

TÉCNICAS ANALÍTICAS POR FLUORESCENCIA DE RAYOS X PARA ESTUDIOS IN VIVO DE LA RIZOFILTRACIÓN DE Y ZINC

Sbarato Viviana M.¹; Ruosi Gustavo¹; Sanchez Elisa¹; Piedra Dayana¹; Marques Julián¹; Aloy Gastón¹; Errasti Jeremías¹; Muller Edwin¹; Olmedo Francisco¹; Gil Silvia P.¹ y Perez Roberto D.²

1: Facultad de Ciencias Agropecuarias
Ing. Agr. Felix Aldo Marrone 746 – Ciudad Universitaria – Córdoba
e-mail: vsbarato@agro.unc.edu.ar

2: Facultad de Matemática, Astronomía, Física y Computación – UNC
Universidad Nacional de Córdoba
Av. Medina Allende 2144– Ciudad Universitaria – Córdoba
e-mail: danperez@famaf.unc.edu.ar

Resumen. *La rizofiltración de aguas contaminadas basada en el cultivo de las plantas acuáticas *Salvinia biloba* y *Lemna minor* ha demostrado una gran capacidad para absorber metales pesados de soluciones acuosas. Las plantas aplicadas en el proceso de fitorremediación se convierten en residuos contaminados con metales, por lo que se retiran del lecho de agua y deben recibir tratamiento y disposición adecuados. Los datos sobre la localización del metal en los órganos de las plantas son importantes para la optimización de los procedimientos. El propósito de esta investigación es determinar la ubicación de las partes más contaminadas como así también el tiempo de exposición requerido para la saturación de las plantas empleadas. Se utilizó la microfluorescencia de rayos x (micro-XRF) para la detección in vivo de metales pesados en las dos especies mencionadas anteriormente. Por medio de la técnica micro-XRF con focalización del espectro emitido por un tubo de rayos x con ánodo de molibdeno se realizaron mediciones en hojas, raíces y tallos de ejemplares expuestos a diferentes concentraciones de Cu y de Zn en diferentes períodos de tiempo. Coincidente con resultados aportados por la bibliografía, se encontró una relación de incremento de la concentración con el tiempo de exposición y con la concentración inicial de los metales en las soluciones. Para ambos metales, se aprecia una mayor concentración en las raíces que en las partes aéreas. En la micro-XRF aplicada in-vivo la medición es directa. Los pocos requerimientos de preparación de muestra ya sea por métodos físicos o químicos le da ventajas prácticas frente a otras técnicas analíticas. Además, es factible el análisis in situ con el montaje de los dispositivos de enfoque y de detección con un tubo de rayos x portátil.*

Palabras clave: rizofiltración, in vivo, metales, cobre, zinc.

1. INTRODUCCIÓN

Las ciudades y sus desechos junto con todos los procesos industriales están contribuyendo con una enorme carga de residuos no tratados que van a dar a los cursos que atraviesan las zonas rurales, impactando en la calidad de los suelos y de las aguas superficiales y subterráneas. Algunos elementos traza son nutrientes esenciales para las plantas y los animales, como es el caso del cobre (Cu) y del zinc (Zn). Aún así, cuando estos elementos están presentes en sistemas ambientales a concentraciones superiores a ciertos niveles pueden ser tóxicos para los seres vivos. La perspectiva del presente trabajo es la de prevención de la contaminación ambiental e intenta aportar información ágil y práctica para el saneamiento de aguas mediante la tecnología de rizofiltración.

La fitorremediación es una tecnología que utiliza plantas para degradar, extraer, contener o inmovilizar contaminantes contenidos en el suelo y agua. La fitorremediación es el conjunto de tecnologías que utilizan plantas para limpiar sitios contaminados. Este concepto incluye aquellas técnicas que eran conocidas por años en agricultura para la resolución de problemas ambientales. Las plantas contribuyen a impedir que el viento, la lluvia y las aguas subterráneas extiendan la contaminación. Se deben de estudiar los efectos en la cadena trófica y en el medioambiente. Si bien la factibilidad de su empleo aún está siendo evaluada desde diferentes perspectivas, los estudios que se disponen coinciden en señalar que se trata de una tecnología más limpia, simple, efectiva y aún de menor costo, en relación con los métodos fisicoquímicos que se usan en la actualidad, tales como el reemplazo de suelos, la solidificación, el lavado o la incineración y en caso de aguas precipitación, intercambio iónico y filtración, etc. (U.S. Environmental Protection Agency, 2000, U.S. Environmental Protection Agency, 2001.)

Dentro del extenso campo de acción que abarca la fitorremediación, se encuentra contenida la rizofiltración. La rizofiltración es la captación de los contaminantes de un medio acuoso en las raíces de plantas por absorción, adsorción o precipitación. Existe una gran cantidad de trabajos sobre diversas variedades de plantas susceptibles de ser aplicadas en la rizofiltración. Muchas de estas plantas, como *Spirodela polyrhiza*, *Eichornia crasipes*, *Lemna minor*, *Salvinia sp*, forman parte de la flora de nuestro país lo que facilita considerablemente la implementación de la rizofiltración en Argentina. (Rezania, 2016).

Las plantas para fitorremediación se escogen privilegiando aquellas con alta distribución, alta disponibilidad, fácil crecimiento y extensa bibliografía sobre su comportamiento. La rizofiltración requiere plantas con un rápido crecimiento y alta tasa de absorción de metales. Una vez confirmada la eficiencia en fitorremediación de la planta seleccionada, se debe asegurar su adaptación a las condiciones climáticas en el sitio de aplicación. Dentro de las plantas acuáticas que cumplen esos requisitos se encuentran el acordeón de agua (*Salvinia biloba*) y la lenteja de agua (*Lemna minor*), que son las que han sido empleadas en el presente trabajo. (Casares, 2012).

Los sistemas de rizofiltración deben ser monitoreados y periódicamente evaluados para determinar su efectividad. Debido a que la rizofiltración es una tecnología emergente, no se ha establecido aun un procedimiento estándar para la evaluación de su rendimiento. Aunque todavía el proceso no es completamente entendido, se cree que el mecanismo por el cual la raíz capta metales pesados es el mismo que transporta micronutrientes esenciales. Durante

este proceso, metales pesados con iguales estados de oxidación compiten por los mismos sitios en los transportadores moleculares (O’Keeffe *et al.*, 1984, Rahmani y Sternberg, 1999.). De los trabajos reportados se puede afirmar que el monitoreo debe ser prolongado para demostrar con certeza la efectividad del proceso y para tomar decisiones sobre el tratamiento de los productos resultantes (Kroukamp, 2016, Břendová, 2018). En virtud de esto resulta de suma utilidad la aplicación de sistemas de monitoreo optimizados que simplifiquen los procesos de medición requeridos aportando indicadores confiables.

Cuantificación de contaminantes metálicos

En los procedimientos analíticos para determinar el grado de eficiencia de las plantas en la captación de contaminantes metálicos por rizofiltración, se debe medir la concentración de metales en el medio acuoso y en las plantas. La cuantificación de metales en el medio acuoso no es suficiente para el monitoreo del sistema; cuando el sistema pierde eficiencia es necesario identificar las plantas que ya no absorben contaminantes metálicos para proceder a reemplazarlas. Para esto es necesario analizar metales pesados en las plantas. La mayoría de las técnicas analíticas aplicadas para la detección de metales pesados son destructivas, como es el caso de la espectroscopía por absorción atómica (De la Rosa *et al.*, 2004.) o la espectroscopía de plasma de acoplamiento inductivo (Chua, 1998, Yun, 1998.).

Recientemente, trabajos pioneros sobre análisis *in vivo* de metales pesados en plantas han sido realizados usando XRF con radiación de sincrotrón (Scheckel *et al.*, 2004, Hokura *et al.*, 2006, Bulska *et al.*, 2006.). En estos trabajos se utilizan sistemas ópticos de rayos x de alta eficiencia que en su fase experimental están mostrando excelentes resultados. En un futuro cercano se espera que la combinación de estos sistemas ópticos con tubos de rayos x compactos transforme gradualmente a la XRF en una técnica de banco de alta versatilidad y bajo costo. De esta forma, los análisis por XRF sobre plantas *in vivo* que actualmente se realizan en laboratorios no convencionales, podrían ser aplicados *in situ* para la resolución de problemas concretos de la industria, como en el caso de la fitorremediación.

En el presente trabajo se propone la aplicación de la espectrometría por micro-fluorescencia de rayos x (micro-XRF) para la determinación de metales pesados *in vivo*. La implementación de una técnica analítica para la determinación *in vivo* de metales pesados en plantas tiene dos importantes ventajas desde el punto de vista analítico. Se evita la preparación de muestras, lo que resulta laborioso en la mayoría de las técnicas analíticas alternativas; y los resultados pueden ser obtenidos *in situ* sin tener que trasladarse a un laboratorio de mayor complejidad. Estas ventajas conducen a una considerable simplificación en el proceso de cuantificación que puede ser sumamente valioso en el monitoreo de procesos de fitorremediación, como ya fue adelantado previamente. Así es que se ha utilizado la micro-XRF (Kalnicky y Singhvi, 2001, Perez *et al.*, 2016, Perez *et al.*, 2010.) para realizar estudios *in vivo* del contenido de metales pesados en plantas.

La aplicación de esta técnica analítica se encuentra con la complejidad de las muestras de tejido biológico. Se presentan intensidades de micro-XRF desarrolladas a partir de deducciones basadas en el modelo propuesto por Kieser (1979) ya que el espesor de las muestras está en una zona donde no valen las aproximaciones más conocidas de muestras de espesor suficiente grande ni suficientemente delgado. En este trabajo se muestran algunas

aplicaciones del modelo desarrollado arrojan valores coherentes en la acumulación comparativa de metales en distintas partes de las plantas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Cuando un haz de rayos x incide sobre la materia ocurre el efecto fotoeléctrico que produce la excitación de los átomos blanco los cuales inmediatamente pierden la energía adquirida emitiendo radiación característica. Al proceso de emisión de fotones característicos luego de una fotoabsorción se lo denomina fluorescencia de rayos x (XRF, por sus siglas en inglés). Como su nombre lo indica, la radiación característica es propia de cada elemento de manera que puede utilizarse para identificar y cuantificar los elementos de una muestra incógnita. Una de las configuraciones más empleadas en la espectrometría por XRF es la dispersiva en energía (EDXRF). La EDXRF se caracteriza por utilizar detectores de estado sólido que miden directamente la energía e intensidad de los fotones de rayos x. Entre sus principales características se encuentran la simultaneidad de medición en un amplio rango de energías, cuya clasificación se realiza mediante un sistema electrónico digital que discrimina energías. La fuente de excitación comúnmente empleada es un tubo de rayos x diseñado y fabricado específicamente para optimizar el análisis de los elementos de interés.

El microanálisis por fluorescencia de rayos x (micro-XRF) es una de las más recientes ramas analíticas derivadas de la XRF convencional capaz de determinar la composición elemental de una muestra en forma no destructiva con resolución espacial micrométrica. La configuración más empleada es igual a la EDXRF con el agregado de componentes ópticos que concentran el haz de excitación a regiones micrométricas. Recientemente, los alcances de esta técnica han sido extendidos con el advenimiento de la óptica de capilares. Los capilares son capaces de transportar rayos x cuyas energías permiten la implementación del microanálisis por rayos x con resolución espacial en dos y tres dimensiones. En comparación con otras técnicas instrumentales de microanálisis, la micro-XRF tiene la ventaja de permitir estudiar elementos en tejidos biológicos en estado muy próximo al natural sin la incorporación de colorantes o compuestos especiales (Paunesku, 2006). La sensibilidad es alta y el análisis es no destructivo con una mínima dosis de radiación sobre la muestra. Como contra se puede mencionar que la resolución espacial por debajo de los micrones solo es posible en fuentes de rayos x de alto flujo como sincrotrones de tercera generación (Bohic, 2001.). Aún así, resoluciones espaciales en el orden de los micrones son accesibles con la incorporación de óptica de rayos x a un tubo convencional de rayos x (Engström, 1989.).

Instrumentación

El tubo de rayos x disponible para el desarrollo de esta línea de investigación es marca Philips modelo PW2275/20 con ánodo de Mo tipo Long Fine Focus con una potencia máxima de 3 kW y voltaje máximo de 60 kV. El ánodo de Mo se encuentra en el plano horizontal cubriendo un área de $12 \mu\text{m} \times 0,4 \mu\text{m}$. En la ventana del tubo que se utilizó en las presentes mediciones, las dimensiones efectivas del ánodo fueron $0,04 \mu\text{m} \times 12 \mu\text{m}$. La ventana es una lámina de Be de $300 \mu\text{m}$ de espesor. Un monocapilar de vidrio se colocó a 50 cm del ánodo con su eje de simetría inclinado 6° con respecto al plano horizontal, que corresponde a la dirección de

máxima emisión. El monocapilar tiene una longitud de 11 cm y permitió enfocar los rayos x en un haz de sección transversal circular de diámetro 0,17 mm.

La incidencia del haz sobre la muestra ocurre con un ángulo de 75° medido desde la superficie de la muestra. La Figura 1 presenta un diagrama esquemático del espectrómetro XRF donde se muestran las trayectorias de los haces de rayos x incidente y detectado. El ángulo del haz detectado respecto de la superficie de la muestra es de 15° . El detector de la radiación emitida es de estado sólido, de silicio, marca AMPTEK modelo XR100T con una resolución en energía de 180 eV para la línea $K\alpha$ del Mn.

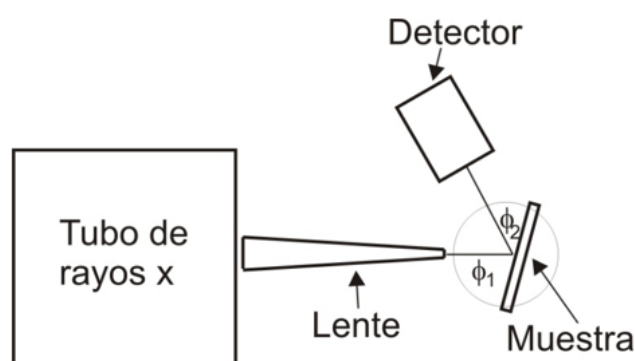


Figura 1. Diagrama esquemático del espectrómetro XRF.

En el análisis de muestras delgadas de matriz liviana como los tejidos biológicos, el espesor de las muestras afecta la señal registrada e impide la comparación de los resultados entre distintas muestras. Es por tanto imprescindible normalizar las señales registradas mediante un procedimiento eficiente. La mejor manera de desarrollar un procedimiento con estas características consiste en emplear un modelo teórico que describa con precisión la intensidad fluorescente. En el presente trabajo se ha desarrollado el procedimiento requerido empleado el modelo de parámetros fundamentales que ha probado su precisión en un amplio rango de aplicaciones (Kieser, 1979). Siguiendo este modelo, se determinó el espesor de la muestra en el punto de irradiación utilizando la dispersión incoherente de las líneas características del tubo de rayos x de molibdeno: líneas $K\alpha$ (17,44 keV) y $K\beta$ (19,7 keV). Estas líneas tienen una atenuación diferente en la muestra y esa diferencia depende unívocamente del espesor. Si N_α y N_β son las intensidades de las líneas $K\alpha$ y $K\beta$, respectivamente, el espesor t resulta por la ecuación (1).

$$t = \frac{(N_\alpha - N_\beta)}{(N_{\alpha 0} - N_{\beta 0})} t_0 \quad (1)$$

donde t_0 es el espesor conocido de una muestra particular y $N_{\alpha 0}$ y $N_{\beta 0}$ son las correspondientes intensidades de las líneas $K\alpha$ y $K\beta$.

Para obtener la intensidad de fluorescencia se procede a corregir la intensidad I_Y del elemento de interés una vez que el espesor de la zona irradiada es conocido. Para ello se procede de acuerdo a la ecuación (2), considerando a la muestra de espesor intermedio:

$$I_{NY} = I_Y \frac{\hat{\mu}t}{(1 - \exp(-\hat{\mu}t))} \quad (2)$$

Aquí $\hat{\mu}$ es el coeficiente de atenuación efectivo de la muestra obtenido teóricamente asumiendo la composición elemental media de las plantas.

La intensidad XRF normalizada es directamente proporcional a la concentración peso en peso del elemento emisor. La constante de proporcionalidad se puede obtener con un estándar secundario de matriz similar al tejido biológico y con concentración conocida del átomo emisor.

Ensayos con *Salvinia biloba* y *Lemna minor*

Las plantas utilizadas provinieron de un estanque monocultivo que se mantiene al aire libre en el predio de la Dirección de Planeamiento Físico de la Universidad Nacional de Córdoba, en la ciudad universitaria. Una determinada biomasa se trasladó al invernáculo donde las plantas se aclimataron durante más de siete días en agua corriente de red a las condiciones de temperatura, humedad y luminosidad artificial con fluorescentes ciclo encendido/apagado de 8hs/16hs.

La localización de los metales en diferentes puntos de las plantas se estudió en ensayos estáticos a 96 horas en los cuales los individuos de la especie se expusieron a distintas concentraciones iniciales de Cu o de Zn. En la presente etapa de la investigación las plantas se mantuvieron en agua corriente de red. Ambas especies utilizadas habían mostrado, en este medio, buena tasa de crecimiento y de reproducción en los ensayos preliminares de análisis de comportamiento a lo largo de cuatro meses. El agregado de las soluciones con concentraciones conocidas de Cu y de Zn se realizó utilizando agua de red como solvente.

Los ejemplares de *Salvinia biloba* sometidos a las pruebas de rayos x que se describen en este trabajo se contaminaron durante abril de 2019, con temperaturas medias de 22°C aproximadamente. Las unidades experimentales consistieron en recipientes plásticos con un volumen de 1 L de medio de cultivo y 20 frondes de *Salvinia* y 10 individuos de *Lemna*. De igual manera se trataron los ejemplares de *Lemna minor*, que datan de ensayos de noviembre de 2018, con temperaturas medias de 25°C aproximadamente.

Las concentraciones iniciales de Cu y de Zn en cada tratamiento se obtuvieron a partir de soluciones stock de sulfato de cobre y de sulfato de zinc, ambos de grado analítico. Para los dos elementos, se realizaron preparados de 10, 20, 30, 40, 100, 200 y 400 ppm (1 ppm equivale a 1 mg/L). Uno de los tratamientos tenía solamente agua de red. En cada recipiente la cantidad de individuos de *Lemna* y frondes de *Salvinia* eran iguales y todos los recipientes idénticos contenían un litro del preparado correspondiente. No se ajustó el pH medio de cultivo, el mismo fue valorado con prueba test tornasol e indicó que son más ácidas las preparaciones de Cu (pH 4,5 a 5,5) que las de Zn (pH 5,5 a 6,5).

Para hacer las comprobaciones del modelo teórico que justifique la aplicación de esta técnica analítica en las determinaciones de metales en especies rizofiltrantes, se utilizó la instrumentación disponible en el laboratorio de Fluorescencia por Técnicas No Convencionales del Grupo de Espectroscopía Atómica y Nuclear, FaMAF. Para realizar los análisis las plantas se trasladaron desde el invernáculo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en recipientes con su misma solución.



Figura 2. Puntos irradiados en *Salvinia*.



Figura 3. Hojas y raíces de *Lemna*.

Las plantas se adhirieron por simple cohesión a un portamuestra de papel celofán, pegado a un marco de plástico para ser soportado en el arreglo experimental para medir por XRF. Para *Salvinia* se tomaron puntos cercanos al borde (B) y al centro (C) de las hojas y también en las raíces (R) (Figura 2). Para el caso de *Lemna*, de dimensiones mucho más pequeñas que la primera especie tratada (Figura 3), *solamente* se enfocó en el centro de una hoja y en un punto de una raíz. En cada caso se procuró que la hoja y la raíz irradiadas fueran de un mismo individuo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las mediciones realizadas en raíces de *Salvinia* indican que entre las 24 y las 96 horas aumenta la concentración de Cu entre 5 y 20%. En ese lapso de tiempo, para una concentración inicial de 20 ppm de Cu en la solución, el incremento fue de 20% mientras que el Cu sólo aumentó en un 5% cuando el tratamiento se encontraba en mezcla con 30 ppm de Zn. La mayor diferencia se refiere a las primeras 24 horas en las cuales, en presencia de Zn, la raíz mostró valores más altos para Cu. En cuanto a las hojas, la presencia de cobre es mayor en puntos del borde B que del centro C de la hoja (ver Figura 2). Las variaciones muestran la tendencia a disminuir en el centro de la hoja mientras se incrementa en los bordes. Para tratamiento con concentración inicial de 40 ppm de Cu, los conteos en un punto de borde de hoja representaron hasta 380% más de los encontrados para puntos en el centro a las 24 horas de exposición incrementándose en un 25% y 130%, respectivamente, a las 96 hs.

Tabla 1. Intensidad XRF normalizada del elemento Cu al inicio, 24 y 96 horas de exposición

Muestra	Intensidad XRF normalizada del Cu		
	Inicio	24 horas	96 horas
Sal20cu_R	0,6806	14,5259	17,8517
Sal40cu_B		9,9646	12,4483
Sal40cu_C		2,0768	4,7692
Sal_400cu_B		49,0299	Sin dato
Sal_400cu_C		33,5923	39,5462
Sal_20cu30zn_R		27,3368	28,7083

La Tabla 1 muestra los valores de las intensidades XRF normalizadas provenientes del Cu obtenidas por la ecuación (2) al inicio, a las 24 hs y luego de 96 hs de tiempo desde el inicio del ensayo.

La Tabla 2 muestra algunos valores de las intensidades XRF normalizadas provenientes del Zn obtenidas por la ecuación (2) al inicio, a las 24 hs y luego de 96 hs de tiempo desde el inicio del ensayo. En cuanto a las hojas, la presencia de zinc es mayor en puntos del borde B que del centro C de la hoja (ver Figura 2). Tras las primeras 24 horas de exposición, mayor concentración en la solución, la intensidad XRF normalizada aumenta en todos los puntos observados. En el tratamiento 30 ppm de Zn y 20 ppm de Cu, las mediciones de Zn realizadas en raíces de *Salvinia* indican que entre las 24 y las 96 horas disminuye la concentración de Zn al 40%. En ese lapso de tiempo, para la misma solución mezcla declina levemente la intensidad XRF normalizada del centro de la hoja mientras que se duplica en el borde.

Tabla 2. Intensidad XRF normalizada del elemento Zn al inicio, 24 y 96 horas de exposición

Muestra	Intensidad XRF normalizada del Zn		
	Inicio	24 horas	96 horas
Sal20zn_C	0,4124	Sin dato	5,1349
Sal30zn_C		1,3644	Sin dato
Sal30zn_B		2,3662	Sin dato
Sal_20cu30zn_R		12,7668	5,1388
Sal_20cu30zn_C		3,9390	3,1639
Sal_20cu30zn_B		2,9010	4,0341

En cuanto a *Lemna*, la planta es menos resistente al invierno local y las primeras pruebas se iniciaron en la primavera 2018. Los experimentos presentados, correspondientes al final del mes de noviembre, indican que la aproximación para la cuantificación de la intensidad XRF normalizada para muestra de espesor finito, dada en la ecuación (2) también encaja, aunque bien podría simplificarse para usar la aproximación de muestra delgada. La Tabla 3 presenta los valores de intensidad para una misma planta sometida a una concentración de 200 ppm de Cu. A las 36 hs, la presencia de Cu en la raíz es superior en la raíz que en las hojas. Igual comportamiento ocurre a las 84 hs, aunque el ritmo de incremento en raíz fue de 150% y 100% en hojas. Cuando *Lemna* estuvo en la solución mezcla a 100 ppm de Cu y 200 ppm de Zn, el ritmo de incremento de Cu en hojas fue de 44% y el Zn no mostró variación en 48 horas.

Tabla 3. Intensidad XRF normalizada de los elementos Zn y Cu al inicio, 36 y 84 horas de exposición

Muestra	Intensidad XRF normalizada del Cu			Intensidad XRF normalizada del Zn		
	Inicio	36 horas	84 horas	Inicio	36 horas	84 horas
Lem200cu_C	0,4635	2,6175	5,2577	0,4204	Sin dato	Sin dato
Lem200cu_R		3,1209	7,8147		Sin dato	Sin dato
Lem100cu200zn_C		0,8804	1,2657		6,1604	6,2900

4. CONCLUSIONES

- A las concentraciones de Cu ensayadas y que van de 20 a 400 ppm en solución de agua corriente, *Salvinia* absorbió rápidamente en las primeras las 24 hs y luego siguió acumulando, aunque disminuyó su ritmo. A mayor concentración de Cu en la solución inicial, mayor resultó la presencia de Cu en los puntos R, B y C de la planta. Al estar en presencia de una solución mezcla con 30 ppm de Zn y 20 ppm de Cu se encontró un marcado aumento de la absorción a las 24 hs mientras que el ritmo de incremento neto en la acumulación fue menor que con igual cantidad de Cu sin estar mezclado con Zn. Se halló una tendencia de mayor acumulación en los bordes que en el centro de las hojas.
- Se está en la fase de prueba de los estándares de matriz similar a los tejidos irradiados para transformar las intensidades XRF normalizadas en concentraciones de Cu o de Zn y así dar una ponderación acerca del saneamiento propiamente dicho. Aún así, los resultados obtenidos y mostrados en la Tabla 1 indican que cuando el cobre alcanza las hojas hay desplazamiento hacia los bordes, lo que es coincidente con la observación de necrosis en los bordes a medida que la planta envejece. Los datos recabados dan cuenta de la acumulación de cobre preferentemente en las raíces de *Salvinia*. Sabiendo que el cobre se liberará nuevamente al necrosarse el tejido que lo alberga y que la raíz es el principal órgano acumulador se puede brindar una recomendación para el manejo en un sistema de rizofiltración: aunque secuencialmente en el lecho para no dejarlo sin cobertura, las plantas completas deben ser removidas periódicamente. Si el operador responsable contara con datos *in vivo* e *in situ* de la intensidad XRF normalizada en centro y borde de hojas y los ritmos de variación, tendría un indicador certero para la toma de decisiones.
- Para Cu y Zn se observó que en las primeras 24 horas las plantas respondieron con mayor absorción al estar en una solución mezcla. En el caso del cobre el comportamiento de las 72 horas posterior fue de un menor ritmo de acumulación en raíz mientras que el en caso del Zn, la planta no lo ha acumulado en la raíz y sí ha aumentado la concentración en hojas. Para brindar una pauta de manejo, es necesario realizar más determinaciones longitudinales pudiendo desvelar que se trata de una especie que no tiene a las raíces como órgano acumulador y que podría manejarse por cultivo de hojas sin extracción de raíces cuando se las utiliza para depuración de aguas contaminadas con zinc.
- Sobre *Lemna*, el ajuste de las intensidades XRF normalizadas a concentraciones depende también de la obtención del estándar para tener una muestra análoga con concentraciones conocidas de Cu y de Zn al cual hacer referencia. No obstante que al día de cierre de la presentación no se cuente con ese dato, el marco teórico nos asegura la proporcionalidad directa entre las intensidades normalizadas mostradas en la Tabla 3 y la concentración de los elementos correspondientes. Con los antecedentes de determinaciones de otros investigadores (Casares, 2012, Rezania, 2016.), la técnica de micro-XRF utilizando sistemas ópticos indica que *Lemna* acumula cobre preferentemente en raíz y que muestra un comportamiento de captación con un ritmo estabilizado a partir de las 36 horas de exposición al zinc.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Bohic, S., Simionovici, A., Snigirev, A., Ortega, R., Devès, G., Heymann, D., Schroer, C.G., 2001. Synchrotron hard x-ray microprobe: Fluorescence imaging of single cells. *Appl. Phys. Lett.* 78:3544-3546.
- Břendová K., Kubátová P., Száková J., TlustošP. (2018). Trace element leaching from contaminated willow and poplar biomass – Alaboratory study of potential risks. *Biomass and Bioenergy* 112 (2018)11–18.
- Bulska, E., Wysocka, I., Wierzbicka, M.L.G., Proost, K., Janssens, K., Falkenberg, G. (2006). In vivo investigation of the distribution and the local speciation in selenium in *Allium cepa* L. by means of microscopic x-ray absorption near-edge structure spectroscopy and confocal microscopic x-ray fluorescence analysis. *Anal. Chem.* 78(22): 7616-7624.
- Casares, M. V. (2012). Biodisponibilidad y toxicidad de metales pesados en aguas naturales con características físico-químicas extremas. Bases para su monitoreo y remediación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Chua, H. (1998). Bio-accumulation of environmental residues of rare earth elements in aquatic flora *Eichorniacrassipes* (Mart.) Solms in Guangdong Province of China. *Sci. Total Environ.* 214: 79- 85.
- De la Rosa, G., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., Parsons, J.G., Cano-Aguilera, I., Gardea-Torresdey, J.L. (2004). Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola Kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere* 55: 1159-1168.
- Engström, P., Larsson, S., Rindby, A., 1989. A 200 μm X-ray microbeam spectrometer. *Nucl. Instr. and Meth.* B36:222-226.
- Hokura, A., Onuma, R., Kitajima, N., Terada, Y., Saito, H., Abe, T., Yoshida, S., Nakai, I. (2006). 2-D x-ray fluorescence imaging of cadmium hyperaccumulating plants by using high-energy synchrotron radiation x-ray microbeam. *Chem. Lett.* 35:1246-1247.
- Kalnicky, D.J., Singhvi, R. (2001). Field portable XRF analysis of environmental samples. *J. Hazard. Mat.* 83: 93-122.
- Kieser R, Mulligan TJ. (1979). Prediction of mass absorption coefficients from inelastically scattered X-radiation for specimens of less than “infinite thickness”. *X-ray Spectrom* 8:164.
- Kroukamp E.M., Wondimu T., Forbes P.B.C. (2016). Metal and metalloid speciation in plants: Overview, instrumentation, approaches and commonly assessed elements. *Trends in Analytical Chemistry* 77 (2016)87–99
- O’Keeffe, D.H., Hary, J.K., Rao, R.A. (1984). Cadmium uptake by the water hyacinth: effect of solution factor. *Environ. Pollut.* 34: 133-136.
- Paunesku, T., Vogt, S., Maser, J., Lai, B., Woloschak, G. (2006). X-Ray Fluorescence Microprobe Imaging in Biology and Medicine. Review. *J. Cell. Biochem.* 99:1489–1502.
- Perez, R.D., Sanchez, H.J., Perez, C.A., Rubio, M. (2010). Latest developments and opportunities for 3D analysis of biological samples by confocal μ -XRF. *Radiation Physics and Chemistry* 79 (2010)195–200

Perez, R.D., Sosa C., Sbarato V., Leani J., Sánchez H.J. (2016). Determination of X-ray excitation spectra in micro X-ray fluorescence spectrometry with capillary optics. *Spectrochimica Acta Part B* 117 (2016) 23–28.

Rahmani, G.N.H., Sternberg, P.K. (1999). Bioremoval of lead from water using *Lemna minor*. *Biosource Technology* 70: 225-230

Rezania S., Mat Taibb S., Dina, M. F. M., Dahalanc F. A., Kamyab H. (2016). Comprehensive review on phytotechnology: Heavy metals removal by diverse aquatic plants species from wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 318: 587–599.

Scheckel, K.G., Lombi, E., Rock, S.A., McLaughlin, M.J. (2004). In vivo synchrotron study of thallium speciation and compartmentation in *Iberis intermedia*. *Environ. Sci. Toxicol.* 38: 5095-5100.

Yun, W., Pratt, S.T., Miller, R.M., Cai, Z., Hunter, D.B., Jarstfer, A.G., Kemner, K.M., Lai, B., Lee, H.R., Legnini, D.G., Rodriguez, W., Smith, C.I. (1998). X-ray imaging and x-raymicrospectroscopy of plants and fungi. *J. Synchrotron Radiat.* 5:1390-1395.

U.S. Environmental Protection Agency, 2000, Introduction to Phytoremediation, National Risk Management Research Laboratory, Office of Research and Development, EPA/600/R-99/107. Recuperado en 24 de abril de 2019, https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?Lab=NRMRL&dirEntryId=63433

U.S. Environmental Protection Agency, 2001. Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites. EPA/540/S-01/500. Recuperado en 24 de abril de 2019, https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/epa_540_s01_500.pdf