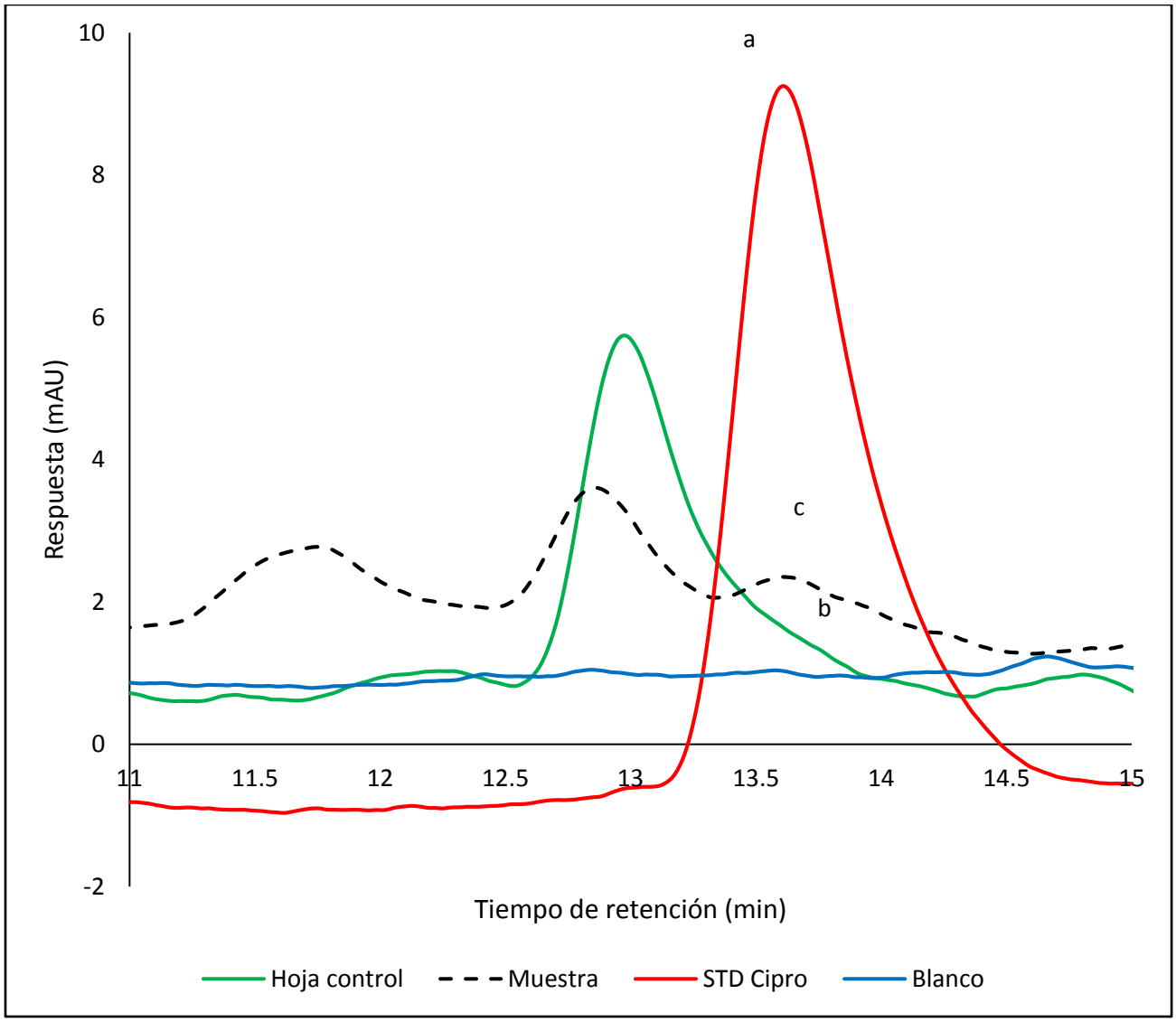

Figura 22. Cromatograma del análisis del extracto de la hoja de *L. leucocephala*. a) Estándar de Ciprofloxacina. b) extracto control de la planta. c) extracto de la planta en contacto con Ciprofloxacina.

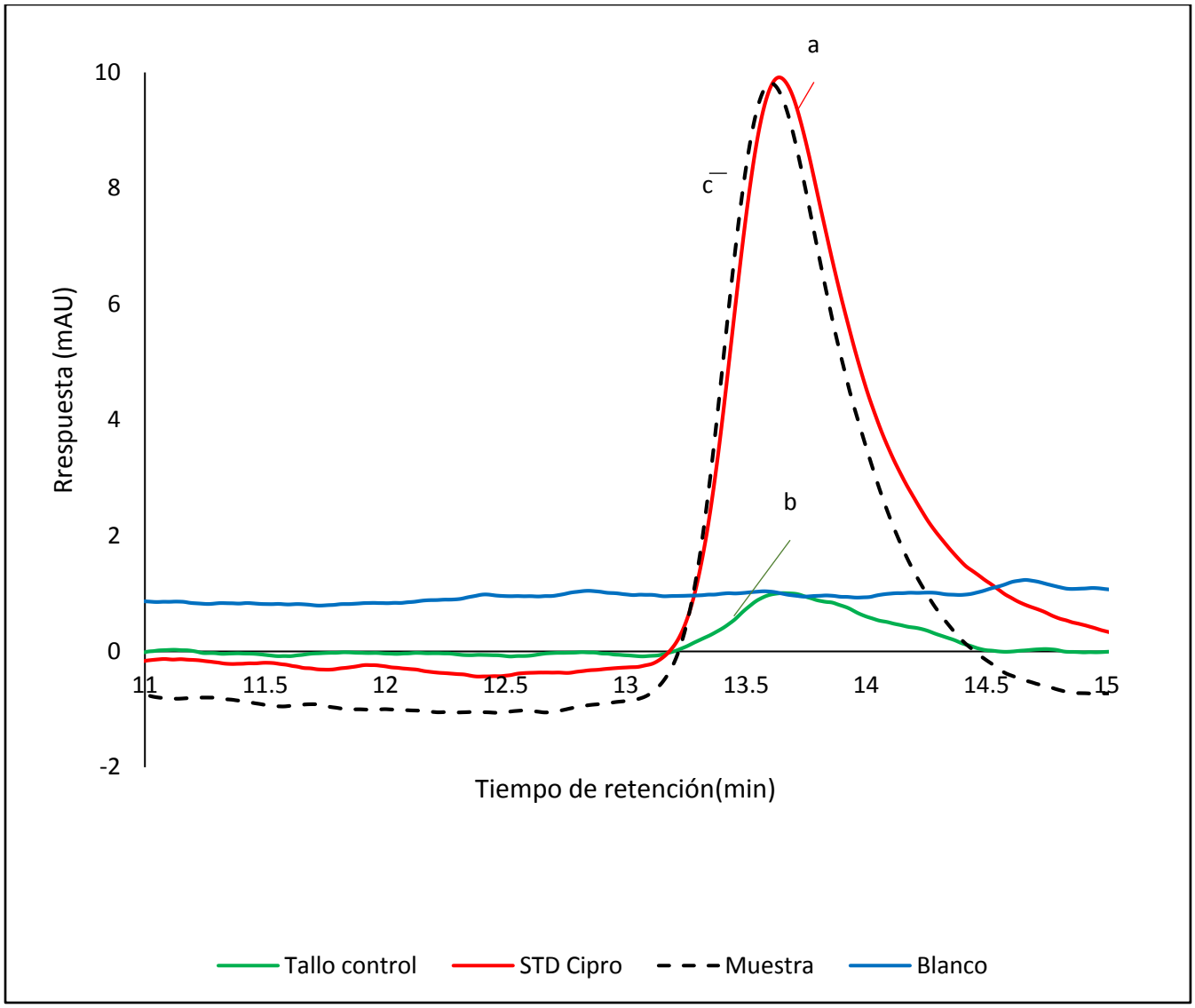

Figura 23. Cromatograma del análisis del tallo de *L. leucocephala*. a) Estándar de Ciprofloxacina. b) tallo control de la planta. c) Tallo de la planta en contacto con Ciprofloxacina.

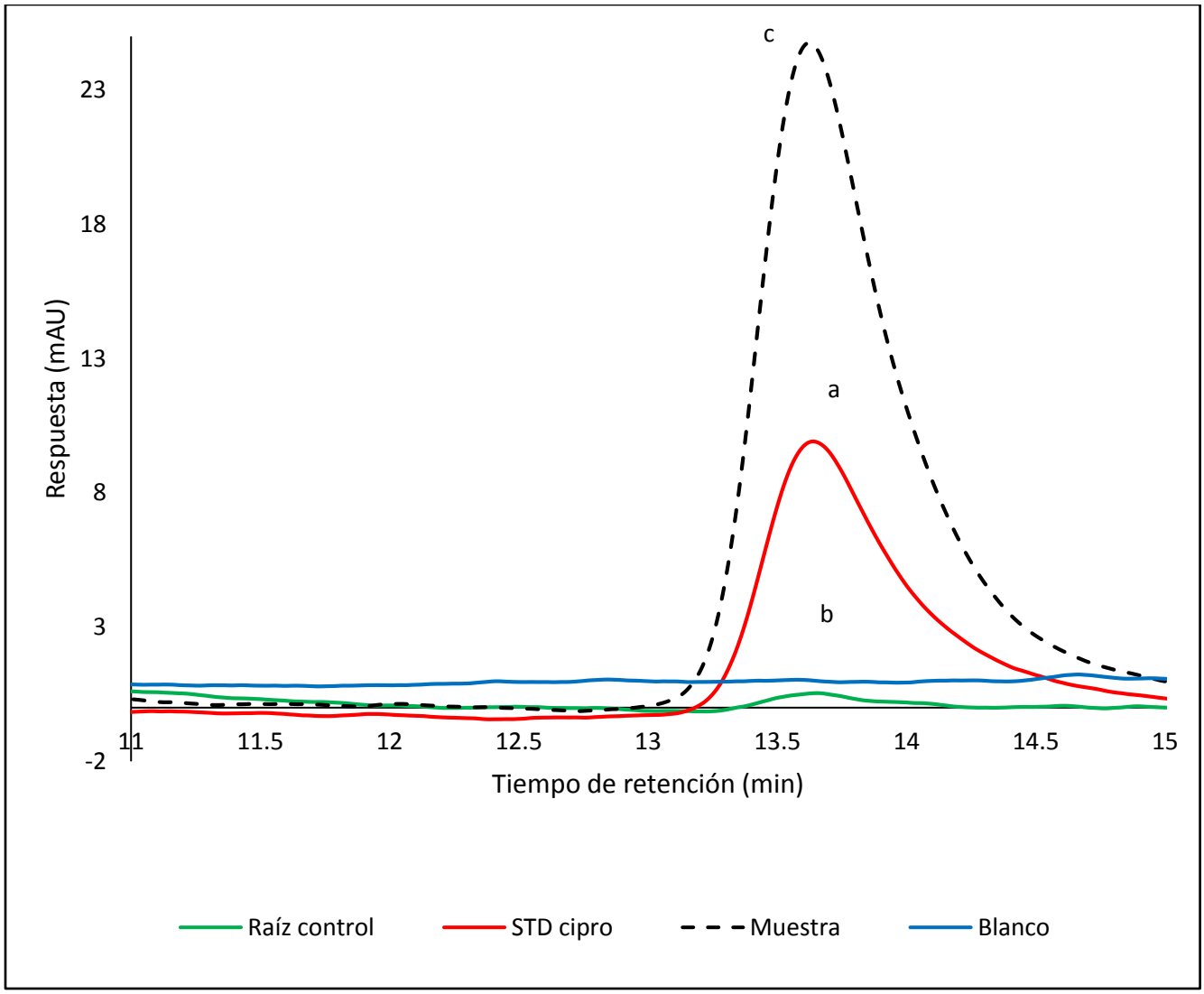

Figura 24. Cromatograma del análisis del extracto de la raíz de *L. leucocephala*. a) Estándar de Ciprofloxacina. b) Extracto control de la planta. c) Extracto de la planta en contacto con Ciprofloxacina.

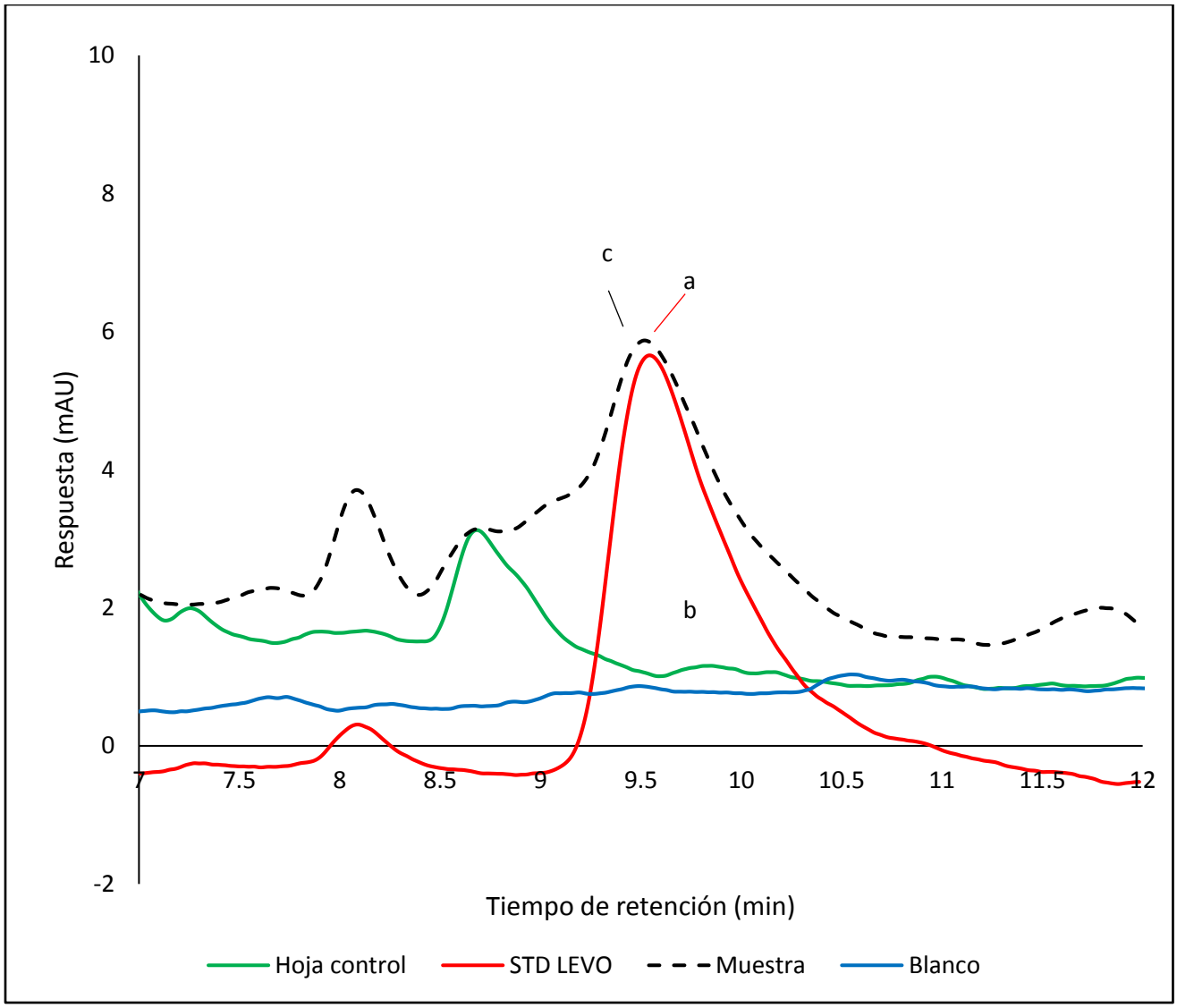

Figura 25. Cromatograma del análisis del extracto de la hoja de *L. leucocephala*. a) Estándar de Levofloxacina. b) Extracto control de la planta. c) Extracto de la planta en contacto con Levofloxacina.

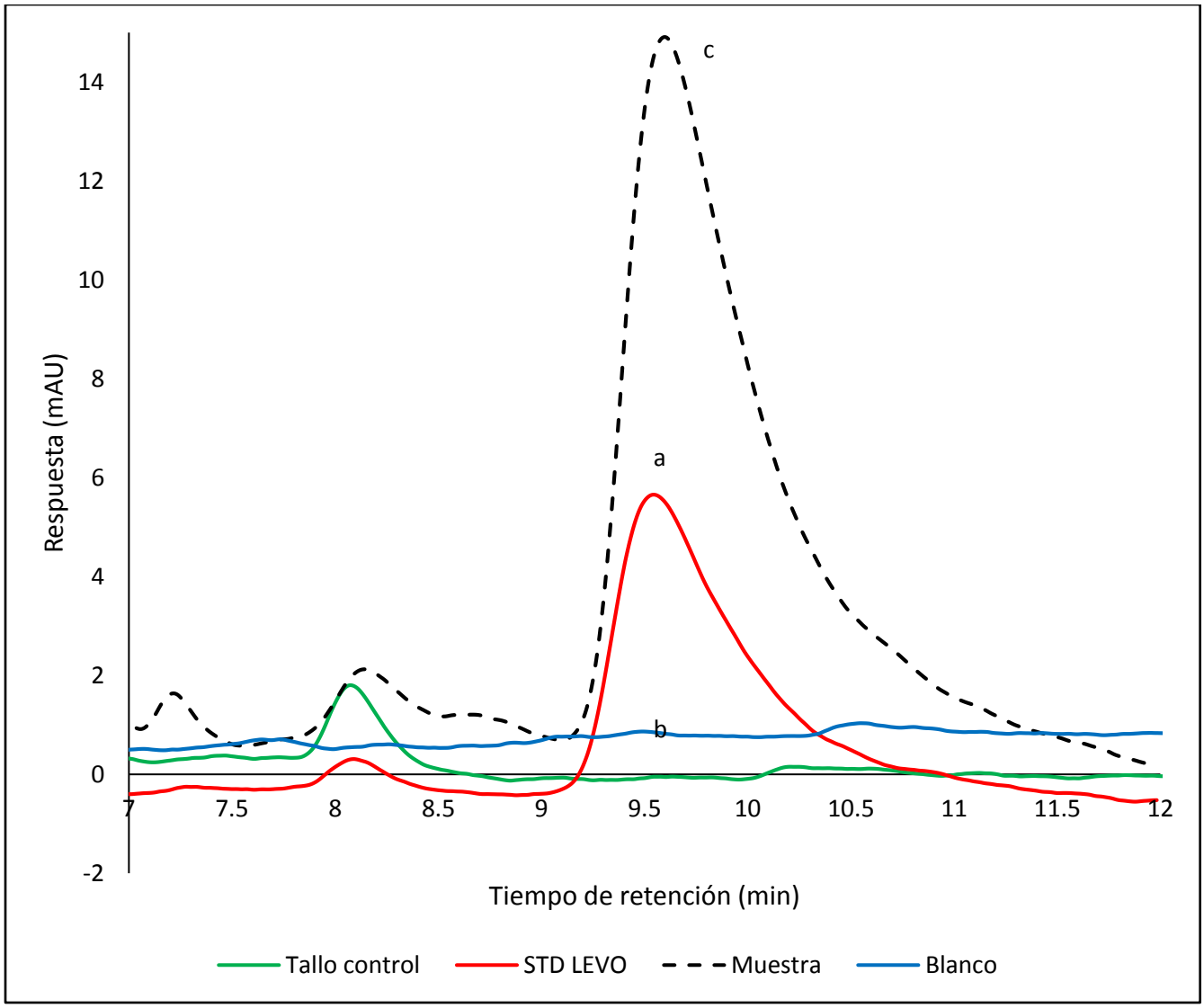

Figura 26. Cromatograma del análisis del extracto del tallo de *L. leucocephala*. a) Estándar de Levofloxacina. b) Extracto control de la planta. c) Extracto de la planta en contacto con Levofloxacina.

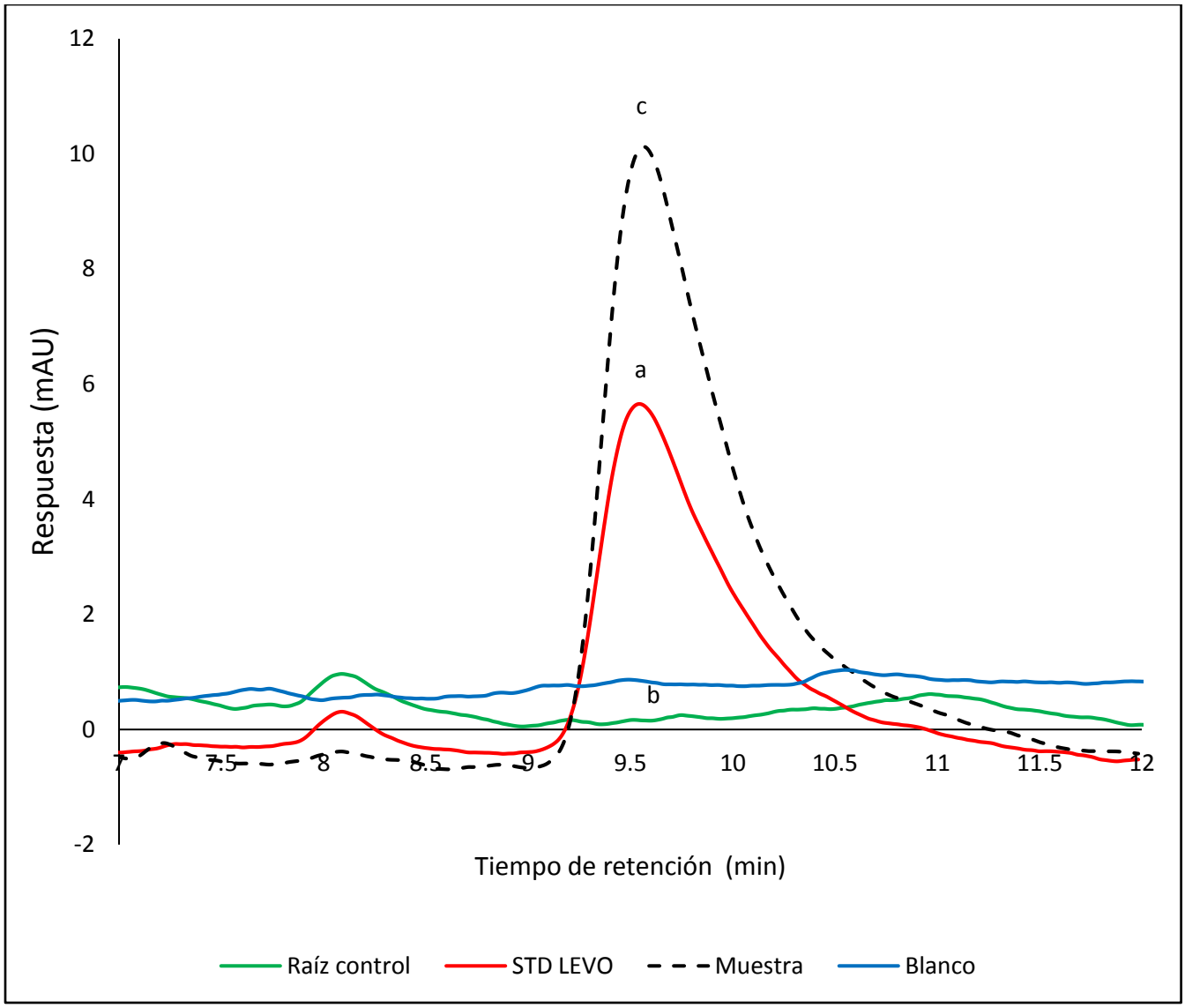

Figura 27. Cromatograma del análisis del extracto de la raíz de *L. leucocephala*. a) Estándar de Levofloxacina. b) Extracto control de la planta. c) Extracto de la planta en contacto con Levofloxacina preconcentrada.

Los cromatogramas que se muestran en las figuras 22 a la 27, fueron comparados con un estándar $4.0x10^{-5}$ M de cada antibiótico con el fin de identificar los compuestos en las partes de la planta. En la figura 22 y la figura 25 se muestra el cromatograma de la hoja de *L. Leucocephala* en contacto con el antibiótico. En estas figuras se puede observar un cambio en la señal entre la hoja control y la hoja que estuvo en contacto con el antibiótico en el tiempo de retención de 11.77min en Cipro y 8.10min en Levo. Con ambos antibióticos ocurrió un comportamiento similar, siendo más notable en Cipro. Esto se puede deber a una degradación del antibiótico o a la formación de un complejo. Este comportamiento es una interferencia en la señal del analito, ya que como se observa en la Figura 25, no hay una buena resolución entre esos compuestos, lo que no permite cuantificar con exactitud la concentración del analito. Como trabajo futuro se propone hacer estudios sobre la estructura de los antibióticos.

Luego de obtener los cromatogramas de las plantas contaminadas con Levo y Cipro, usando los datos obtenido en la regresión de los estándares, se logró calcular la concentración aproximada de la pre-concentración de los extractos con los antibióticos. Estos valores se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados obtenidos de la pre-concentración de los extractos de las plantas en sus respectivas partes.

Antibiótico	Concentración promedio (M) Hoja	Concentración promedio (M) Tallo	Concentración promedio (M) Raíz
Ciprofloxacina	$1.02(\pm 0.4)\text{x}10^{-5}$	$4.31(\pm 0.08)\text{x}10^{-5}$	$1.04(\pm 0.03)\text{x}10^{-4}$
Levofloxacina	$6.98(\pm 0.2)\text{x}10^{-5}$	$1.17(\pm 0.09)\text{x}10^{-4}$	$7.87(\pm 0.3)\text{x}10^{-5}$

Los valores que se muestran en la Tabla 6 son los resultados de la pre-concentración de las muestras, por lo que la concentración en algunos casos puede ser mayor a la del estándar utilizado como ocurre en la muestra de la raíz de Cipro (Figura 24) y en el tallo de Levo (Figura 26). De los valores obtenidos se pudo determinar dónde hay mayor concentración presente de los antibióticos. En el caso de Cipro la mayor cantidad se encuentra en la raíz con una concentración de $1.04x10^{-4}$ M. Sin embargo, para Levo la mayor cantidad se encuentra en el tallo a diferencia de Cipro, con una concentración de 1.17 $x10^{-4}$M, esto puede deberse a que Levo es ligeramente más soluble que Cipro facilitando así el transporte del fármaco hasta el tallo y hoja.

Los valores que se muestran en la Tabla 7 son los resultados calculados después de tomar en consideración el factor de dilución, este valor es uno aproximado teniendo en cuenta el volumen luego de pre-concentrar (~10.00mL)

Tabla 7. Resultados obtenidos teniendo en cuenta la pre-concentración de los extractos de las plantas en sus respectivas partes.

Antibiótico	Concentración promedio (M) Hoja	Concentración promedio (M) Tallo	Concentración promedio (M) Raíz
Ciprofloxacina	$4.10\text{x}10^{-7}$ (0.0339 mg)	$1.72\text{x}10^{-6}$ (0.1427mg)	$4.17\text{x}10^{-4}$ (0.3457 mg)
Levofloxacina	$2.79\text{x}10^{-6}$ (0.2524 mg)	$4.66\text{x}10^{-6}$ (0.4213 mg)	$3.15\text{x}10^{-6}$ (0.2844 mg)

Tabla 8. Porciento promedio de remoción aproximado de los antibióticos en la planta en sus respectivas partes.

Antibiótico	Porciento (%p/p) Hoja	Porciento (%p/p) Tallo	Porciento (%p/p) Raíz	Porciento (%p/p) total
Ciprofloxacina	1.0	4.3	10.5	15.8
Levofloxacina	7.0	11.7	7.9	26.6

En resumen, se puede indicar tomando en cuenta los resultados observados que cuando se suma la concentración presente en raíz, tallo y hoja de la planta; el resultado permite calcular el porciento total absorbido por la planta, como se observa en la Tabla 8. Para obtener los porcientos, se utilizó el peso fórmula para calcular los gramos de los antibióticos presentes en las partes de la planta y los gramos pesados para la preparación de la solución en la que se colocaron las plantas. Estos resultados demuestran que la mayor cantidad de Cipro se encuentran en la raíz con un 15.8%p/p y un 26.6%p/p para Levo.

IV. Conclusión

Luego de realizar los análisis, se logró determinar que toda la planta *L. Leucocephala* puede remover un 15.8% y 26.6% Cipro y Levo respectivamente. El porciento de Levo fue mayor que el de Cipro, esto se puede atribuir a la mayor solubilidad en agua del mismo. Cuando se comparan ambas técnicas se observa que en CV la concentración final de la solución es muy similar para ambos medicamentos $4.66x10^{-5}$M para Cipro y $4.40x10^{-5}$M para Levo, pero con el análisis de HPLC se observa que Cipro obtuvo un 15.8%p/p y Levo un 26.6%p/p. La diferencia en los resultados se puede deber a que los valores de LOD y LOQ de la técnica de CV para Cipro, fueron del orden de $1.35x10^{-5}$M y $4.38x10^{-5}$M, respectivamente. Y para Levo los valores de LOD y LOQ de la técnica de CV fueron de $8.35x10^{-6}$M y 2.78 $x10^{-5}$M, respectivamente.

L. Leucocephala resultó ser es una alternativa para la remoción de los contaminantes, Cipro y Levo. Los resultados obtenidos muestran que la planta remueve los antibióticos acumulando la mayor parte en la raíz para Cipro (10.5%p/p) o el tallo para Levo (11.7%p/p). Observando los cromatogramas se puede llegar a la conclusión de que hay presente productos de degradación o formación de complejos en la hoja, que se deben estudiar en un futuro. Se recomienda utilizar algunas de estas técnicas que darán luz sobre las estructuras de dichos cambios estructurales: HPLC-MS, RMN, IR, RAMAN, entre otras.

Estos resultados brindan una alternativa para eliminar ciertos contaminantes de los cuerpos de agua y mejorar el ambiente, evitando que se altere el ecosistema. Sin embargo, el emplear esta técnica en las PTAR no es una alternativa muy factible, pues las instalaciones al momento no lo permiten.

Los resultados obtenidos muestran la presencia de los antibióticos en la planta luego de seis días con un corto periodo de crecimiento de las plantas, por lo que aumentar el tiempo de crecimiento y de exposición puede mejorar el porciento de remoción. Dado que el LOD y el LOQ para Cipro en CV fueron del orden de $1.35x10^{-5}$M y $4.38x10^{-5}$M, respectivamente, y para Levo los valores de LOD y LOQ de la técnica de CV fueron de $8.35x10^{-6}$M y 2.78 $x10^{-5}$M, respectivamente, se recomienda hacer mejoras para que se puedan detectar concentraciones más bajas y poder aumentar el tiempo de exposición. Utilizar un amortiguador de fosfato como electrolito soporte puede mejorar la detección, además se puede realizar el estudio con un electrodo de mercurio. Por otra parte, se puede realizar una cromatografía de columna para recobrar los antibióticos de los extractos, al igual que de la solución Hoagland.

V. Referencias

1. Wilson, B. A.; Smith, V. H.; deNoyelles, F.; Larive, C. K., Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages. *Environ. Sci. Technol.* **2003,** *37* (9), 1713-1719.

2. Ferguson, P. J.; Bernot, M. J.; Doll, J. C.; Lauer, T. E., Detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in near-shore habitats of southern Lake Michigan. *Sci. Total Environ.* **2013,** *458*, 187-196.

3. Blair, B. D.; Crago, J. P.; Hedman, C. J.; Klaper, R. D., Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chemosphere* **2013,** *93* (9), 2116-2123.

4. Zhang, D.; Gersberg, R. M.; Ng, W. J.; Tan, S. K., Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: a review. *Environ. Pollut.* **2014,** *184*, 620-639.

5. Larsson, D. J.; de Pedro, C.; Paxeus, N., Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J. Hazard. Mater.* **2007,** *148* (3), 751-755.

6. Reif, R.; Santos, A.; Judd, S. J.; Lema, J. M.; Omil, F., Occurrence and fate of pharmaceutical and personal care products in a sewage treatment works. *J. Environ. Monit.* **2011,** *13* (1), 137-144.

7. Girardi, C.; Greve, J.; Lamshöft, M.; Fetzer, I.; Miltner, A.; Schäffer, A.; Kästner, M., Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. *J. Hazard. Mater.* **2011,** *198*, 22-30.

8. Li, X.; Zheng, W.; Kelly, W. R., Occurrence and removal of pharmaceutical and hormone contaminants in rural wastewater treatment lagoons. *Sci. Total Environ.* **2013,** *445*, 22-28.

9. Goel, S., Antibiotics in the Environment: A Review. In *Emerging Micro-Pollutants in the Environment: Occurrence, Fate, and Distribution*, ACS Publications: 2015; pp 19-42.

10. Hawkshead, J., Hospital wastewater containing pharmaceutically active compounds and drug-resistant organisms: a source of environmental toxicity and increased antibiotic resistance. *J Residuals Sci Technol* **2008,** *5* (2), 51-60.

11. Yamil, N. An Evaluation of Wastewater Treatment by Ozonation for Reductions in Micropollutant Toxicity to Fish. PhD thesis, Trent University, Peterborough, Ontario Canada, 2016.

12. Yang, B.; Meng, L.; Xue, N., Removal of five fluoroquinolone antibiotics during broiler manure composting. *Environ. Technol.* **2017,** (just-accepted), 1-33.

13. Uslu, B.; Bozal, B.; Kuscu, M. E., Anodic voltammetry of ciprofloxacin and its analytical applications. *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal* **2010,** *3* (1).

14. Idowu, O. R.; Peggins, J. O., Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004,** *35* (1), 143-153.

15. Appelbaum, P.; Hunter, P., The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000,** *16* (1), 5-15.

16. Paton, J.; Reeves, D., Fluoroquinolone antibiotics. *Drugs* **1988,** *36* (2), 193-228.

17. Kamberi, M.; Tsutsumi, K.; Kotegawa, T.; Kawano, K.; Nakamura, K.; Niki, Y.; Nakano, S., Influences of urinary pH on ciprofloxacin pharmacokinetics in humans and antimicrobial activity in vitro versus those of sparfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999,** *43* (3), 525-529.

18. Batt, A. L.; Bruce, I. B.; Aga, D. S., Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. *Environ. Pollut.* **2006,** *142* (2), 295-302.

19. Diab, N.; Abu-Shqair, I.; Salim, R.; Al-Subu, M., The behavior of ciprofloxacin at a DNA modified glassy carbon electrodes. *Int. J. Electrochem. Sci* **2014,** *9*, 1771-1783.

20. Yi, H.; Li, C., Voltammetric determination of ciprofloxacin based on the enhancement effect of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) at carbon paste electrode. *Russ. J. Electrochem.* **2007,** *43* (12), 1377-1381.

21. Dodd, M. C.; Shah, A. D.; von Gunten, U.; Huang, C.-H., Interactions of fluoroquinolone antibacterial agents with aqueous chlorine: reaction kinetics, mechanisms, and transformation pathways. *Environ. Sci. Technol.* **2005,** *39* (18), 7065-7076.

22. Radi, A.; El-Sherif, Z., Determination of levofloxacin in human urine by adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry on a glassy carbon electrode. *Talanta* **2002,** *58* (2), 319-324.

23. Lone, M. I.; He, Z.-l.; Stoffella, P. J.; Yang, X.-e., Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progresses and perspectives. *J Zhejiang Univ Sci B* **2008,** *9* (3), 210-220.

24. Dhir, B., *Phytoremediation: Role of aquatic plants in environmental clean-up*. Springer: 2013.

25. Bisht, S. S.; Mishra, R.; Praveen, B.; Panda, A. K.; Panda, K. K.; Routray, A., Phytoremediation Studies on Coal Mine Waste and Coal Fly Ash by Leucaena Leucocephala. *Int. J. Biosci., Biochem. Bioinf.* **2011,** *1* (4), 252.

26. Jayanthy, V.; Geetha, R.; Rajendran, R.; Prabhavathi, P.; Sundaram, S. K.; Kumar, S. D.; Santhanam, P., Phytoremediation of dye contaminated soil by Leucaena leucocephala (subabul) seed and growth assessment of Vigna radiata in the remediated soil. *Saudi J. Biol. Sci.* **2014,** *21* (4), 324-333.

27. Barceló-Quintal, I. D.; Gardezi, A. K.; Cetina-Alcalá, V. M.; Solís-Correa, H. E.; López-Chuken, U. J., Copper Accumulation in Leucaena leucocephala by Mycorrhizae Glomus Sp. Zac–19 in Symbiosis with Rhizobium.

28. Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; Leddy, J.; Zoski, C. G., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. Wiley New York: 1980; Vol. 2.

29. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; Gómez, M. d. C. M., Principios de análisis instrumental. **2001**.

30. Knoth, H.; Scriba, G.; Buettner, B., Electrochemical behavior of the antifungal agents itraconazole, posaconazole and ketoconazole at a glassy carbon electrode. *Pharmazie* **2015,** *70* (6), 374-378.

31. Peng, X.; Tan, J.; Tang, C.; Yu, Y.; Wang, Z., Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim, and chloramphenicol antibiotics in urban waters in China. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008,** *27* (1), 73-79.

32. Corradini, D., *Handbook of HPLC*. CRC Press: 2010.

33. Lagishetty, R.; Nagarajan, P., Qualitative Analysis of Antibiotic Residues in Hospital Effluents from South India. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2015,** *32* (1), 315-320.

34. Areizaga-Martínez, H. Novel Bio-Inspired And Sample Translation Approaches For The Raman Detection Of Pharmaceutical Agents In Water. PhD thesis, University of Puerto Rico at Mayaguez, 2016.