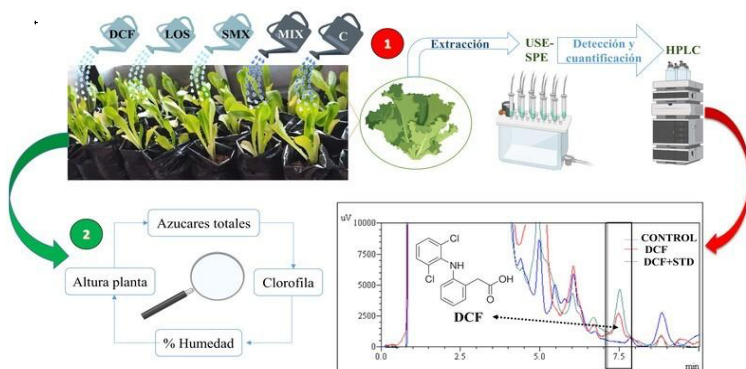


# Estudio de captación y bioacumulación de compuestos farmacéuticamente activos en cultivo de *Lactuca sativa* y evaluación de sus posibles efectos en las características morfológicas de la planta

*Study of uptake and bioaccumulation of pharmaceutically active compounds in Lactuca sativa plants and evaluation of their effect on the morphological characteristics*

## Graphical Abstract (GA)



Se estudió la presencia de SMX, DCF y LOS en hojas de *Lactuca sativa* y sus efectos en la calidad de la planta.

**Estudio de captación y bioacumulación de compuestos farmacéuticamente activos en cultivo de *Lactuca sativa* y evaluación de sus posibles efectos en las características morfológicas de la planta**

*Study of uptake and bioaccumulation of pharmaceutically active compounds in Lactuca sativa plants and evaluation of their effect on the phenotypic characteristics*

*Angie Valentina Carvajal Silva \**

*\* Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

*Dirigido por:  
Alejandro Moncayo- Lasso, Dr. Sci.*

**Resumen**

Se ha comprobado que los compuestos farmacéuticamente activos liberados en los agroecosistemas son absorbidos y acumulados en las partes comestibles de las plantas de cultivo. Mediante el empleo de un cultivo simulado en condiciones controladas, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la absorción y bioacumulación de tres compuestos farmacéuticamente activos comunes (Diclofenaco, Sulfametoxazol y Losartán) aplicados individualmente y en mezcla en el agua de riego del cultivo de *Lactuca sativa romana*, así como los efectos mediados por estos compuestos en los atributos de la calidad de las plantas. Para esto, se emplearon las técnicas de extracción en fase sólida asistida por ultrasonido en conjunto para la cromatografía líquida de alta eficiencia para su identificación en las hojas de la planta. Se observó que los compuestos sulfametoxazol y losartán no son absorbidos en las hojas de lechuga, mientras que el diclofenaco se detectó en concentraciones de 0.0372 ng/g. Se evidenció que los compuestos estudiados aplicados en diferentes niveles de concentraciones afectaron significativamente (disminuyeron sus valores) los atributos de la planta tales como niveles de azúcares, porcentaje de humedad y clorofila. Por otro lado, se sugiere seguir realizando estudios que permitan establecer la movilidad de los fármacos en la planta, su posible metabolización y los probables productos de transformación de los tres compuestos farmacéuticos empleados y de los que puedan encontrarse en las muestras de agua de riego en cultivos a nivel campo.

**Estudio de captación y bioacumulación de compuestos farmacéuticamente activos en cultivo de *Lactuca sativa* y evaluación de sus posibles efectos en las características morfológicas de la planta**

***Study of uptake and bioaccumulation of pharmaceutically active compounds in *Lactuca sativa* plants and evaluation of their effect on the phenotypic characteristics***

**Abstract**

It has been shown that pharmaceutically active compounds released in agroecosystems are absorbed and accumulated in the edible parts of crop plants. Using a simulated culture under controlled conditions, the present study aimed to evaluate the absorption and bioaccumulation of three common pharmaceutically active compounds (Diclofenac, Sulfamethoxazole and Losartan) applied individually and in mixture in *Lactuca sativa* roman crop, and the effects mediated by these compounds on the quality attributes of the leafy plant. Ultrasound assisted solid phase extraction technique and high-performance liquid chromatography was used to identify and quantify these compounds in lettuce leaves. Absorption of sulfamethoxazole and losartan was not observed, while diclofenac was detected in concentrations of 0.0372 ng/g. The compounds evaluated and applied at different concentrations significantly affected (lower values) the attributes of the plant such as sugars, humidity, and chlorophyll. On the other hand, it is suggested to continue carrying out studies related with establishing the mobility of pharmaceutical compounds in the plant, their possible metabolization and the probable transformation products of the three pharmaceutical compounds used and of those that may be found in irrigation water samples in crops at field level.

**Keywords:** Pharmaceutically active compounds, Absorption and bioaccumulation, Diclofenac, *Lactuca sativa*.

## **Introducción**

El cambio climático y la contaminación del agua son fenómenos que aumentan la vulnerabilidad y la escasez de agua. En la actualidad, la escasez de agua afecta al 40% de la población mundial, ocasionando que alrededor de 844 millones de personas no tengan acceso al agua, cifra que va en aumento año tras año (Dubois, 2011; S Galicia, 2018). Sumado a este problema, se encuentra la alta demanda hídrica a nivel mundial, a tal punto que para el 2030 se espera que la demanda de agua crezca a un 50% debido a las necesidades de la población (UNESCO, 2020). Entre las necesidades más importantes, está la producción de alimentos que se encuentra dentro del sector agrícola, este sector demanda más agua al consumir un 70% del agua total extraída (IDEAM, 2020). Adicionalmente, para el 2050 se intensificará la demanda de agua por parte del sector agrícola, pues se necesitará aproximadamente un 70% más de alimentos ocasionando que, aproximadamente 2.3 billones podrían llegar a vivir en áreas con un alto estrés hídrico (Guillaume et al., 2021).

Debido a esto, se ha planteado como posible solución la reutilización de aguas residuales para el riego de cultivos agrícolas. Sin embargo, el uso de aguas residuales tratadas (ART) para riego de cultivos, constituyen la vía principal de introducción de contaminantes de diversa índole (metales pesados, compuestos orgánicos, microorganismos patógenos, etc.) en los agroecosistemas y una de las vías más grandes de contaminación alimentaria (Grossberger et al., 2014; Martínez-Hernández et al., 2019). Dentro de los contaminantes que se han venido detectando regularmente en agroecosistemas en los últimos años están los denominados contaminantes de preocupación emergente (CPEs) (Riemenschneider et al., 2016), los cuales son compuestos de diferente naturaleza química que se encuentran en concentraciones muy bajas ( $\mu\text{g/L}$  -  $\text{ng/L}$ ) cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de esta (Rodríguez-Narvaez et al., 2017). Entre los CPEs que probablemente presentan mayor preocupación y de estudio en los últimos años, se encuentran los compuestos farmacéuticamente activos (CFAc), los cuales se detectan con frecuencia, ya sea en su forma de compuesto original o como productos de transformación (Ts) (Christou et al., 2016), e

diferentes sistemas de aguas superficiales y subterráneas que reciben esas ART y en suelos agrícolas que han empleado en el riego ART. Los CFAC pueden encontrarse en los agroecosistemas en mezclas de una gran variedad de compuestos activos individuales y de sus Ts, la cual varía continuamente en composición y concentración, dependiendo de su tasa de introducción y de degradación (Paíga et al., 2017).

Los residuos de CFAC y sus Ts que han sido detectados en el medio ambiente a niveles traza, pueden introducirse en algunos organismos terrestres o acuáticos e inducir efectos tóxicos u otros efectos adversos (Vasquez et al., 2014). Además, la posible bioacumulación de CFACs en una gran cantidad de organismos, incluidos peces y plantas, en conjunto con su posterior entrada en la red alimentaria humana se considera un tema de alta prioridad y que requiere una investigación intensiva, debido a posibles implicaciones sobre la salud pública (Fatta-Kassinos et al., 2011).

Dentro de los CFACs frecuentemente detectados se encuentra el diclofenaco (DCF) un antiinflamatorio no esteroideo y el sulfametoxazol (SMX) un antibiótico bacteriostático. El DCF es un compuesto que se vende en muchos países en altas cantidades anuales (Heberer, 2002), presenta una alta persistencia en el medio ambiente al tener una baja velocidad de biodegradación y se encuentra en concentraciones de algunos  $\mu\text{g/L}$  en aguas residuales y aguas superficiales (Basnyat, 2011; Vieno & Sillanpää, 2014). Puede ser absorbido por plantas y generar estrés oxidativo en las células vegetales (González García et al., 2018). Este compuesto presente en los agroecosistemas es capaz de introducirse a cultivos agrícolas como por ejemplo el de la *lactuca sativa*, con mayor acumulación en las raíces y con bajo transporte a las hojas (Bigott et al., 2021). Por otro lado, el SMX es un compuesto de interés debido a su prevalencia en los efluentes de las plantas de tratamiento y a la creciente preocupación por la propagación de la resistencia a antibióticos (Yao et al., 2012). Desde su introducción, el SMX se ha prescrito ampliamente debido a su potencia contra las bacterias gram positivas y gram negativas (Brunton et al., 2011). En la actualidad, el SMX se ha detectado en concentraciones que van de  $\text{ng/L}$  a  $\mu\text{g/L}$  en aguas superficiales y algunos efluentes de plantas de tratamiento, y de  $\text{ng/Kg}$  a  $\text{mg/Kg}$  en suelos y estiércol (Brausch et al.,

2012; Hu et al., 2010). Recientes estudios sobre el reúso de aguas en condiciones de campo han puesto de manifiesto el potencial de absorción y translocación del SMX en algunas plantas de cultivo como el tomate (Christou et al., 2017).

El antihipertensivo losartán (LOS), también es de gran interés debido a recientes reportes de su presencia en efluentes de plantas de tratamientos de aguas residuales en concentraciones de  $\mu\text{g/L}$  (Botero-Coy et al., 2018) y que poco se ha estudiado, sobre sus posibles efectos sobre cultivos.

Se ha evidenciado que las plantas de cultivos que crecen en agroecosistemas contaminados con CFACs (como los mencionados anteriormente), son capaces de absorber y acumular estos productos farmacéuticos en sus tejidos (Christou et al., 2017; Pan et al., 2014; Wu et al., 2014), y, una vez se absorben por las raíces, se movilizan dentro de las plantas a través de su sistema vascular, siguiendo el flujo de masa impulsado por la transpiración o alguna otra ruta simétrica, la cual se encuentra mediada por moléculas de alta energía constituidas por transportadores y canales (Miller et al., 2016). Por lo tanto, una proporción de CFACs liberados en los agroecosistemas pueden acumularse en diferentes tejidos y órganos de la planta (raíces, hojas y frutos) (Goldstein et al., 2014; Riemenschneider et al., 2017).

Por otro lado, los CFAC también pueden metabolizarse mediante un mecanismo elaborado basado en enzimas de las células vegetales, lo que lleva a su desintoxicación, inactivación y secreción (Bartha et al., 2014; Schröder et al., 2007). Dentro del mecanismo de desintoxicación, la Fase I da inicio mediante enzimas que catalizan la oxidación, reducción o hidrólisis de los CFACs, lo que resulta en una producción de compuesto intermedios con mayor polaridad o reactividad (PTs), que luego se conjugan con moléculas endógenas polares como carbohidratos, ácido malónico o glutatión (Bartha et al., 2014; Huber et al., 2012). Los conjugados de CFACs que se forman en las dos fases iniciales de desintoxicación, se secretan por medio del citosol celular en vacuolas o por enzimas pertenecientes a la familia de transportadores ABC, donde permanecen como solutos o como residuos unidos, respectivamente. En algunos casos entran a hacer metabolizados dentro de la célula vegetal (He et al.,

2017; Li et al., 2014). Los CFAC conservan su bioactividad dentro de las células vegetales reportándose que pueden ejercer efectos significativos en diversas respuestas morfológicas y fisiológicas de las plantas bajo diferentes condiciones experimentales (Carvalho et al., 2014; Hurtado et al., 2017), los cuales dependen en gran medida de la planta misma, ya que las diferentes especies de plantas, órganos y tejidos pueden tener respuestas distintas, así como en las propiedades de los CFACs y la concentración o tiempo de exposición (Hillis et al., 2011; Schmidt & Redshaw, 2015). Se ha demostrado que los CFACs pueden causar efectos de estrés (altas concentraciones de exposición) y hormesis (bajas concentraciones de exposición) (Migliore, Godeas, et al., 2010; Migliore, Rotini, et al., 2010), la cual hace referencia a mayores tasas de crecimiento que se manifiestan a través de una mayor producción de biomasa y alargamiento de raíces, tallos y hojas (Migliore, Godeas, et al., 2010; Migliore, Rotini, et al., 2010), mientras que las altas concentraciones se refiere a respuestas fitotóxicas, como permutaciones en el desarrollo y fisiología de las plantas (Bártíková et al., 2016; Michelini et al., 2013). De manera similar, se han registrado los efectos de la exposición de las plantas de lechuga a una mezcla de CPEs (incluidos los CFACs), encontrando que la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes (0.05 µg/L de cada CPEs añadida a la solución de riego) puede causar alteraciones metabólicas significativas en las plantas, efectos sobre el metabolismo de los carbohidratos, ciclo del ácido cítrico, fosfato de pentosa y vía del glutatión, que pueden estar relacionadas con cambios en los parámetros morfológicos como la altura de la hoja, grosor del tallo y contenido de clorofila (Hurtado et al., 2017; Michelini et al., 2013). Es importante destacar que los efectos de la mezcla de CPEs, debido a las interacciones sinérgicas de los CFACs presentes en las mezclas en agroecosistemas, son más tóxicos para la planta, ya que, se ha demostrado que los CFACs aplicados en mezclas ejercen efectos fitotóxicos acelerados en plantas de alfalfa, en comparación con los causados por los CFAC aplicados individualmente (Christou et al., 2018).

El daño sobre los cultivos es una problemática aún mayor debido a las pérdidas de producción y a la disminución de los nutrientes y minerales en sus hojas y frutos (Christou et al., 2019). Entre los cultivos

irrigados con ART está la lechuga, siendo Cundinamarca el principal departamento productor del país con 80.000 toneladas anuales (Cámara de comercio, 2013). Estos cultivos se encuentran aledaños a la cuenca media del río Bogotá, en esta zona el caudal ya ha sido tratado por la PTAR salitre, donde solo se ha eliminado un 40% de los residuos antropogénicos, esto indica que los CFACs aún permanecen presentes en el efluente que fluye cerca de las zonas del departamento de Cundinamarca.

A pesar de que los efectos fitotóxicos de los CFACs en las plantas han sido demostrados tanto a nivel morfológico como metabólico (Hurtado et al., 2017), en Colombia (La Sabana de Bogotá y el departamento de Cundinamarca) aún no se ha examinado la absorción y acumulación de CFACs en hortalizas como la lechuga, y, los posibles efectos mediados por estos productos en la calidad del cultivo. El objetivo del presente estudio es evaluar la presencia y bioacumulación de tres CFACs en el tejido vegetal de plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) identificando los posibles efectos sobre el rendimiento y las características de la calidad de la planta (porcentaje de humedad, azúcares, clorofila y altura de la planta) inducidos por la exposición a tres CFACs de uso común (diclofenaco - DCF; sulfametoxazol - SMX; losartan - LOS) y su mezcla (MIX).

## **1. Materiales y Métodos**

### **1.1. Reactivos**

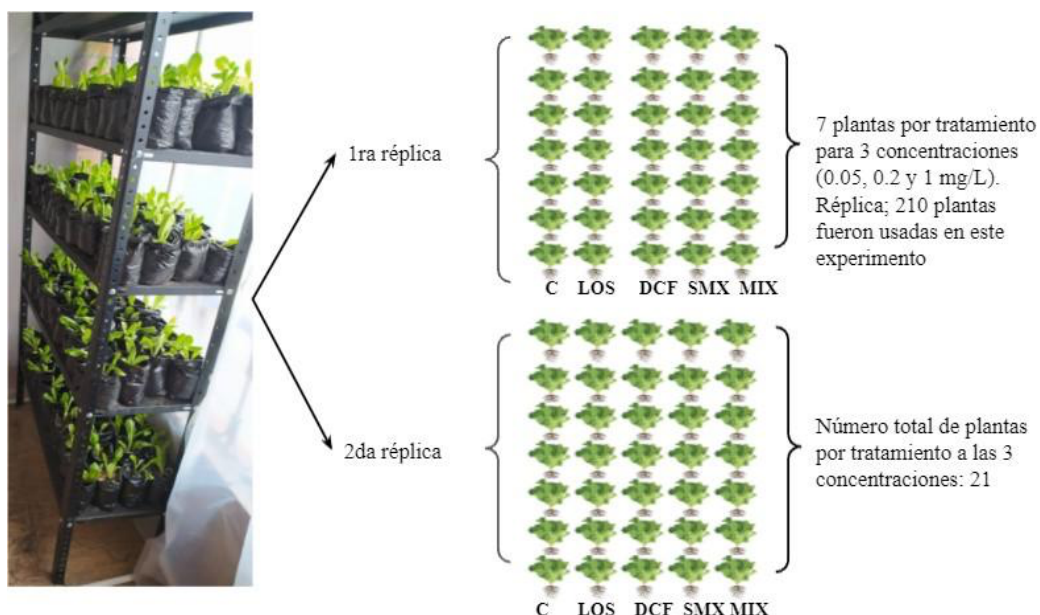
Los estándares de diclofenaco, losartán potásico y sulfametoxazol se adquirieron de Sigma Aldrich. El metanol y el acetonitrilo grado HPLC se obtuvieron de Panreac. Los reactivos para la solución de Hoagland, el dipotasio-hidrógeno fosfato anhidro, fosfato potásico, nitrato de potasio, nitrato de calcio tetrahidratado, EDTA de hierro, ácido bórico, cloruro de magnesio tetrahidratado, sulfato de zinc heptahidratado, sulfato de cobre y ácido de molibdeno hidratado, todo grado analítico se obtuvieron de Panreac. El bicarbonato de potasio fue de calidad analítica de Merck. Todas las soluciones se prepararon con agua ultrapura producida por un sistema Millipore Milli-Q con resistividad  $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .



## 1.2. Diseño experimental y tratamientos

Los ensayos de invernadero fueron desarrollados a partir de plántulas de lechuga romana, las cuales contaban con quince (15) días de germinadas. Las plántulas se lavaron en el intercepto de la raíz y el tallo con agua a temperatura 20.5 °C. Durante un periodo de transición de cinco días se dejaron en agua sumergiendo las raíces y dejando libre tallo y hojas.

Siguiendo como referencia el diseño experimental de (Christou et al., 2017, 2019) las plantas de lechuga fueron sometidas a cinco tratamientos diferentes que corresponden a cada compuesto farmacéutico activo añadido al agua de riego con los respectivos controles. Las plantas del tratamiento control se regaron únicamente con solución nutritiva, las plantas de los tratamientos SMX, LOS y DCF se regaron con solución enriquecida con los tres compuestos farmacéuticos activos a tres concentraciones: 0.05 mg/L, 0.2 mg/L y 1 mg/L, mientras que el tratamiento MIX se refiere a las plantas regadas con solución enriquecida con los tres compuestos farmacéuticos activos a las tres concentraciones antes mencionadas (Figura 1).



**Figura 1** Diseño experimental en bloques. Lechugas romanas expuestas a los fármacos losartan (LOS), diclofenaco (DCF), sulfametoxazol (SMX), la mezcla (MIX) y el control (C) presentes en el agua de riego.

Se aplicó un diseño experimental de bloques completos aleatorios. Cada tratamiento se llevó a cabo de forma independiente, se realizaron dos réplicas para los cinco tratamientos. Cada réplica constaba de siete plantas por tratamiento. Cada planta recibió alrededor de 170 mL de solución de riego durante el periodo del experimento (75 días). Las soluciones de riego que contenían cada uno de los CFACs o su mezcla se preparaban una vez a la semana y se almacenaban en galones de plástico de 3L. Se suministró macronutrientes (Calcio, magnesio, nitrógeno, fósforo, potasio y azufre) y micronutrientes (boro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc) por medio de la solución de Hoagland irrigada una vez por semana. Las hortalizas se cultivaron bajo condiciones no controladas de temperatura y luz. Para este proceso se midió la altura de la planta desde el tallo hasta la hoja más larga de la planta.

### **1.2.1 Muestreo**

Se realizó un muestreo aleatorio en cada tratamiento a los 45 y a los 75 días de exposición a los compuestos farmacéuticos. Para los 45 días se muestrearon 8 lechugas, se quitó raíz, tallo y hojas. Se almacenaron en bolsas ziploc® en refrigerador hasta su posterior análisis. A los 75 días se tomaron las 9 plantas restantes y se procedió a realizar el mismo tratamiento quitando raíz, tallos y hojas. Se almacenaron en el refrigerador a una temperatura de -20°C.

Para los posteriores análisis las muestras de lechuga fueron descongeladas a temperatura ambiente.

### **1.3 Parámetros morfológicos evaluados en las plantas del invernadero**

En esta sección se seleccionaron diferentes parámetros morfológicos para evidenciar el posible efecto de la presencia de los CFACs en el agua de riego sobre las plantas de lechuga. Se realizó el seguimiento de estos parámetros, a los 45 días y 75 días de exposición a los CFACs. Estos parámetros permiten evaluar de manera general el estrés hídrico, cantidad de nutrientes absorbidos y proceso de fotosíntesis cuando las plantas están expuestas a los CFACs.

#### **1.3.1 Porcentaje de humedad total**

El contenido de humedad se determinó mediante un método termogravimétrico. Para este parámetro se seleccionaron las plantas de las dos cosechas a los 45 y 75 días del tratamiento. Se realizó por triplicado el pesaje de tallo, raíz y hojas en balanza analítica. Luego se dejaron en bolsas de papel durante 72 horas en horno de secado a 70 °C. Transcurrido el tiempo de secado, se pesó nuevamente el material vegetal

y se realizó el cálculo para la relación de pérdida de agua por secado (Balaguera et al., 2008).

### **1.3.2 Cuantificación de clorofila**

La medición se realizó con el medidor de clorofila SPAD-502. Se tomaron diez mediciones en cada planta (por tratamiento a los 45 y a los 75 días) para posteriormente obtener un dato promedio, para evitar variación de los valores las mediciones fueron obtenidas de la parte basal media y apical de las hojas ([Ahmed et al. 2015](#)).

### **1.3.3 Cuantificación de azúcares**

Se siguió el protocolo de (Schvambach et al., 2020). Se determinó el contenido por refractometría utilizando 1.0 g de hojas de lechuga maceradas en crisol y diluido con 1.0 mL de agua destilada. Se empleó un refractómetro digital milwaukee MA871 específico, para determinar grados Brix ( $^{\circ}\text{Bx}$ ), con un rango de lectura de 0  $^{\circ}\text{Bx}$  a 82% y una precisión de  $\pm 0.2\%$   $^{\circ}\text{Bx}$ . Antes de leer cada muestra, se calibró el refractómetro con agua destilada y luego de la calibración se colocó una gota de cada muestra en la superficie del prisma, leyendo directamente, los resultados se expresaron en grados Brix ( $^{\circ}\text{Bx}$ ) según la Asociación de Química Analítica Oficial (AOAC, 2002).

## **1.4. Validación de la técnica cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

Se prepararon soluciones madre estándar de 1000 mg/L para LOS, DCF Y SMX, se realizó una primera dilución de 200 mg/L de los tres compuestos farmacéuticos y se almacenaron a 4°C protegidas de la luz hasta su uso. Los estándares de calibración para los tres fármacos se prepararon diariamente partiendo de la dilución de 200 mg/L con agua Mili-Q. A partir de los cromatogramas obtenidos, se analizó, la linealidad, la precisión, la exactitud, el límite de cuantificación (LC) y el límite de detección (LD) como parámetros de validación del método analítico (Christou et al., 2017, 2019).

### **1.4.1 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia**

Se utilizó un equipo HPLC Shimadzu LC-20AT con un detector de arreglo de diodos SPD-M20A, con una columna (C8 Shim-pack GIST/GISS (UHPLC) 150 x 3.0 mm 5 $\mu\text{m}$ ). La fase móvil estaba compuesta de un amortiguador fosfato (pH 3.5, 0.01 mol/L) /acetonitrilo (50/50 v/v) a 25°C, en condiciones

isocráticas. La mezcla se bombeó a una velocidad de flujo de 0.60 mL/min, lo que resulta en una presión máxima del sistema de 1690 a 1990 bar, la detección se estableció a 220 nm para LOS, 270 nm para SMX y 275 nm para DCF. El volumen de inyección fue de 20 uL. En estas condiciones, SMX, LOS y DCF eluyeron a 2.0 min, 2.5 min y 7.6 min respectivamente.

### **1.5 Validación extracción CFAC en matriz vegetal en fase sólida (SPE) asistida por ultrasonido (EAU)**

A las lechugas utilizadas, inicialmente se les realizó el corte de la raíz y el tallo, para posteriormente someterlas a una crío-maceración con hielo seco en un picador industrial. Se pesaron y mezclaron 600 g de la muestra en un beaker de 1000 mL. Luego se prepararon cuatro muestras de validación en beaker de 250 mL y se doparon con los compuestos fármacos estándar a una concentración (5 mg/Kg). Se prepararon seis muestras (tres fueron réplicas) en tubos falcon de 50 mL, agregando 10 g de lechuga para LOS, SMX y DCF (se ajustó el pH del DCF a 6-7 con 1 g de NaHCO<sub>3</sub>). Se siguió el protocolo de extracción descrito por (Christou et al., 2017, 2019), el cual consistió en la adición de 10 mL de metanol grado analítico (99.9%) para la extracción de LOS y DCF, para la extracción de SMX se empleó acetonitrilo (mayor solubilidad del compuesto), luego se sonicaron las muestras durante una hora y posteriormente se centrifugó a 3900 rpm durante diez minutos. Se tomó el sobrenadante de cada muestra y se transfirió a un tubo falcon de 15 mL, se agregó 10 mL de metanol/agua Mili-Q 1:1 a la matriz vegetal (residuo) y se sonicó durante 30 minutos. Se procedió a tomar nuevamente el sobrenadante de cada muestra y se transfirió a otro tubo falcon de 15 mL, el cual contenía el sobrenadante inicial para obtener un total de 20 mL de muestra. De las muestras obtenidas se tomaron 10 mL, se transfirieron a un beaker de 500 mL y se diluyeron en 390 mL de agua mili-Q. Las disoluciones se filtraron en filtro de vidrio de 0.22 um.

#### **1.5.1 Extracción en fase sólida (SPE)**

Se inició pre-acondicionamiento de cuatro columnas OASIS HLB (Waters, 60 mg, 3 mL) pasando 5 mL de metanol en las columnas para la extracción de LOS y el DCF y 5 mL de acetonitrilo en la columna

para la extracción de SMX, seguido de 5 mL de agua Mili-Q en las cuatro columnas. Se tomaron las muestras y se pasaron a un flujo de 1 mL/ min a través de la columna, al completar la extracción de los beakers antes mencionados, se lavó la columna con 6 mL de agua Mili-Q y se dejó secar al vacío durante 15 minutos cada columna y finalizado el tiempo se eluyó las muestras de DCF y LOS en 9 mL de metanol y SMX en 9 mL de acetonitrilo. El procedimiento se llevó a cabo de la misma manera, para la concentración alta de 100 mg/Kg de peso fresco. Para la validación del método, se determinó el porcentaje de recuperación con la respectiva desviación estándar, el coeficiente de varianza.

### **1.6 Identificación, cuantificación y acumulación de SMX, DCF y LOS en muestras de invernadero**

Se siguió la metodología del numeral (1.5) para la extracción de los compuestos farmacéuticos en lechugas expuestas a los fármacos SMX, LOS y DCF a concentración de 1 mg/L durante 75 días. Seguido de esto, se realizó la identificación y cuantificación de los compuestos farmacéuticos siguiendo el procedimiento descrito en el numeral (1.5.1).

### **1.7 Análisis estadístico**

Los resultados se presentan como la media y el error estándar de la media (mean  $\pm$  SEM). La significancia estadística se determinó mediante una prueba ANOVA acoplada al método de Dunnett para dos factores suponiendo variaciones desiguales. Las diferencias entre los controles y los valores experimentales fueron estadísticamente significativas cuando el valor de  $P \leq 0.05$  en la prueba de Dunnett y el valor F era mayor al valor crítico F. El análisis estadístico se realizó usando el módulo de análisis de datos de GraphPad Prism 8.0.2.

## **2. Resultados y Discusión**

### **2.1 Efecto de los CFacs sobre la morfología de la planta de lechuga**

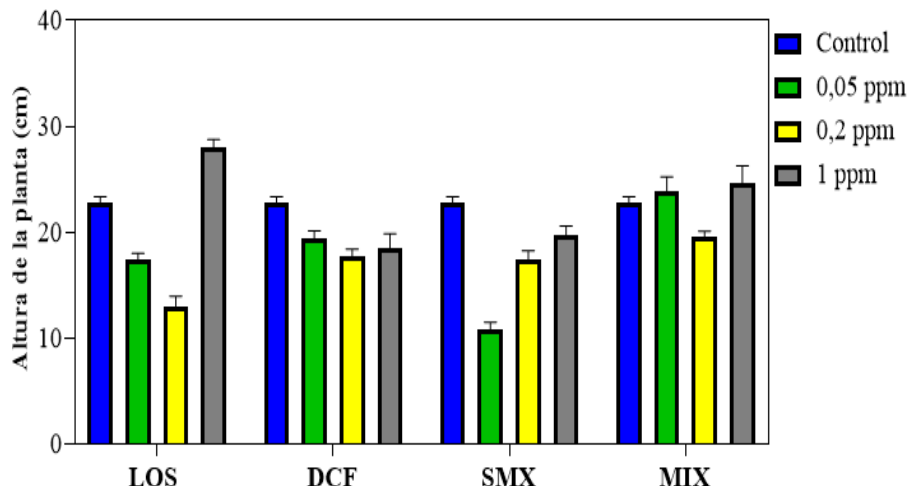
El tamaño de la planta es uno de los rasgos morfológicos indicador del efecto causado por la interacción

de la planta y algún agente externo, como lo puede ser la presencia de compuestos farmacéuticos. El tamaño fue determinado en las muestras de plantas de lechuga expuestas a los fármacos SMX, LOS y DCF (presentes en el agua de riego empleada) durante 75 días (Figura 2).



**Figura 2.** A) Muestras de lechuga romana Control (C) y muestras expuestas a los fármacos LOS y DCF. B) Muestras de lechuga romana Control (C) y muestras expuestas a los fármacos SMX y la mezcla (LOS, DCF y SMX).

Los resultados muestran que la altura de las plantas expuestas a los fármacos son significativamente menores con respecto al control (plantas no expuestas) a las tres concentraciones del fármaco empleadas (0.05, 0.2 y 1 mg/L); exceptuando el caso de LOS, donde se observa una mayor altura (28.06 cm) en comparación con el control (22.82 cm) cuando la concentración del fármaco es de 1.0 mg/L y en el caso de la mezcla de los tres fármacos donde se observa una diferencia significativa en la altura (19.56 cm) a la concentración de 0.2 mg/L con respecto al control (Figura 3). Cuando se hace la comparación entre las diferentes concentraciones de fármacos empleadas, no se observan diferencias significativas en la altura de la planta. Estos datos fueron confirmados con la prueba estadística de comparación múltiple de Dunnett (Anexo 1), en la cual los valores medios de altura de la planta que presentan la letra A no son diferentes significativamente del control, mientras que aquellos valores medios que presentan la letra B son diferentes significativamente del control a un nivel de confianza del 95%.



**Figura 3.** Efecto en el tamaño de la planta de *L.sativa* a los 75 días en presencia de los fármacos Losartán (LOS), Diclofenaco (DCF), Sulfametoxazol (SMX) y MIX (LOS; DCF; SMX) presentes en el agua empleada para su riego.

Estudios recientes han demostrado que la presencia de CFACs produce cambios en las concentraciones de hormonas vegetales (auxinas, citoquininas, ácido abscísico y jasmonatos) y en la composición de nutrientes de las hojas de los cultivos (Carter et al., 2015), lo cual ocasiona que disminuya el efecto de las fitohormonas en el crecimiento de la planta. Se ha reportado también que la exposición a antibióticos (sulfonamidas) generan efectos negativos en el crecimiento de la planta de pepino, tomate y lechuga (Ahmed et al., 2015), estos efectos tóxicos, se deben a su comportamiento en el suelo a través de la sorción, degradación y quelación con metales (Liu et al., 2009). Los hallazgos anteriores apoyan los resultados obtenidos sobre los efectos negativos en el crecimiento de las plantas tratadas con el antibiótico SMX. Por otra parte, se ha evidenciado que los analgésicos como el acetaminofén/paracetamol al ser absorbidos por los cultivos ocasiona la inhibición del crecimiento de la planta. Se ha reportado igualmente que el acetaminofén puede formar un glucósido y un glutatión en las células de la raíz de *A. rusticana* con moléculas endógenas, ocasionando una disminución en la desintoxicación de las plantas generando un daño oxidativo que conlleva a la disminución en el



alargamiento de la planta y en la cantidad de biomasa (Huber et al., 2009).

Otra posible razón de la disminución del tallo podría estar relacionada con cambios metabólicos ocasionados por la exposición a CFAcs. Por ejemplo (Hurtado et al., 2017) observaron que un aumento en los niveles de 5-oxoprolina y metabolitos del azúcar (es decir, ácido glucónico, glucopiranososa, isoformas de inositol, ácido ribónico, galactitol y ácido galactónico) estaba asociado con un aumento en la altura de las hojas y una disminución en el tallo. Cabe mencionar que el aumento de 5-oxoprolina se asocia con la elongación celular, al haber una deficiencia en la biosíntesis de prolina que conlleva a plantas anormales y defectos en la pared celular, lo cual sugiere que este metabolito desempeña un papel importante en las proteínas estructurales, algunas de las cuales modulan la elongación del tallo y el crecimiento de los brotes (Kavi Kishor et al., 2015).

Esto demuestra la importancia de las propiedades fisicoquímicas de los principios activos en la absorción y toxicidad de las plantas. Anteriormente se han observado diferencias en el nivel de efectos tóxicos entre principios activos pertenecientes a distintas clases terapéuticas debido a las características lipofílicas, neutras, catiónicas, aniónicas o bipolares las cuales pueden también influir en el comportamiento de absorción (Kotyza et al., 2010).

## **2.2 Atributos de la calidad de las hojas**

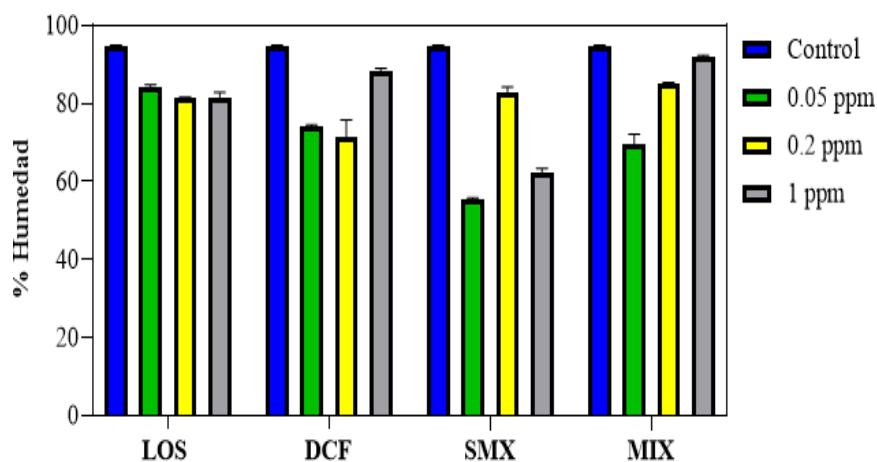
Para asegurar la calidad de las hortalizas para consumo humano, se examinan atributos los cuales son el conjunto de cualidades que hace aceptable los alimentos por parte de los consumidores. En esta sección entre los atributos que se evaluaron están el porcentaje de humedad, cantidad de clorofila y azúcares totales. Estos parámetros fueron analizados en las muestras de plantas de lechuga expuestas a los fármacos SMX, LOS y DCF y la mezcla de ellos (presentes en el agua de riego empleada) durante 45 y 75 días. Para el caso de los 45 días no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados en comparación con el control (Anexo 1.1)

### **2.2.1 Porcentaje de Humedad**

El porcentaje de humedad es uno de los parámetros más importantes en el análisis de alimentos. Las plantas comestibles pueden sufrir cambios cuando están sometidas a un agente externo presente en el



medio, como lo puede ser la presencia de compuestos farmacéuticos. Los resultados muestran que el porcentaje de humedad en las lechugas expuestas al fármaco SMX y la mezcla durante 75 días es significativamente menor en comparación con el control a las concentraciones empleadas de 0.05 y 1 mg/L. Los efectos negativos del tratamiento con concentración más baja de SMX en el porcentaje de humedad en comparación con el control (Figura 4) puede estar relacionado con el aumento de la biomasa de la raíz, conllevando a un menor crecimiento de la planta (Figuras 2 y 3). Por ejemplo, en el caso de la exposición al SMX se observa un significativo menor tamaño de las plantas expuestas, en comparación con el control a las concentraciones empleadas de 0.05 y 0.2 mg/L, y por otro lado unos menores porcentajes de humedad, por lo que estos parámetros podrían estar asociados.



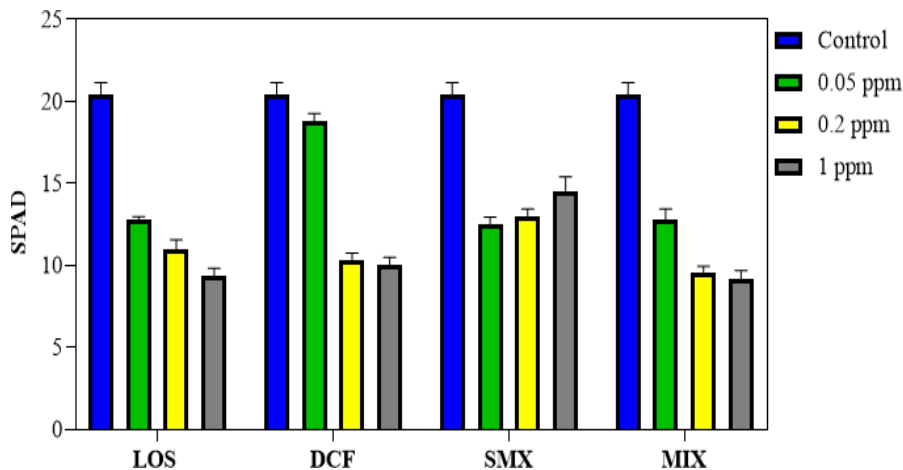
**Figura 4.** Efecto en el porcentaje de humedad de la planta de *L. sativa* a los 75 días en presencia de los fármacos Losartan(LOS), Diclofenaco (DCF), Sulfametoxazol (SMX) y MIX (LOS. DCF. SMX) presentes en el agua empleada para su riego. Estos datos fueron confirmados con la prueba estadística de comparación múltiple de Dunnett (Anexo 2).

Los valores mayores de biomasa total en las plantas que presentan bajos niveles de humedad se pueden atribuir a una disminución del potencial de turgencia y cierre de estomas, al haber baja humedad habrá un nivel hídrico negativo lo que provoca que las diferencias en la presión de turgencia generen un área

foliar menor para plantas cultivadas bajo sequía, según lo reportado por (Balaguera et al., 2008). Es preciso mencionar la importancia del porcentaje de humedad en la fotosíntesis. Si la planta pierde demasiada agua, los estomas se cierran lo cual provocará que la fotosíntesis se frene, al suceder esto la planta no podrá absorber más CO<sub>2</sub>, molécula que permite que la fotosíntesis se lleve a cabo en condiciones normales (Euned, n.d.). Dicho lo anterior posiblemente el SMX podría ocasionar un cierre de los estomas por la condición de estrés al compuesto y conllevar a un aumento de la biomasa en la raíz en comparación con el tallo, aumentando la cantidad de agua absorbida por la raíz y la disminución de esta por el tallo y hojas (Ahmed et al. 2015).

### **2.2.2 Cantidad de clorofila**

La cantidad de clorofila es un parámetro que permite evaluar la capacidad de la planta para realizar la fotosíntesis. Cuando hay algún efecto causado por la interacción de la planta y algún agente externo, como lo puede ser la presencia de compuestos farmacéuticos, se evidencia alguna alteración en el contenido total de la planta. La cantidad de clorofila fue determinada en las muestras de plantas de lechuga expuestas a los fármacos SMX, LOS, DCF y la mezcla durante 45 y 75 días. Los resultados demuestran una reducción significativa entre 31% y el 49% del contenido de clorofila en todos los tratamientos en comparación con las muestras no expuestas al tratamiento (Control) durante 75 días; exceptuando el DCF, donde no se observa una diferencia significativa en la cantidad de clorofila con respecto al control a concentración de 1 mg/L (Figura 5). Adicionalmente a esto, se evidenció que las muestras sometidas a la mezcla de CFACs presentaron una disminución significativa en las tres concentraciones en comparación con las muestras control.



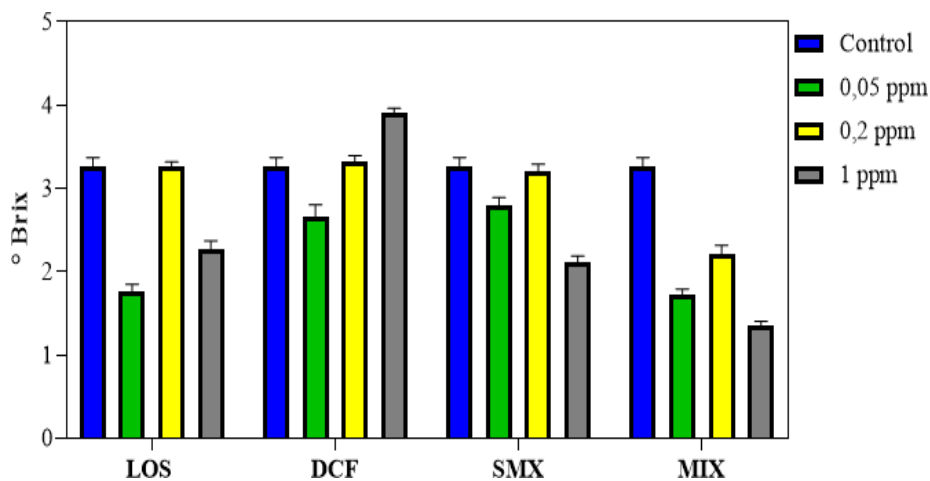
**Figura 5.** Efecto en la cantidad de clorofila de la planta de *L. sativa* a los 75 días en presencia de los fármacos Losartan(LOS), Diclofenaco (DCF), Sulfametoxazol (SMX) y MIX (LOS;DCF;SMX) presentes en el agua empleada para su riego. Estos datos fueron confirmados con la prueba estadística de comparación múltiple de Dunnett (Anexo 2).

Posiblemente esta reducción de clorofila puede deberse a una disminución en el nivel de ácido málico. Esto concuerda con lo reportado por (Darandeh & Hadavi, 2011) donde la aplicación foliar de ácido málico aumenta significativamente el contenido de clorofila en la planta *Lilium* sp. La lanzadera de malato utiliza ácido málico para transportar nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) generado por la fotosíntesis entre compartimentos celulares (cloroplasto, citosol y mitocondrias) (Hebbelmann et al., 2012). Por tanto, la disminución del contenido de clorofila observada en el presente estudio posiblemente podría deberse a una relación entre la reducción de la fotosíntesis y, en consecuencia, una reducción del ácido málico necesario para transportar NADPH (Hurtado et al., 2017). Otra posible razón de la disminución de la cantidad de clorofila en las plantas expuestas a DCF, puede deberse a la afectación de la enzima glutamina sintetasa (GS), esta enzima se encarga de los procesos primarios de la planta: asimilación de nitrógeno (N) y fotosíntesis. (Martins et al., 2020) observaron en estudios similares de exposición a fármacos como el DCF (0.05 y 5 mg/L), pero en plantas de tomate,

una afectación de la GS de manera dependiente del órgano, por la presencia de este contaminante, en los niveles de expresión génica, proteica y en la actividad enzimática.

### 2.2.3 Contenido de azúcares °Brix

El contenido de azúcares es un parámetro que permite identificar si la planta está obteniendo sus nutrientes necesarios para su debido crecimiento. Cuando hay algún efecto causado por la interacción de la planta y algún agente externo, como lo puede ser la presencia de compuestos farmacéuticos, se evidencia alguna alteración en el contenido total de la planta. El contenido de azúcares en las plantas expuestas a los fármacos SMX y LOS durante 75 días es significativamente menor con respecto al control a solo dos de las concentraciones empleadas (0.05 y 1 mg/L); igualmente para la mezcla, se observa una disminución significativa en comparación con el control a las tres concentraciones empleadas (0.05, 0.2 y 1 mg/L) (Figura 6). En el caso del DCF a una concentración de 1 mg/L la cantidad de azúcares es significativamente mayor en comparación con el control. Todos estos datos fueron igualmente confirmados con la prueba estadística de comparación múltiple de Dunnett (Anexo 2).



**Figura 6.** Efecto en la cantidad de azúcares (°Brix) de la planta de *L. sativa* a los 75 días en presencia de los fármacos Losartán (LOS), Diclofenaco (DCF), Sulfametoxazol (SMX) y MIX (LOS. DCF. SMX) presentes en el agua empleada para su riego.

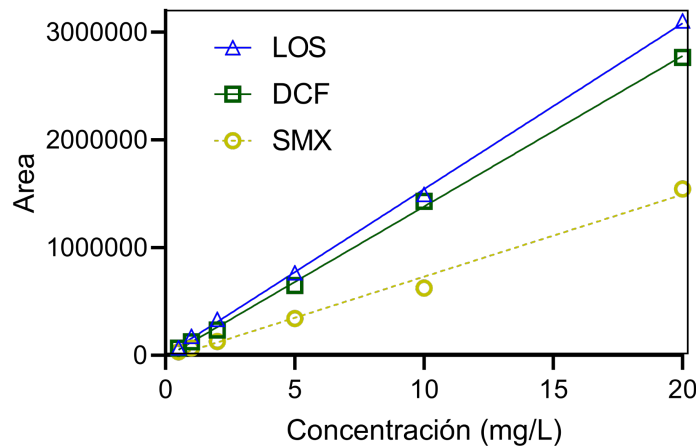
Esta disminución posiblemente indica un cambio de la absorción y de la asimilación de carbono (Rosa et al., 2009). Los azúcares no estructurales desempeñan muchas funciones en la fisiología de la planta, tanto para obtención de energía como para la protección contra presiones osmóticas altas y otras formas de estrés (Martínez-Vilalta et al., 2016). En consecuencia se ha observado que la cantidades más bajas de intermediarios del metabolismo central del C (ciclo de glucólisis y TCA) registradas en cultivos de lechuga expuestos a CFACs, probablemente estén asociadas con aumentos en el consumo de energía (Bowne et al., 2012; Zhao et al., 2015), lo que conlleva a una disminución de azúcares totales en plantas de consumo humano. Por otra parte, estudios recientes informan resultados contradictorios ya que demuestran un aumento en la cantidad de sacarosa, fructosa, glucosa y azúcares totales en frutos de cultivos de tomate expuestos a SMX y TMP (trimetoprim) (Christou et al., 2019). Estos resultados contradictorios sugieren que las condiciones de cultivo de las plantas (temperatura y humedad), así como el medio de cultivo (propiedades fisicoquímicas del suelo, pH de la solución nutritiva etc.) y la propia planta (variedad, fisiología, clase, familia etc.), puede afectar significativamente el patrón de absorción de los CFACs y su conjugación con moléculas endógenas por parte de la planta y dar lugar a resultados distintos en diferentes condiciones experimentales. Sin embargo, se reporta en el mismo estudio un aumento de sacarosa cuando el cultivo está expuesto a DCF en concentraciones relevantes de 1 mg/L.

## **2.2 Acumulación de DCF, SMX y LOS en muestras de plantas de lechuga de invernadero**

### **2.2.1 Validación de método de extracción y cuantificación para LOS, DCF y SMX**

Para el seguimiento, identificación y detección de LOS, DCF y SMX en las muestras de plantas de lechuga de invernadero expuestas a estos fármacos, se realizó la validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia para la identificación y cuantificación de la concentración de LOS, DCF y SMX en los extractos de plantas de lechuga expuestas a los tres compuestos farmacéuticos en *L.sativa*. Al realizar la curva de calibración de LOS, DCF y SMX (Figura 7), los resultados del modelo lineal indican la correlación existente entre la concentración y la medida del área bajo los picos

resultantes, se obtuvo un  $R^2$  estadístico de 0.9994 para LOS, de 0.9908 para DCF y 0.9992 para SMX, y el coeficiente de variación entre las réplicas de una misma concentración fue inferior al 4% en todos los casos, lo cual indica muy poca dispersión entre las mediciones (precisión).



**Figura 7.** Curva de calibración con un rango de cuantificación de 0.5 a 20 mg/L para LOS, DCF y SMX.

Se obtuvieron los límites de cuantificación y detección a partir de las curvas de calibración. El límite de cuantificación para el caso de LOS es de 0.0037 mg/L, de 0.0053 mg/L para DCF y de 0.0063 mg/L para SMX y límites de detección de 0.0018 mg/L para LOS, de 0.0040 mg/L para DCF y 0.0037 mg/L para SMX, garantizando que el ensayo no sólo posee una buena sensibilidad para la cuantificación de los CFAC, sino también para su detección. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al evaluar todos los parámetros de validación establecidos, se afirmó que el método empleado se encuentra validado satisfactoriamente y constituye una herramienta valiosa para determinar los compuestos farmacéuticos durante los experimentos de bioacumulación.

En cuanto a los resultados de la evaluación de la exactitud, se obtuvieron los porcentajes de recuperación para los tres CFACs a concentraciones de 5 mg/L y 100 mg/L (Tabla 1). Para el LOS, a una concentración de 5 mg/L, se obtuvo un porcentaje de recuperación del 44.94% y para una concentración de 100 mg/L, el porcentaje fue del 82.17%. Por otra parte, para los CFACs, SMX y DCF se obtienen porcentajes de recuperación mayores en comparación con los obtenidos para el LOS. Para el SMX los valores medio de recuperación son de 78.69% para la concentración baja y 84.05% para la concentración alta. El método de extracción empleado mostró mejores valores de recuperación para el DCF en

comparación con los otros CFACs, obteniendo así para la concentración baja un porcentaje de 100.16% y para la concentración alta de 103.61% (Tabla 1). El coeficiente de variación entre las réplicas de una misma concentración fue inferior al 3% en todos los casos, lo cual indica muy poca dispersión entre las mediciones (Anexo 4 Y 5). Los valores obtenidos en este estudio son similares a los encontrados por otros autores en la extracción de antibióticos (Tetraciclinas, sulfonamidas fluoroquinolonas), en donde los porcentajes de recuperación fueron de 60% empleando la mezcla metanol/acetonitrilo (Dimpe et al., 2016). Para el caso de SMX y DCF también se ha evidenciado que el método es preciso y exacto con solventes metanol/acetonitrilo obteniendo porcentajes de recuperación de 96% y 95%, respectivamente (Christou et al., 2017).

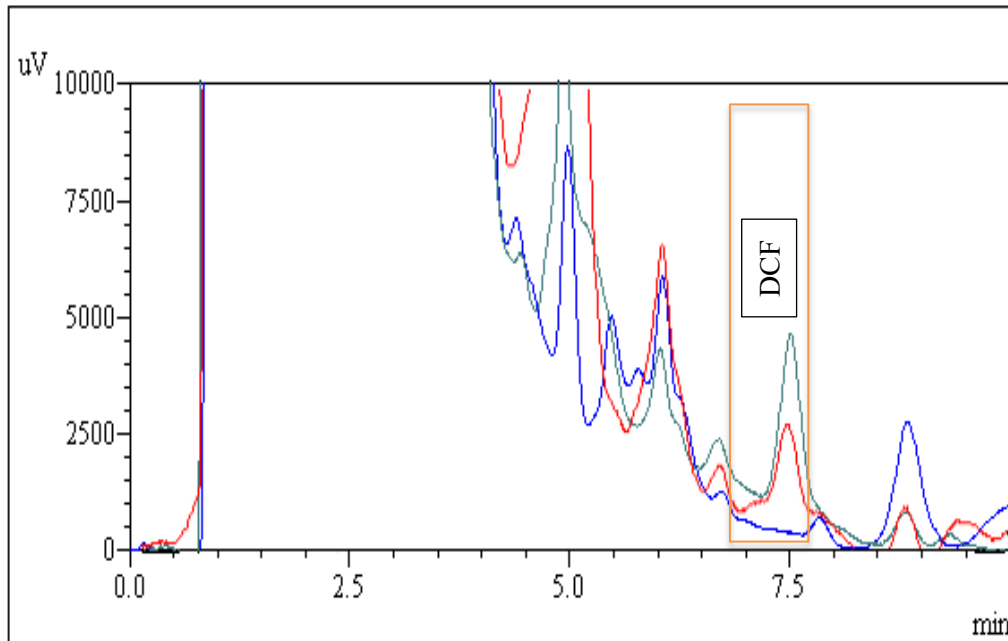
**Tabla 1.** Porcentaje de recuperación de la extracción en matriz vegetal empleando cartuchos de fase sólida (SPE) asistida por ultrasonido (EAU) para dos concentraciones 5 y 100 mg/L de cada CFAC.

[CFACs] mg/L	LOS	DCF	SMX
<b>5</b>	44.94%	100.16%	78.69 %
<b>100</b>	82.17%	103.61%	84.05%

### 2.2.2 Detección de LOS, DFC y SMX en muestras de plantas de lechuga

Los extractos obtenidos de las muestras de las hojas de la lechuga expuesta a los fármacos LOS, DCF y SMX (a las concentraciones más altas de 1 mg/L) fueron analizados por HPLC con el fin de determinar la posible absorción de estos fármacos por la planta. Se analizaron estas muestras puesto que algunos autores reportan que hay una mayor acumulación de CFACs cuando las plantas están expuestas a concentraciones más altas (Christou et al., 2019; Christou et al., 2017; Pan et al., 2014; Wu et al., 2014). Los extractos de las hojas de las plantas expuestas a las concentraciones de 0.05 y 0.2 mg/L no se pudieron analizar por cuestiones de logística y tiempo, pero se espera puedan ser analizadas posteriormente, para dar mayor claridad del efecto de la concentración de los fármacos sobre el cultivo. Los resultados de estos primeros ensayos muestran, como se esperaba, la no

detección de CFACs en las muestras de control regadas solamente con solución nutritiva de Hoagland (línea azul Figura 9). Por otro lado, uno de los resultados más interesantes e importantes de este trabajo fue la detección del DCF en las muestras de plantas de lechuga expuestas a una concentración de 1 mg/L (línea roja, Figura 9).



**Figura 9.** Cromatogramas de absorción de diclofenaco (DCF) en *L.sativa*. Cromatograma azul (Muestra control); Cromatograma rojo (Muestra DCF en extracto a los 75 días de exposición), Cromatograma verde (Muestra DCF dopada con estándar de DCF).

La concentración media de DCF en las hojas cuando se aplicó individualmente fue de 0.037 ng/g (Anexo 6). El DCF como otros CFACs ligeramente ácidos puede acumularse dentro del citosol debido al efecto de trampas de iones, y por lo tanto ser translocado por el floema en lugar del xilema, teniendo como resultado su acumulación en la raíz en lugar de las hojas (Goldstein et al., 2014; Huber et al., 2012). Los ensayos de detección en raíces serían un paso para seguir con el fin de establecer la movilidad del fármaco y puntos de mayor acumulación. Este resultado es similar al reportado por González García et al., 2018, quienes evaluaron la presencia de DCF y carbamazepina en tres variedades de lechuga, observando una mayor absorción de DCF en las raíces en comparación con las hojas, debido a su alta hidrofobicidad y baja solubilidad en agua. La acumulación de DCF en cultivos de lechuga mini romana



fue mayor en comparación con las otras dos variedades, y reportan una absorción de 0.03 ng/g; resultado similar al obtenido en este trabajo. Esto también se observó en la sección hoja/raíz donde fue menor a 1, lo que sugieren que la translocación de DCF fue limitada.

En trabajos donde se emplea el diseño experimental similar en tomate se ha reportado la no absorción y bioacumulación de DCF en frutos de tomate, no obstante, mencionan que al haber un riego prolongado con este CFAC en el cultivo de tomate puede ser absorbido y bioacumulado por los frutos. Estos resultados son una clara evidencia de que la absorción de los CFACs depende en gran medida de la planta, las propiedades fisicoquímicas del CFAC suministrado y el tiempo de exposición a los CFACs (Christou et al., 2019).

Por otro lado, la translocación limitada de DCF en las hojas podría ser un efecto de las propiedades fisicoquímicas, ya que el DCF es un compuesto débilmente ácido, como lo reportan los resultados obtenidos por otros autores, en donde se muestra una mayor captación de DCF en raíces (en comparación con las hojas), y se les atribuye esa captación a las características débilmente ácidas. Esto deja en evidencia que los productos químicos con un  $\log K_{ow} > 4$ , con baja solubilidad en agua (2.37 mg L<sup>-1</sup> a 25 °C) pueden presentar un alto potencial de retención principalmente en las raíces de las plantas (Miller et al., 2016). Otra posible ruta que disminuya la cantidad de DCF en la planta puede deberse a la propiedad de las plantas de realizar un mecanismo de desintoxicación endógeno, en el cual, este CFAC es absorbido por las plantas y se metaboliza rápidamente, el fármaco se activa en una reacción de fase I que da como resultado el metabolito hidroxilado 4'OH-diclofenaco que se conjuga posteriormente en la fase II con un glucopiranosido, un metabolito típico específico de una planta lo cual ocasiona que se disminuya el compuesto activo y aumente su metabolito (Huber et al., 2012). Otro aspecto importante para la poca absorción y translocación podría deberse a su lipofilia, lo que significa que la translocación de la raíz a las hojas se considera un proceso pasivo y depende de las propiedades fisicoquímicas del fármaco (Hillis et al., 2011; Schmidt & Redshaw, 2015). En este estudio no se analizaron los metabolitos de ninguno de los tres CFAC analizados, cabe mencionar que se hace necesario implementar un

seguimiento de estos metabolitos en estudios posteriores. En el caso del DCF, la cantidad diaria estimada ingerida está muy por debajo de los límites aceptables. La ingesta diaria estimada de DCF considerada por una persona de 70.0 kg es de 8.22 ng/kg (lechuga romana), mientras que la ingesta diaria máxima aceptable es de 67 ng/kg, por lo que el consumo diario de lechugas regadas con agua regenerada mezclada con DCF no representaría en principio una amenaza para la salud (González García et al., 2018).

En cuanto a LOS y el SMX no se detectaron en ninguna de las tres muestras a los 75 días de exposición a la concentración más alta empleada (1 mg/L), probablemente por un problema analítico y no de absorción, al ser una muestra compleja los picos se solapan con otras señales en el cromatograma y al trabajar con concentraciones demasiado bajas de los CFACs, estas no son diferenciadas por el equipo. Las posibles soluciones para estas interferencias, sería la modificación del método cromatográfico para SMX y LOS, en el cual los tiempos de retención sean mayores a los obtenidos con el método empleado en este trabajo. También se podrían cambiar los tiempos de retención de los picos de los dos CFACs a otra zona del cromatograma donde no haya interferencias o picos con señales mayores que las de los dos CFACs de interés. Se ha reportado la absorción de antibióticos como el sulfametoxazol y la sulfometoxazina a concentraciones de 5 mg/Kg y 20 mg/Kg, en cultivo de lechuga. Estos compuestos fueron altamente acumulados en las raíces más que en las hojas (Ahmed et al., 2015). De igual forma se ha evidenciado la absorción de SMX en cultivo de tomate en concentraciones relevantes de 0.05 mg/L en concentraciones de 62.7 µg/Kg a 184.4 µg/Kg. En comparación con el DCF, este compuesto es más hidrófilo ( $\log K_{ow}$  1.90) y se conserva su estado aniónico en el citosol (pH 7.5), aunque también puede encontrarse en su forma neutra en la vacuola y el apoplasto (pH 5.5), lo que permite su translocación dentro de las plantas a bajas tasas (Christou et al., 2019). El SMX puede penetrar de manera más extensa que el DCF y translocar preferentemente en el floema en lugar del xilema de las plantas, como lo hacen otros compuestos débilmente ácidos lo que da lugar a la detección en los frutos de tomate (Christou et al. 2017).

En el caso de LOS no hay investigación preexistente de este compuesto farmacéutico. Este compuesto presenta un valor (log Kow 4.3) similar al DCF, lo cual posiblemente se absorba mejor en las raíces y no en las hojas como se mencionó anteriormente con el DCF.

Aunque los resultados de esta investigación sugieren que el consumo de lechugas regadas con aguas residuales puede considerarse seguro, este estudio sólo abarca tres productos farmacéuticos en unas variedades de lechuga. Por lo tanto, es necesario realizar más investigaciones, como el trabajo propuesto aquí, para estimar el nivel de exposición humana a estos y otros productos farmacéuticos debido al consumo de cultivos regados con aguas regeneradas de PTARs y para garantizar un uso agrícola correcto de las aguas residuales sin que suponga ningún riesgo para la salud humana.

### **Conclusiones**

El presente estudio aborda la evaluación de la posible absorción y bioacumulación de tres CFACs en las hojas de un importante cultivo de hortalizas de amplia distribución, como lo es la lechuga, así como sobre los efectos mediados por estos CFACs en algunos atributos de la calidad de la planta. El enfoque experimental empleado permitió evaluar los efectos de los CFACs aplicados individualmente y en mezcla. Especialmente, el análisis bioquímico de cuatro atributos de calidad, permitieron identificar de manera general los efectos adversos sobre la calidad de las plantas debido a la exposición prolongada (75 días) a los CFACs estudiados. Cabe enfatizar que el diseño experimental empleado en este estudio es representativo de la posible reutilización de ART para riego de cultivos agrícolas en la sabana de Bogotá.

Es importante destacar que los efectos mediados por los compuestos farmacéuticos activos sobre los atributos de calidad pueden variar en función del compuesto farmacéutico aplicado (como se evidenció en este trabajo), la especie vegetal y el tiempo de exposición. Por otra parte, cabe mencionar que de los fármacos seleccionados el DCF se detectó en hojas de lechuga romana y la concentración afectó todos los atributos de la planta. Hasta donde se sabe, este es el primer informe en Colombia, que destaca los

efectos potenciales de los CFACs liberados en los agroecosistemas debido a diversas actividades humanas, sobre la calidad del cultivo de lechuga. Desde luego, se hace indispensables estudios a campo abierto puesto que la carga de contaminantes farmacéuticos en el agua de riego es aún mayor y no es controlada como en el presente estudio.

### **Agradecimientos**

Se agradece el apoyo financiero de MINCIENCIAS (contrato de proyecto 818-2019), a la Universidad Antonio Nariño por la contribución con las instalaciones y equipos. Igualmente, al doctor Alejandro Moncayo-Lasso, de la línea de Investigación de Remediación Ambiental y Procesos Avanzados de Oxidación, por su cooperación en el planteamiento y desarrollo de este trabajo. De igual forma, a mis compañeros del semillero SIRAPAOs, por toda la colaboración prestada, especialmente a Paula Espinosa por todos los conocimientos brindados y su contribución en el laboratorio. Por último, a mis padres por el apoyo constante durante mi proceso de aprendizaje, a mi hermana por involucrarse aún sin tener idea del tema y a mi hermano por sus consejos en cultivos agrícolas.

## Referencias

- Ahmed, M. B. M., Rajapaksha, A. U., Lim, J. E., Vu, N. T., Kim, I. S., Kang, H. M., Lee, S. S., & Ok, Y. S. (2015). Distribution and accumulative pattern of tetracyclines and sulfonamides in edible vegetables of cucumber, tomato, and lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(2), 398–405. <https://doi.org/10.1021/jf5034637>
- Balaguera, H. E., Álvarez-Herrera, J. G., & Rodríguez, J. D. (2008). Effect of the water deficit on the transplant of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Agronomía Colombiana*.
- Bartha, B., Huber, C., & Schröder, P. (2014). Uptake and metabolism of diclofenac in *Typha latifolia*-- how plants cope with human pharmaceutical pollution. *Plant Science*, *227*, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.06.001>
- Bártíková, H., Podlipná, R., & Skálová, L. (2016). Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*, *144*, 2290–2301. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.137>
- Basnyat, P. (2011). *Evaluation of Toxicity of Pharmaceuticals to the Activated Sludge Treatment Plant*.
- Bigott, Y., Chowdhury, S. P., Pérez, S., Montemurro, N., Manasfi, R., & Schröder, P. (2021). Effect of the pharmaceuticals diclofenac and lamotrigine on stress responses and stress gene expression in lettuce (*Lactuca sativa*) at environmentally relevant concentrations. *Journal of Hazardous Materials*, *403*, 123881. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123881>
- Bowne, J. B., Erwin, T. A., Juttner, J., Schnurbusch, T., Langridge, P., Bacic, A., & Roessner, U. (2012). Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. *Molecular Plant*, *5*(2), 418–429. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr114>
- Brausch, J. M., Connors, K. A., Brooks, B. W., & Rand, G. M. (2012). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review of recent toxicological studies and considerations for toxicity testing. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *218*, 1–99. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3137-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3137-4_1)

- Brunton et al. (2011). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman - 13.ed. - Laurence L. Brunton, PhD, Randa Hilal-Dandan, PhD, Björn C. Knollmann, MD, PhD - Google Libros* (2018 Artmed Editora, Ed.).
- Carter, L. J., Williams, M., Böttcher, C., & Kookana, R. S. (2015). Uptake of pharmaceuticals influences plant development and affects nutrient and hormone homeostases. *Environmental Science & Technology*, 49(20), 12509–12518. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03468>
- Carvalho, P. N., Basto, M. C. P., Almeida, C. M. R., & Brix, H. (2014). A review of plant-pharmaceutical interactions: from uptake and effects in crop plants to phytoremediation in constructed wetlands. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(20), 11729–11763. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2550-3>
- Christou, A., Antoniou, C., Christodoulou, C., Hapeshi, E., Stavrou, I., Michael, C., Fatta-Kassinos, D., & Fotopoulos, V. (2016). Stress-related phenomena and detoxification mechanisms induced by common pharmaceuticals in alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. *The Science of the Total Environment*, 557–558, 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.054>
- Christou, A., Karaolia, P., Hapeshi, E., Michael, C., & Fatta-Kassinos, D. (2017). Long-term wastewater irrigation of vegetables in real agricultural systems: Concentration of pharmaceuticals in soil, uptake and bioaccumulation in tomato fruits and human health risk assessment. *Water Research*, 109, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.033>
- Christou, A., Kyriacou, M. C., Georgiadou, E. C., Papamarkou, R., Hapeshi, E., Karaolia, P., Michael, C., Fotopoulos, V., & Fatta-Kassinos, D. (2019). Uptake and bioaccumulation of three widely prescribed pharmaceutically active compounds in tomato fruits and mediated effects on fruit quality attributes. *The Science of the Total Environment*, 647, 1169–1178. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.053>
- Christou, A., Michael, C., Fatta-Kassinos, D., & Fotopoulos, V. (2018). Can the pharmaceutically active

compounds released in agroecosystems be considered as emerging plant stressors? *Environment International*, 114, 360–364. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.003>

Darandeh, N., & Hadavi, E. (2011). Effect of Pre-Harvest Foliar Application of Citric Acid and Malic Acid on Chlorophyll Content and Post-Harvest Vase Life of Liliium cv. Brunello. *Frontiers in Plant Science*, 2, 106. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00106>

Dubois, O. (2011). The state of the world's land and water resources for food and agriculture: managing systems at risk. *The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture: Managing Systems at Risk*.

Euned, 1994 (Ed.). (n.d.). *Atlas agropecuario de Costa Rica - Gonzalo Cortés Enríquez, Universidad Estatal a Distancia (Costa Rica) - Google Libros*.

Fatta-Kassinos, D., Kalavrouziotis, I. K., Koukoulakis, P. H., & Vasquez, M. I. (2011). The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment. *The Science of the Total Environment*, 409(19), 3555–3563. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.036>

Goldstein, M., Shenker, M., & Chefetz, B. (2014). Insights into the uptake processes of wastewater-borne pharmaceuticals by vegetables. *Environmental Science & Technology*, 48(10), 5593–5600. <https://doi.org/10.1021/es5008615>

González García, M., Fernández-López, C., Pedrero-Salcedo, F., & Alarcón, J. J. (2018). Absorption of carbamazepine and diclofenac in hydroponically cultivated lettuces and human health risk assessment. *Agricultural Water Management*, 206, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.04.018>

Grossberger, A., Hadar, Y., Borch, T., & Chefetz, B. (2014). Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environmental Pollution*, 185, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.038>

Guillaume et al.,. (2021, July 29). *Water Scarcity: Coming Soon – UNU-INWEH*.

- He, Y., Langenhoff, A. A. M., Sutton, N. B., Rijnaarts, H. H. M., Blokland, M. H., Chen, F., Huber, C., & Schröder, P. (2017). Metabolism of Ibuprofen by *Phragmites australis*: Uptake and Phytodegradation. *Environmental Science & Technology*, *51*(8), 4576–4584. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00458>
- Hebbelmann, I., Selinski, J., Wehmeyer, C., Goss, T., Voss, I., Mulo, P., Kangasjärvi, S., Aro, E.-M., Oelze, M.-L., Dietz, K.-J., Nunes-Nesi, A., Do, P. T., Fernie, A. R., Talla, S. K., Raghavendra, A. S., Linke, V., & Scheibe, R. (2012). Multiple strategies to prevent oxidative stress in Arabidopsis plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase. *Journal of Experimental Botany*, *63*(3), 1445–1459. <https://doi.org/10.1093/jxb/err386>
- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, *131*(1–2), 5–17. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00041-3)
- Hillis, D. G., Fletcher, J., Solomon, K. R., & Sibley, P. K. (2011). Effects of ten antibiotics on seed germination and root elongation in three plant species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *60*(2), 220–232. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9624-0>
- Hu, X., Zhou, Q., & Luo, Y. (2010). Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution*, *158*(9), 2992–2998. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.05.023>
- Huber, C., Bartha, B., Harpaintner, R., & Schröder, P. (2009). Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants--two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Environmental Science and Pollution Research International*, *16*(2), 206–213. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0095-z>
- Huber, C., Bartha, B., & Schröder, P. (2012). Metabolism of diclofenac in plants--hydroxylation is followed by glucose conjugation. *Journal of Hazardous Materials*, *243*, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.023>



- Hurtado, C., Parastar, H., Matamoros, V., Piña, B., Tauler, R., & Bayona, J. M. (2017). Linking the morphological and metabolomic response of *Lactuca sativa* L exposed to emerging contaminants using GC × GC-MS and chemometric tools. *Scientific Reports*, 7(1), 6546. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06773-0>
- IDEAM. (2020). *EVALUACIÓN DEL RECURSO HÍDRICO - IDEAM*.
- Kavi Kishor, P. B., Hima Kumari, P., Sunita, M. S. L., & Sreenivasulu, N. (2015). Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Frontiers in Plant Science*, 6, 544. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00544>
- Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z., & Vaněk, T. (2010). Phytoremediation of pharmaceuticals--preliminary study. *International Journal of Phytoremediation*, 12(3), 306–316. <https://doi.org/10.1080/15226510903563900>
- Liu, F., Ying, G.-G., Tao, R., Zhao, J.-L., Yang, J.-F., & Zhao, L.-F. (2009). Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution*, 157(5), 1636–1642. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.021>
- Li, Y., Zhu, G., Ng, W. J., & Tan, S. K. (2014). A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism. *The Science of the Total Environment*, 468–469, 908–932. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.018>
- Martínez-Hernández, V., Meffe, R., Lopez Heras, I., Hernandez Martin, J., & Alonso Alonso, C. (2019). *Atenuación de contaminantes de preocupación emergente y microorganismos patógenos en la zona no saturada: filtros verdes y efecto de enmiendas*.
- Martínez-Vilalta, J., Sala, A., Asensio, D., Galiano, L., Hoch, G., Palacio, S., Piper, F. I., & Lloret, F. (2016). Dynamics of non-structural carbohydrates in terrestrial plants: a global synthesis. *Ecological Monographs*, 86(4), 495–516. <https://doi.org/10.1002/ecm.1231>
- Martins, M., Sousa, B., Lopes, J., Soares, C., Machado, J., Carvalho, S., Fidalgo, F., & Teixeira, J.

(2020). Diclofenac shifts the role of root glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase for maintaining nitrogen assimilation and proline production at the expense of shoot carbon reserves in *Solanum lycopersicum* L. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(23), 29130–29142. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09136-x>

Michelini, L., La Rocca, N., Rascio, N., & Ghisi, R. (2013). Structural and functional alterations induced by two sulfonamide antibiotics on barley plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 67, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.027>

Migliore, L., Godeas, F., De Filippis, S. P., Mantovi, P., Barchi, D., Testa, C., Rubattu, N., & Brambilla, G. (2010). Hormetic effect(s) of tetracyclines as environmental contaminant on *Zea mays*. *Environmental Pollution*, 158(1), 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.039>

Migliore, L., Rotini, A., Cerioli, N. L., Cozzolino, S., & Fiori, M. (2010). Phytotoxic antibiotic sulfadimethoxine elicits a complex hormetic response in the weed *lythrum salicaria* L. *Dose-Response*, 8(4), 414–427. <https://doi.org/10.2203/dose-response.09-033.Migliore>

Miller, E. L., Nason, S. L., Karthikeyan, K. G., & Pedersen, J. A. (2016). Root uptake of pharmaceuticals and personal care product ingredients. *Environmental Science & Technology*, 50(2), 525–541. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01546>

Paíga, P., Santos, L. H. M. L. M., & Delerue-Matos, C. (2017). Development of a multi-residue method for the determination of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in aqueous environmental matrices by SPE-UHPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 135, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.013>

Pan, M., Wong, C. K. C., & Chu, L. M. (2014). Distribution of antibiotics in wastewater-irrigated soils and their accumulation in vegetable crops in the Pearl River Delta, southern China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(46), 11062–11069. <https://doi.org/10.1021/jf503850v>

Riemenschneider, C., Al-Raggad, M., Moeder, M., Seiwert, B., Salameh, E., & Reemtsma, T. (2016). Pharmaceuticals, Their Metabolites, and Other Polar Pollutants in Field-Grown Vegetables

Irrigated with Treated Municipal Wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(29), 5784–5792. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01696>

Riemenschneider, C., Seiwert, B., Moeder, M., Schwarz, D., & Reemtsma, T. (2017). Extensive Transformation of the Pharmaceutical Carbamazepine Following Uptake into Intact Tomato Plants. *Environmental Science & Technology*, 51(11), 6100–6109. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06485>

Rodriguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., & Bandala, E. R. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 323, 361–380. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.106>

Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. A., Hilal, M., & Prado, F. E. (2009). Soluble sugars--metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. *Plant Signaling & Behavior*, 4(5), 388–393. <https://doi.org/10.4161/psb.4.5.8294>

Schmidt, W., & Redshaw, C. H. (2015). Evaluation of biological endpoints in crop plants after exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): implications for phytotoxicological assessment of novel contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112, 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.008>

S Galicia, E. (2018). *Vivir sin agua Cienciorama*.

Schröder, P., Scheer, C. E., Diekmann, F., & Stampfl, A. (2007). How plants cope with foreign compounds. Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). *Environmental Science and Pollution Research International*, 14(2), 114–122. <https://doi.org/10.1065/espr2006.10.352>

Schvambach, M. I., Vargas Andriolli, B., Barcelos Oliveira, J. L., & de Souza, P. F. (2020). *Conservation of crisp lettuce in different post-harvest storage conditions I - ProQuest*. <https://www.proquest.com/openview/3b28a002ccfaac3122a72025cc71974c/1?pq->

origsite=gscholar&cbl=2030545

- UNESCO. (2020). *The United Nations World Water Development Report 2020: Water and Climate Change*. <https://www.unwater.org/publications/world-water-development-report-2020/>
- Vasquez, M. I., Lambrianides, A., Schneider, M., Kümmerer, K., & Fatta-Kassinos, D. (2014). Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: what we know and what we should know. *Journal of Hazardous Materials*, 279, 169–189. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.069>
- Vieno, N., & Sillanpää, M. (2014). Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant - a review. *Environment International*, 69, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.021>
- Wu, X., Conkle, J. L., Ernst, F., & Gan, J. (2014). Treated wastewater irrigation: uptake of pharmaceutical and personal care products by common vegetables under field conditions. *Environmental Science & Technology*, 48(19), 11286–11293. <https://doi.org/10.1021/es502868k>
- Yao, Y., Gao, B., Chen, H., Jiang, L., Inyang, M., Zimmerman, A. R., Cao, X., Yang, L., Xue, Y., & Li, H. (2012). Adsorption of sulfamethoxazole on biochar and its impact on reclaimed water irrigation. *Journal of Hazardous Materials*, 209–210, 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.01.046>
- Zhao, Y., Zhao, J., Zhao, C., Zhou, H., Li, Y., Zhang, J., Li, L., Hu, C., Li, W., Peng, X., Lu, X., Lin, F., & Xu, G. (2015). A metabolomics study delineating geographical location-associated primary metabolic changes in the leaves of growing tobacco plants by GC-MS and CE-MS. *Scientific Reports*, 5, 16346. <https://doi.org/10.1038/srep16346>

**Anexos**

**Anexo 1.** Comparación de los valores medios del tamaño de la planta expuestos con SMX, LOS y DCF con el valor medio de las plantas control mediante prueba ANOVA de dos factores acoplado al método Dunnett a los 75 días.

	<b>Tamaño de la planta</b>		
	cm		
CFAc	0.05 mg/L	0.2 mg/L	1 mg/L
Control	22.8 2A		
LOS	17.44 B	13.02 B	28.06 B
DCF	19.44 B	17.7 B	18.50 B
SMX	10.82 B	17.38 B	19.66 B
MIX	23.84 A	19.56 B	24.60 A

Los valores con letra (B) en cada columna son significativamente diferentes en comparación con la media control según la prueba de comparación múltiple de Dunnett  $P \leq 0.05$ .

**Anexo 1.1** Comparación de los valores medios del tamaño de la planta expuestos con SMX, LOS y DCF con el valor medio de las plantas control mediante prueba ANOVA de dos factores acoplado al método Dunnett a los 45 días.

	Tamaño de la planta		
	cm		
CFAc	0.05 mg/L	0.2 mg/L	1 mg/L
Control	19.48A		
LOS	17.16A	19.32A	19.50A
DCF	20.03A	20.12A	20.01A
SMX	19.33A	19.46A	19.63A
MIX	18.98A	19.47A	19.45A

Los valores con letra (B) en cada columna son significativamente diferentes en comparación con la media control según la prueba de comparación múltiple de Dunnett  $P \leq 0.05$ .

**Anexo 2.** Comparación de los valores medios de los tres atributos de calidad examinados en lechuga romana expuestos a los fármacos LOS, DCF, SMX y la mezcla (75 días) con el valor medio de las plantas control mediante prueba anova de dos factores acoplado al método Dunnett

	Humedad			Clorofila			Azúcares		
	%			SPAD			mg/mL		
CFAc	0.05 mg/L	0.2 mg/L	1 mg/L	0.05 mg/L	0.2 mg/L	1 mg/L	0.05 mg/L	0.2 mg/L	1 mg/L
Control	94.47A			20.44A			3.26A		
LOS	84.16A	81.26A	81.42A	12.8 B	11.00 B	9.36 B	1.76 B	3.26A	2.26 B
DCF	73.92 B	71.63B	88.25A	18.82 A	10.38B	10.00 B	2.6 B	3.31A	3.9 B
SMX	55.44 B	82.87 A	62.27B	12.56 B	12.96B	14.56B	2.8 B	3.2 A	2.11 B
MIX	69.47 B	85.18A	91.88A	12.80 B	9.54 B	9.16 B	1.71 B	2.21 B	1.35 B

Los valores con letra (B) en cada columna son significativamente diferentes en comparación con la media control según la prueba de comparación múltiple de Dunnett  $P \leq 0.05$ .

**Anexo 3.** Comparación de los valores medios de tres atributos de calidad examinados en lechuga romana expuestas a los fármacos LOS, DCF, SMX y la mezcla (45 días) con el valor medio de las plantas control mediante prueba anova de dos factores acoplado al método Dunnett

	Humedad			Clorofila			Azúcares		
	%			SPAD			mg/mL		
CFAc	0.05 mg/L	0.2 mg/L	1 mg/L	0.05 mg/L	0.2 mg/L	1 mg/L	0.05 mg/L	0.2 mg/L	1 mg/L
Control	92.44A			21.16A			1.06 A		
LOS	90.43A	93.43A	91.78A	20.63A	20.44A	20.20A	0.9667A	0.6333 B	0.7667A
DCF	90.42A	90.25A	90.55A	21.16A	21.33A	21.15A	1,2A	1A	1.3 B
SMX	92.56A	91.81A	91.33A	21.56A	21.67A	21.63A	0.6333 B	1,16A	0.9A
MIX	91.49A	93.93A	93.31A	20.45A	20.37A	20.66A	0.8667A	0.9A	0.7667A

Los valores con letra (B) en cada columna son significativamente diferentes en comparación con la media control según la prueba de comparación múltiple de Dunnett  $P \leq 0.05$ .



**Anexo 4.** Resultados de precisión y exactitud de hojas de *L.sativa* dopado con LOS, DCF y SMX estándar (5 mg/L).

CFacs	Concentración (mg/L)	Concentración según la curva de calibración (mg/L)		Promedio	DS	CV	% Recuperación
LOS	5	2.283	2.690	2.486	0.287	1.301	44.94
DCF		4.883	6.246	5.564	0.529	0.766	78.69
SMX		3.997	4.746	4.371	0.963	1.70	100.16

DS: Desviación estándar CV: Coeficiente de Variación

**Anexo 5.** Resultados de precisión y exactitud de hojas de *L.sativa* dopado con LOS, DCF y SMX estándar (100 mg/L)

CFacs	Concentración (mg/L)	Concentración según la curva de calibración (mg/L)		Promedio	DS	CV	% Recuperación
LOS	100	90.425	92.179	91.302	1.240	1.359	82.172
DCF		114.140	116.214	115.177	1.537	1.335	103.614
SMX		91.324	95.460	93.392	2.924	3.131	84.053

DS: Desviación estándar CV: Coeficiente de Variación

**Anexo 6.** Resultado de absorción y bioacumulación de DCF (1 mg/L) a los 75 días de exposición.

<b>Concentración (mg/L) CFAc 75 días</b>	<b>Concentración según la curva de calibración (mg/L)</b>			<b>Promedio</b>	<b>DS</b>	<b>CV</b>
1	1.24	1.22	1.25	1.24	0.015	1.232

DS: Desviación estándar CV: Coeficiente de Variación