



Facultad de Ingeniería

Escuela de Ingeniería en Medioambiente

Ingeniería Ambiental

**Evaluación del efecto ecotoxicológico de soluciones de ketoprofeno sometidas a procesos de oxidación avanzada, sobre celomocitos de *Eisenia fetida* y semillas de *Lactuca sativa*.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA AMBIENTAL**

**AUTORA: Sofía Alejandra Vásquez Mella**

**PROFESOR GUÍA: Hernán Gaete Olivares**

**PROFESOR CO-GUÍA: Juan Ojeda Herrera**

**Valparaíso, 5 de diciembre de 2025**

## Agradecimiento

A mi familia por su apoyo incondicional durante todo este proceso. A mi mamá por estar conmigo en todas y siempre apoyarme a pesar de la distancia, su amor incondicional, sus palabras de ánimo y su confianza permanente fueron una fuente de fuerza en los momentos más desafiantes durante la carrera y aunque no estuviera físicamente cerca, su presencia y apoyo fueron esenciales para llegar hasta aquí, por lo que, este logro también es suyo. A mi hermana quien estuvo cerca mío en cada paso, quiero darle las gracias por ser un pilar fundamental durante este proceso. A mi bebé de cuatro patitas Greta, quien se unió durante este proceso, gracias por ser la distracción y compañía más linda que me ha dado Valparaíso. A mi papá, por su guía durante mi vida universitaria y por el esfuerzo incondicional con el que siempre buscó apoyarme en todo lo que estaba a su alcance. A mi hermano, por estar siempre presente cuando más lo necesitaba.

A mis amigos y amigas, gracias por ser un apoyo y compañía. Sus palabras, ánimos y su energía hicieron que este camino fuera más liviano y significativo. Agradezco cada conversación y cada momento de celebración y contención que compartimos durante estos años. Su amistad fue un soporte indispensable durante estos años, fuera de casa. A mi amiga Aracelli, quiero dedicarle un agradecimiento especial. Me hubiera encantado que pudiéramos cerrar juntas este proceso, como tantas veces lo imaginamos, pero sé que muy pronto estaremos celebrando nuestros logros como colegas. Gracias por tu amistad, por tu apoyo sincero y por haber sido una parte tan importante de este camino.

Al profesor Hernán Gaete, por su dedicación, su paciencia y por cada uno de sus consejos que me ayudaron a crecer como estudiante y como persona. Gracias por creer en esta investigación y en mi capacidad para desarrollarla. Al profesor Juan Ojeda, por su buena disposición y la dedicación con la que me acompañó durante este proceso en mi investigación.

A la Escuela de Medio Ambiente, por brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente y desarrollar este trabajo de investigación en sus instalaciones. A la Facultad de Farmacia por facilitar materiales y laboratorio necesarios para el desarrollo experimental.

A mi perrita Lupe que la extraño todos los días y me hubiera encantado que me hubiera acompañado hasta esta etapa tan importante para mí. Y por último a mi abuela Rosa Lincolao Painecura que sé que estaría muy orgullosa de lo que estoy logrando.

A todas las personas que de algún modo aportaron a este proyecto, muchas gracias.

## Resumen

La presencia de fármacos en el ambiente se ha transformado como una problemática emergente de creciente preocupación debido a su persistencia y potencial efecto tóxico sobre organismos no objetivos. Entre ellos el ketoprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo de uso extendido en medicina humana y veterinaria, ha sido identificado en aguas residuales y suelos agrícolas en concentraciones suficientes para provocar efectos subletales. Los sistemas de tratamiento convencionales presentan baja eficiencia para su eliminación, lo que ha impulsado el desarrollo de procesos de oxidación avanzada, como la fotólisis por radiación UV-A y la fotocatalisis heterogénea con dióxido de titanio. Sin embargo, persiste la incertidumbre sobre si los productos intermedios generados durante estos tratamientos mantienen o incrementan la toxicidad del compuesto original, afectando potencialmente a los organismos expuestos en ecosistemas terrestres y acuáticos.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto del ketoprofeno antes y después de su tratamiento mediante fotólisis y fotocatalisis sobre celomocitos de *Eisenia fetida* y semillas de *Lactuca sativa*. Para ello, se prepararon disoluciones de ketoprofeno a concentraciones de 1,5, 10 y 20 mg L<sup>-1</sup>, las cuales fueron sometidas a radiación UV-A, con y sin catalizador de TiO<sub>2</sub> y posteriormente se evaluaron mediante bioensayos ecotoxicológicos estandarizados de tiempo de retención del rojo neutro en celomocitos de *E. fetida* y de germinación y elongación radicular e hipocotilar en semillas de *L. sativa*.

Los resultados muestran que el ketoprofeno sin tratar provocó una reducción en la estabilidad lisosomal de los celomocitos, observándose una disminución del tiempo de retención del rojo neutro desde 90 minutos en el control hasta 30,7 minutos a 20 mg L<sup>-1</sup>, lo que representó una inhibición del 65,9 %. En *Lactuca sativa*, el fármaco generó efectos fitotóxicos evidenciados por una reducción de la germinación hasta un 86,7 % y una inhibición del crecimiento hipocotilar del 40,2 % en la concentración más alta. Tras la exposición a radiación UV-A, el efecto sobre la membrana celular de los celomocitos disminuyó, aumentando el TRRN a 40 minutos en 20 mg L<sup>-1</sup> y reduciendo la inhibición hipocotilar a 35,8 %. El tratamiento fotocatalítico con TiO<sub>2</sub> promovió una recuperación aún mayor: el TRRN aumentó a 44,3 minutos, la germinación se mantuvo sobre 93 % en todas las concentraciones, y la inhibición del hipocótilo disminuyó a 28,6 % en 20 mg L<sup>-1</sup>. Aun así, se detectó una toxicidad residual atribuible a la formación de compuestos intermedios oxigenados, lo que sugiere una mineralización incompleta del fármaco.

En conclusión, la fotocatalisis heterogénea con TiO<sub>2</sub> constituyó una alternativa eficaz para disminuir el efecto tóxico del ketoprofeno en los organismos evaluados, aunque no eliminó completamente sus efectos. Este enfoque basado en bioensayos permitió identificar los cambios en la respuesta biológica asociados a los tratamientos fotoquímicos, aportando evidencia experimental sobre la relevancia de evaluar la seguridad ambiental de los efluentes tratados mediante metodologías biológicas sensibles.

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Contaminantes emergentes	3
1.2. Ketoprofeno	6
1.3. Tratamientos de oxidación avanzada	8
1.4. Celomocitos de <i>Eisenia fetida</i>	12
1.5. Bioensayo de tiempo de retención rojo neutro en celomocitos de <i>Eisenia fetida</i>	15
1.6. Semillas de <i>Lactuca Sativa</i>	16
1.7. Bioensayo de fitotoxicidad con semilla de <i>Lactuca Sativa</i>	17
1.8. Normativa aplicada	19
<b>2. Problema</b>	<b>21</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>22</b>
3.1. Objetivo general	22
3.2. Objetivos específicos	22
<b>4. Materiales y métodos</b>	<b>23</b>
4.1. Materiales	23
4.1.1. Reactivos químicos	23
4.1.2. Organismos biológicos	23
4.1.3. Equipos y materiales de laboratorio	24
4.2. Procedimiento experimental	24
4.2.1. Grupos experimentales	24
4.2.2. Bioensayo de tiempo de retención rojo neutro en celomocitos de <i>Eisenia fetida</i>	25
4.2.3. Bioensayo de fitotoxicidad con semilla de <i>Lactuca sativa</i>	26
4.3. Análisis estadístico	26
4.4. Cálculo de inhibición	27
<b>5. Resultados</b>	<b>29</b>
5.1. Efecto de ketoprofeno sobre el tiempo de retención rojo neutro en celomocitos de <i>Eisenia fetida</i>	29
5.2. Efecto del ketoprofeno sobre la germinación, elongación radicular e hipocotilar en semillas de <i>Lactuca Sativa</i>	30
5.3. Análisis de las respuestas biológicas en los bioensayos de toxicidad aguda	31
5.3.1. Bioensayo tiempo de retención rojo neutro en celomocitos de <i>Eisenia fetida</i>	31
5.3.2. Bioensayo de fitotoxicidad con semilla de <i>Lactuca sativa</i>	35
5.4. Cálculo de inhibición	46
<b>6. Discusión</b>	<b>49</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>51</b>
<b>8. Referencias bibliográficas</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>61</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.1.</b> Sustancias monitoreadas por la UE (European Commission, 2020) .....	<b>6</b>
<b>Tabla 1.2.</b> Características fisicoquímicas del Ketoprofeno (PubChem, 2025) .....	<b>7</b>
<b>Tabla 5.1.</b> Tiempo de retención rojo neutro en celomocitos de <i>Eisenia fetida</i> .....	<b>29</b>
<b>Tabla 5.2.</b> Germinación, elongación radicular e hipocotilar en semillas de <i>Lactuca sativa</i> .....	<b>30</b>
<b>Tabla 5.3.</b> Inhibición de los tratamientos en TRRN de <i>Eisenia fetida</i> .....	<b>46</b>
<b>Tabla 5.4.</b> Inhibición de los tratamientos en la germinación de <i>Lactuca sativa</i> .....	<b>47</b>
<b>Tabla 5.5.</b> Inhibición de los tratamientos en la elongación radicular de <i>Lactuca sativa</i> . Valores negativos indican estímulo de crecimiento .....	<b>47</b>
<b>Tabla 5.6.</b> Inhibición de los tratamientos en la elongación del hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> .....	<b>48</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Resumen gráfico de contaminantes emergentes (Kumar et al., 2022) .....	<b>4</b>
<b>Figura 1.2.</b> Estructura química del Ketoprofeno (Bor et al., 2015) .....	<b>7</b>
<b>Figura 1.3.</b> Espectro de radiación ultravioleta (Manzano, 2020) .....	<b>11</b>
<b>Figura 1.4.</b> Caracteres externos de una lombriz de tierra (Reines et al., 1998) .....	<b>13</b>
<b>Figura 1.5.</b> Corte transversal de una lombriz de tierra (Reines et al., 1998) .....	<b>13</b>
<b>Figura 1.6.</b> Celomocitos de <i>Eisenia fetida</i> (Marcano, L et al., 2018) .....	<b>14</b>
<b>Figura 1.7</b> Morfología de la semilla y la plántula de lechuga <i>Lactuca sativa</i> (Castillo, 2004) .....	<b>17</b>
<b>Figura 4.1.</b> Cámara de radiación UV -A (Facultad farmacia, Universidad de Valparaíso) .....	<b>25</b>
<b>Figura 5.1.</b> Tiempo de retención del rojo neutro en celomocitos de <i>Eisenia fetida</i> expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ) .....	<b>31</b>
<b>Figura 5.2.</b> Tiempo de retención del rojo neutro en <i>Eisenia fetida</i> expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado mediante radiación UV-A. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ) .....	<b>32</b>
<b>Figura 5.3.</b> Tiempo de retención del rojo neutro en <i>Eisenia fetida</i> expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado mediante el sistema fotocatalítico UV-A + TiO <sub>2</sub> . Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ) .....	<b>32</b>
<b>Figura 5.4.</b> Comparación del tiempo de retención del rojo neutro en celomocitos de <i>Eisenia fetida</i> expuesta a ketoprofeno sin irradiar y ketoprofeno tratado con radiación UV-A durante. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos por concentración ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento UV - A, los cuales presentan diferencias significativas respecto a la exposición sin irradiar .....	<b>33</b>
<b>Figura 5.5.</b> Comparación del tiempo de retención del rojo neutro en celomocitos de <i>Eisenia fetida</i> expuesta a ketoprofeno sin irradiar y ketoprofeno tratado con radiación UV-A en presencia de TiO <sub>2</sub> . Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos por concentración ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A + TiO <sub>2</sub> , los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto a la exposición sin irradiar .....	<b>34</b>

<b>Figura 5.6.</b> Comparación del tiempo de retención del rojo neutro en celomocitos de <i>Eisenia fetida</i> expuesta a ketoprofeno tratado con radiación UV-A y ketoprofeno tratado con radiación UV-A + TiO <sub>2</sub> . Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos por concentraciones ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A +TiO <sub>2</sub> , los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento con UV-A .....	<b>35</b>
<b>Figura 5.7.</b> Germinación de <i>Lactuca sativa</i> expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ) .....	<b>36</b>
<b>Figura 5.8.</b> Germinación de <i>Lactuca sativa</i> expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado con radiación UV-A. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ) .....	<b>36</b>
<b>Figura 5.9.</b> Germinación de <i>Lactuca sativa</i> expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado mediante fotocátalisis de UV-A + TiO <sub>2</sub> . Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ) .....	<b>37</b>
<b>Figura 5.10.</b> Comparación de germinación de <i>Lactuca sativa</i> expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar y tratado con radiación UV-A. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre exposiciones por concentración ( $p < 0,05$ ) .....	<b>38</b>
<b>Figura 5.11.</b> Comparación de germinación de <i>Lactuca sativa</i> expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar y tratado mediante fotocátalisis de UV-A + TiO <sub>2</sub> . Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre exposiciones por concentración ( $p < 0,05$ ) .....	<b>38</b>
<b>Figura 5.12.</b> Comparación de germinación de <i>Lactuca sativa</i> expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado con radiación UV-A y fotocátalisis de UV-A + TiO <sub>2</sub> . Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos por concentración ( $p < 0,05$ ) .....	<b>39</b>
<b>Figura 5.13.</b> Elongación radicular de semillas de <i>Lactuca sativa</i> expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ) .....	<b>39</b>
<b>Figura 5.14.</b> Elongación radicular de semillas de <i>Lactuca sativa</i> expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno irradiado con UV -A. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ) .....	<b>40</b>

**Figura 5.15.** Elongación radicular de semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno irradiado con UV -A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones (p < 0,05) .....40

**Figura 5.16.** Comparación de elongación radicular en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar y tratado con radiación UV-A. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tipo de exposición por concentración (p < 0,05). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto a la exposición de ketoprofeno sin irradiar.....41

**Figura 5.17.** Comparación de elongación radicular en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar y tratado con radiación UV-A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tipo de exposición por concentración (p < 0,05). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A + TiO<sub>2</sub>, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto a la exposición de ketoprofeno sin irradiar.....42

**Figura 5.18.** Comparación de elongación radicular en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado con radiación UV-A y mediante fotocatalisis UV-A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos por concentraciones (p < 0,05). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A + TiO<sub>2</sub>, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento con solo UV-A .....42

**Figura 5.19.** Elongación del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones (p < 0,05) .....43

**Figura 5.20.** Elongación del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado con luz UV-A. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones (p < 0,05) .....43

**Figura 5.21.** Elongación del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado con luz UV-A y dióxido de titanio. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones (p < 0,05) .....44

**Figura 5.22.** Comparación de elongación del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar y tratado con luz UV-A durante. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tipo de exposición por concentración ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto a la de ketoprofeno sin irradiar .....**44**

**Figura 5.23.** Comparación de elongación del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar y tratado con luz UV-A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tipo de exposición por concentración ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A + TiO<sub>2</sub>, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto al de ketoprofeno sin irradiar.....**45**

**Figura 5.24.** Comparación de elongación del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado con luz UV-A y con luz UV-A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A + TiO<sub>2</sub>, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento con sólo UV-A .....**46**

## **Acrónimos**

**AINE:** Antiinflamatorios no esteroideos.

**ANOVA:** Análisis de varianza.

**CEs:** Contaminantes emergentes.

**EPA:** Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos.

**PFAS:** Compuestos perfluorados.

**POAs:** Procesos de oxidación avanzada.

**PPCPs:** Productos farmacéuticos y de cuidado personal.

**PTARs:** Plantas de tratamiento de aguas residuales.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**TiO<sub>2</sub>:** Dióxido de titanio.

**TRRN:** Tiempo de retención rojo neutro.

## 1. Introducción

En las últimas décadas, los ecosistemas terrestres y acuáticos han sido sometidos a una creciente presión por la incorporación de sustancias químicas de origen antropogénico que no habían sido consideradas en las regulaciones ambientales tradicionales. Entre estas destacan los denominados contaminantes emergentes, que incluyen fármacos, productos de cuidado personal, hormonas y pesticidas, cuya presencia en el medio ambiente ha despertado un interés creciente por sus posibles efectos adversos en la biota y la salud humana (Ebele et al., 2017). Estos compuestos se encuentran en aguas superficiales, subterráneas, suelos y sedimentos en concentraciones que van desde el rango de nanogramos hasta microgramos por litro, valores que aunque sean bajos, son suficientes para generar efectos subletales en organismos sensibles (Cizmas et al., 2015). Dentro de este grupo, los productos farmacéuticos han cobrado especial relevancia debido a su uso masivo y continuo, tanto en medicina humana como veterinaria. Se estima que a nivel mundial, el consumo de fármacos alcanza millones de dosis diarias, lo que incrementa la probabilidad de su presencia en aguas residuales y suelos agrícolas, especialmente cuando se utilizan lodos de depuradora como enmiendas (Wilkinson et al., 2022). La mayoría de estos compuestos atraviesa los sistemas de tratamiento de aguas residuales sin ser completamente eliminados, liberando al ambiente en formas activas o como metabolitos que pueden conservar actividad biológica y toxicidad residual (Archer et al., 2017).

El ketoprofeno, derivado del ácido propiónico, es un antiinflamatorio no esteroideo ampliamente utilizado como analgésico y antiinflamatorio en humanos y animales. Su consumo se ha incrementado de manera sostenida debido a su eficacia y disponibilidad como medicamento de venta libre en varios países. Sin embargo, la eliminación incompleta en plantas de tratamiento de aguas residuales ha llevado a su detección en diversos cuerpos hídricos y suelos agrícolas en concentraciones que varían entre 0,10 ng/L y 260.000 ng/L (Tyumina et al., 2023). Investigaciones previas reportan que este fármaco provoca estrés oxidativo, daño en el ADN, alteraciones metabólicas y efectos sobre el crecimiento y la reproducción de organismos acuáticos expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes (Bowkin et al., 2020). Estos hallazgos confirman que, aunque se trata de un compuesto de uso cotidiano, su persistencia en el ambiente constituye un riesgo ecotoxicológico emergente.

Frente a la dificultad que presentan los sistemas convencionales de tratamiento para eliminar estos compuestos, se han desarrollado procesos de oxidación avanzada, entre los cuales la fotólisis y la fotocatalisis heterogénea con dióxido de titanio se destacan como alternativas prometedoras. En el caso de la fotólisis por radiación ultravioleta sin catalizador, se ha demostrado que fármacos como el Ketoprofeno siguen cinéticas de degradación de primer orden bajo irradiación UV, generando productos de transformación tales como 3-hidroxibenzofenona, catecol y benzoquinona, algunos de los cuales presentaron una toxicidad predicha mayor que el compuesto original (Li et al., 2017). Este proceso sin catalizador depende directamente de la capacidad del fármaco de absorber fotones UV, lo cual limita su eficiencia frente a compuestos poco fotoactivos

o en matrices complejas. Por otra parte, la fotocatalisis con  $\text{TiO}_2$  activa mediante UV-A genera radicales hidroxilos ( $\bullet\text{OH}$ ) y aniones superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ) que permiten una degradación más profunda (Navidpour et al., 2023). La ventaja de este método radica en que el  $\text{TiO}_2$  es estable, no tóxico y eficiente en la degradación de contaminantes persistentes. No obstante, persisten dudas acerca de la toxicidad de los subproductos generados durante la fotocatalisis, los cuales pueden ser igual o incluso más tóxicos que el compuesto original (Ferrando-Climent et al., 2012).

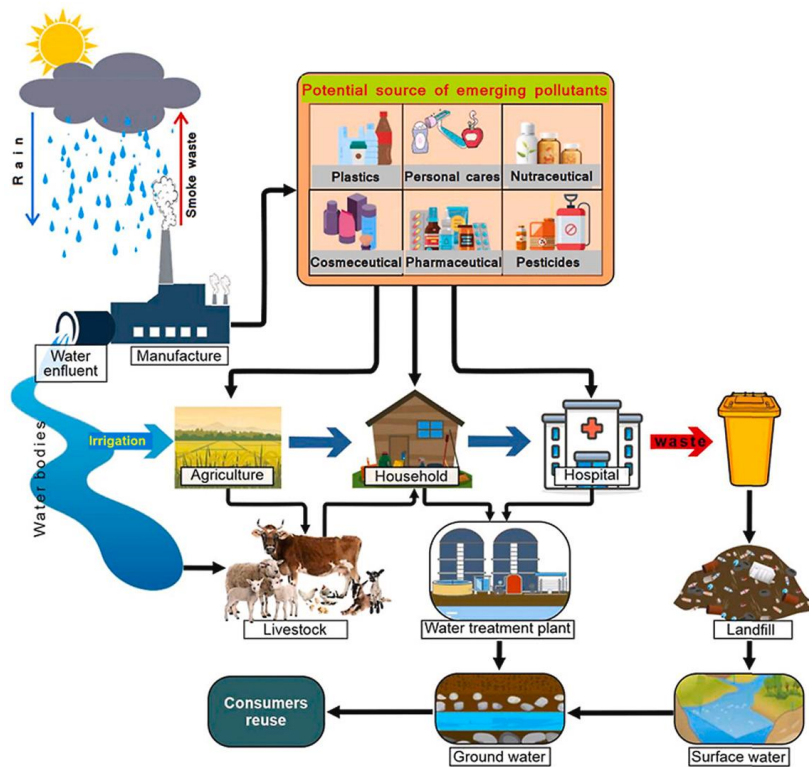
En este contexto, resulta imprescindible complementar los estudios de degradación química con bioensayos ecotoxicológicos, que permitan evaluar la toxicidad residual de los compuestos tratados. Los organismos bioindicadores desempeñan un papel fundamental en este tipo de estudios, ya que integran las respuestas biológicas frente a la exposición a contaminantes y sus metabolitos, proporcionando una medida más realista del riesgo ambiental. Uno de los organismos más utilizados en ecotoxicología terrestre es la lombriz de tierra *Eisenia fetida*, especie epigea de amplia distribución y alta sensibilidad a contaminantes químicos. Esta especie participa activamente en los procesos de reciclaje de materia orgánica y mantenimiento de la estructura del suelo, lo que la convierte en un bioindicador representativo de la calidad edáfica (OECD, 2004). Además, su fácil manejo en laboratorio, corto ciclo de vida y capacidad para bioacumular contaminantes la posicionan como modelo ideal para estudios ecotoxicológicos (Nahmani et al., 2007). Entre los métodos de evaluación más empleados en esta especie se encuentra el bioensayo de tiempo de retención del colorante rojo neutro, el cual mide la estabilidad de las membranas lisosomales en los celomocitos, células inmunocompetentes presentes en el fluido celómico de las lombrices. Una reducción en el tiempo de retención del colorante indica daño celular o estrés fisiológico, lo que convierte a esta técnica en un biomarcador sensible de exposición a contaminantes (Weeks & Svendsen, 1996). Este bioensayo permite detectar efectos subletales tempranos, lo que resulta especialmente relevante en la evaluación de contaminantes emergentes y de los productos derivados de su degradación.

De forma complementaria, la presente investigación incorpora un segundo organismo biológico, la especie vegetal *Lactuca sativa*, conocida por su alta sensibilidad y valor ecotoxicológico en pruebas de toxicidad aguda. El bioensayo de germinación y crecimiento radicular e hipocotilar con *L. sativa* constituye un método estandarizado y reproducible para evaluar la fitotoxicidad de contaminantes en aguas y suelos (OECD, 2006; Priac et al., 2017). En este bioensayo, la germinación de las semillas y la elongación de las raíces y tallos primarios se utilizan como indicadores directos del impacto del contaminante sobre procesos fisiológicos esenciales para el desarrollo vegetal (Campagna-Fernandes et al., 2016). Debido a su relevancia agrícola y alimentaria, la lechuga permite además extrapolar los resultados hacia la evaluación del riesgo en cultivos de consumo humano, aportando una dimensión adicional en el análisis del impacto ambiental del ketoprofeno y de sus productos de degradación.

La integración de ambos bioensayos permite abordar de manera más completa la toxicidad comparativa del ketoprofeno y de sus tratamientos por radiación UV-A y fotocátalisis UV-A/TiO<sub>2</sub>, evaluando su efecto tanto en organismos del suelo como en especies vegetales. Esta aproximación interdisciplinaria contribuye al entendimiento del comportamiento ambiental del fármaco, vinculando la eficiencia tecnológica de los tratamientos con su impacto biológico. En conjunto, este enfoque proporciona una herramienta integral para evaluar la efectividad y seguridad ambiental de los procesos de degradación aplicados a contaminantes emergentes, generando información relevante para la gestión ambiental y el desarrollo de normativas específicas que consideren el riesgo ecotoxicológico asociado al uso y disposición de fármacos en el ambiente.

## 1.1. Contaminantes emergentes

En las últimas décadas, la investigación ambiental ha incorporado un nuevo concepto que ha cobrado gran relevancia, estos son los contaminantes emergentes, también conocidos como contaminantes de preocupación emergente. Estos compuestos corresponden a sustancias químicas detectadas en el ambiente gracias a los avances en técnicas analíticas de alta resolución, y cuya presencia no había sido considerada previamente en las normativas de calidad ambiental (Kumar et al., 2022). A diferencia de los contaminantes tradicionales, los CE se caracterizan por su diversidad química, su amplia distribución en diferentes matrices ambientales y la falta de regulaciones específicas que establezcan límites seguros de exposición (Ebele et al., 2017). Entre los principales grupos de contaminantes emergentes se incluyen los productos farmacéuticos y de cuidado personal, los pesticidas de nueva generación, los compuestos perfluorados, los retardantes de llama bromados, los endocrino-disruptores como el bisfenol A y los nanomateriales. Su detección en aguas superficiales, aguas subterráneas, sedimentos, suelos e incluso en agua potable ha sido documentada en todo el mundo (Wilkinson et al., 2022). El resumen gráfico de contaminantes emergentes elaborado por Kumar et al. (2022) se muestra en la figura 1.1, está sintetiza de manera visual los principales grupos, sus fuentes y las rutas de entrada al ambiente, proporcionando una perspectiva clara de la magnitud de este problema global. La principal vía de ingreso de contaminantes emergentes al ambiente es el vertido de aguas residuales domésticas, hospitalarias e industriales que contienen metabolitos o compuestos sin degradar. Se ha demostrado que las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales no están diseñadas para remover de forma eficiente estos compuestos, lo que provoca que lleguen a ríos, lagos y suelos agrícolas a través del reúso de lodos y aguas tratadas (Archer et al., 2017). Kumar et al. (2022) destacan que incluso en concentraciones bajas, en el rango de ng/L a µg/L, los CE pueden inducir efectos adversos en organismos acuáticos y terrestres, con implicancias a nivel celular, fisiológico y ecológico.



**Figura 1.1.** Resumen gráfico de contaminantes emergentes (Kumar et al., 2022).

En el caso de los productos farmacéuticos, su impacto es particularmente preocupante debido a que han sido diseñados para ejercer efectos biológicos específicos y en muchos casos persistentes. Dentro de ellos, los antiinflamatorios no esteroideos, como diclofenaco, ibuprofeno y ketoprofeno, se encuentran entre los fármacos más consumidos a nivel global. Se ha estimado que el consumo mundial de diclofenaco alcanza 940 toneladas anuales (Zhang et al., 2008), mientras que en China se estima un consumo de alrededor de 2827 toneladas de ibuprofeno en 2017, con una tendencia creciente en los años siguientes (Liu et al., 2025). En Chile, durante 2014 se comercializaron 27,5 millones de cajas que contenían AINEs, de las cuales el 10,3% correspondía a ketoprofeno (ISP-Chile, 2015). Esto demuestra la fuerte penetración de este AINE en el mercado farmacéutico nacional. Adomat y Grischek (2024) documentaron en el río Elba, en Alemania, la presencia de más de 50 fármacos en concentraciones de hasta 1270 ng/L. En Latinoamérica, Wilkinson et al. (2022) ubicaron a Santiago de Chile como el quinto país con más contaminación farmacéutica a nivel sudamericano, con niveles cercanos a los 4000 ng/L en aguas superficiales, confirmando que esta problemática no se limita a países totalmente industrializados y desarrollados.

Los efectos ecotoxicológicos de los CE han sido descritos en diversos niveles de organización biológica. A nivel celular, generan estrés oxidativo, daño en el ADN y alteraciones en membranas. En organismos acuáticos, provocan cambios en el crecimiento, la reproducción y el comportamiento (Cizmas et al., 2015). Grădinariu et al. (2025) reporta que los contaminantes farmacéuticos en concentraciones ambientales generan estrés oxidativo en peces, alteran enzimas

antioxidantes y producen peroxidación lipídica junto con daño en el ADN. En microalgas como *Chlorella pyrenoidosa* han evidenciado inhibición en el crecimiento y reducción de pigmentos en presencia de fluoxetina (Xie et al., 2022). Estos resultados reflejan que la presencia de CE puede alterar la base de las cadenas tróficas y desencadenar efectos en cascada sobre los ecosistemas.

Otro grupo relevante corresponde a los disruptores endocrinos, como hormonas sintéticas y compuestos industriales. Estos compuestos interfieren con el sistema endocrino de los organismos, alterando procesos de desarrollo, reproducción y crecimiento. Estudios han demostrado que la exposición crónica a etinilestradiol, un estrógeno sintético presente en anticonceptivos orales causa feminización en poblaciones de peces, afectando su dinámica poblacional (Kidd et al., 2007). Estos efectos, aunque se manifiestan a largo plazo, pueden comprometer la estabilidad de poblaciones completas y modificar la estructura de comunidades acuáticas. Los compuestos perfluorados, ampliamente utilizados en la industria por sus propiedades repelentes al agua y al aceite, representan otro subgrupo crítico de contaminantes emergentes. Estos compuestos son extremadamente persistentes, motivo por el cual han sido denominados “químicos eternos”. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos ha comenzado a establecer límites regulatorios para algunos PFAS, lo que demuestra el avance, aunque aún incipiente, en la gestión de estos contaminantes. En relación con los nanomateriales, como nanopartículas de plata, óxidos metálicos y nano plásticos, su creciente producción y uso en sectores industriales, cosméticos y médicos ha incrementado la preocupación sobre sus efectos ambientales. Estas partículas presentan un alto grado de reactividad superficial y pueden atravesar barreras biológicas, acumulándose en tejidos de organismos vivos. Kumar et al. (2022) subrayan que la falta de estudios a largo plazo sobre su ecotoxicidad constituye un vacío de conocimiento que dificulta el establecimiento de regulaciones específicas.

En términos de regulación ambiental, la mayoría de los países carece de normativas específicas para contaminantes emergentes. La Unión Europea ha incorporado algunos fármacos, en listas de vigilancia para monitoreo en cuerpos de agua, como se muestra en la tabla 1.1. Sin embargo, estos avances aún son limitados frente a la magnitud y diversidad de compuestos identificados. En América Latina incluyendo Chile, no existen normativas específicas que regulen concentraciones de PPCPs en aguas residuales o superficiales, lo que evidencia la necesidad de generar información científica que respalde futuras decisiones regulatorias (Henríquez, 2012). La complejidad de los CE radica no solo en su diversidad química, sino también en la interacción de múltiples factores ambientales que determinan su persistencia y destino. Factores como el pH, la temperatura, la luz solar y la presencia de materia orgánica influyen en su degradación o transformación. Además, muchos de estos compuestos pueden actuar de manera sinérgica, potenciando sus efectos en organismos expuestos a mezclas, un fenómeno cada vez más reconocido en la ecotoxicología moderna (Backhaus & Faust, 2012).

**Tabla 1.1.** Sustancias monitoreadas por la UE (European Commission, 2020).

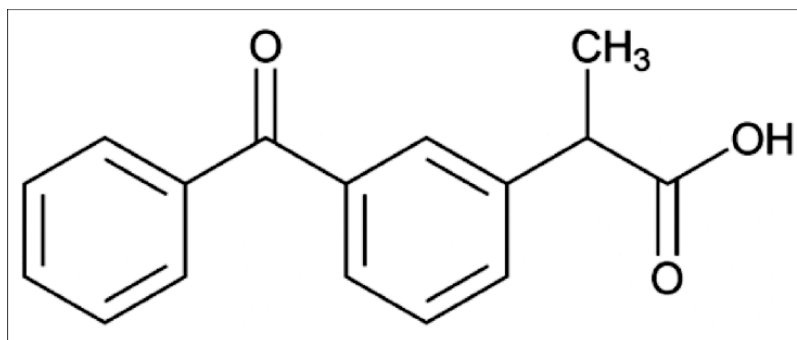
**Lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión, de conformidad con el artículo 8 ter de la Directiva 2008/105/CE**

Nombre de la sustancia/grupo de sustancias	N.º CAS (¹)	N.º UE (²)	Método analítico indicativo (³) (⁴)	Límite máximo aceptable de detección del método (ng/l)
Metaflumizona	139968-49-3	604-167-6	LLE, LC-MS-MS o SPE, LC-MS-MS	65
Amoxicilina	26787-78-0	248-003-8	SPE, LC-MS-MS	78
Ciprofloxacina	85721-33-1	617-751-0	SPE, LC-MS-MS	89
Sulfametoxazol (⁵)	723-46-6	211-963-3	SPE, LC-MS-MS	100
Trimetoprim (⁶)	738-70-5	212-006-2	SPE, LC-MS-MS	100
Venlafaxina y O-desmetilvenlafaxina (⁷)	93413-69-5 93413-62-8	618-944-2 700-516-2	SPE, LC-MS-MS	6
<i>Compuestos azólicos (⁸)</i>			SPE, LC-MS-MS	
Clotrimazol	23593-75-1	245-764-8		20
Fluconazol	86386-73-4	627-806-0		250
Imazalil	35554-44-0	252-615-0		800
Ipconazol	125225-28-7	603-038-1		44
Metconazol	125116-23-6	603-031-3		29
Miconazol	22916-47-8	245-324-5		200
Penconazol	66246-88-6	266-275-6		1 700
Procloraz	67747-09-5	266-994-5		161
Tebuconazol	107534-96-3	403-640-2		240
Tetraconazol	112281-77-3	407-760-6		1 900
Dimoxistrobina	149961-52-4	604-712-8	SPE, LC-MS-MS	32
Famoxadona	131807-57-3	603-520-1	SPE, LC-MS-MS	8,5

Finalmente, el desafío que representan los contaminantes emergentes requiere una aproximación integral que combine la mejora de los sistemas de tratamiento de aguas, el desarrollo de tecnologías avanzadas de remoción, como la fotocatalisis heterogénea, el uso de bioensayos ecotoxicológicos y la generación de políticas públicas basadas en evidencia científica. Tal como lo sintetiza Kumar et al. (2022), comprender las fuentes, los efectos y los riesgos de los contaminantes emergentes es un paso esencial para diseñar estrategias de mitigación que aseguren la protección de los ecosistemas y la salud humana.

## 1.2. Ketoprofeno

El ketoprofeno es un fármaco perteneciente al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos, ampliamente utilizado en medicina humana y veterinaria debido a sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas. Químicamente, corresponde a un derivado del ácido propiónico, con fórmula molecular  $C_{16}H_{14}O_3$  y un peso molecular de 254,28 g/mol. Su estructura se caracteriza por la presencia de un grupo carboxilo (-COOH) que le confiere acidez, y de un núcleo aromático con sustituyentes lipofílicos que determinan su comportamiento en medios biológicos y ambientales (Madikizela & Chimuka, 2017), como se muestra en la figura 1.2.



**Figura 1.2.** Estructura química del Ketoprofeno (Bor et al., 2015).

El ketoprofeno se caracteriza por presentar un conjunto de propiedades fisicoquímicas que determinan su comportamiento en sistemas biológicos y ambientales. Estas características fisicoquímicas se detallan de manera resumida en la tabla 1.2, elaborada a partir de la información disponible en la base de datos PubChem (2025).

**Tabla 1.2.** Características fisicoquímicas del Ketoprofeno (PubChem, 2025).

Propiedad	Valor / Rango
Log P	≈ 3,2
pKa	~ 4,45
Solubilidad en agua	~ 51 mg/La 22 °C
Punto de fusión	≈94 °C

La farmacocinética del ketoprofeno en organismos superiores muestra una rápida absorción y metabolización. Sin embargo, cuando llega al ambiente a través de excreciones humanas o animales, o mediante vertidos de aguas residuales hospitalarias e industriales, este compuesto y sus metabolitos pueden persistir durante semanas en el medio acuático. En sistemas de tratamiento de aguas residuales, el ketoprofeno es resistente a la biodegradación convencional, lo que favorece su detección en efluentes tratados y en cuerpos receptores (García-Galán et al., 2012).

La presencia ambiental de ketoprofeno ha sido reportada a nivel global. En Europa, Adomat y Grischek (2024) encontraron concentraciones de hasta 0,94 µg/L en el río Elba de Alemania, mientras que en el Mediterráneo se han detectado valores entre 10 y 250 ng/L en aguas costeras

(Rodrigues-Silva et al., 2014). Por otro lado, Tyumina et al. (2023), posiciona a India y África como los países con más altos niveles de ketoprofeno, registrando 260.000 ng/L y 159.000 respectivamente. En Latinoamérica, estudios en Argentina y Brasil han identificado su presencia en aguas superficiales en niveles de hasta 1,2 µg/L, evidenciando que este compuesto atraviesa las plantas de tratamiento sin una remoción completa (Santos et al., 2021). En Chile, aunque la información es aún limitada, Wilkinson et al. (2022) situaron al país dentro de las regiones con contaminación farmacéutica significativa en ríos urbanos.

El impacto ecotoxicológico del ketoprofeno ha sido objeto de diversas investigaciones. En organismos como *Daphnia magna*, se ha observado que la exposición a concentraciones a concentraciones entre 0,005 y 50 mg/L provoca una reducción significativa en la velocidad de nado y en parámetros fisiológicos como el ritmo cardíaco y la actividad de los apéndices torácicos tras 48 horas de exposición (Bownik et al., 2020). De manera similar, estudios en microcosmos acuáticos revelan que el ketoprofeno a 0,05 mg/L afecta la reproducción de *D. magna* (Ramirez-Morales et al., 2024). En ambientes terrestres, el ketoprofeno puede llegar al suelo a través de la aplicación de aguas residuales tratadas, biosólidos o estiércoles utilizados como fertilizante. Al tratarse de un ácido, su comportamiento en el suelo está fuertemente influenciado por el pH: en condiciones neutras o ligeramente alcalinas presenta una baja adsorción a las partículas, lo que facilita su movilidad vertical y el riesgo de lixiviación hacia aguas subterráneas. Este comportamiento ha sido documentado, donde se destaca al ketoprofeno entre los AINEs como uno de los fármacos con mayor persistencia en suelos agrícolas y con potencial de ser absorbido por plantas, lo que incrementa el riesgo de transferencia a la cadena alimentaria (Gworek et al., 2021).

### 1.3. Tratamientos de oxidación avanzada

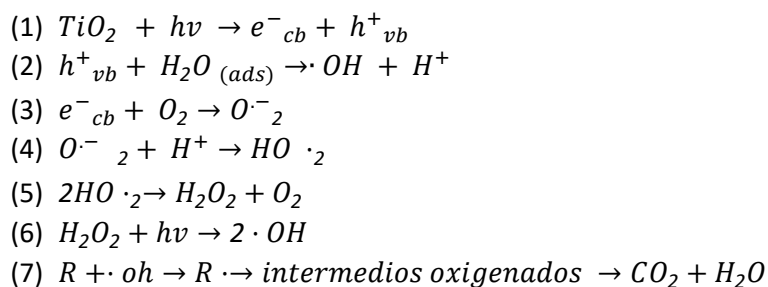
Existen diversas tecnologías aplicadas a la remoción de contaminantes emergentes, como la adsorción con materiales porosos, la nanofiltración, la ósmosis inversa y los tratamientos biológicos convencionales o mejorados. Sin embargo, si bien estos métodos permiten retener o reducir parcialmente ciertos compuestos, su eficiencia es limitada frente a moléculas altamente persistentes, ya que no logran degradarlas completamente y, en el caso de membranas y adsorbentes, únicamente transfieren el contaminante a una fase sólida o a un concentrado de rechazo, generando residuos secundarios que requieren tratamiento adicional (Petrie et al., 2015). Debido a estas limitaciones, los procesos basados en oxidación se han convertido en alternativas fundamentales cuando se necesita transformar compuestos refractarios. Entre estos destacan la ozonización, el proceso peroxone ( $O_3/H_2O_2$ ), la activación de persulfato y peroximonosulfato mediante UV, calor o metales, además de los procesos Fenton y foto-Fenton, reconocidos por su capacidad para generar radicales altamente reactivos ( $\bullet OH$ ) capaces de atacar enlaces aromáticos y estructuras recalcitrantes (Pignatello et al., 2006; Mirzaei et al., 2017). En este contexto, los procesos de oxidación avanzada se presentan como una de las tecnologías más prometedoras para la eliminación de CE en matrices acuosas y terrestres, debido a su elevada capacidad oxidante y

su potencial para lograr la mineralización parcial o total de contaminantes orgánicos. Dentro de este grupo, destacan la fotólisis UV y la fotocatalisis heterogénea con dióxido de titanio, ampliamente utilizadas en la degradación de fármacos como los antiinflamatorios no esteroideos, incluido el ketoprofeno (Esplugas et al., 2007).

En el caso del tratamiento UV-A sin catalizador, la degradación del ketoprofeno ocurre principalmente por fotólisis directa, proceso en el cual los fotones ultravioletas ( $\lambda = 315\text{--}400\text{ nm}$ ) inciden sobre la molécula provocando la ruptura de enlaces  $\pi\text{--}\pi$  y  $\text{C--O}$  característicos de sus estructuras aromáticas. En estudios de laboratorio se utilizan típicamente irradiancias de  $0,74\text{ mW/cm}^2$ , valores suficientes para inducir reacciones de oxidación y descarboxilación que transforman parcialmente el compuesto (Li et al., 2017; Wasan et al., 2019). Sin embargo, la ausencia de un catalizador limita la generación de especies reactivas secundarias, lo que puede resultar en una degradación incompleta y la formación de subproductos persistentes (Li et al., 2017). Estas especies intermedias se originan porque, tras la excitación inicial del ketoprofeno, se induce la pérdida del grupo carboxilo (descarboxilación) y la posterior ruptura del puente carbonílico (descarbonilación), permitiendo la formación de radicales aromáticos estables. Estos radicales pueden reaccionar lentamente con oxígeno disuelto, generando compuestos hidroxilados o semiquinonas, o bien sufrir isomerizaciones internas que mantienen intacto el anillo bencénico, lo que explica la persistencia de varios de estos fotoproductos. Entre los principales productos de transformación identificados durante la fotólisis del ketoprofeno se encuentran la 3-hidroxibenzofenona, el catecol (1,2-dihidroxibenceno) y la 1,4-benzoquinona, derivados de reacciones de hidroxilación y descarbonilación del anillo aromático (Li et al., 2012; Ferrando-Climent et al., 2012). Aunque estos productos representan una etapa intermedia hacia la mineralización, algunos presentan toxicidad residual comparable o incluso superior al compuesto original, lo que justifica la necesidad de evaluar los efectos biológicos posteriores al tratamiento.

La fotocatalisis heterogénea con dióxido de titanio ha sido estudiada como una de las tecnologías más eficientes para la degradación de contaminantes orgánicos en medios acuosos (Fujishima & Honda, 1972; Herrmann, 1999). Este proceso representa una mejora significativa en comparación con la fotólisis directa, al incorporar un catalizador semiconductor capaz de potenciar la formación de radicales reactivos. Su principio se basa en la activación del  $\text{TiO}_2$  mediante la absorción de radiación ultravioleta, lo que provoca la excitación de electrones desde la banda de valencia hacia la banda de conducción y la consecuente generación de pares electrón-hueco ( $e^-/h^+$ ).

El mecanismo general del proceso se describe mediante las siguientes ecuaciones:



En donde,

$h\nu$  = radiación UV - A

$e^-_{cb}$  = electrón foto excitado

$h^+_{vb}$  = hueco positivo

$R + \cdot oh$  = Ketoprofeno

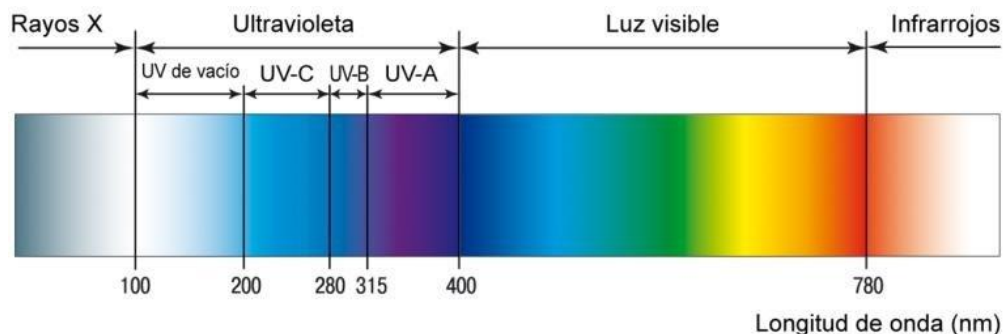
La radiación UV-A genera pares electrón-hueco en la superficie del  $TiO_2$  (ecuación 1). Los huecos ( $h^+$ ) oxidan las moléculas de agua o iones  $OH^-$  adsorbidos, produciendo radicales hidroxilos ( $\cdot OH$ ) (ecuación 2), mientras que los electrones ( $e^-$ ) reducen el oxígeno disuelto del aire, generando aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (ecuación 3). Estas especies reactivas de oxígeno ( $\cdot OH$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO_2 \cdot$  y  $H_2O_2$ ) son altamente inestables y poseen un elevado potencial de oxidación, capaz de atacar los enlaces aromáticos y carboxílicos del ketoprofeno (ecuaciones 4–7). El resultado de estas reacciones es la desestabilización estructural del fármaco, la formación de intermediarios oxigenados (como alcoholes, quinonas o ácidos) y, finalmente, su degradación parcial a  $CO_2$  y  $H_2O$ . El oxígeno atmosférico presente en el medio desempeña un papel esencial al actuar como aceptor de electrones, favoreciendo la generación continua de ROS y evitando la recombinación del par electrón-hueco, lo que incrementa la eficiencia del proceso (Chong et al., 2010; Albarrán & Mendoza, 2022).

La eficiencia de la fotocatalisis depende de diversos factores fisicoquímicos. La concentración inicial del contaminante influye directamente en la velocidad de degradación: a bajas concentraciones (5 - 10 mg/L), el ketoprofeno se oxida con mayor rapidez debido a la abundancia de sitios activos disponibles en la superficie del catalizador, mientras que a concentraciones elevadas (>30-50 mg/L) estos sitios se saturan, disminuyendo la eficiencia (Chong et al., 2010). La intensidad de la radiación UV-A determina la cantidad de pares electrón-hueco generados, y tanto la concentración de catalizador como el pH del medio influyen en la adsorción del fármaco sobre el  $TiO_2$ . A su vez, la

concentración del catalizador suele variar entre 0.1 y 1 g/L, con valores óptimos cercanos a 0.5 g/L, como se observa en Wang et al. (2018) y Mella (2022).

En medios ligeramente ácidos, el ketoprofeno neutro presenta mayor afinidad por el catalizador, favoreciendo las etapas iniciales de oxidación (Wang et al., 2018). Además, se han desarrollado sistemas combinados como adsorción–fotólisis o adsorción–fotocatálisis, que mejoran la eficiencia de remoción. Cabrera et al. (2021) reportaron eficiencias superiores al 90 % en la eliminación de contaminantes emergentes mediante TiO<sub>2</sub> activado por radiación UV, mientras que Mella (2022) alcanzó remociones del 99 % para ciprofloxacino y 96 % para moxifloxacino, demostrando el potencial de estas tecnologías para depurar aguas contaminadas con fármacos.

La radiación ultravioleta cumple un papel esencial en ambos procesos, ya que constituye la fuente de energía que inicia las reacciones fotoquímicas y fotocatalíticas. Dependiendo de su longitud de onda, la radiación se clasifica en UV - A (315 –400 nm), UV - B (280 – 315 nm) y UV - C (200 – 280 nm), como se muestra en la figura 1.3. La región UV-A, utilizada en esta investigación, es menos energética que la UV-C, pero suficiente para activar el TiO<sub>2</sub> y promover la generación de especies reactivas de oxígeno en condiciones experimentales controladas (Parsons, 2004).



**Figura 1.3.** Espectro de radiación ultravioleta (Manzano, 2020)

A pesar de su eficacia, un aspecto crítico de los procesos de oxidación avanzada radica en la posible formación de subproductos con actividad biológica persistente. Algunos intermediarios presentan estructuras parcialmente oxidadas que pueden mantener o incluso incrementar su toxicidad, afectando organismos acuáticos y terrestres expuestos a los efluentes tratados (Ferrando-Climent et al., 2012; Navidpour et al., 2023). Por esta razón, la evaluación del éxito de los tratamientos fotocatalíticos y fotolíticos no debe basarse únicamente en parámetros químicos, sino también en su impacto biológico. En este contexto, los bioensayos ecotoxicológicos constituyen herramientas esenciales para determinar la toxicidad residual de los efluentes tratados. Los celomocitos de *Eisenia fetida*, mediante el bioensayo de tiempo de retención del rojo neutro, permiten detectar alteraciones celulares causadas por los productos intermedios. Paralelamente, el bioensayo de

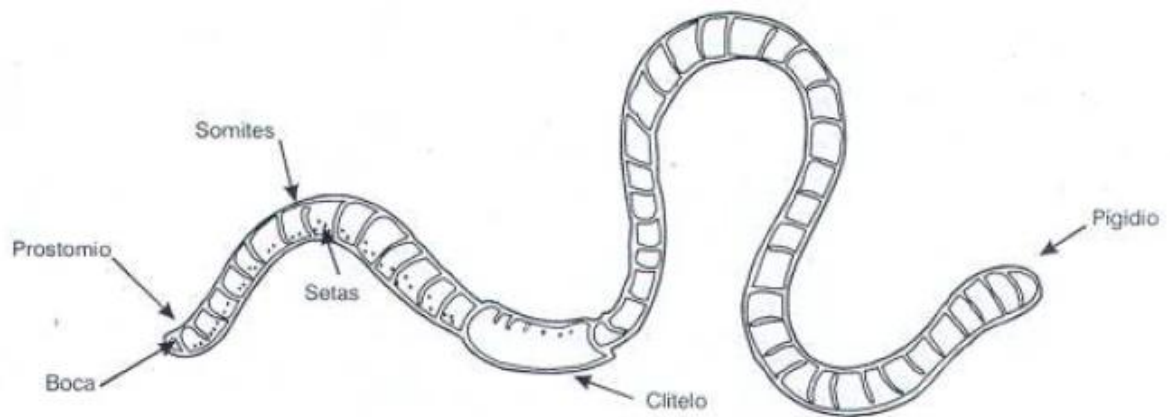
germinación y elongación radicular e hipocotilar en *Lactuca sativa* evalúa los efectos fitotóxicos sobre el desarrollo vegetal, permitiendo comparar la respuesta biológica entre organismos animales y vegetales expuestos a los mismos tratamientos.

La combinación de fotólisis y fotocátalisis heterogénea con TiO<sub>2</sub> constituye, por tanto, una estrategia efectiva y complementaria para reducir la concentración de contaminantes emergentes como el ketoprofeno. La incorporación de bioensayos con *E. fetida* y *L. sativa* en este tipo de estudios permite verificar no solo la eficiencia química del tratamiento, sino también su seguridad ambiental, evitando la generación de nuevos riesgos asociados a los subproductos de transformación.

#### 1.4. Celomocitos de *Eisenia fetida*

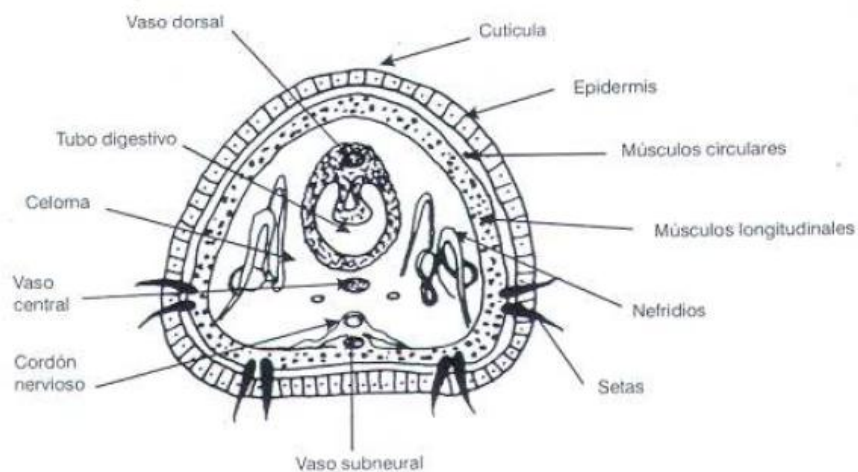
*Eisenia fetida* es una lombriz de tierra perteneciente a la familia Lumbricidae, del orden de los haplotaxidos y a su vez a la subclase de los oligoquetos, estas habitan de manera natural en los suelos. Estos organismos invertebrados constituyen la fracción más abundante de biomasa animal en la mayoría de los ecosistemas terrestres templados. Su actividad modifica de forma notable las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, ya que contribuyen a mejorar su estructura y aceleran tanto la descomposición de la materia orgánica como el reciclaje de nutrientes (Domínguez et al., 2009).

La estructura externa de *E. fetida* está compuesta por seis partes como se puede ver en la figura 1.4, en primer lugar está la boca en consiguiente el prostomio, el cual es el primer lóbulo del cuerpo y el pigidio el último lóbulo en donde se abre el ano. Las setas, son proyecciones quitinosas semejante a pelos pequeños ubicados en toda su estructura a excepción de la boca, clitelo y ano. El clitelo, es la zona glandular que aparece cuando la lombriz está sexualmente apta para reproducirse.



**Figura 1.4.** Caracteres externos de una lombriz de tierra (Reines et al., 1998).

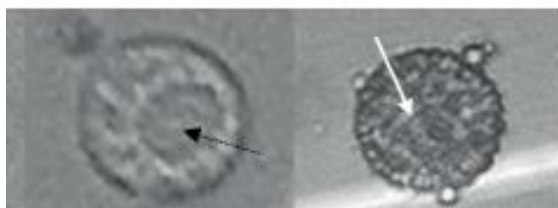
Su sistema inmunitario innato se encuentra conformado principalmente por células libres denominadas celomocitos que se encuentran localizadas en el fluido celómico del celoma, como se muestra en la figura 1.5, rellenando la cavidad corporal. Estos elementos celulares desempeñan funciones esenciales de defensa, detoxificación y mantenimiento de la homeostasis interna, lo que los convierte en biomarcadores sensibles de exposición a contaminantes emergentes como fármacos, metales pesados y nanopartículas (OECD, 2004; Correia et al., 2021).



**Figura 1.5.** Corte transversal de una lombriz de tierra (Reines et al., 1998).

Los celomocitos se clasifican en subpoblaciones con funciones especializadas: amebocitos granulares, amebocitos hialinos, y otras menos definidas como celomocitos eleocitos/cloragocitos en especies afines. Los amebocitos se encargan principalmente de la fagocitosis, generación de radicales, encapsulación y respuesta inmune rápida, mientras que los eleocitos o cloragocitos contribuyen más con funciones de almacenamiento, metabolismo y mantenimiento homeostático

(Diogène et al., 1997). En la figura 1.6 se puede apreciar en microscopio la estructura física de un celomocito de *E. fetida*.



**Figura 1.6.** Celomocitos de *Eisenia fetida* al microscopio óptico (40X) (Marcano, L et al., 2018).

Cuando *E. fetida* expone sus celomocitos a contaminantes, éstos presentan respuesta oxidativa, citotóxica y genotóxica. Un estudio midió la respuesta de celomocitos tras exposición a nanopartículas de MoS<sub>2</sub> defectuosas, observando inhibición de complejos del sistema respiratorio mitocondrial, alteraciones metabólicas, aumento de apoptosis e inhibición de funciones oxidativas en distintos niveles de concentración, entre 10 y 100 mg de Mo/L a 96 horas de exposición (Sun et al., 2023).

Los celomocitos muestran además alteraciones funcionales tempranas incluso antes de observar mortalidad o efectos a nivel poblacional. Por ejemplo, se registran cambios en la actividad de enzimas antioxidantes, aumento de especies reactivas de oxígeno, pérdida de viabilidad celular, alteraciones en la morfología, reducción de la capacidad fagocítica y posibilidades de apoptosis o muerte celular programada (Sun et al., 2023).

La extracción de celomocitos permite también ensayos *ex vivo*, lo cual facilita evaluar la toxicidad de contaminantes y sus productos de degradación. Este enfoque permite exponer celomocitos directamente en medios controlados, medir viabilidad, integridad lisosomal, daño en ADN, estrés oxidativo y reparación del daño celular. Estos ensayos *ex vivo* ofrecen una herramienta rápida para determinar diferencias de toxicidad entre compuestos originales y sus transformados (Fuchs 2011; Marcano et al, 2018).

Aunque no se ha encontrado hasta ahora un estudio específico sobre la exposición de celomocitos de *E. fetida* al ketoprofeno, los resultados con otros contaminantes suelen ser comparables en mecanismos de daño. Se infiere que *E. fetida*, al exponerse al ketoprofeno, experimentaría alteraciones similares, demostrando una reducción de TRRN, daño en ADN medible, aumento de producción de ROS, pérdida de viabilidad y posible apoptosis en subpoblaciones sensibles como los amebocitos (Ma et al., 2016; Sun et al., 2023).

## 1.5. Bioensayo de tiempo de retención rojo neutro en celomocitos de *Eisenia fetida*

El bioensayo de tiempo de retención del rojo neutro se establece como una de las metodologías más sensibles para evaluar el daño subletal en organismos expuestos a contaminantes emergentes. Este ensayo se fundamenta en la capacidad del colorante rojo neutro de acumularse en los lisosomas de células viables. Cuando la célula se encuentra en condiciones fisiológicas normales, los lisosomas son estables y retienen el colorante durante un periodo prolongado. Sin embargo, frente a situaciones de estrés químico, como la exposición a xenobióticos, la integridad lisosomal se ve comprometida, disminuyendo el tiempo de retención del colorante. Por lo tanto, el TRRN constituye un biomarcador temprano de toxicidad celular, ampliamente validado en ecotoxicología con lombrices de tierra, especialmente con *Eisenia fetida* (Ma et al., 2016).

En el contexto de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, el ketoprofeno representa un contaminante de creciente interés debido a su alta frecuencia de detección en suelos agrícolas y aguas residuales tratadas. Su persistencia y movilidad ambiental hacen posible que organismos edáficos como *E. fetida* entren en contacto directo con el compuesto. Dado que los celomocitos de esta especie poseen un sistema lisosomal muy sensible, el TRRN se convierte en una herramienta esencial para determinar si la exposición al ketoprofeno genera efectos en la viabilidad celular de las lombrices, incluso a concentraciones subletales que no producen mortalidad inmediata (García-Velasco et al., 2019).

El procedimiento del bioensayo comienza con la extracción del fluido celómico de *E. fetida*, el cual contiene poblaciones celulares como hialinocitos y granulocitos. Estos últimos son los principales responsables de la fagocitosis y poseen un sistema lisosomal desarrollado, por lo que se consideran los más sensibles al ensayo. Una vez obtenida la suspensión celular mediante la técnica de extrusión celómica, los celomocitos se exponen al colorante rojo neutro en condiciones controladas de laboratorio. El tiempo de retención se mide bajo microscopio de contraste de fases, observando periódicamente la pérdida de coloración en los lisosomas. La disminución del TRRN indica un daño progresivo en la estabilidad de membranas lisosomales, atribuible al efecto del contaminante ensayado (Diogène et al., 1997; Gupta, 2000).

Los resultados esperados del bioensayo de TRRN con ketoprofeno incluyen una reducción progresiva en el tiempo de retención del rojo neutro en granulocitos, reflejando pérdida de estabilidad lisosomal. Esta disminución puede correlacionarse con un aumento en la permeabilidad de membranas, liberación de enzimas lisosomales y activación de vías apoptóticas. En paralelo, se

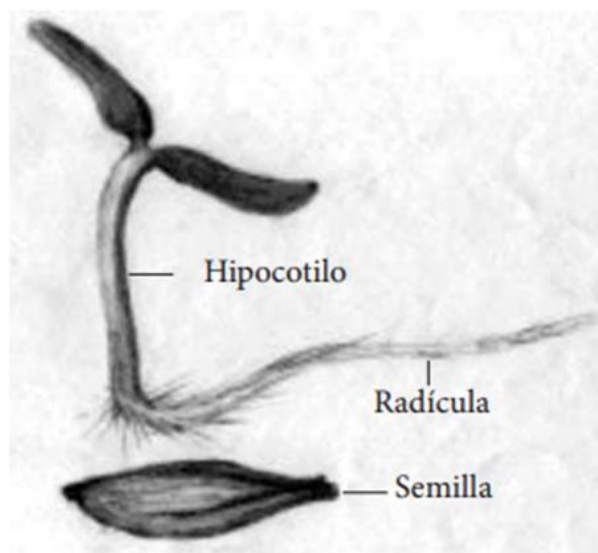
anticipa que las exposiciones prolongadas o a mayores concentraciones de ketoprofeno desencadenan respuestas inmunotóxicas más severas, tales como reducción en la capacidad fagocítica y alteraciones en el equilibrio redox de los celomocitos (Lowe et al., 1995; Gupta, 2000; Lee et al., 2009).

## 1.6. Semillas de *Lactuca Sativa*

*Lactuca sativa* L., conocida comúnmente como lechuga, es una planta perteneciente a la familia Asteraceae, cultivada extensamente en todo el mundo por su valor alimenticio y su importancia económica. Desde un punto de vista botánico, representa una especie modelo de gran utilidad tanto en investigaciones agronómicas como en estudios de ecotoxicología debido a su rápida germinación, a la homogeneidad en el desarrollo inicial de sus plántulas y a la sensibilidad que muestra frente a contaminantes ambientales presentes en agua y suelo. Su incorporación en bioensayos ha permitido establecer relaciones directas entre la exposición a compuestos tóxicos y las respuestas fisiológicas de los vegetales, contribuyendo a comprender el impacto de sustancias químicas emergentes sobre los ecosistemas terrestres y acuáticos (Chan-Keb et al., 2022).

El cultivo de *L. sativa* es fundamental en sistemas agrícolas a nivel global y, por ello, se encuentra expuesta de manera constante a contaminantes provenientes de prácticas intensivas de producción, fertilización, uso de pesticidas y riego con aguas residuales tratadas. Esta condición la transforma en un indicador vegetal adecuado para la evaluación de riesgos ambientales, especialmente en relación con contaminantes emergentes como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, que son liberados de manera continua al ambiente debido a su amplio consumo humano y a la limitada eficiencia de los sistemas convencionales de tratamiento de aguas (Kumar et al., 2022).

En cuanto a sus características morfológicas la semilla de *Lactuca sativa* es pequeña, de forma alargada y contiene los embriones responsables del inicio del desarrollo de la plántula. Al germinar, se distinguen rápidamente la radícula primaria, que constituye la primera estructura en emerger y que da origen al sistema radicular, junto con el hipocótilo y los cotiledones, órganos que cumplen funciones fotosintéticas iniciales hasta la aparición de las primeras hojas verdaderas. La radícula atraviesa fases de diferenciación que incluyen la zona meristemática, donde predominan divisiones celulares, la zona de elongación, en la que ocurre la expansión de las células, y la zona de maduración, donde aparecen los pelos radicales que facilitan la absorción de agua y nutrientes. La simplicidad y regularidad de este desarrollo inicial hacen posible medir con precisión la elongación de la raíz y el crecimiento de la plántula, parámetros utilizados comúnmente en bioensayos ecotoxicológicos (Priac et al., 2017). Su morfología se puede observar en la figura 1.7.



**Figura 1.7** Morfología de la semilla y la plántula de lechuga *Lactuca sativa* (Castillo, 2004).

En ecotoxicología, *Lactuca sativa* ha sido reconocida como una especie de prueba estandarizada en bioensayos de fitotoxicidad aguda, recomendados por organismos internacionales como la US Environmental Protection Agency y la OECD. La razón de esta elección radica en que la germinación y la elongación radicular son procesos altamente sensibles a contaminantes, en comparación con otras especies vegetales. Los parámetros más utilizados en estos bioensayos son la tasa de germinación y la longitud de la radícula, aunque en muchos estudios también se consideran la longitud del hipocótilo y el peso seco de las plántulas. En general, la elongación de la radícula es más sensible que la germinación, pues responde a concentraciones menores de contaminantes que no necesariamente impiden la emergencia de la semilla (Priac et al., 2017).

### 1.7. Bioensayo de fitotoxicidad con semilla de *Lactuca Sativa*

El bioensayo de toxicidad aguda con semillas de *Lactuca sativa* constituye una herramienta estandarizada y ampliamente aceptada en ecotoxicología para evaluar el efecto de contaminantes sobre la germinación y el desarrollo inicial de las plántulas. Su relevancia se sustenta en la rapidez de respuesta, la sensibilidad de los parámetros medidos y la facilidad metodológica de aplicación. A diferencia de otros ensayos vegetales que requieren semanas para obtener resultados, el bioensayo con lechuga permite observar efectos tóxicos en un rango de 72 a 120 horas, lo cual facilita la comparación entre contaminantes de distinta naturaleza (Campagna-Fernandes et al. 2016).

El fundamento del ensayo consiste en medir la tasa de germinación, la longitud de la radícula e hipocótilo como indicadores de fitotoxicidad. La germinación representa la capacidad de las

semillas para iniciar su desarrollo bajo condiciones de exposición, mientras que la elongación radicular refleja la respuesta celular al contaminante en las fases iniciales de división y expansión. Entre estos parámetros, la elongación de la radícula se considera más sensible, ya que puede verse afectada incluso a concentraciones que no reducen significativamente la germinación. Esta sensibilidad convierte al ensayo en un biomarcador temprano de toxicidad subletal (Campagna-Fernandes et al., 2016). Asimismo, la elongación del hipocótilo constituye un indicador complementario que refleja el crecimiento del eje embrionario aéreo, dependiente de procesos fisiológicos como la división y elongación celular, la síntesis de proteínas y la funcionalidad de los tejidos meristemáticos. La inhibición del hipocótilo puede evidenciar alteraciones metabólicas y hormonales inducidas por contaminantes, especialmente aquellos que interfieren en la producción de auxinas o en la integridad de las paredes celulares. Por ello, la evaluación conjunta de la radícula y el hipocótilo permite una interpretación más completa del impacto tóxico sobre las fases tempranas del desarrollo vegetal.

El bioensayo con *L. sativa* ha demostrado ser particularmente útil para evaluar contaminantes emergentes. Chan-Keb et al. (2022) estudiaron el efecto de fármacos comunes, como losartán y ranitidina, sobre la germinación y el crecimiento de semillas de lechuga. Los resultados mostraron reducciones significativas en la elongación radicular a concentraciones de 0,01 a 1000 mg/L, con un patrón dosis-dependiente. Este hallazgo respalda el uso de la lechuga como especie bioindicador para fármacos de amplio consumo humano que alcanzan ecosistemas terrestres y acuáticos. Por otro lado, Saetama et al. (2018) observa que en semillas de *Lactuca sativa*, la exposición a determinadas concentraciones (20, 10, 5, 2, 1 y 0.5 mg/L) de Ibuprofeno puede generar un efecto estimulante en la elongación de la radícula y el hipocótilo en comparación con el control. Este fenómeno refleja una posible respuesta hormética, en la que bajas concentraciones del contaminante actúan como un leve estímulo fisiológico que activa mecanismos de defensa y favorece temporalmente el crecimiento vegetal. Dicho comportamiento sugiere que la exposición a contaminantes farmacéuticos no siempre produce efectos fitotóxicos inmediatos, sino que puede modificar los procesos de germinación y desarrollo inicial de las plantas según la dosis y la naturaleza del compuesto.

Asimismo, se ha comprobado que *L. sativa* es sensible a contaminantes presentes en aguas residuales tratadas. Priac et al. (2017) evaluaron la fitotoxicidad de aguas depuradas mediante este bioensayo y observaron que, a pesar de la disminución de la carga orgánica tras el tratamiento, persistían efectos inhibitorios en la elongación radicular. Esto revela que los procesos de depuración convencionales no siempre eliminan los contaminantes emergentes, lo que refuerza la necesidad de complementar las mediciones químicas con pruebas biológicas.

El empleo del bioensayo con *L. sativa* en la evaluación de contaminantes farmacéuticos, como el ketoprofeno, adquiere gran relevancia al considerar que este compuesto ha sido reportado de manera recurrente en aguas residuales y suelos agrícolas. Al tratarse de un antiinflamatorio de uso

común y de difícil eliminación en procesos convencionales, su presencia residual plantea riesgos para la vegetación expuesta a través del riego o la enmienda de suelos con biosólidos. La inhibición del crecimiento radicular en lechuga tras la exposición a ketoprofeno o a sus productos de transformación podría indicar un impacto negativo directo en cultivos de importancia agrícola, lo que a su vez podría repercutir en la productividad y en la seguridad alimentaria. En este sentido, los bioensayos con *L. sativa* no solo cumplen un rol diagnóstico, sino también predictivo. Al reflejar efectos tempranos en el desarrollo vegetal, permiten anticipar consecuencias ecológicas y económicas de la presencia de contaminantes emergentes. Además, su incorporación en investigaciones sobre tecnologías de remediación, como la fotocatalisis heterogénea con TiO<sub>2</sub>, resulta indispensable. Si bien este proceso degrada moléculas complejas como el ketoprofeno en compuestos más simples, existe la posibilidad de que los intermediarios generados presenten toxicidad residual. Por ello, el bioensayo con lechuga puede confirmar si la reducción de concentración química se traduce en una disminución real de la toxicidad biológica.

Una ventaja adicional del ensayo radica en su bajo costo y facilidad de estandarización. Las semillas de lechuga son de amplia disponibilidad comercial, presentan una alta tasa de germinación y requieren condiciones experimentales simples, como placas de Petri con papel filtro humedecido. Además, organismos internacionales como la OECD han establecido protocolos específicos para este tipo de ensayos, lo que asegura la reproducibilidad y comparabilidad de resultados entre diferentes estudios y laboratorios. Sin embargo, el bioensayo presenta limitaciones que deben reconocerse, al centrarse en las etapas iniciales del desarrollo, los resultados reflejan toxicidad aguda inmediata, pero no necesariamente predicen efectos crónicos o acumulativos en el ciclo completo de las plantas.

## 1.8. Normativa aplicada

La regulación de los contaminantes emergentes, particularmente de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, ha tomado creciente relevancia debido a su detección reiterada en aguas superficiales, suelos y efluentes, así como a los posibles efectos ecotoxicológicos derivados de su persistencia y bioactividad. En Chile, aún no existe una normativa específica que establezca límites para fármacos en matrices ambientales ni protocolos obligatorios para su evaluación toxicológica. No obstante, el marco regulatorio internacional ofrece lineamientos sólidos que respaldan el uso de bioensayos como herramienta para evaluar el riesgo ambiental asociado a estos compuestos.

En materia de evaluación de sustancias químicas y principios activos farmacéuticos, la Unión Europea exige la realización de evaluaciones de riesgo ambiental antes de su comercialización, tal como establecen la Directiva 2001/82/CE para medicamentos veterinarios y la Directiva 2004/27/CE para medicamentos de uso humano. Estas directrices, junto con los lineamientos de la

European Medicines Agency (EMA, 2006), consideran explícitamente la posible afectación de organismos del suelo y recomiendan el uso de lombrices como organismos modelo. Complementariamente, la normativa REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) exige información ecotoxicológica que incluye ensayos en organismos terrestres como parte del proceso de registro y autorización de sustancias químicas.

En relación con organismos edáficos, las guías estandarizadas más utilizadas a nivel mundial corresponden a las de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico. La OECD Guideline 207: Earthworm, Acute Toxicity Test (2004) regula la evaluación de toxicidad aguda en *Eisenia fetida*, mientras que la OECD Guideline 222: Earthworm Reproduction Test (2008) establece protocolos para estudiar efectos crónicos sobre la reproducción y el crecimiento. En América, la US Environmental Protection Agency reconoce a *E. fetida* como organismo de referencia para la evaluación de toxicidad en suelos contaminados, tal como se detalla en la guía EPA OPPTS 850.6200: Earthworm Subchronic Toxicity Test (1996). Estas normas constituyen el respaldo metodológico central para el uso de lombrices en estudios de toxicidad de contaminantes emergentes, aun cuando no exista exigencia regulatoria nacional.

Adicionalmente, el uso de bioensayos agudos de corta duración (24–48 h) en *Eisenia fetida*, como los de este estudio, se encuentra respaldado por metodologías internacionalmente aceptadas para la evaluación de biomarcadores celulares en exposiciones breves. La norma ISO 16387:2004 establece procedimientos de ensayos de evitación con duraciones de 24–48 h, mientras que protocolos ampliamente utilizados en toxicología celular (Weeks & Svendsen, 1996; Homa et al., 2003, 2015; Kebede et al., 2018) estandarizan el uso de placas Petri, soluciones directas y tiempos de exposición de hasta 48 h para medir estabilidad lisosomal, viabilidad celular y respuestas tempranas ante contaminantes emergentes. En el caso de los bioensayos vegetales, *Lactuca sativa* es una especie modelo ampliamente aceptada debido a su alta sensibilidad y rápida germinación. La OECD Guideline 208: Terrestrial Plant Test – Seedling Emergence and Seedling Growth Test (2006) establece procedimientos estandarizados para evaluar germinación y crecimiento inicial. Asimismo, la US EPA y la norma ISO 18763:2016 respaldan bioensayos de fitotoxicidad aguda con duraciones de 72 a 120 h, incluyendo modalidades directas sin sustrato, en las cuales las semillas se exponen sobre un soporte inerte humedecido con la solución del contaminante. Estas metodologías permiten evaluar con precisión los efectos tempranos sobre germinación, elongación radicular e hipocotilar sin interferencias del suelo. De este modo, el bioensayo vegetal empleado en este estudio se ajusta plenamente a los estándares internacionales para pruebas de fitotoxicidad aguda.

## 2. Problema

La presencia de contaminantes emergentes, especialmente los compuestos farmacéuticos como el ketoprofeno, constituye un desafío creciente para la calidad ambiental y la estabilidad de los ecosistemas terrestres y acuáticos. Este fármaco, clasificado como antiinflamatorio no esterooidal, es uno de los analgésicos más consumidos a nivel global: en Europa su uso alcanza entre 10 y 50 toneladas anuales, dependiendo del país, mientras que en España se reportó un consumo de 27 toneladas/año solo en 2015 (Gómez-Canela et al., 2014; Santos et al., 2018). Su amplio uso en medicina humana y veterinaria explica su detección recurrente en aguas residuales, cuerpos receptores y suelos agrícolas irrigados con efluentes tratados, debido a su persistencia y baja biodegradabilidad. La exposición continua de organismos edáficos y vegetales a este tipo de fármacos genera preocupación por los posibles efectos subletales, tales como alteraciones celulares, estrés oxidativo y disfunción fisiológica.

A pesar del desarrollo de tecnologías de tratamiento más avanzadas, como los procesos de oxidación avanzada, la evidencia científica disponible no permite establecer con claridad si la degradación fotoquímica de fármacos como el ketoprofeno implica una reducción efectiva de su toxicidad. Se desconoce en qué medida los productos intermedios formados durante procesos como la fotólisis o la fotocatalisis con dióxido de titanio mantienen o incluso incrementan su efecto biológico adverso. Esta falta de conocimiento limita la comprensión del riesgo ambiental real asociado a los tratamientos fotocatalíticos, ya que la desaparición analítica del compuesto no garantiza la disminución de su impacto ecotoxicológico.

La problemática se centra, por tanto, en la incertidumbre respecto a los efectos biológicos y ambientales derivados de los productos de degradación del ketoprofeno generados por radiación UV-A y sistemas fotocatalíticos UV-A/TiO<sub>2</sub>. Esta brecha de conocimiento impide determinar si las tecnologías de oxidación avanzada representan una alternativa ambientalmente segura o si, por el contrario, podrían originar compuestos con toxicidad residual capaces de afectar a organismos del suelo y plantas expuestas a estos contaminantes.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del ketoprofeno, antes y después del tratamiento mediante fotólisis y fotocátalisis heterogénea, sobre celomocitos de *Eisenia fetida* y semillas de *Lactuca sativa*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Implementar bioensayos de toxicidad aguda en celomocitos de *Eisenia fetida* y semillas de *Lactuca sativa*, frente a exposiciones de soluciones de ketoprofeno.
- 3.2.2. Comparar las respuestas de los bioensayos de toxicidad aguda en celomocitos de *Eisenia fetida* y semillas de *Lactuca sativa*.
- 3.2.3. Calcular el porcentaje de inhibición de las respuestas en los bioensayos de toxicidad aguda con celomocitos de *Eisenia fetida* y semillas de *Lactuca sativa*.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Reactivos químicos

Para el desarrollo de los bioensayos se utilizó ketoprofeno ( $C_{16}H_{14}O_3$ ) de grado analítico de la marca, seleccionado por su carácter de contaminante emergente y por su alta frecuencia de detección en matrices ambientales, especialmente en aguas residuales y suelos agrícolas irrigados (Wilkinson et al., 2022; Tyumina et al., 2023). El sistema fotocatalítico se preparó utilizando dióxido de titanio ( $TiO_2$ ) P25 de la marca Evonik, debido a que este semiconductor es el catalizador más empleado y validado en estudios de fotocatalisis heterogénea por su estabilidad, no toxicidad y elevada eficiencia para generar especies reactivas de oxígeno bajo radiación UV-A (Fujishima & Honda, 1972; Herrmann, 1999; Chong et al., 2010). Su incorporación permite reproducir condiciones comparables a ensayos previos de remoción de fármacos, mediante procesos fotoquímicos.

Las disoluciones se prepararon utilizando agua destilada libre de cloro y compuestos orgánicos, con el fin de evitar interferencias en la absorción UV del fármaco o en la formación de especies reactivas durante los tratamientos fotoquímicos (Parsons, 2004).

#### 4.1.2. Organismos biológicos

Como organismos de prueba se emplearon ejemplares adultos clitelados de *Eisenia fetida*, obtenidos de un cultivo mantenido en condiciones controladas de humedad ( $70 \pm 5$  %), temperatura ( $22 \pm 2$  °C) y alimentación con compost natural. Los individuos utilizados presentaron un peso comprendido entre 0,4 y 0,7 gramos y se seleccionaron de tamaño y apariencia similar para estandarizar los ensayos. Para el bioensayo de fitotoxicidad se utilizaron semillas comerciales de *Lactuca sativa* marca Roots, de variedad homogénea y libres de tratamientos químicos. Las semillas se conservaron en su respectivo empaque, protegidas de la humedad y la luz, hasta su uso en los experimentos.

### 4.1.3. Equipos y materiales de laboratorio

Para la exposición de los organismos y la realización de los ensayos se utilizaron placas Petri de vidrio de 90 mm de diámetro, papel filtro libre de blanqueadores, micropipetas automáticas (1–1000  $\mu\text{L}$ ), pipetas graduadas, vasos de precipitado, frascos de vidrio y material de vidrio tipo borosilicato. En el bioensayo de *E. fetida* se empleó solución Ringer y solución de rojo neutro como colorante vital para el ensayo de tiempo de retención del rojo neutro. Las observaciones celulares se realizaron con un microscopio óptico al aumento 10x. Los tratamientos con radiación UV - A se llevaron a cabo en una cámara de radiación equipada por seis tubos Led de UV-A de Philips TL-D 15W/10, manteniendo una intensidad promedio de  $0,8 \text{ mW/cm}^2$  medida con un radiómetro portátil modelo UV340B.

## 4.2. Procedimiento experimental

### 4.2.1. Grupos experimentales

Los ensayos se organizaron en cuatro grupos experimentales: control sin adición de fármaco, ketoprofeno sin irradiar, ketoprofeno irradiado con radiación UV-A y ketoprofeno irradiado con radiación UV-A en presencia de dióxido de titanio. Todas las soluciones de ketoprofeno se prepararon a concentraciones de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  y  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , utilizando agua destilada libre de cloro y otras impurezas. Las concentraciones de ketoprofeno seleccionadas para este estudio se establecieron con el fin de abarcar un rango representativo de efectos subletales y observar gradientes de respuesta biológica en los bioensayos con *Eisenia fetida* y *Lactuca sativa*. La concentración más baja ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) se empleó como nivel de exposición cercano a valores reportados en efluentes y aguas residuales tratadas, donde típicamente se detectan concentraciones en el orden de microgramos a pocos miligramos por litro. Esta dosis permite evaluar respuestas tempranas o efectos leves en parámetros sensibles como la estabilidad lisosomal y la germinación. La concentración intermedia ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) se utilizó para representar escenarios de contaminación moderada, donde se espera detectar alteraciones fisiológicas más marcadas, tales como disminución del tiempo de retención del rojo neutro, afectación del equilibrio redox o inhibición parcial del crecimiento radicular. Finalmente, la concentración más alta ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) se seleccionó para asegurar la generación de un efecto biológico claro dentro del rango subletal, permitiendo caracterizar la magnitud del impacto y las diferencias entre tratamientos fotolíticos y fotocatalíticos. Este valor corresponde a un nivel experimental utilizado comúnmente en estudios ecotoxicológicos para establecer gradientes de respuesta y comparar la sensibilidad entre organismos biológicos, aun cuando exceda las concentraciones ambientales típicas. De esta manera, el conjunto de concentraciones permite observar un perfil completo de respuestas biológicas.

Estas concentraciones se alinean con los rangos utilizados en bioensayos agudos (de corta duración) reportados en la literatura. Bownik et al. (2020) evaluaron los efectos del ketoprofeno en organismos *Daphnia magna* empleando concentraciones entre 0,005 y 50 mg L<sup>-1</sup>, mientras que Chan-Keb et al. (2022) desarrollaron bioensayos fitotóxicos utilizando un rango de 0,01 a 1000 mg L<sup>-1</sup> de fármacos como losartán y ranitidina, demostrando que estos niveles permiten detectar respuestas subletales y gradientes de efecto comparables a los observados en el presente estudio.

La exposición fotoquímica sin catalizador se efectuó en una cámara de radiación equipada con lámparas UV-A ubicadas a 20 cm de la superficie de exposición, como se muestra en la figura 4.1. La intensidad promedio de radiación se mantuvo en 0,8 mW/cm<sup>2</sup>. Las soluciones se mantuvieron bajo agitación constante durante 90 minutos a temperatura ambiente controlada, garantizando la uniformidad del proceso. Para el tratamiento fotocatalítico, se adicionó 0,33 g/L TiO<sub>2</sub> en suspensión a las soluciones de ketoprofeno bajo las mismas condiciones experimentales de radiación. La suspensión se agitó continuamente durante la exposición para asegurar la dispersión homogénea del catalizador y evitar la sedimentación de las partículas. Al término de cada tratamiento, las muestras se conservaron en frascos ámbar, protegidas de la luz y a temperatura ambiente, hasta su utilización en los bioensayos de toxicidad.



**Figura 4.1.** Cámara de radiación UV -A (Facultad farmacia, Universidad de Valparaíso).

#### 4.2.2. Bioensayo de tiempo de retención rojo neutro en celomocitos de *Eisenia fetida*

Luego de realizar las soluciones de ketoprofeno (sin tratamiento, con tratamiento UV -A, con tratamiento UV - A / TiO<sub>2</sub>), se hizo el bioensayo de tiempo de tinción rojo neutro en celomocitos de *Eisenia fetida*, siguiendo el procedimiento descrito originalmente por Weeks y Svendsen (1996). Para esto se seleccionó lombrices adultas con peso entre 0,4 y 0,7 gramos con clitelo visible, se expuso tres lombrices por placa Petri de 90 mm con papel filtro y en cada placa se colocó 4 mL de concentración correspondiente: control (agua destilada), ketoprofeno, ketoprofeno + UV-A, y ketoprofeno + UV-A + TiO<sub>2</sub>. Se replicó tres veces cada concentración de ketoprofeno en cada ensayo y se mantuvo durante 48 horas a oscuridad. Transcurrido el tiempo, se extrajo el fluido celómico a través de la inserción de una jeringa de 1 mL en la parte posterior del clitelo (Eyambe et al., 1991). El fluido que se obtuvo se depositó sobre portaobjetos estériles, añadiendo 5 µL de solución de Ringer para mantener la viabilidad celular. Los celomocitos se dejaron adherir durante 30 segundos y posteriormente se adicionaron 20 µL de solución de rojo neutro de concentración 80 µg mL<sup>-1</sup>. Las observaciones se realizaron bajo microscopio óptico de aumento 10x. Se registró el tiempo transcurrido hasta que el 50% o más de las células observadas perdió la tinción intracelular, considerándose dicho valor como el tiempo de retención del rojo neutro (Ma et al., 2017). Este parámetro se empleó como indicador de la integridad lisosomal y de la viabilidad celular frente a los diferentes tratamientos evaluados.

#### 4.2.3. Bioensayo de fitotoxicidad con semilla de *Lactuca sativa*

El bioensayo de fitotoxicidad se realizó con el fin de evaluar los posibles efectos del ketoprofeno y de sus productos de transformación sobre la germinación y el crecimiento inicial de *Lactuca sativa*. Se utilizó semillas comerciales sin curar ni tratamiento químico previo. Las pruebas se realizaron en placas Petri de 90 mm de diámetro, acondicionadas con papel filtro humedecido con 4 mL de cada solución de tratamiento. En cada placa se colocaron diez semillas equidistantes, evitando el contacto entre ellas para permitir el desarrollo independiente de las radículas e hipocótilos (Castillo, 2004). Cada tratamiento se realizó por triplicado, incluyendo un control negativo con agua destilada. Las placas se mantuvieron en oscuridad a una temperatura constante de 22 ± 2 °C durante 96 horas. Finalizado el periodo de exposición, se registró el número de semillas germinadas, considerándose como germinadas aquellas con una radícula visible superior a 1 mm (OECD, 2006). A continuación, se midió la longitud de la radícula y del hipocótilo de cada plántula utilizando una regla milimetrada. El efecto fitotóxico se evaluó a partir de la reducción en la germinación y del crecimiento de las estructuras de las plántulas.

### 4.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los bioensayos se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar para cada concentración de cada tipo de exposición. Previo al análisis estadístico inferencial, se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro–Wilk y Levene, respectivamente. Cuando los datos cumplieron con ambos supuestos, se aplicó un análisis de varianza de una vía, considerando como factor el tipo de exposición (control, ketoprofeno, ketoprofeno + UV-A y ketoprofeno + UV-A + TiO<sub>2</sub>). En los casos en que el ANOVA indicó diferencias estadísticamente significativas,  $p < 0,05$ , se aplicó la prueba post hoc de Tukey para identificar los tratamientos que difirieron significativamente entre sí. Cuando los datos no cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se recurrió a la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis, seguida de la prueba de Dunn con corrección de Bonferroni. El nivel de significancia considerado fue del 5 % ( $\alpha = 0,05$ ). Los resultados se representaron en gráficos de barras con sus respectivos errores estándar, asignando letras distintas a los grupos que presentaron diferencias significativas. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa JASP, los cuales permitieron verificar los supuestos estadísticos, aplicar las pruebas de comparación y generar las representaciones gráficas. Una disminución significativa en el tiempo de retención del rojo neutro se interpretó como una alteración en la estabilidad lisosomal de los celomocitos de *Eisenia fetida*, mientras que una reducción significativa en la longitud de la radícula o del hipocótilo respecto al control se consideró una respuesta fitotóxica en *Lactuca sativa*, asociada a la exposición al ketoprofeno o a sus productos de transformación generados bajo radiación UV-A y/o en presencia de TiO<sub>2</sub>.

### 4.4. Cálculo de inhibición

La determinación del porcentaje de inhibición biológica se realizó con el propósito de cuantificar el efecto tóxico relativo del ketoprofeno y de sus productos de transformación sobre los organismos de prueba *Eisenia fetida* y *Lactuca sativa*. Este cálculo permitió expresar de manera porcentual la reducción del parámetro biológico medido en comparación con el control, proporcionando una medida estandarizada del grado de alteración fisiológica causada por la exposición a contaminantes emergentes (Environment and Climate Change Canada, 2007). El cálculo se efectuó mediante la relación entre el valor promedio del control y el promedio del tratamiento correspondiente, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde C corresponde al valor promedio del parámetro biológico en el control y T al valor promedio registrado en cada tratamiento. Esta forma de cálculo ha sido aplicada en ensayos de inhibición de crecimiento y toxicidad en organismos acuáticos y terrestres, ya que permite representar la pérdida relativa de función o viabilidad celular frente a un agente químico (Ma et al., 2017; Priac et al., 2017; Cabrera et al., 2021).

En el presente estudio, la inhibición se calculó utilizando los valores promedio de tiempo de retención del rojo neutro en celomocitos de *Eisenia fetida*, y las variables de germinación, elongación radicular e hipocotilar en *Lactuca sativa*. Esta metodología ha sido utilizada previamente en pruebas ecotoxicológicas para determinar la pérdida de integridad lisosomal y la disminución del crecimiento vegetal en función de la exposición a contaminantes farmacéuticos, permitiendo evaluar la severidad del efecto biológico en condiciones controladas (OECD, 2006; Ma et al., 2017).

No obstante, en concordancia con criterios estadísticos y con el enfoque metodológico adoptado en este estudio, el porcentaje de inhibición se interpretó y reportó únicamente en aquellos casos en que las diferencias entre el tratamiento y el control fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Esto se debe a que, si bien el porcentaje de inhibición constituye un indicador descriptivo de la magnitud del cambio, su interpretación toxicológica sólo es válida cuando la variación observada representa un efecto real y no una fluctuación atribuible a la variabilidad experimental.

El cálculo del porcentaje de inhibición se empleó para evidenciar la magnitud del efecto tóxico entre los tratamientos sin irradiar, irradiados con UV-A y tratados mediante fotocátalisis UV-A + TiO<sub>2</sub>. Este enfoque permitió determinar de manera cuantitativa el grado de alteración inducido por el ketoprofeno antes y después de la aplicación de los procesos de oxidación avanzada, contribuyendo a evaluar la eficacia de dichos tratamientos en la reducción de la toxicidad residual (Ferrando-Climent et al., 2012; Li et al., 2017). Asimismo, este análisis permitió complementar los resultados de eficiencia, aportando un indicador biológico de la respuesta diferencial de los organismos expuestos a los distintos tratamientos fotolíticos y fotocatalíticos.

## 5. Resultados

### 5.1. Efecto de ketoprofeno sobre el tiempo de retención rojo neutro en celomocitos de *Eisenia fetida*

En la tabla 5.1 se presentan los valores que se obtuvieron del bioensayo de tiempo de retención de rojo neutro en celomocitos de *Eisenia fetida* para cada tipo exposición. Se evidenció una disminución del tiempo de retención a medida que aumentó la concentración del fármaco en la exposición sin tratamiento, patrón que también se observó en las exposiciones fotoinducidas. Asimismo, los tratamientos sometidos a radiación UV-A y UV-A + TiO<sub>2</sub> mostraron variaciones en los tiempos de retención en comparación con el ketoprofeno no tratado, reflejando diferencias entre tipos de exposición. Los resultados presentados corresponden a los promedios obtenidos para cada condición experimental.

**Tabla 5.1.** Tiempo de retención rojo neutro en celomocitos de *Eisenia fetida*.

Exposición	Concentración ketoprofeno (mg/L)	Réplica	Promedio de tiempo retención rojo neutro por placa (minutos)	Promedio TRRN por concentración (minutos)
Control	0	1	90	90
		2	90	
		3	90	
Ketoprofeno sin irradiar	1,5	1	71	71,34
		2	74	
		3	69	
	10	1	44	43,34
		2	41	
		3	45	
	20	1	30	30,67
		2	33	
		3	29	
Ketoprofeno + UV - A	1,5	1	78	79,34
		2	81	
		3	79	
	10	1	53	54,67
		2	55	
		3	56	
	20	1	41	40
		2	39	
		3	40	
Ketoprofeno + UV - A + TiO <sub>2</sub>	1,5	1	83	83
		2	81	
		3	85	
	10	1	81	81,67
		2	84	
		3	60	
	20	1	46	44,34
		2	44	
		3	43	

## 5.2. Efecto del ketoprofeno sobre la germinación, elongación radicular e hipocotilar en semillas de *Lactuca Sativa*

En la tabla 5.2 se presentan los valores que se obtuvieron del bioensayo de fitotoxicidad sobre la germinación, elongación radicular e hipocotilar en semillas de *Lactuca Sativa* para cada tipo de exposición. Lo que permitió evidenciar el efecto del ketoprofeno sobre la germinación y el crecimiento temprano de *Lactuca sativa*. La germinación se mantuvo elevada en todos los tratamientos, aunque se observaron variaciones en el porcentaje de germinación al aumentar la concentración del fármaco. En cuanto al desarrollo de las plántulas, la elongación radicular mostró un incremento progresivo a medida que aumentó la concentración del ketoprofeno en los distintos tratamientos, mientras que la elongación hipocotilar presentó una tendencia opuesta, evidenciando una disminución conforme se incrementó la concentración del contaminante. Estas variaciones también se observaron en los tratamientos fotoexpuestos, registrándose diferencias entre las condiciones UV-A y UV-A + TiO<sub>2</sub>. Los resultados presentados corresponden a los promedios obtenidos para cada condición experimental, junto con sus respectivas desviaciones estándar.

**Tabla 5.2.** Germinación, elongación radicular e hipocotilar en semillas de *Lactuca sativa*.

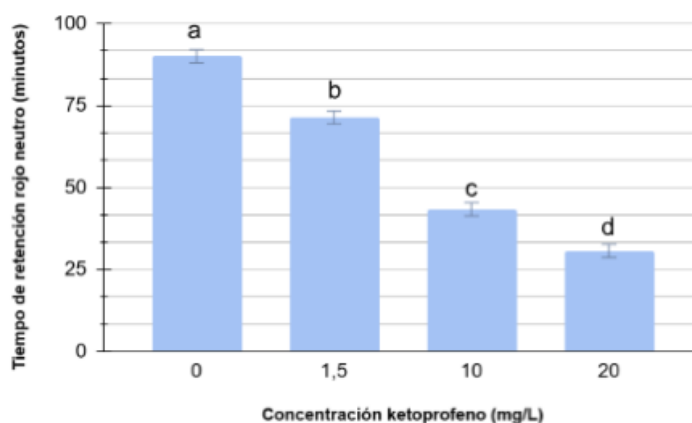
Exposición	Concentración ketoprofeno (mg/L)	N° Semillas con germinación	Germinación por placa (%)	Promedio germinación por concentración (%)	Promedio longitud radícula por placa (mm)	Promedio longitud radícula por concentración (mm)	Promedio longitud hipocótilo por placa (mm)	Promedio longitud hipocótilo por concentración (mm)
Control	0 mg/L	10	100%	100,00%	8,3	8,34	13,5	13,34
		10	100%		8,2		12,8	
		10	100%		8,5		13,7	
Ketoprofeno sin irradiar	[] 1,5 mg/L	9	90%	96,67 %	9,1	9,3	12,3	12,55
		10	100%		8,7		12,8	
		10	100%		10,1		12,5	
	[] 10 mg/L	9	90%	93,34%	11,6	11,86	9,6	9,8
		9	90%		11,2		9,8	
		10	100%		12,8		10	
	[] 20 mg/L	9	90%	86,67 %	14,1	14,37	7,56	7,97
		9	90%		15,7		7,44	
		8	80%		13,3		8,9	
Ketoprofeno + UV - A	[] 1,5 mg/L	9	90%	96,67 %	7,5	7,2	10,9	10,9
		10	100%		6,7		11,1	
		10	100%		7,4		10,7	
	[] 10 mg/L	9	90%	96,34%	11,3	10,8	9,7	9,97
		9	90%		10,2		10,2	
		10	100%		10,9		10	
	[] 20 mg/L	9	90%	90%	12,4	11,48	8,3	8,56
		9	90%		10,43		8,7	
		9	90%		11,6		8,67	
Ketoprofeno + UV - A + TiO <sub>2</sub>	[] 1,5 mg/L	10	100%	96,67 %	7,1	6,23	10,7	11,1
		10	100%		5,5		12,2	
		9	90%		6,1		10,3	
	[] 10 mg/L	10	100%	93,34%	9,8	9,03	10,7	10,6
		9	100%		9		10,3	
		9	90%		8,3		10,8	
	[] 20 mg/L	10	100%	93,34 %	10,5	9,93	10,2	9,53
		9	90%		10,1		9,7	
		9	90%		9,2		8,7	

### 5.3. Análisis de las respuestas biológicas en los bioensayos de toxicidad aguda

Los resultados de los análisis estadísticos para comparar los efectos de los bioensayos implementados que se obtuvieron mediante el programa JAPS se encuentran adjuntados en el Anexo 1.

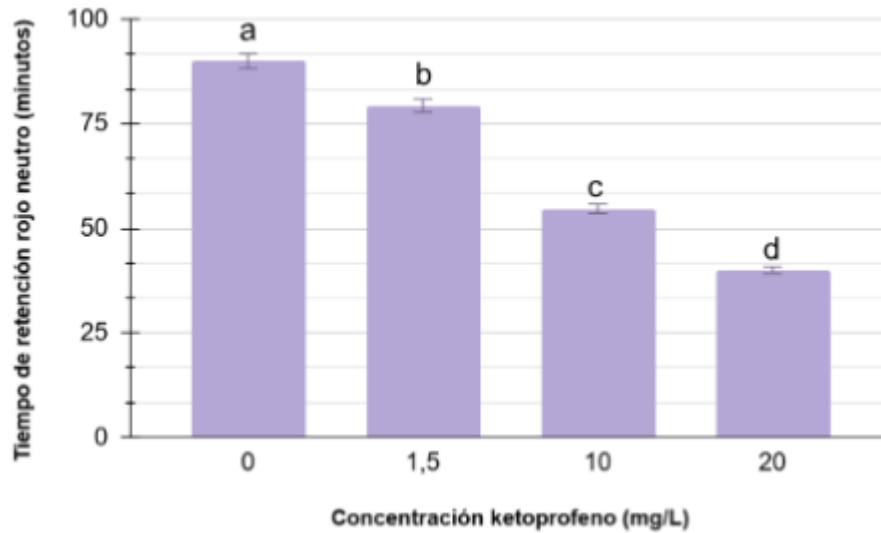
#### 5.3.1. Bioensayo tiempo de retención rojo neutro en celomocitos de *Eisenia fetida*

En la figura 5.1 se observó una disminución significativa del TRRN a medida que aumentó la concentración del fármaco, en donde todos los grupos difirieron entre sí. El TRRN varió entre 90 minutos y 30 minutos, en el control y la concentración de 20 mg/L respectivamente.



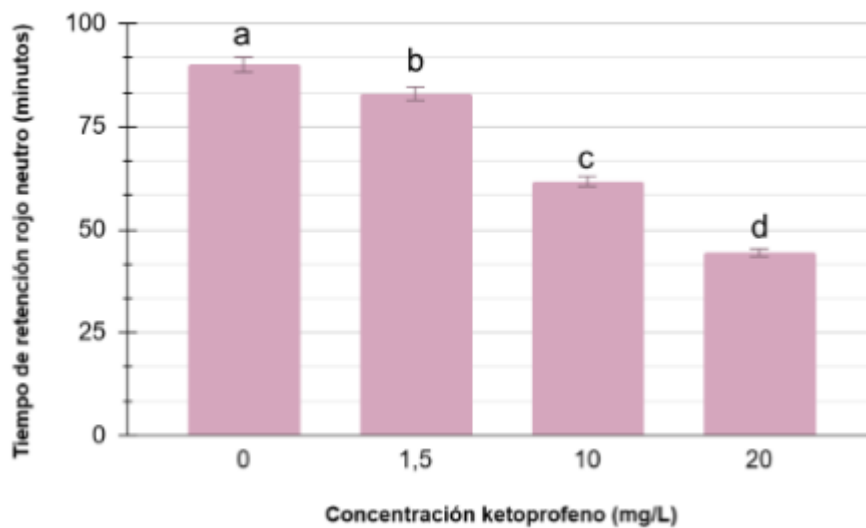
**Figura 5.1.** Tiempo de retención del rojo neutro en celomocitos de *Eisenia fetida* expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ).

La figura 5.2 muestra el tiempo de retención del rojo neutro en *Eisenia fetida* expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno irradiado con luz UV-A. Se observó una disminución del TRRN conforme aumentó la concentración del fármaco. Variando de 90 minutos en el control a los 40 minutos en 20 mg /L de contaminante.



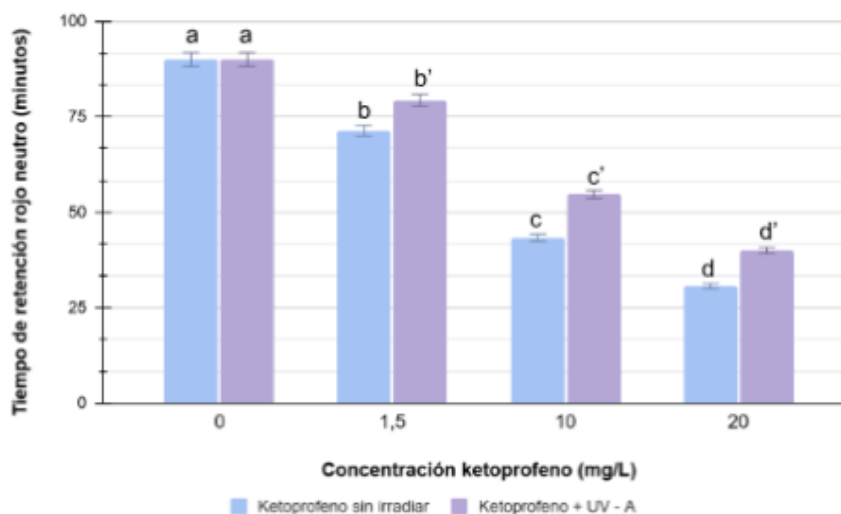
**Figura 5.2.** Tiempo de retención del rojo neutro en *Eisenia fetida* expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado mediante radiación UV-A. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ).

En la figura 5.3 se observa que el tiempo de retención del rojo neutro en *Eisenia fetida* disminuyó al aumentar la concentración de ketoprofeno tratado mediante fotocatalisis UV-A + TiO<sub>2</sub>. En donde el control presentó un TRRN de 90 minutos y la concentración más alta un tiempo de 44,33 minutos.



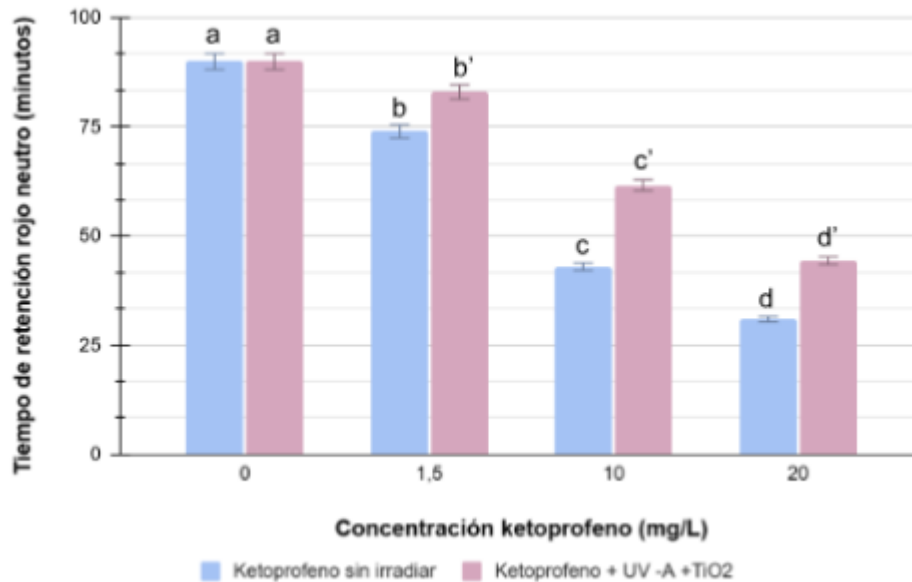
**Figura 5.3.** Tiempo de retención del rojo neutro en *Eisenia fetida* expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado mediante el sistema fotocatalítico UV-A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ).

En la figura 5.4 se muestra la comparación entre las exposiciones a ketoprofeno sin irradiar y tratado con radiación UV-A. En ambos tratamientos, el tiempo de retención del rojo neutro disminuyó con el aumento de la concentración del fármaco. Se observó diferencias significativas entre el tipo de exposición por concentración.



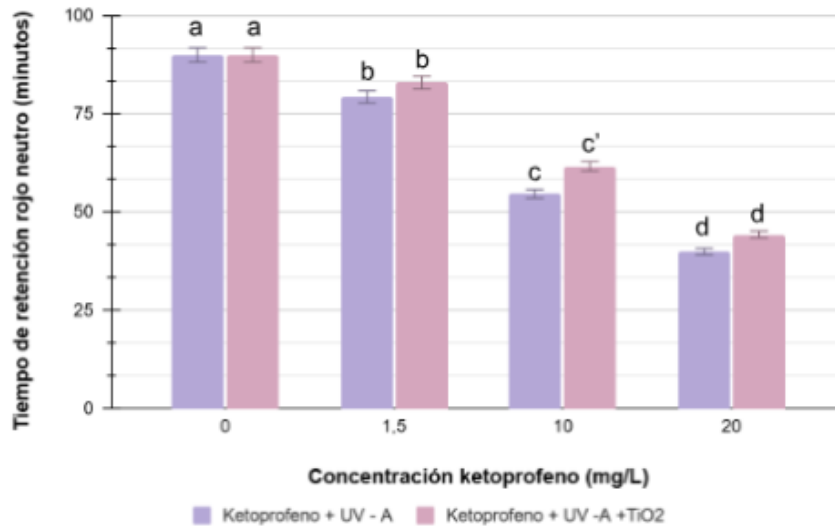
**Figura 5.4.** Comparación del tiempo de retención del rojo neutro en celomocitos de *Eisenia fetida* expuesta a ketoprofeno sin irradiar y ketoprofeno tratado con radiación UV-A durante. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos por concentración ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento UV - A, los cuales presentan diferencias significativas respecto a la exposición sin irradiar.

En la figura 5.5 se muestra la comparación entre las exposiciones a ketoprofeno sin irradiar y tratado con radiación UV-A + TiO<sub>2</sub>. El tiempo de retención del rojo neutro fue mayor en las lombrices expuestas al tratamiento con UV-A + TiO<sub>2</sub>. En ambos casos, el TRRN disminuyó significativamente con el aumento de la concentración, evidenciando un efecto dosis-dependiente, indicando diferencias significativas tanto dentro de cada exposición como entre tratamientos a igual concentración.



**Figura 5.5.** Comparación del tiempo de retención del rojo neutro en celomocitos de *Eisenia fetida* expuesta a ketoprofeno sin irradiar y ketoprofeno tratado con radiación UV-A en presencia de TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos por concentración ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A + TiO<sub>2</sub>, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto a la exposición sin irradiar.

En la figura 5.6 se muestra la comparación entre las exposiciones a ketoprofeno tratado con radiación UV-A y con UV-A + TiO<sub>2</sub>. En ambos tratamientos, el tiempo de retención del rojo neutro disminuyó con el aumento de la concentración. Los valores de TRRN fueron mayores en las lombrices expuestas al ketoprofeno tratado con UV-A + TiO<sub>2</sub>. El análisis de varianza reveló diferencias significativas entre las concentraciones ( $p < 0,05$ ). La prueba de Tukey indicó que solo la concentración de 10 mg L<sup>-1</sup> presentó diferencias significativas entre ambos tratamientos.

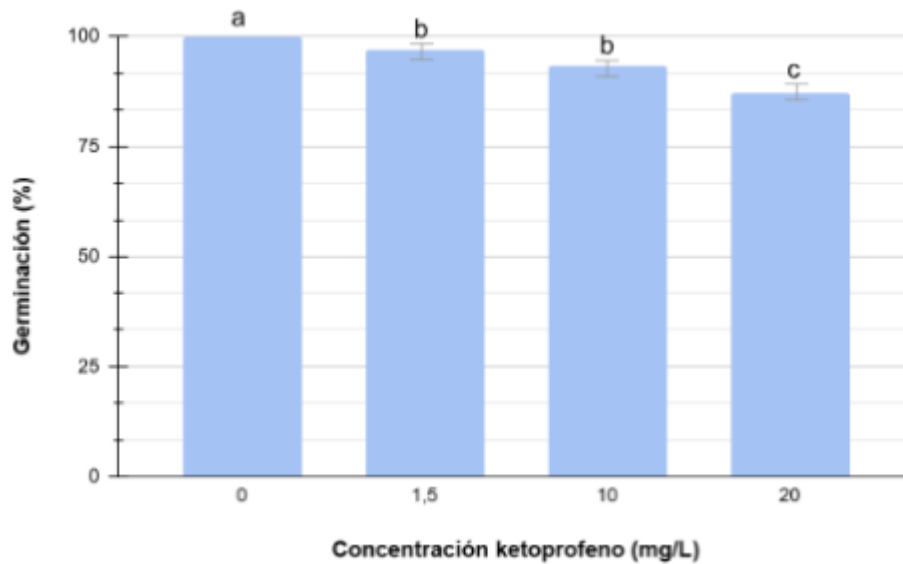


**Figura 5.6.** Comparación del tiempo de retención del rojo neutro en celomocitos de *Eisenia fetida* expuesta a ketoprofeno tratado con radiación UV-A y ketoprofeno tratado con radiación UV-A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos por concentraciones ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A + TiO<sub>2</sub>, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento con solo UV-A.

### 5.3.2. Bioensayo de fitotoxicidad con semilla de *Lactuca sativa*

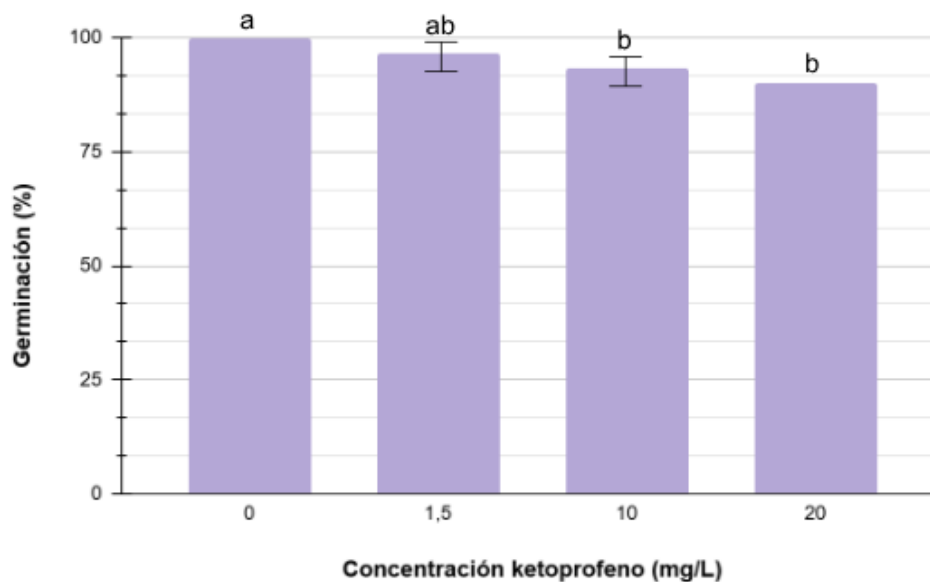
#### Germinación de semillas

En la figura 5.7 se muestra que la germinación de *Lactuca sativa* disminuyó gradualmente con el aumento de la concentración de ketoprofeno sin irradiar. Los porcentajes promedio de germinación fueron de 100 % para el control, 96,7 % para 1,5 mg L<sup>-1</sup>, 93,3 % para 10 mg L<sup>-1</sup> y 86,7 % para 20 mg L<sup>-1</sup>. Se observó diferencias significativas entre tratamientos.



**Figura 5.7.** Germinación de *Lactuca sativa* expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ).

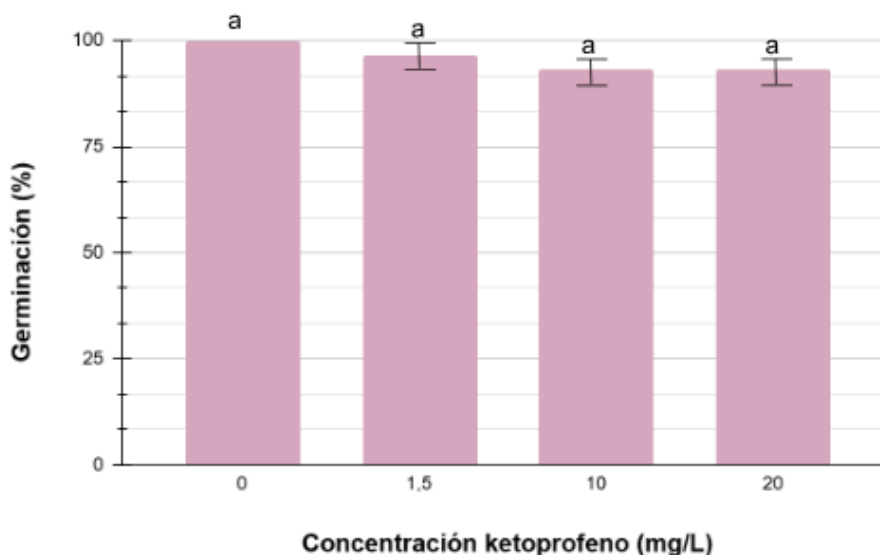
En la figura 5.8 se observa que la germinación de *Lactuca sativa* disminuyó levemente con el aumento de la concentración de ketoprofeno irradiado con luz UV-A. El control presentó una germinación promedio del 100 %, mientras que en 1,5 mg L<sup>-1</sup>, 10 mg L<sup>-1</sup> y 20 mg L<sup>-1</sup> se registraron valores de 96,7 %, 93,3 % y 90 %, respectivamente. Se evidenció diferencias significativas entre la exposición de control con las concentraciones de 10 y 20 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 5.8.** Germinación de *Lactuca sativa* expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado con radiación UV-A. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ).

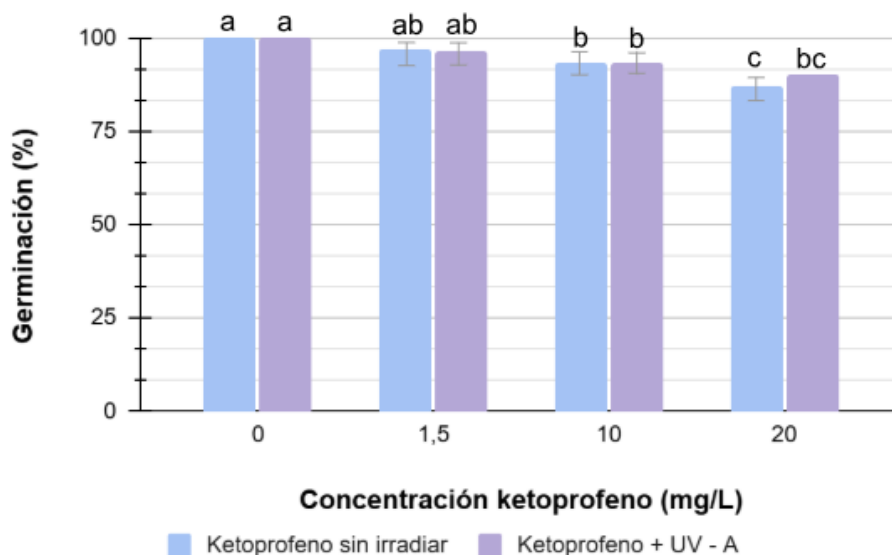
En la figura 5.9 se observa que las semillas de *Lactuca sativa* mantuvieron una alta capacidad germinativa frente al ketoprofeno tratado con radiación UV-A en presencia de TiO<sub>2</sub>. El porcentaje de germinación fue de 100 % para el control y se mantuvo entre 93,3 % y 96,7 % en las

concentraciones tratadas, sin evidenciar diferencias significativas entre grupos. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).



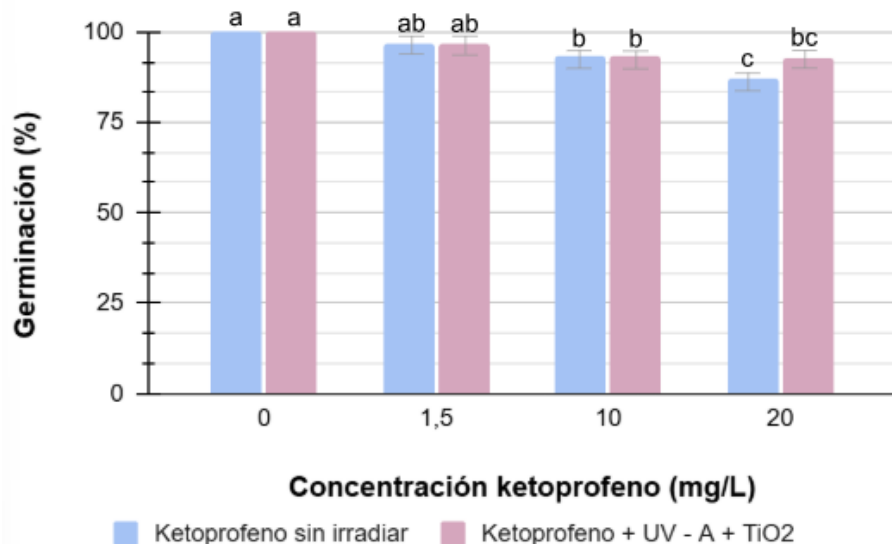
**Figura 5.9.** Germinación de *Lactuca sativa* expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado mediante fotocatalisis de UV-A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ).

En la figura 5.10 se muestra la comparación entre las exposiciones a ketoprofeno sin irradiar y tratado con radiación UV-A. En ambos casos, la germinación de *Lactuca sativa* disminuyó progresivamente con el aumento de la concentración del contaminante. El análisis estadístico indicó diferencias entre concentraciones ( $p < 0,05$ ), en donde las semillas expuestas al ketoprofeno sin irradiar presentaron una mayor reducción en la germinación a medida que aumentaba la concentración, mientras que las tratadas con UV-A mantuvieron porcentajes ligeramente superiores a medida que aumentaba la concentración.



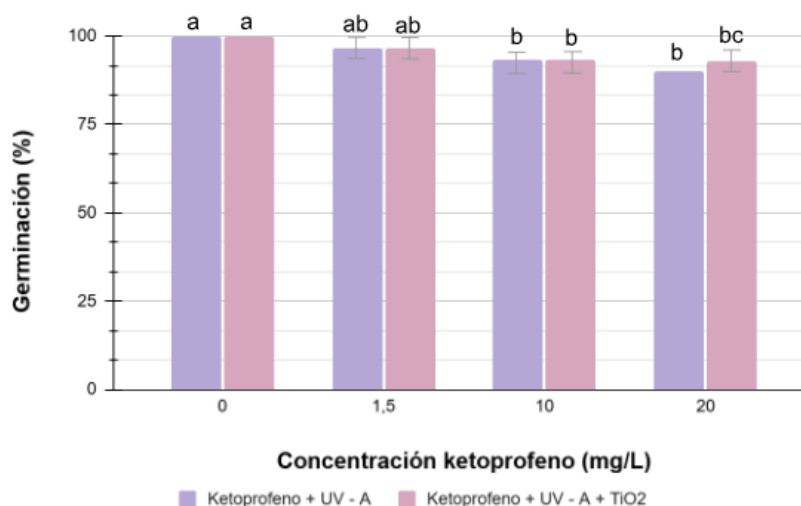
**Figura 5.10.** Comparación de germinación de *Lactuca sativa* expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar y tratado con radiación UV-A. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre exposiciones por concentración ( $p < 0,05$ ).

En la figura 5.11 se muestra la comparación entre las exposiciones a ketoprofeno sin irradiar y tratado mediante fotocatalisis UV-A + TiO<sub>2</sub>. En ambos casos, la germinación de *Lactuca sativa* se mantuvo elevada en todas las concentraciones evaluadas. Se evidenció diferencias significativas leves ( $p < 0,05$ ), entre el control y la concentración más alta (20 mg L<sup>-1</sup>). Las letras en el gráfico reflejan estas diferencias estadísticas entre tratamientos.



**Figura 5.11.** Comparación de germinación de *Lactuca sativa* expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar y tratado mediante fotocatalisis de UV-A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre exposiciones por concentración ( $p < 0,05$ ).

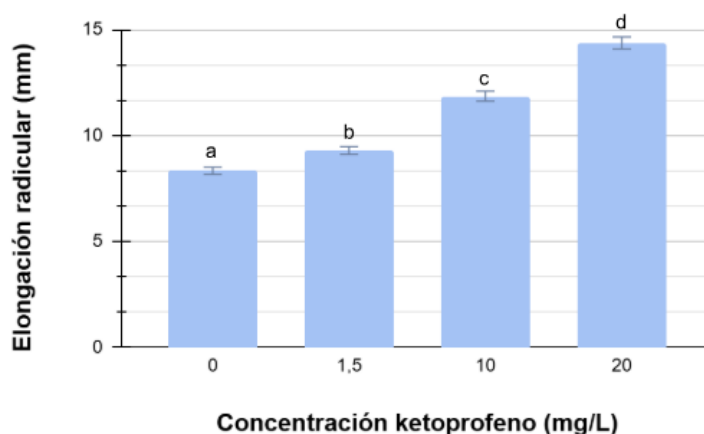
En la figura 5.12 se muestra la comparación entre las exposiciones a ketoprofeno tratado con radiación UV-A y con fotocátalisis UV-A + TiO<sub>2</sub>. En ambos tratamientos, la germinación de *Lactuca sativa* se mantuvo elevada en todas las concentraciones, con valores promedio entre 90 % y 100 %. No se evidenció diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 5.12.** Comparación de germinación de *Lactuca sativa* expuesta a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado con radiación UV-A y fotocátalisis de UV-A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos por concentración ( $p < 0,05$ ).

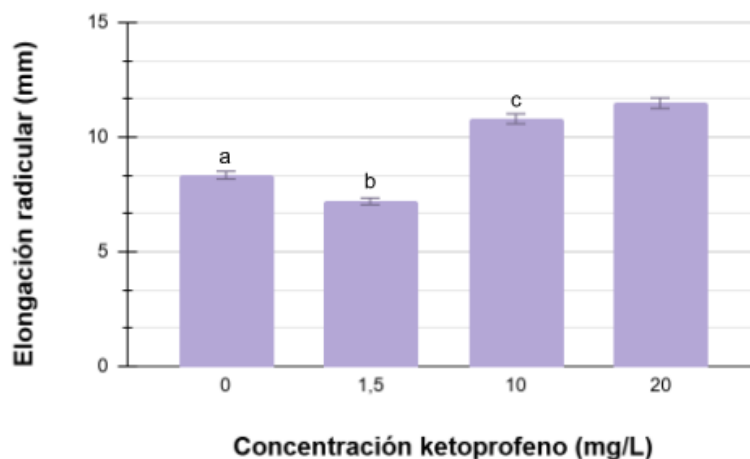
### Elongación radicular

En la figura 5.13 se observa un aumento progresivo en la longitud radicular de *Lactuca sativa* con el incremento de la concentración de ketoprofeno sin irradiar. Se observó diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). El control presentó la menor elongación promedio, mientras que la mayor se registró en 20 mg L<sup>-1</sup>



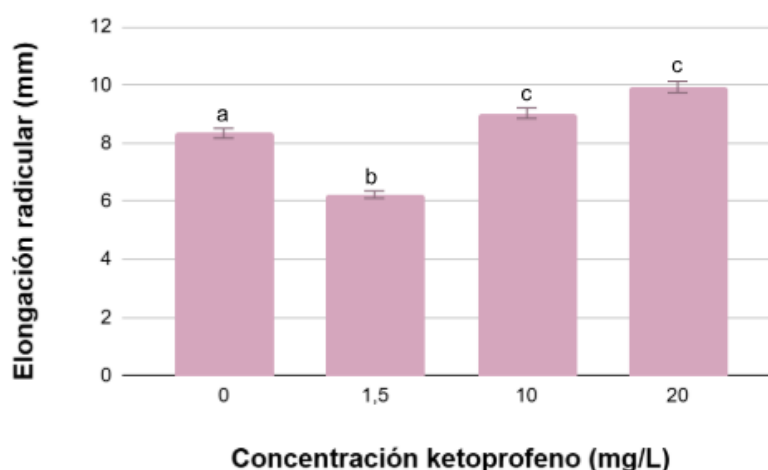
**Figura 5.13.** Elongación radicular de semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ).

En la figura 5.14 se muestra que las semillas expuestas a soluciones de ketoprofeno irradiadas con luz UV-A presentaron un incremento progresivo en la longitud radicular conforme aumentó la concentración del contaminante. Se observó diferencias significativas entre las concentraciones. Las concentraciones de 10 mg L<sup>-1</sup> y 20 mg L<sup>-1</sup> registraron las mayores elongaciones.



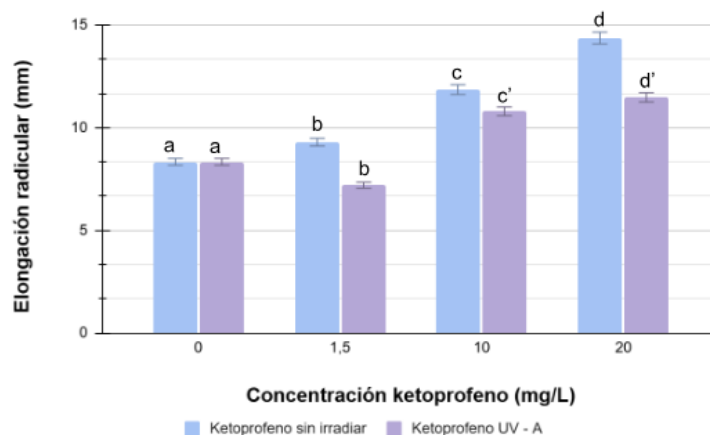
**Figura 5.14.** Elongación radicular de semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno irradiado con UV -A. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ).

En la figura 5.15 se muestra que las semillas de *Lactuca sativa* expuestas a ketoprofeno tratado mediante fotocatalisis UV-A + TiO<sub>2</sub> presentaron diferencias significativas en la elongación radicular respecto al control. La menor longitud radicular se registró a 1,5 mg L<sup>-1</sup>, mientras que las concentraciones de 10 mg L<sup>-1</sup> y 20 mg L<sup>-1</sup> mostraron los mayores valores.



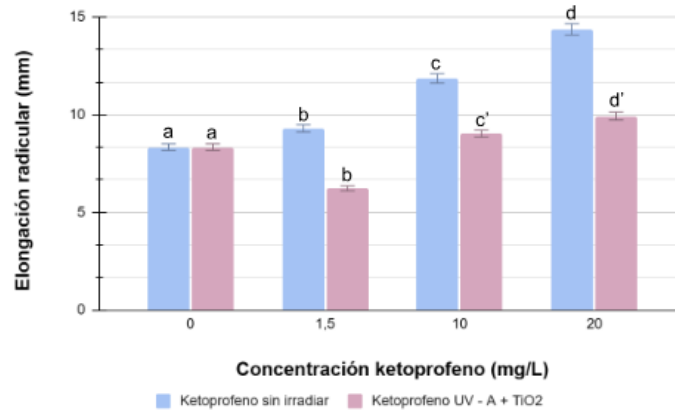
**Figura 5.15.** Elongación radicular de semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno irradiado con UV -A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ).

En la figura 5.16 se muestra la comparación entre las exposiciones a ketoprofeno sin irradiar y tratado con radiación UV-A. Las semillas de *Lactuca sativa* presentaron variaciones significativas en la elongación radicular en función del tipo de tratamiento y de la concentración. En el tratamiento sin irradiar, la longitud radicular aumentó progresivamente hasta alcanzar su valor máximo a 20 mg L<sup>-1</sup>, mientras que en el tratamiento con radiación UV-A el incremento fue más moderado en la misma concentración.



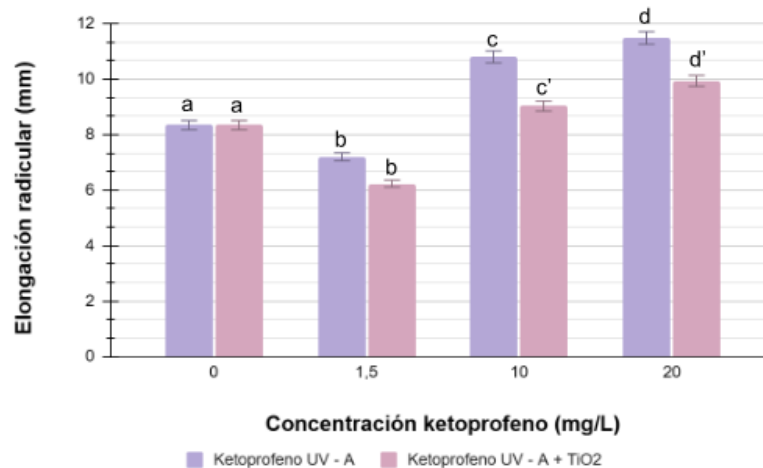
**Figura 5.16.** Comparación de elongación radicular en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar y tratado con radiación UV-A. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tipo de exposición por concentración ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto a la exposición de ketoprofeno sin irradiar.

En la figura 5.17 se muestra la comparación entre las exposiciones a ketoprofeno sin irradiar y tratado mediante fotocatalisis UV-A + TiO<sub>2</sub>. La elongación radicular de *Lactuca sativa* presentó variaciones significativas entre concentraciones y tratamientos, a excepción de la concentración 1,5 mg/L. En ambos casos, la longitud radicular aumentó con la concentración, aunque las semillas expuestas al ketoprofeno sin irradiar registraron valores mayores que las tratadas con el sistema fotocatalítico.



**Figura 5.17.** Comparación de elongación radicular en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar y tratado con radiación UV-A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tipo de exposición por concentración ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A + TiO<sub>2</sub>, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto a la exposición de ketoprofeno sin irradiar.

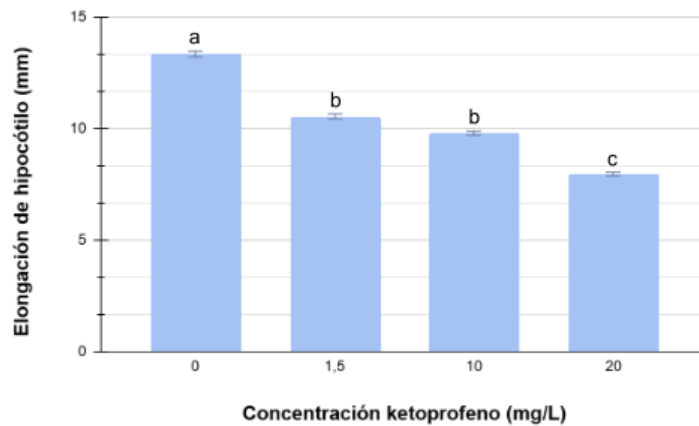
En la figura 5.18 se muestra la comparación entre las exposiciones a ketoprofeno tratado con radiación UV-A y con fotocátalisis UV-A + TiO<sub>2</sub>. La elongación radicular de *Lactuca sativa* presentó diferencias significativas entre concentraciones y tratamientos, a excepción de la concentración 1,5 mg/L. En ambos casos se observó un aumento progresivo en la longitud radicular con el incremento de la concentración del contaminante. Las semillas expuestas al tratamiento fotocatalítico mostraron valores menores que las tratadas solo con UV-A, especialmente en las concentraciones de 10 mg L<sup>-1</sup> y 20 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 5.18.** Comparación de elongación radicular en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado con radiación UV-A y mediante fotocátalisis UV-A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos por concentraciones ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A + TiO<sub>2</sub>, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento con sólo UV-A.

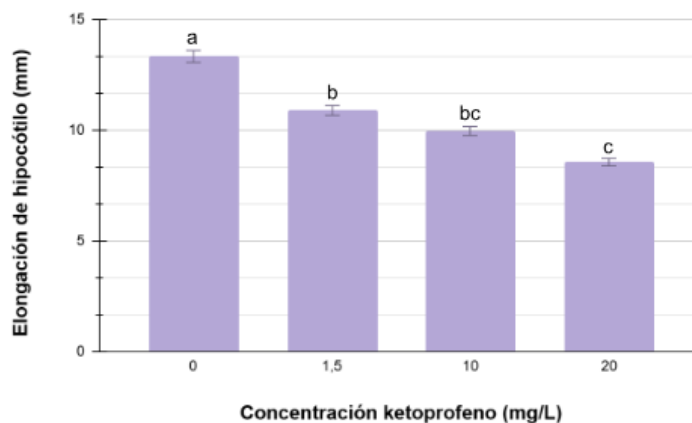
## Elongación del hipocótilo

En la figura 5.19 se observa una disminución progresiva en la elongación del hipocótilo de *Lactuca sativa* con el aumento de la concentración de ketoprofeno sin irradiar. Se observó diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Se identificó que el control presentó la mayor longitud promedio, mientras que las concentraciones de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  y  $20 \text{ mg L}^{-1}$  registraron reducciones significativas, siendo esta última la de menor elongación.



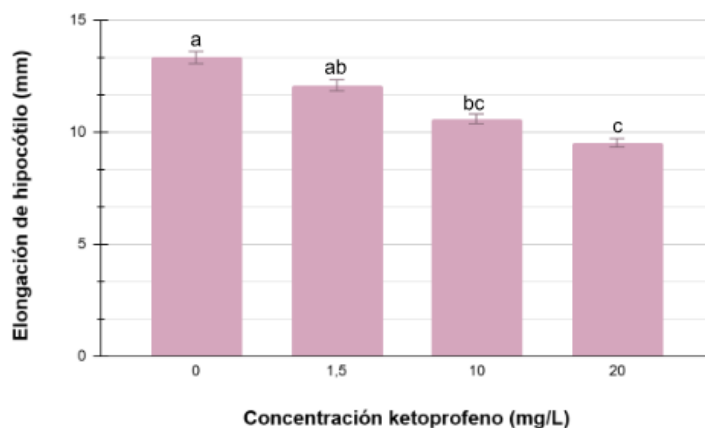
**Figura 5.19.** Elongación del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ).

En la figura 5.20 se observa una disminución significativa en la elongación del hipocótilo de *Lactuca sativa* con el aumento de la concentración de ketoprofeno tratado con radiación UV-A. El control presentó la mayor longitud promedio, mientras que las concentraciones de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  y  $20 \text{ mg L}^{-1}$  registraron reducciones notorias, alcanzando el valor mínimo en  $20 \text{ mg L}^{-1}$  (8,56 mm). Se evidenció diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ), mostrando un efecto dosis-dependiente de inhibición del crecimiento.



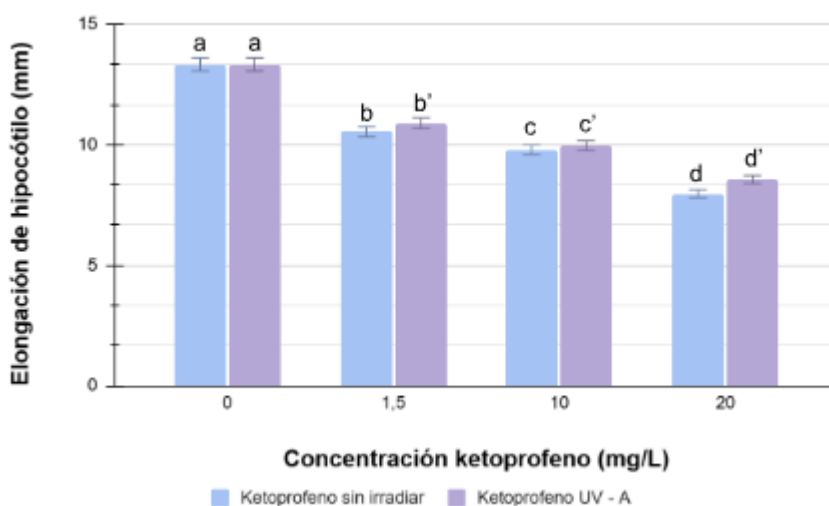
**Figura 5.20.** Elongación del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado con luz UV-A. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ).

En la figura 5.21 se observa una disminución gradual en la elongación del hipocótilo de *Lactuca sativa* con el aumento de la concentración de ketoprofeno tratado mediante fotocatalisis UV-A + TiO<sub>2</sub>. El control presentó la mayor longitud promedio, mientras que las concentraciones de 10 mg L<sup>-1</sup> y 20 mg L<sup>-1</sup> mostraron reducciones significativas, alcanzando el menor valor en 20 mg L<sup>-1</sup>. Se evidenció un efecto de inhibición progresivo sobre el crecimiento hipocotilar a medida que aumentó la concentración.



**Figura 5.21.** Elongación del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado con luz UV-A y dióxido de titanio. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones ( $p < 0,05$ ).

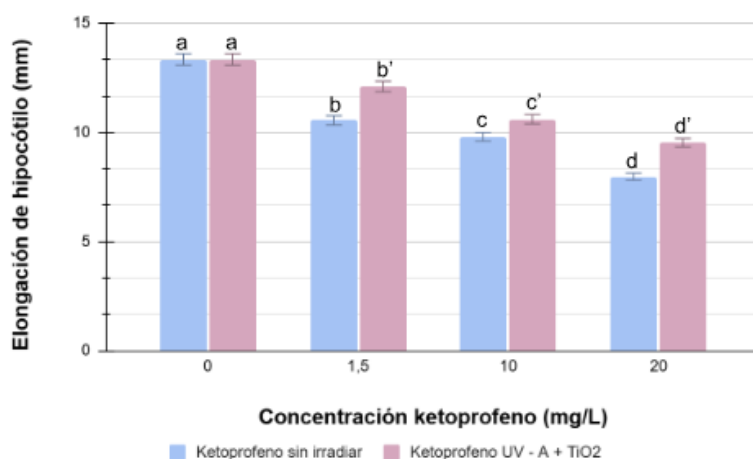
En la figura 5.22 se muestra la comparación entre las exposiciones a ketoprofeno sin irradiar y tratado con radiación UV-A. En ambos tratamientos, la elongación del hipocótilo de *Lactuca sativa* disminuyó significativamente con el aumento de la concentración. El control presentó la mayor longitud promedio, mientras que los valores mínimos se registraron a 20 mg L<sup>-1</sup>, para el ketoprofeno sin irradiar y para el tratado con UV-A. Se evidenció diferencias significativas entre concentraciones y tipos de exposición ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.22.** Comparación de elongación del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar y tratado con luz UV-A durante. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tipo de exposición por concentración ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla

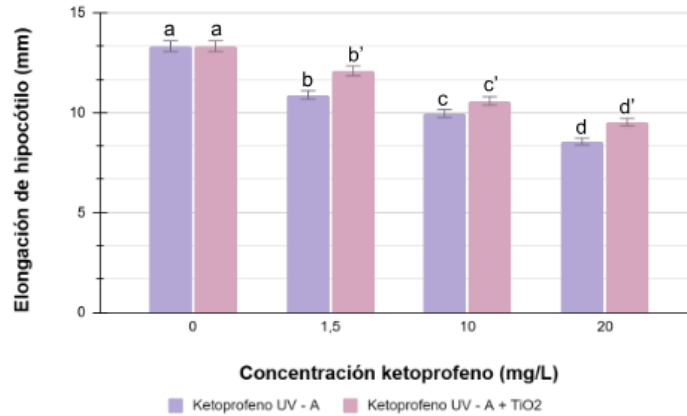
(') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto a la de ketoprofeno sin irradiar.

En la figura 5.23 se muestra la comparación entre las exposiciones a ketoprofeno sin irradiar y tratado mediante fotocátalisis UV-A + TiO<sub>2</sub>. En ambos tratamientos, la elongación del hipocótilo de *Lactuca sativa* disminuyó significativamente con el aumento de la concentración. El control presentó la mayor longitud promedio, mientras que a 20 mg L<sup>-1</sup> se registraron los menores valores. La prueba post hoc de Tukey evidenció diferencias significativas entre concentraciones y tipos de exposición ( $p < 0,05$ ). En general, la fotocátalisis con TiO<sub>2</sub> mostró una ligera mejora en la elongación del hipocótilo respecto al ketoprofeno sin irradiar.



**Figura 5.23.** Comparación de elongación del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno sin irradiar y tratado con luz UV-A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tipo de exposición por concentración ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A + TiO<sub>2</sub>, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto al de ketoprofeno sin irradiar.

En la figura 5.24 se muestra la comparación entre las exposiciones a ketoprofeno tratado con radiación UV-A y con fotocátalisis UV-A + TiO<sub>2</sub>. En ambos tratamientos, la elongación del hipocótilo de *Lactuca sativa* disminuyó significativamente con el aumento de la concentración del contaminante. El control presentó la mayor longitud promedio, mientras que a 20 mg L<sup>-1</sup> se registraron los valores mínimos. Se evidenció diferencias significativas entre concentraciones y entre tipos de exposición ( $p < 0,05$ ). En general, la fotocátalisis con TiO<sub>2</sub> promovió una ligera recuperación en la elongación del hipocótilo respecto al tratamiento con UV-A solo.



**Figura 5.24.** Comparación de elongación del hipocótilo en semillas de *Lactuca sativa* expuestas a diferentes concentraciones de ketoprofeno tratado con luz UV-A y con luz UV-A + TiO<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). Las letras con comilla (') identifican los grupos correspondientes al tratamiento con UV-A + TiO<sub>2</sub>, los cuales presentan diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento con sólo UV-A.

#### 5.4. Cálculo de inhibición

En la tabla 5.3 se presentan los resultados de los porcentajes de inhibición del bioensayo de TRRN en celomocitos de *Eisenia fetida* calculados respecto al control, en donde se evidenció un aumento del porcentaje de inhibición a medida que aumenta la concentración en cada tratamiento, pero una disminución comparativa entre exposición cuando se aplica radiación UV - A y UV - A + TiO<sub>2</sub>.

**Tabla 5.3.** Inhibición de los tratamientos en TRRN de *Eisenia fetida*.

Concentración (mg/L)	TRRN sin irradiar (minutos)	Inhibición %	TRRN UV - A (minutos)	Inhibición %	TRRN UV - A + TiO <sub>2</sub> (minutos)	Inhibición %
0	90	—	90	—	90	—
1,5	71,33	<b>20,74</b>	79,33	<b>11,85</b>	83	<b>7,78</b>
10	43,34	<b>51,85</b>	54,67	<b>39,26</b>	61,67	<b>31,48</b>
20	30,67	<b>65,92</b>	40	<b>55,56</b>	44,33	<b>50,74</b>

En la tabla 5.4 se observan los resultados de los porcentajes de inhibición calculados respecto al control en la germinación de *Lactuca sativa*, en donde se evidenció un aumento del porcentaje de inhibición a medida que aumenta la concentración en cada tratamiento. Al no haber diferencia significativa en germinación con radiación UV - A + TiO<sub>2</sub>, no se calculó el porcentaje de inhibición.

**Tabla 5.4.** Inhibición de los tratamientos en la germinación de *Lactuca sativa*.

Concentración (mg/L)	Germinación sin irradiar %	Inhibición %	Germinación UV - A %	Inhibición %
0	100	—	100	—
1,5	96,67	3,34	96,67	3,34
10	93,34	6,67	93,34	6,67
20	86,67	13,34	90	10

En la tabla 5.5 se presentan los resultados de los porcentajes de inhibición calculados respecto al control en la elongación radicular de *Lactuca sativa*, en donde se observó una respuesta contraria de inhibición, indicando un estímulo de crecimiento en la mayoría de las concentraciones de los tratamientos.

**Tabla 5.5.** Inhibición de los tratamientos en la elongación radicular de *Lactuca sativa*. Valores negativos indican estímulo de crecimiento (es decir, no hubo inhibición, sino un aumento respecto al control).

Concentración (mg/L)	Radícula sin irradiar (mm)	Inhibición %	Radícula UV - A (mm)	Inhibición %	Radícula UV - A +TiO <sub>2</sub> (mm)	Inhibición %
0	8,34	—	8,34	—	8,34	—
1,5	9,30	-11,50*	7,2	13,67*	6,23	25,33
10	11,86	-42,2*	10,8	-29,47*	9,03	-8,27
20	14,37	-72,31*	11,48	-37,60*	9,93	-19,08*

En la tabla 5.6 se muestran los resultados de los porcentajes de inhibición calculados respecto al control en la elongación del hipocótilo de *Lactuca sativa*, en donde se observó un aumento del porcentaje de inhibición a medida que aumenta la concentración en cada tratamiento, pero una disminución comparativa entre exposición cuando se aplica radiación UV - A y UV - A + TiO<sub>2</sub>.

**Tabla 5.6.** Inhibición de los tratamientos en la elongación del hipocótilo de *Lactuca sativa*.

<b>Concentración (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Hipocótilo sin irradiar (mm)</b>	<b>Inhibición (%)</b>	<b>Hipocótilo UV-A (mm)</b>	<b>Inhibición (%)</b>	<b>Hipocótilo UV-A + TiO<sub>2</sub> (mm)</b>	<b>Inhibición (%)</b>
<b>0</b>	13,34	0,00 %	13,34	0,00 %	13,34	0,00 %
<b>1,5</b>	12,55	<b>5,93 %</b>	10,90	<b>18,33 %</b>	11,10	<b>16,79 %</b>
<b>10</b>	9,80	<b>26,52 %</b>	9,97	<b>25,27 %</b>	10,60	<b>20,53 %</b>
<b>20</b>	7,97	<b>40,25 %</b>	8,56	<b>35,83 %</b>	9,53	<b>28,56 %</b>

## 6. Discusión

El presente estudio evaluó la toxicidad del ketoprofeno antes y después de su tratamiento mediante fotólisis UV-A y fotocatalisis heterogénea con  $\text{TiO}_2$ , utilizando *Eisenia fetida* y *Lactuca sativa* como organismos bioindicadores. Los resultados obtenidos permitieron evidenciar los efectos subletales de este antiinflamatorio no esteroideo y la capacidad de los tratamientos fotoquímicos para reducir parcialmente su impacto ecotoxicológico. Estudios previos han documentado respuestas similares frente a fármacos persistentes en organismos terrestres y acuáticos. Li et al. (2017) reportaron, por ejemplo, una  $\text{EC}_{50}$  de  $12,3 \text{ mg L}^{-1}$  para *Daphnia magna* tras 48 h de exposición a ketoprofeno, mientras que Priac et al. (2017) describieron inhibiciones significativas de la germinación de *Lactuca sativa* a partir de concentraciones de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . En este estudio, las concentraciones de efecto fueron inferiores, observándose respuestas subletales desde  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  en *E. fetida* y desde  $10 \text{ mg L}^{-1}$  en *L. sativa*, lo que indicó una mayor sensibilidad del modelo edáfico frente a contaminantes emergentes de naturaleza farmacéutica.

En *Eisenia fetida*, la exposición al ketoprofeno sin irradiar produjo una disminución significativa y dependiente de la concentración en el tiempo de retención del rojo neutro, reduciendo de 90 minutos en el control a 30,67 minutos en  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Esta magnitud fue comparable al grado de daño lisosomal descrito por Ma et al. (2017), quienes observaron disminuciones superiores al 50 % del TRRN en lombrices expuestas a contaminantes orgánicos oxidativos, y por Nahmani et al. (2007), quienes reportaron alteraciones lisosomales en *Eisenia fetida* bajo condiciones de estrés químico. Si bien estos estudios no utilizaron ketoprofeno, los porcentajes de disminución observados en este trabajo se situaron dentro del rango característico de xenobióticos capaces de inducir daño celular temprano. Los tratamientos fotoquímicos redujeron parcialmente esta toxicidad. Bajo radiación UV-A, el TRRN aumentó desde 30,67 minutos hasta 40 minutos en  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , la fotocatalisis UV-A +  $\text{TiO}_2$  generó una recuperación aún mayor, alcanzando 44,33 minutos. Estas tendencias coincidieron con lo reportado por Herrmann (1999) y Chong et al. (2010), quienes demostraron que los procesos oxidativos avanzados reducen la toxicidad de compuestos aromáticos parcialmente degradados al incrementar la mineralización y disminuir la presencia de especies reactivas intermedias. No obstante, la persistencia de una inhibición residual confirmó la formación de subproductos oxidativos como 3-hidroxibenzofenona, catecol y benzoquinonas, identificados por Ferrando-Climent et al. (2012) como metabolitos tóxicos intermedios durante la fotodegradación del ketoprofeno. En comparación con estudios previos, la magnitud del daño lisosomal observado en este trabajo fue similar a la registrada en lombrices expuestas a naproxeno o diclofenaco ( $\text{EC}_{50}$  entre  $15$  y  $25 \text{ mg L}^{-1}$ ), lo que sugiere que el ketoprofeno presenta una toxicidad comparable dentro del grupo de los AINEs.

En *Lactuca sativa*, la exposición al ketoprofeno sin tratar redujo la germinación desde 100 % a 86,7 % en  $20 \text{ mg L}^{-1}$  y provocó una inhibición del crecimiento radicular e hipocotilar. Estos valores fueron consistentes con lo reportado por Priac et al. (2017), quienes observaron inhibiciones cercanas al 30–50 % en plantas expuestas a fármacos aromáticos, y con los resultados de Cabrera et al. (2021),

quienes documentaron alteraciones fisiológicas asociadas a disrupción del metabolismo energético en plántulas expuestas a contaminantes emergentes. La mayor sensibilidad del hipocótilo frente a la radícula, observada en este estudio, coincidió con lo descrito para otros fármacos fotoactivos que interfieren con la elongación celular mediante la generación de estrés oxidativo. Tras aplicar los tratamientos fotoquímicos, la fitotoxicidad disminuyó gradualmente. Bajo radiación UV-A, la germinación a 20 mg L<sup>-1</sup> aumentó de 86,7 % a 90 %, mientras que la fotocatalisis UV-A + TiO<sub>2</sub> mantuvo valores cercanos al control, entre 93,3 % y 96,7 %, lo que representó una reducción sustancial del efecto tóxico. En términos de elongación, el hipocótilo mostró una disminución de la inhibición desde **40,25 %** (sin tratar) a **28,56 %** tras UV-A + TiO<sub>2</sub>, evidenciando una recuperación cercana al 12 %. En algunos casos, especialmente en la elongación radicular, se observó un efecto hormético, con aumentos de hasta **72 %** respecto al control, fenómeno descrito por Saetama et al. (2018) como una respuesta compensatoria del crecimiento vegetal ante bajas dosis de xenobióticos. Al comparar con valores de referencia, las concentraciones de efecto observadas en este estudio fueron similares a las informadas por Priac et al. (2017), quienes indicaron efectos significativos en *Lactuca sativa* a partir de 10 mg L<sup>-1</sup>. En este trabajo, la LOEC para germinación fue de 10 mg L<sup>-1</sup>, mientras que para elongación radicular y del hipocótilo fue de 1,5 mg L<sup>-1</sup> y 10 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, ubicándose en rangos comparables entre estudios.

El análisis del porcentaje de inhibición confirmó la coherencia entre la degradación química y la reducción de los efectos biológicos. En *Eisenia fetida*, la inhibición disminuyó aproximadamente 15 % tras tratamiento UV-A y 15–20 % adicionales bajo fotocatalisis. En *Lactuca sativa*, la inhibición se redujo entre 5 % y 15 % según el parámetro evaluado. Esta tendencia fue consistente con lo descrito por Rizzo (2011), quien destacó el uso de bioensayos como herramienta fundamental para evaluar la eficiencia de procesos de oxidación avanzada, así como con estudios recientes que emplearon indicadores biológicos para monitorear la evolución de la toxicidad durante tratamientos fotoquímicos (Priac et al., 2017; Stella et al., 2022; Zhang et al., 2025).

En conjunto, los resultados mostraron que, aunque la fotólisis UV-A reduce parcialmente la toxicidad del ketoprofeno, la fotocatalisis heterogénea con TiO<sub>2</sub> constituye un método más eficaz para disminuir los efectos subletales del fármaco sobre organismos sensibles. Sin embargo, la persistencia de efectos residuales confirma la necesidad de evaluar los subproductos generados durante los procesos de oxidación avanzada, ya que estos pueden presentar toxicidad comparable o incluso superior al compuesto original.

## 7. Conclusiones

La implementación de los bioensayos de toxicidad aguda en celomocitos de *Eisenia fetida* y semillas de *Lactuca sativa* permitió identificar los efectos del ketoprofeno en sus distintas concentraciones y condiciones de tratamiento. En *E. fetida*, el bioensayo TRRN evidenció una disminución progresiva del tiempo de retención desde 90 minutos en el control hasta valores cercanos a 30 minutos en la mayor concentración, mientras que en *L. sativa* se observaron reducciones en la elongación del hipocótilo y variaciones en la elongación radicular y germinación según la exposición. Estos resultados demostraron que ambos bioensayos fueron efectivos, sensibles y adecuados para evaluar toxicidad aguda frente al ketoprofeno y sus soluciones tratadas.

La comparación de las respuestas biológicas entre *E. fetida* y *L. sativa* permitió establecer diferencias claras en la sensibilidad y en la dirección de los efectos según el organismo y el parámetro evaluado. Mientras los celomocitos mostraron una reducción consistente en la estabilidad lisosomal a medida que aumentaba la concentración del ketoprofeno, en *L. sativa* se observó un comportamiento mixto: la radícula presentó aumentos en su longitud bajo ciertas condiciones, mientras que el hipocótilo mostró una inhibición progresiva, especialmente en las concentraciones más altas. Esta comparación evidenció que los dos bioensayos respondieron de manera diferenciada ante el mismo contaminante, aportando una visión complementaria del impacto tóxico.

El cálculo del porcentaje de inhibición permitió cuantificar la magnitud del efecto observado en cada organismo y evaluar la reducción de toxicidad tras los tratamientos fotoquímicos. En *E. fetida*, la inhibición del TRRN alcanzó un 65,9 % en el ketoprofeno sin tratar y disminuyó tras la fotólisis y fotocátalisis UV-A + TiO<sub>2</sub>, mostrando una recuperación parcial de la respuesta celular. En *L. sativa*, la inhibición del hipocótilo disminuyó desde un 40,2 % en el tratamiento sin irradiar hasta un 28,6 % con fotocátalisis, mientras que la germinación se mantuvo sobre el 93 % bajo los tratamientos avanzados. Estos resultados confirmaron que la metodología de inhibición fue útil para comparar cuantitativamente los tratamientos y evidenciar su efectividad al reducir la toxicidad, aunque sin eliminarla completamente.

De manera integral, esta investigación demuestra que los procesos de oxidación avanzada, especialmente la fotocátalisis con TiO<sub>2</sub>, disminuyen la toxicidad del ketoprofeno. Los bioensayos implementados se consolidan como herramientas esenciales para evaluar la seguridad de estas tecnologías y permiten vincular la eficiencia química con el impacto biológico real. Como futura Ingeniera Ambiental, este estudio refuerza la necesidad de incorporar evaluaciones ecotoxicológicas en el diseño y validación de tecnologías de tratamiento para contaminantes emergentes, asegurando que las soluciones propuestas reduzcan efectivamente el riesgo ambiental.

## 8. Referencias bibliográficas

- Adomat, A., & Grischek, T. (2024). Pharmaceuticals and personal care products in the Elbe River, Germany. *Science of the Total Environment*, 902, 166152. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2024.100938>
- Albarrán, G., & Mendoza, E. (2022). Procesos de oxidación avanzados para la purificación de agua: Revisión. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 13(2), 21-41. Recuperado de <https://www.executivebs.org/publishing.cl/aci/2022/Vol13/Nro2/2-ACI1394-21-full.pdf>
- Archer, E., Petrie, B., Kasprzyk-Hordern, B., & Wolfaardt, G. M. (2017). The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in a wastewater treatment plant in South Africa. *Chemosphere*, 174, 437-446. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.101>
- Aus der Beek T, Weber FA, Bergmann A, Hickmann S, Ebert I, Hein A, Küster A. (2016) Pharmaceuticals in the environment--Global occurrences and perspectives. *Environ Toxicol Chem.*;35(4):823-35. Doi: 10.1002/etc.3339.
- Backhaus, T., & Faust, M. (2012). Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: a conceptual framework. *Environmental Science & Technology*, 46(5), 2564–2573. <https://doi.org/10.1021/es2034125>
- Bor, Vega M., Dubraska & Baffi, Patricia & Correa, Liseth & Fernandes, María & Fernández, Jenilynd & González, Zulheth & Guillén, Midabel & López, Sondra. (2015). Optimización y validación de un método por RP-HPLC para la determinación de Ketoprofeno 100 mg en comprimidos con cubierta entérica. *Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela*. 78. 34-42.
- Bowkin, A., Jasieczek, M., Kosztowny, E. (2020). Ketoprofen affects swimming behavior and impairs physiological endpoints of *Daphnia magna*. *Science of the total environment*, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138312>
- Cabrera, J., Marcoval, M. A., Díaz-Jaramillo, M., et al. (2021). Single and combined effects of cypermethrin and UVR pre-exposure in the microalgae *Phaeodactylum tricorutum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(3), 507–516. <https://doi.org/10.1007/s00244-021-00889-1>
- Campagna-Fernandes, A. F., Marin, E. B., & Penha, T. H. F. L. (2016). Application of root growth endpoint in toxicity tests with lettuce (*Lactuca sativa*). *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 11(1), 59–65. <https://doi.org/10.5132/eec.2016.01.05>
- Castillo G. (ed.). (2004) Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IDRC, IMTA, Canadá. 202 pp.

- Celis Hidalgo, J., Sandoval Estrada, M., & Briones Luengo, M. (2007). Bioensayos de fitotoxicidad de residuos orgánicos en lechuga y ballica anual realizados en un suelo Alfisol degradado. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*, 7(3), 51–60. [https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-27912007000300005&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-27912007000300005&script=sci_arttext)
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (2025). Resumen de compuestos de PubChem para CID 3825, ketoprofeno. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3825>
- Chan-Keb, C. A., Agraz-Hernández, C. M., Gutiérrez-Alcántara, E. J., Ake-Canché, B., Tirado-Torres, D., & Vázquez-Santiago, Y. (2022). Acute phytotoxicity of pharmaceuticals on germination and growth of *Lactuca sativa* L. *Journal of Ecological Engineering*, 23(6), 73–81. [https://www.aloki.hu/pdf/2005\\_37373746.pdf](https://www.aloki.hu/pdf/2005_37373746.pdf)
- ChemicalBook. (2025). Ketoprofen: Properties, molecular structure, uses. Recuperado de [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_IN\\_CB3299418.htm?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_IN_CB3299418.htm?utm_source=chatgpt.com)
- Chong, M. N., Jin, B., Chow, C. W. K., & Saint, C. (2010). Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. *Water Research*, 44(10), 2997–3027. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.039>
- Cizmas, L., Sharma, V. K., Gray, C. M., & McDonald, T. J. (2015). Pharmaceuticals and personal care products in waters: occurrence, toxicity, and risk. *Environ Chem Lett*. 2015 December ; 13(4): 381–394. 10.1007/s10311-015-0524-4.
- Correia, F., Sales, S. & Moreira, J. (2021), Earthworm coelomocytes as a soil health assessment tool. *Ecotoxicol. Environ. Contam.*, v. 16, n. 1, 2021, 97-105. 10.5132/eec.2021.01.13
- Diogène, J., Dufour, M., Poirier, G. G., & Nadeau, D. (1997). Extrusion of earthworm coelomocytes. *Laboratory Animals*, 31(4), 326-336. <https://doi.org/10.1258/002367797780596068>
- Domínguez, J., Aira, M., Gómez-Brandón, M. (2009). El papel de las lombrices de tierra en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes. *Ecosistemas* 18 (2): 20-31. <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/61>
- Ebele, A. J., Abdallah, M. A. E., & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>
- EPA. (1996). Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.6200: Earthworm Subchronic Toxicity Test. United States Environmental Protection Agency. <<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P100XGYI.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1995+Thru+1999&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQF>

ieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C95thru99%5CTxt%5C00000041%5CP100XGYI.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL>

Esplugas, S., Bila, D. M., Krause, L. G. T., & Dezotti, M. (2007). Ozonation and advanced oxidation technologies to remove emerging contaminants in water. *Journal of Hazardous Materials*, 149(3), 631-642. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.073>

European Chemicals Agency (ECHA). (2018). Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) Regulation. <[https://environment.ec.europa.eu/topics/chemicals/reach-regulation\\_en](https://environment.ec.europa.eu/topics/chemicals/reach-regulation_en)>

European Commission (2020). Water Framework Directive Watch List 2020. Official Journal of the European Union. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020D1161>

European Medicines Agency (EMA). (2006). Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-environmental-risk-assessment-medicinal-products-human-use-first-version\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-environmental-risk-assessment-medicinal-products-human-use-first-version_en.pdf)

European Union. (2001). Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products. Official Journal of the European Communities. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32001L0082>

European Union. (2004). Directive 2004/27/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. Official Journal of the European Union. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32004L0027>

Feng L, Oturan N, van Hullebusch ED, Esposito G, Oturan MA (2014). Degradation of anti-inflammatory drug ketoprofen by electro-oxidation: comparison of electro-Fenton and anodic oxidation processes. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2014;21(14):8406-16. doi: 10.1007/s11356-014-2774-2.

Ferrando-Climent, L., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodríguez-Roda, I., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2012). Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in wastewater and the environment: presence, degradation, and toxicity. *Science of the Total Environment*, 438, 404-413. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.073>

- Fuchs J, Piola L, González EP, Oneto ML, Basack S, Kesten E, Casabé N. (2011) Coelomocyte biomarkers in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Environ Monit Assess.* Apr;175(1-4):127-37. [10.1007/s10661-010-1499-z](https://doi.org/10.1007/s10661-010-1499-z).
- Fujishima, A., & Honda, K. (1972). Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature*, 238, 37–38. <https://doi.org/10.1038/238037a0>
- García-Galán, M. J., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2012). Occurrence and removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Spain. *Environmental Pollution*, 165, 267–273. [10.1016/j.chemosphere.2011.12.025](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.025)
- García-Velasco, N., Irizar, A., Urionabarrenetxea, E., Scott-Fordsmand, J. J., & Soto, M. (2019). Selection of an optimal culture medium and the most responsive viability assay to assess AgNPs toxicity with primary cultures of *Eisenia fetida* coelomocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183, Article 109545. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109545>
- Grădinaru L, Crețu M, Vizireanu C, Dediu L. Oxidative Stress Biomarkers in Fish Exposed to Environmental Concentrations of Pharmaceutical Pollutants: A Review. *Biology (Basel)*. 2025 Apr 25;14(5):472. doi: 10.3390/biology14050472
- Gupta, S. K. (2000). Neutral red retention by earthworm coelomocytes: a biomarker of cadmium contamination in soil. *Biomedicine & Environmental Sciences*, 13(2), 117–121. <https://www.besjournal.com/fileSWYXYHJKX/journal/article/swyxyhjx/2000/2/PDF/bes200002005.pdf>
- Gworek, B., Kijeńska, M., Wrzosek, J. (2021). Pharmaceuticals in the Soil and Plant Environment: a Review. *Water Air Soil Pollut* 232, 145 . <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04954-8>
- Henríquez, J. (2012). Contaminantes farmacéuticos en aguas residuales en Chile: situación actual y desafíos regulatorios. *Revista Chilena de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 28(3), 55-62. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/102748>
- Herrmann, J. M. (1999). Heterogeneous photocatalysis: Fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. *Catalysis Today*, 53(1), 115–129. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(99\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(99)00107-8)
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2015). Boletín de Farmacovigilancia N.º 6: Uso y seguridad de los antiinflamatorios no esteroideos. Santiago, Chile. <https://www.ispch.cl/newsfarmacovigilancia/06/images/farmacovigilancia.pdf>
- ISO. (2004). ISO 16387:2004. Soil quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Determination of avoidance behaviour of earthworms. International Organization for Standardization.

- ISO. (2016). ISO 18763:2016. Soil quality — Determination of the toxic effects of pollutants on seed germination. International Organization for Standardization.
- Karimi, H., Mohammadi, F., Rajabi, S. et al. Eliminación biológica de 2,4,6-trinitrotolueno mediante lodos activados con aireación prolongada: optimización mediante redes neuronales artificiales. *Sci Rep* 13 , 9053 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34657-z>
- Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., & Flick, R. W. (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(21), 8897–8901. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609568104>
- Kumar, A., Yadav, A., Kumar, A., & Cabral-Pinto, M. (2022). Emerging contaminants in aquatic systems: sources, effects, and mitigation strategies. *Environmental Research*, 204, 112070. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2022.100219>
- Lee, B., Kim, B. (2009). Lysosomal membrane response of earthworm, *Eisenia fetida*, to arsenic contamination in soils. *Environ Toxicol.* 2009 Aug;24(4):369-76. doi: 10.1002/tox.20441.
- Li J, Ma LY, Li LS, Xu L (2017). Photodegradation kinetics, transformation, and toxicity prediction of ketoprofen, carprofen, and diclofenac acid in aqueous solutions. *Environ Toxicol Chem.* 10.1002/etc.3915.
- Liu, S., Wang, Y., Huang, Y., Li, Y. & Wang, X. (2025). Are non-steroidal anti-inflammatory drugs exhibiting higher chronic ecological risks? Exploring water quality criteria for ibuprofen in China. *Journal of Environmental Management*, 392, 126724. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2025.126724>
- Lowe, D. M., Fossato, V. U., & Depledge, M. H. (1995). Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Venice Lagoon: An in vitro study. *Marine Ecology Progress Series*, 129, 189–196. <https://doi.org/10.3354/meps129189>
- Ma, T., Chen, L., Wu, L., Zhang, H., & Luo, Y. (2016). Oxidative Stress, Cytotoxicity and Genotoxicity in Earthworm *Eisenia fetida* at Different Di-n-Butyl Phthalate Exposure Levels. *PLoS ONE*, 11(3), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151128>
- Ma, T., Chen, L., Wu, L., Zhang, H., & Luo, Y. (2017). Toxicity effects of di-(2 ethylhexyl) phthalate to *Eisenia fetida*. *PLoS ONE*, 12(3), e0173957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173957>
- Madikizela, L. M., & Chimuka, L. (2017). Occurrence of naproxen, ibuprofen, and diclofenac residues in wastewater and river water of KwaZulu-Natal Province in South Africa. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(7). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6069-1>

- Manzano E., Ferreira E., Cudmani M., Costa D., Nobrega D., Marigliano M., Gor A., Assaf A., Tonello L., Raitelli G., Cabrera M. (2020). Radiación ultravioleta C aplicada a la desinfección de ambulancias. <https://www.facet.unt.edu.ar/luminotecnia/wp-content/uploads/sites/15/2021/10/Radiacion-ultravioleta-C-aplicada-a-la-desinfeccion-de-ambulancias.pdf>
- Marcano, L., León, A., Arrieche, D. y Zapata-Vívenes, E. (2018). Toxicidad del cadmio en celomocitos de lombriz de tierra *Eisenia sp.* Universidad de Oriente. Escuela de Ciencias. Núcleo de Sucre. Departamento de Biología. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/30006/31037>
- Martins, R. C., Quinta-Ferreira, R. M., & Costa, M. R. P. F. N. (2009). A study of photocatalytic process involving the degradation of the organic load and amoxicillin in hospital wastewater. *Water Science and Technology*, 60(9), 2417–2424. [https://doi.org/10.1002/clen.200800022?urlappend=%3Futm\\_source%3Dresearchgate](https://doi.org/10.1002/clen.200800022?urlappend=%3Futm_source%3Dresearchgate)
- Matamoros, V., Arias, C., Brix, H., & Bayona, J. M. (2008). Preliminary screening of small-scale domestic wastewater treatment systems for removal of pharmaceutical and personal care products. *Water, Air, and Soil Pollution*, 192(1–4), 67–76. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9765-1>
- Mella Muñoz, M. (2022). Fotodegradación directa de ciprofloxacino y moxifloxacino sobre carbón activado, alúmina y sílice (Unidad de Investigación II para optar al título de Químico Farmacéutico). Universidad de Valparaíso, Facultad de Farmacia, Escuela de Química y Farmacia.
- Mirzaei, A., Chen, Z., Haghghat, F., & Yerushalmi, L. (2017). Removal of pharmaceuticals from water by homo/heterogeneous Fenton-type processes — A review. *Chemosphere*, 174, 665–688. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.019>
- Nahmani, J., Hodson, M. E., & Black, S. (2007). A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental Pollution*, 145(2), 402-424. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.04.009>
- Navidpour, A., Abbasi, S., Li, D., Mojiri, A. & Zhou, J. (2023). Advanced Oxidation Process in the Presence of TiO<sub>2</sub> Semiconductor as Photocatalyst: Property, Principle, Kinetic Analysis, and Photocatalytic Activity. *Catalyst*, 13, 232. <https://doi.org/10.3390/catal13020232>
- OECD. (2004). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 207: Earthworm Acute Toxicity Tests. Organisation for Economic Co-operation and Development. [https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/1984/04/test-no-207-earthworm-acute-toxicity-tests\\_g1gh28fd/9789264070042-en.pdf](https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/1984/04/test-no-207-earthworm-acute-toxicity-tests_g1gh28fd/9789264070042-en.pdf)
- OECD. (2006). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 208: Terrestrial Plant Test – Seedling Emergence and Seedling Growth Test. OECD Publishing, Paris. <https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2006/08/test-no-208->

terrestrial-plant-test-seedling-emergence-and-seedling-growth-test\_g1gh28ff/9789264070066-en.pdf

- OECD. (2008). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 222: Earthworm Reproduction Test. Organisation for Economic Co-operation and Development. [https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2016/07/test-no-222-earthworm-reproduction-test-eisenia-fetida-eisenia-andrei\\_g1g6ed00/9789264264496-en.pdf](https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2016/07/test-no-222-earthworm-reproduction-test-eisenia-fetida-eisenia-andrei_g1g6ed00/9789264264496-en.pdf)
- Paparo, D., Di Trolio, A., Lisi, L., & Turco, R. (2024). Photodegradation of ketoprofen over TiO<sub>2</sub>: Kinetic and thermodynamic investigation. *ChemEngineering*, 8(5), 90. <https://doi.org/10.3390/chemengineering8050090>
- Parsons, S. A. (Ed.). (2004). *Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment*. IWA Publishing. ISBN 9781843390176.
- Petrie, B., Barden, R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewater and the environment: Sources, fate and removal technologies. *Science of the Total Environment*, 575, 585–609. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- Pignatello, J. J., Oliveros, E., & MacKay, A. (2006). Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36, 1–84. <https://doi.org/10.1080/10643380500326564>
- Priac, A., Badot, P., Crini, G. (2017). Treated Wastewater Phytotoxicity Assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. *Comptes Rendus Biologies*, 340(3), 171–179. <https://comptes-rendus.academie-sciences.fr/biologies/item/10.1016/j.crv.2017.01.002.pdf>
- Ramírez-Morales D, Rojas-Jiménez K, Castro-Gutiérrez V, Rodríguez-Saravia S, Vaglio-Garro A, Araya-Valverde E, Rodríguez-Rodríguez (2024). Ecotoxicological effects of ketoprofen and fluoxetine and their mixture in an aquatic microcosm. *Aquat Toxicol.* 10.1016/j.aquat.2024.106924.
- Rizzo, L. (2011). Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Research*, 45(15), 4311–4340. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.035>
- Rodríguez Romero, A. J., Robles Salazar, C. A., Ruiz Picos, R. A., López López, E., Sedeño Díaz, J. E., & Rodríguez Dorantes, A. (2014). Índices de germinación y elongación radical de *Lactuca sativa* en el biomonitorio de la calidad del agua del río Chalma. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30(3). <https://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v30n3/v30n3a7.pdf>

- Saetama, V., Vera, L., Vanegas, M. E., Cruzat, C., & Brazales, D. (2018). Evaluación toxicológica de soluciones acuosas de ibuprofeno mediante bioensayos con *Artemia salina*, *Allium schoenoprasum* L., y *Lactuca sativa*. *Revista de Toxicología*, 35(2), 112-118. Asociación Española de Toxicología. <https://www.redalyc.org/journal/919/91960137006/html/>
- Stella, A., Coria, D., Álvarez, J., & Muñoz, V. (2022). Study of La Candelaria streams water photocatalysis treatment over *Lactuca sativa* L. seeds [Preprint]. ResearchSquare. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1488442/v1>
- Sun, Kailun; White, Jason C.; He, Erkai; Van Gestel, Cornelis A.M.; Qiu, Hao. (2023). Surface defects regulate the in vivo bioenergetic response of earthworm *Eisenia fetida* coelomocytes to MoS<sub>2</sub> nanosheets. *ACS Nano*, 17, 2639-2652. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c10623>
- Tyumina E, Subbotina M, Polygalov M, Tyan S, Ivshina I. (2023). Ketoprofen as an emerging contaminant: occurrence, ecotoxicity and (bio)removal. *Front Microbiol* ;14:1200108. doi: 10.3389/fmicb.2023.1200108.
- US EPA. (1996). OPPTS 850.6200 Earthworm Subchronic Toxicity Test. <https://nepis.epa.gov/Exe/tiff2png.cgi/P100XGYI.PNG?-r+75+g+7+D%3A%5CZYFILES%5CINDEX%20DATA%5C95THRU99%5CTIFF%5C00003356%5CP100XGYI.TIF>
- U.S. Environmental Protection Agency. (1996). Ecological Effects Test Guidelines: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. EPA. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P100RF5I.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1995+Thru+1999&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C95thru99%5Ctxt%5C00000038%5CP100RF5I.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL>
- Vries F., Van der Meijden R., Brandenburg W., (1994). Botanical Files on Lettuce (*Lactuca sativa*). Gorteria Supplement 2. <https://repository.naturalis.nl/pub/528197/GORSUP1994002001001.pdf>
- Wang J., Shu-qi Zhao, Meng-ya Zhang, Bing-shu He (2018). Targeted eco-pharmacovigilance for ketoprofen in the environment: Need, strategy and challenge, *Chemosphere*, Volume 194, Pages 450-462. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.020>
- Wasan, E. K., Zhao, J., Poteet, J., Mohammed, M. A., Syeda, J., Soulsbury, K., Cawthray, J., Bunyamin, A., Zhang, C., Fahlman, B. M., & Krol, E. S. (2019). Development of a UV-stabilized topical

formulation of nifedipine for the treatment of Raynaud phenomenon and chilblains. *Pharmaceutics*, 11(11), 594. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110594>

Weeks, J. M., & Svendsen, C. (1996). Neutral red retention assay: a review of its use in earthworm toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(7), 1123-1129. <https://doi.org/10.1023/A:1008824531114>

Wilkinson, J. L., Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Leung, K. M. Y., Lai, F. Y., & Jürgens, M. D. (2022). Pharmaceutical pollution of the world 's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(8), e2113947119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>

Xie, Z., Chen, H., & Li, C. (2022). Toxic effects of fluoxetine on *Chlorella pyrenoidosa*: photosynthesis, oxidative stress, and growth inhibition. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 241, 113774. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114045>

Zhang, W., Nomura, Y., Fukahori, S., Kiso, T., Myoujin, K., & Fujiwara, T. (2025). Ecotoxicity mitigation and biodegradability enhancement during sulfamethazine removal by a pilot-scale rotating advanced oxidation contactor equipped with TiO<sub>2</sub>-zeolite composite sheets. *Journal of Environmental Management*, 377, 124621. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2025.124621>

Zhang, Y., Geiben, S.-U., & Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73(8), 1151-1161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>

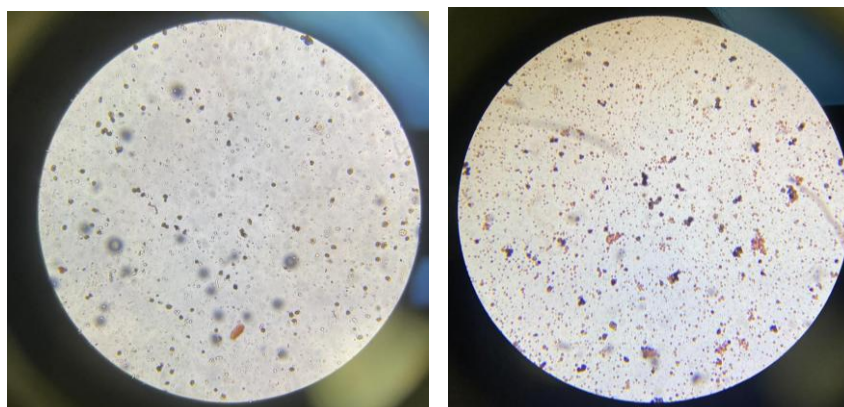
## ANEXO 1

### Resultados bioensayo en celomocitos de *Eisenia fetida*

Tabla de análisis estadístico: Tiempo de retención rojo neutro por placa en bioensayo en celomocitos de *Eisenia fetida*.

Figura	Tratamiento	Concentración (mg/L)	Organismo	Endpoint	Prueba_normalidad	Prueba_global	p_valor	Post_hoc	Letras significativas
5.1	Ketoprofeno sin irradiar	0	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	a
		1,5	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	b
		10	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	c
		20	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	d
5.2	Ketoprofeno UV-A	0	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	a
		1,5	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	b
		10	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	c
		20	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	d
5.3	Ketoprofeno UV-A + TiO2	0	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	a
		1,5	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	b
		10	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	c
		20	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	d
5.4	Ketoprofeno sin irradiar	0	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	a
		1,5	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	b
		10	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	c
		20	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	d
	Ketoprofeno UV-A	0	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	a
		1,5	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	b'
		10	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	c'
		20	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	d'
5.5	Ketoprofeno sin irradiar	0	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	a
		1,5	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	b
		10	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	c
		20	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	d
	Ketoprofeno UV-A + TiO2	0	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	a
		1,5	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	b'
		10	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	c'
		20	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	d'
5.6	Ketoprofeno UV-A	0	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	a
		1,5	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	b
		10	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	c
		20	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	d
	Ketoprofeno UV-A + TiO2	0	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	a
		1,5	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	0.008'	Tukey	b
		10	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	c'
		20	<i>Eisenia fetida</i>	NRRT	Shapiro-Wilk (p>0.05)	ANOVA	<0.001	Tukey	d'

Figuras: Cambio de tinción rojo neutro en celomocitos de *Eisenia fetida* al microscopio x10.



## Resultados bioensayo en semillas de *Lactuca Sativa*

Tabla de análisis estadístico: Germinación en semillas de *Lactuca sativa*.

Figura	Tratamiento	Concentración (mg/L)	Organismo	Endpoint	Prueba	p_valor_global	Post_hoc	Letras de significancia
5.7	Ketoprofeno sin irradiar	0	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,034	Dunn-Bonferroni	a
		1,5	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,014	Dunn-Bonferroni	b
		10	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,118	Dunn-Bonferroni	b
		20	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,042	Dunn-Bonferroni	c
5.8	Ketoprofeno UV-A	0	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,061	Dunn-Bonferroni	a
		1,5	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,054	Dunn-Bonferroni	ab
		10	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,004	Dunn-Bonferroni	b
		20	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,022	Dunn-Bonferroni	b
5.9	Ketoprofeno UV-A + TiO2	0	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,072	Dunn-Bonferroni	a
		1,5	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,212	Dunn-Bonferroni	a
		10	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,214	Dunn-Bonferroni	a
		20	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,945	Dunn-Bonferroni	a
5.10	Ketoprofeno sin irradiar	0	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,034	Dunn-Bonferroni	a
		1,5	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,054	Dunn-Bonferroni	ab
		10	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	<0.001	Dunn-Bonferroni	b
		20	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	<0.001	Dunn-Bonferroni	c
	Ketoprofeno UV-A	0	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,014	Dunn-Bonferroni	a
		1,5	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,054	Dunn-Bonferroni	ab
		10	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,004	Dunn-Bonferroni	b
		20	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,054	Dunn-Bonferroni	bc
5.11	Ketoprofeno sin irradiar	0	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	<0.001	Dunn-Bonferroni	a
		1,5	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	<0.001	Dunn-Bonferroni	ab
		10	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	<0.001	Dunn-Bonferroni	b
		20	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	<0.001	Dunn-Bonferroni	c
	Ketoprofeno UV-A + TiO2	0	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	<0.001	Dunn-Bonferroni	a
		1,5	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,054	Dunn-Bonferroni	ab
		10	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	<0.001	Dunn-Bonferroni	b
		20	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,054	Dunn-Bonferroni	bc
5.12	Ketoprofeno UV-A	0	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,014	Dunn-Bonferroni	a
		1,5	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,054	Dunn-Bonferroni	ab
		10	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,054	Dunn-Bonferroni	b
		20	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,214	Dunn-Bonferroni	b
	Ketoprofeno UV-A + TiO2	0	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,033	Dunn-Bonferroni	a
		1,5	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,054	Dunn-Bonferroni	ab
		10	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	<0.001	Dunn-Bonferroni	b
		20	<i>Lactuca sativa</i>	Germinación	Kruskal-Wallis	0,054	Dunn-Bonferroni	bc

