

Implementación de la Técnica Dispersión de la Matriz en fase sólida para el Monitoreo de
Fármacos Anti-Inflamatorios y sus Metabolitos en Plantas Acuáticas

Oscar Eduardo Osorio Lizarazo

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Directora

Elena E. Stashenko

Química, *Ph.D.*

Codirector

Andrés Fernando González Suárez

Químico, *M.Sc.*

Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL

Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM

Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2022

Dedicatoria

A Dios, dador de la sabiduría, ciencia y conocimiento.

A mi familia, por su apoyo incondicional.

A la profesora Elena y el profesor Jairo, por enseñarme y creer en mí.

A Andrés González, por acompañarme y guiarme en el proceso de aprendizaje.

A todos mis compañeros del CENIVAM y CROM-MASS, porque de todos aprendí un poco.

Agradecimientos

Agradecimientos a Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50.

Agradecimientos al apoyo financiero de MINCIENCIAS (N° 785/2017).

Tabla de Contenido

Introducción	15
1. Estado del arte	17
1.1. Contaminantes Emergentes	17
1.2. Anti-inflamatorios No Esteroides	18
1.3. Productos Farmacéuticos como Contaminantes Emergentes	18
1.4. Plantas Acuáticas.....	20
1.4.1. <i>Salvinia Adnata</i>.....	22
1.5. Interacción de Plantas con Compuestos Xenobióticos.....	22
1.6. Métodos Analíticos para la Determinación de AINE y sus Metabolitos en Material Vegetal	23
1.7. Dispersión de la Matriz en Fase Sólida.....	24
1.8. Cromatografía Líquida Acoplada a Detectores de Arreglo de Diodos y Espectrometría de Masas	26
1.9. Cienciometría	27
2. Desarrollo Experimental	30
2.1. Reactivos y Solventes.....	30
2.2. Material y Equipos del Laboratorio	30
2.3. Material Vegetal.....	31
2.4. Análisis por HPLC/DAD de Compuestos AINE	31
2.5. Determinación de Parámetros de Eficiencia de la Separación Cromatográfica.....	32
2.6. Determinación de las Figuras de Mérito para el Método de Análisis por HPLC/DAD	33
2.7. Implementación de la Técnica MSPD para la Extracción de AINE en Material Vegetal	34
2.8. Interacción Planta-Fármacos	36
2.9. Análisis UHPLC-ESI- <i>Orbitrap</i> -HRMS	36
2.10. Detección, Identificación y Cuantificación de los AINE y sus Metabolitos en el Material Vegetal.....	38
3. Análisis de Resultados	40
3.1. Metodología de Análisis de Compuestos AINE por HPLC/DAD.	40
3.2. Parámetros de Eficiencia de la Separación de Compuestos AINE por HPLC/DAD.....	42
3.3. Figuras de Mérito Obtenidas para el Método HPLC/DAD Empleado	43

3.4.	Implementación de la Técnica de Extracción MSPD de los AINE en Material Vegetal.	46
3.4.1.	<i>Efecto del Solvente de Extracción sobre la Eficiencia de Extracción de los AINE en Material Vegetal</i>	47
3.4.2.	<i>Efecto del Agente de Dispersión sobre la Eficiencia de Extracción de los AINE en Material Vegetal</i>	48
3.4.3.	<i>Efecto del Volumen de Elución sobre la Eficiencia de Extracción de los AINE en Material Vegetal</i>	50
3.4.4.	<i>Efecto de la Relación del Material Vegetal y el Dispersante sobre la Eficiencia de Extracción de los AINE en Material Vegetal</i>	51
3.4.5.	<i>Figuras de Mérito de la Técnica de Extracción MSPD</i>	52
3.5.	Análisis de AINE y sus Metabolitos por UHPLC-ESI ⁺ -Orbitrap-HRMS en los Extractos MSPD de Plantas Acuáticas Expuestas a un Medio de Cultivo con Fármacos	56
3.6.	Determinación de la Cantidad de los AINE y sus Metabolitos Durante el Tiempo de Interacción Planta-Fármaco.....	64
3.6.1.	<i>Figuras de mérito del método de análisis por UHPLC/ESI⁺-Orbitrap-HRMS</i>	64
3.6.2.	<i>Análisis por UHPLC-ESI^{+/-}-Orbitrap-HRMS de los AINE en el Experimento de Interacción Planta-Fármaco en Hojas y Raíces.</i>	68
4.	Conclusiones	75
5.	Recomendaciones	77
	Referencias Bibliográficas	78
	Apéndices.....	90

Lista de Tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los AINE de mayor consumo en Colombia.....	21
Tabla 2. Principales técnicas de extracción y de análisis instrumental utilizadas para el monitoreo de fármacos AINE en material vegetal.	25
Tabla 3. Identificación y número de voucher de la planta <i>Salvinia adnata</i>	31
Tabla 4. Parámetros cromatográficos usados para el análisis por HPLC de compuestos AINE. .	40
Tabla 5. Parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica de fármacos AINE por HPLC	42
Tabla 6. Repetibilidad de los tiempos de retención de los compuestos (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), analizados por HPLC-DAD (nivel de concentración bajo).	43
Tabla 7. Repetibilidad de los tiempos de retención de los compuestos AINE (7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), analizados por HPLC-DAD (nivel de concentración alto).	44
Tabla 8. La linealidad y la sensibilidad del método HPLC-DAD para cuantificación de los AINE bajo estudio.	44
Tabla 9. Niveles mínimos de detección y cuantificación de los compuestos AINE obtenidos por HPLC/DAD.....	46
Tabla 10. Estudio de la repetibilidad de la eficiencia de extracción de fármacos AINE (1 $\mu\text{g g}^{-1}$) en hoja y raíz de la planta <i>Azolla filiculoides</i> (n=5), usando MSPD.....	53
Tabla 11. Estudio de la repetibilidad de la eficiencia de extracción de fármacos AINE (1 $\mu\text{g g}^{-1}$) en hoja y raíz de la planta <i>Salvinia adnata</i> (n=5), usando MSPD.....	53

Tabla 12. Reproducibilidad de la eficiencia de extracción de los fármacos AINE (5 $\mu\text{g g}^{-1}$) mediante MSPD en distintos días de la técnica MSPD (n=5) realizada.	54
Tabla 13. Comparación las eficiencias de extracción de la técnica MSPD implementada y de la extracción con solvente asistida con ultrasonido.	55
Tabla 14. Masas exactas de los AINE y sus posibles metabolitos determinados por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS, en los extractos obtenidos por MSPD de <i>S. adnata</i> . durante el experimento de interacción planta-fármaco.	57
Tabla 15. Repetibilidad de los tiempos de retención de los compuestos AINE (50 $\mu\text{g L}^{-1}$), obtenidos por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS.	66
Tabla 16. Linealidad y sensibilidad del método de análisis de fármacos AINE por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS.	66
Tabla 17. Niveles mínimos de detección y cuantificación fármacos AINE del método por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS.	67
Tabla 18. Eficiencia de extracción de los AINE (30 ng g^{-1}) obtenidos mediante la técnica de extracción MSPD de <i>Salvinia adnata</i> (hojas y raíces), analizados por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS.	68
Tabla 19. Factor de traslocación de los fármacos AINE encontrados durante el experimento de interacción de la planta <i>S. adnata</i> y los fármacos AINE.	71
Tabla 20. Valores de K_{ow} de los fármacos AINE.	73

Lista de Figuras

Figura 1. Número de publicaciones por año.	28
Figura 2. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Agilent Technologies 1260 series.....	32
Figura 3. Cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia DionexUltiMate® 3000 (Thermo Fischer scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Espectrómetro de masas Orbitrap Exactive Plus (Thermo Scientific, Bremen, Alemania).....	38
Figura 4. Perfil cromatográfico obtenido por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD) 1260 Series AT, de las sustancias de referencia certificadas de fármacos AINE (5 µg mL ⁻¹) y el estándar interno (difenilamina).	41
Figura 5. Efecto del solvente de elución sobre la recuperación de los AINE del material vegetal, usando la técnica MSPD (n=2).	48
Figura 6. Efecto del agente de dispersión de la muestra sobre la eficiencia de extracción de los AINE del material vegetal, usando MSPD (n=2).	49
Figura 7. Efecto del volumen de elución del solvente sobre la eficiencia de extracción de los AINE en el material vegetal, usando la técnica MSPD (n=2).	50
Figura 8. Efecto de la relación del material vegetal y el agente dispersante sobre la eficiencia de extracción de los AINE en el material vegetal usando MSPD (n=2).	51
Figura 9. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC-DAD, de los extractos de muestra blanco (azul), extracto del material vegetal enriquecido con AINE (rojo), material de referencia certificado (verde).	52

Figura 10. A. Espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS en modo step scan (HCD, 10 eV) del naproxeno presente en el extracto MSPD (día 10, hojas), $[M+H]^+$ $C_{14}H_{14}O_3$, en m/z 231.10157. B. Distribución isotópica del ion $[M+H]^+$ en el espectro de masas. 59

Figura 11. Espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS en modo step scan (HCD, 10 eV) del diclofenaco en el extracto MSPD (hojas, día 10), $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ $[M+H]^+$ m/z 296.02396. B Distribución isotópica en el espectro de masas del diclofenaco obtenida por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS: Relación isotópica de la señal del ion $[M+H]^+$ m/z 296.02383 (35Cl, 100%); m/z 297.02713 (13C, 35Cl ; 15,3%); m/z 298.02069 (35Cl, 37Cl ; 59.5%); m/z 299.02402 (13C, 35Cl, 37Cl ; 10.7%); ; m/z 300.01764 (37Cl, 37Cl; 10.6%). 60

Figura 12. Esquema de fragmentación del diclofenaco. 61

Figura 13. A. Espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS en modo step scan (HCD, 10 eV) del ibuprofeno, presente en el extracto MSPD de una muestra enriquecida con el fármaco (30 μg kg^{-1}), $[M+Na]^+$ $C_{13}H_{18}O_2Na$ m/z 229.11977. B. Distribución isotópica en el espectro de masas de ibuprofeno obtenida por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS: Relación isotópica de la señal del ion $[M+H]^+$ m/z 229.11977 (12C, 100%); m/z 230.12306 (13C, 14.3%). 62

Figura 14. A. Espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS en modo step scan (HCD, 20 eV) de piroxicam, presente en el extracto MSPD (hojas, día 10) de $[M+H]^+$, $C_{15}H_{14}O_4,S$ m/z 332.06989. B. Relación isotópica de la señal del ion $[M+H]^+$ m/z 332.06956 (1 2C ;100%) ; m/z 333.07245 (13C ;16.5%); m/z 334.06537 (34S; 4.24%). 63

Figura 15. Ruptura Retro Diels-Alder que se produce apartir de un tautómero en la forma ceto de la molécula piroxicam. 64

Figura 16. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de iones $[M+H]^+$ obtenidas por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS de las sustancias de referencia de los fármacos AINE ($100 \mu\text{g L}^{-1}$).....	65
Figura 17. Distribución del piroxicam en la planta <i>S. adnata</i> (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta <i>S. adnata</i> al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) (n=5).....	69
Figura 18. Distribución del naproxeno en la planta <i>S. adnata</i> (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta <i>S. adnata</i> al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) (n=5).....	70
Figura 19. Distribución del diclofenaco en la planta <i>S. adnata</i> (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta <i>S. adnata</i> al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) (n=5).....	72

Apéndice

Apéndice 1. Foto de la planta <i>Salvinia Adnata</i> . Familia: <i>Salvinaceae</i>	90
Apéndice 2. Foto de la planta <i>Azolla filiculoides</i>	91
Apéndice 3. Planta <i>Salvinia adnata</i> liofilizada.	91
Apéndice 4. Montaje experimental de los ensayos planta-fármaco.	91
Apéndice 5. Distribución del hidroxipiroxicam en la planta <i>S. adnata</i> (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta <i>S. adnata</i> al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) (n=5).	92
Apéndice 6. Corrientes iónicas extraídas de moléculas protonadas de piroxicam e hidroxipiroxicam obtenidas por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS. Análisis del extracto MSPD de hojas (<i>S. adnata</i> , día 10) (n=5).	93
Apéndice 7. Distribución del naproxeno-glucósido-malonato en la planta <i>S. adnata</i> (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta <i>S. adnata</i> al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) (n=5).	93
Apéndice 8. Distribución del naproxeno-glucósido en la planta <i>S. adnata</i> (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta <i>S. adnata</i> al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) (n=5).	94
Apéndice 9. Corrientes iónicas extraídas de moléculas protonadas de naproxeno-glucósido, naproxeno-glucósido-malonato y naproxeno obtenidas por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS. Análisis del extracto MSPD de hojas (<i>S. adnata</i> , día 10) (n=5).	94

Apéndice 10. Distribución del diclofenaco-glucósido en la planta <i>S. adnata</i> (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) (n=5).	95
Apéndice 11. Corrientes iónicas extraídas de moléculas protonadas de diclofenaco, diclofenaco-glucorónido-malonato y diclofenaco-glucósido obtenidas por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS. Análisis del extracto MSPD de hojas (<i>S. adnata</i> , día 10) (n=5).	95
Apéndice 12. Distribución del diclofenaco en la planta <i>Salvinia adnata</i> (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta al fármaco disuelto en agua durante 35 días.	96
Apéndice 13. Distribución del naproxeno en la planta <i>Salvinia adnata</i> (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta al fármaco disuelto en agua durante 35 días.	96
Apéndice 14. Cambio de concentración del ibuprofeno (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) en el medio acuoso sin la presencia de la planta <i>Salvinia adnata</i> , extraído mediante la técnica SPE y analizado por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS.	97

Resumen

Título: Implementación de la técnica dispersión de la matriz en fase sólida para el monitoreo de fármacos anti-inflamatorios y sus metabolitos en plantas acuáticas.*

Autor: Óscar Eduardo Osorio Lizarazo. **

Palabras clave: Contaminantes emergentes, *Azolla filiculoides*, *Salvinia adnata*, anti-inflamatorios no esteroideos, dispersión de la matriz en fase sólida.

Descripción: Los contaminantes emergentes son sustancias químicas emitidas al medio ambiente debido a la actividad humana. Estos compuestos provocan preocupación especial, debido a los efectos adversos que pueden tener en el ecosistema acuático. A nivel mundial, se ha estimado un consumo anual de productos farmacéuticos cercano a los 10^9 kg, de los cuales, los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se han determinado en agua superficial, subterránea e incluso potable en todo el mundo. El presente trabajo implementa la técnica de extracción por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) para el análisis y monitoreo de compuestos AINE y sus posibles metabolitos en plantas acuáticas

Se determinó la eficiencia de extracción para los compuestos piroxicam, naproxeno, ibuprofeno y diclofenaco, que se cuantificaron por HPLC/DAD. gel de sílice modificada con C_{18} (relación 1:10; muestra: dispersante) y una solución de ácido fórmico al 3% (v/v) en acetato de etilo:metanol (60:40 v/v), permitieron obtener eficiencias de extracción de 77-105%, según cada compuesto, determinados en hojas y raíces de *A. filiculoides* y *S. adnata*. Se realizó un estudio con la planta *S. adnata* que se expuso a una concentración de AINE ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) durante un total de 25 días. Los extractos se obtuvieron por MSPD y se analizaron por UHPLC-ESI⁺-orbitrap-MS. Este estudio aporta información útil para el monitoreo ambiental de la interacción de los AINE y su interacción con las plantas acuáticas.

*Trabajo de grado.

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko. Química, Ph.D. Codirector: Andrés Fernando González Suárez. Químico, M.Sc.

Abstract

Title: Implementation of the solid phase matrix dispersion technique for the monitoring of anti-inflammatory drugs and their metabolites in aquatic plants.*

Name: Óscar Eduardo Osorio Lizarazo.**

Key Words: Emerging contaminants, *Azolla filiculoides*, *Salvinia adnata*, non-steroidal anti-inflammatory drugs, solid phase matrix dispersion.

Description: Emerging pollutants are chemicals released into the environment due to human activity. These compounds are of particular concern due to the adverse effects they may have on the aquatic ecosystem. Worldwide, an annual consumption of pharmaceuticals has been estimated at close to 109 kg, of which nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been determined in surface, groundwater, and even drinking water throughout the world. The present work implements the solid phase matrix dispersion (MSPD) extraction technique for the analysis and monitoring of NSAID compounds and their possible metabolites in aquatic plants.

The extraction efficiency was determined for the compounds piroxicam, naproxen, ibuprofen and diclofenac, which were quantified by HPLC/DAD. modified silica gel with C18 (ratio 1:10; sample: dispersant) and a solution of formic acid at 3% (v/v) in ethyl acetate:methanol (60:40 v/v), allowed obtaining extraction efficiencies 77-105%, depending on each compound, determined in leaves and roots of *A. filiculoides* and *S. adnata*. A study was carried out with the *S. adnata* plant that was exposed to a concentration of NSAIDs ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) for a total of 25 days. Extracts were obtained by MSPD and analyzed by UHPLC-ESI+-orbitrap-MS. This study provides useful information for environmental monitoring of the interaction of NSAIDs and their interaction with aquatic plants.

* Degree Work.

** Science Faculty. School of Chemistry. Director: Elena E. Stashenko. Química, Ph.D. Codirector: Andrés Fernando González Suárez. Químico, M.Sc.

Introducción

El agua es uno de los recursos naturales no renovables más importantes para el ser humano, y es la base de la vida de ecosistemas terrestres y acuáticos. Para el beneficio de la sociedad, el agua ha sido utilizada para diferentes propósitos: alimentación, industria, regadío, transporte y eliminación de desechos. Uno de los principales problemas que enfrenta la humanidad en el siglo XXI está relacionado con la cantidad y la calidad del agua (Jackson, 2001). El problema más directo y severo es la falta de saneamiento mejorado y la ausencia de agua potable segura. Las amenazas adicionales incluyen, por ejemplo, la exposición a patógenos o sustancias químicas tóxicas a través de la cadena alimentaria (el riego de plantas con agua contaminada y la bioacumulación de sustancias químicas tóxicas por parte de organismos acuáticos, incluidos los mariscos y peces) o durante la recreación (nadar en aguas superficiales contaminadas) (Gavrilescu, 2015).

Una gran cantidad de contaminantes pueden encontrarse en el agua debido a la actividad humana: hidrocarburos, metales pesados, material suspendido, fertilizantes y los contaminantes emergentes (CE). Los CE son compuestos orgánicos persistentes en el agua, que, en su mayoría, no están aún regulados o están en proceso de regulación, pero algunos poseen propiedades conducentes a la alteración endocrina en el cuerpo humano (Vidal-Dorsch, 2012). La mayoría de estas sustancias orgánicas llegan a las aguas residuales por ausencia de tratamientos de residuos adecuados o disposición directa (sector residencial y hospitalario). En las aguas residuales, algunos compuestos se eliminan parcialmente por las plantas convencionales de tratamiento, pero muchos de ellos no son eliminados, van al medio ambiente en concentraciones bajas y se distribuyen en diferentes compartimentos ecológicos (Chen, 2021).

Por otra parte, la vida acuática tiene riesgos de efectos adversos, porque puede estar expuesta a una dosis continua de CE a través del medio en el que está. Los niveles típicos de estos contaminantes detectados son bajos (nanogramos a microgramos por litro), de los cuales los anti-inflamatorios no esteroideos como piroxicam, diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno, se han encontrado en aguas superficiales y subterráneas en diferentes partes del mundo (Chapman, 2007).

El monitoreo de estos fármacos en el ecosistema acuático, es muy importante para entender los efectos que pueden generar. En este trabajo, se planteó como objetivo principal la implementación de la técnica de extracción por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) para determinar fármacos anti-inflamatorios no esteroideos en plantas acuáticas, expuestas en sus medios a estas sustancias y la posible formación de productos derivados del metabolismo. Para esto, se efectuó el análisis de los AINE (piroxicam naproxeno, ibuprofeno y diclofenaco) por HPLC/DAD y UHPLC-ESI-Orbitrap-MS, se implementó el método de extracción por MSPD para el aislamiento de los AINE en plantas acuáticas. Se estudiaron las plantas *Azolla filiculoides* y *Salvinia adnata*, como matrices previamente enriquecidas con los AINE en concentraciones conocidas, para evaluar la eficiencia del método MSPD. Por último, se utilizó una de las plantas (*Salvinia adnata*) que se expuso a los fármacos AINE ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) para evaluar la aplicación de la técnica de extracción en muestras reales, que permitieron encontrar la presencia de los AINE y sus productos de biotransformación en la planta.

1. Estado del arte

La contaminación es la introducción por los humanos al medio sustancias que son dañinas o nocivas para las personas o el ambiente. El aumento de las actividades industriales y agrícolas ha resultado en la generación de varios tipos de contaminantes tóxicos, que son la principal causa de la contaminación del agua a escala mundial (Vidal-Dorsch, 2012). Los tipos de contaminantes en las aguas residuales dependen principalmente de la industria local. Sin embargo, algunos de los contaminantes comunes generalmente presentes en los efluentes son iones metálicos, colorantes, fenoles, plaguicidas, detergentes y otras moléculas orgánicas. Los contaminantes en las aguas residuales pueden ser tóxicos para la vida acuática y pueden hacer que las aguas naturales no sean aptas como fuentes de agua potable (Wang, 2004).

Las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) surgieron como medida para su descontaminación, de tal manera que el agua tratada fuese más limpia para regresar al medio ambiente. Los contaminantes orgánicos presentes en las aguas superficiales en bajas concentraciones, como los denominados contaminantes emergentes (CE), no se eliminan completamente por las PTAR, y su presencia eleva la preocupación, porque son compuestos persistentes, bioacumulables y potencialmente tóxicos para los ecosistemas acuáticos (Vallack, 2015).

1.1. Contaminantes Emergentes

Los CE son sustancias químicas de origen sintético emitidas al medio acuático por la actividad antropogénica; su remoción por las plantas de tratamiento de aguas no es eficiente. Los CE, comúnmente, no son regulados aún por entidades gubernamentales y existe la preocupación de que, a largo plazo, puedan tener efectos adversos en los ecosistemas y en la salud del ser humano. Los productos farmacéuticos o veterinarios, desinfectantes, plaguicidas, aditivos de

comida, nanomateriales, residuos industriales y sustancias para el cuidado personal, se denominan CE, y provienen de actividades como la agricultura, uso doméstico, manufactura y urbanización (Geissen, 2015).

1.2. Anti-inflamatorios No Esteroideos

Los anti-inflamatorios no esteroideos son un grupo químicamente de fármacos, analgésicos y antipiréticos, que aplacan los síntomas de la inflamación, el dolor y la fiebre. Las propiedades fisicoquímicas de los AINE más consumidos en Colombia se muestran en la **Tabla 1**. El término “no esteroideo” fue utilizado por primera vez en 1960, y sirvió para distanciar estos fármacos de los esteroides, que estaban, particularmente estigmatizados, debido a las asociaciones con el abuso de esteroides anabólicos (Buer, 2014).

Los AINE inhiben la actividad de las enzimas ciclooxigenasas (COX). En las células, estas enzimas participan en la síntesis de mediadores biológicos clave como las prostaglandinas, que participan en las respuestas inmunes y, los tromboxanos, que participan en la coagulación de la sangre (Day, 2004).

1.3. Productos Farmacéuticos como Contaminantes Emergentes

El consumo de productos farmacéuticos a nivel mundial es una cifra cada vez más creciente. Se utiliza un gran volumen de productos farmacéuticos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades en humanos y animales (hang, 2008). La mayoría de los productos farmacéuticos no se degradan por completo, después su aplicación. Los metabolitos y los principios activos se excretan y, posteriormente, ingresan al ecosistema. Otra de las formas de aparición de los productos farmacéuticos en ecosistemas está relacionada con descarga de desechos y drogas vencidas, hormonas, drogas inyectadas al ganado y residuos industriales. (Pal, 2010)

Los fármacos como diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno y piroxicam, se encuentran entre los más consumidos y automedicados, se ha reportado su presencia en aguas residuales en concentraciones entre 0.06 y 151 $\mu\text{g L}^{-1}$ en diferentes partes del mundo (Gómez, 2006). El diclofenaco ocupa el primer lugar en las historias clínicas emitidas en Colombia, con 21% de consumo, seguido del ibuprofeno (16%) y del piroxicam (13%), entre otros (Solano, 2013)(Madikizela, 2018). El ibuprofeno es el tercer medicamento de venta libre más popular, altamente recetado y más vendido en el mundo, es uno de los medicamentos incluidos en la lista de medicamentos esenciales elaborada por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La toxicidad y concentración de los AINE en plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) y cuerpos de agua aumentan día a día por el incremento de la tasa de consumo de medicamentos debido a la presión demográfica. Esto podría tener un impacto peligroso al medio ambiente debido a la naturaleza bioactiva de los AINE (Marchlewicz, 2015). Su persistencia en los cuerpos de agua se da porque no se pueden eliminar, de manera efectiva, a los AINE, usando los métodos convencionales para tratamiento de agua residual. Diversos estudios en Colombia (Botero-Coy, 2018)(Bedoya-Ríos, 2018), han encontrado los fármacos AINE en aguas residuales de ciudades como Bogotá y Medellín. El diclofenaco y el naproxeno se hallaron en concentraciones entre el 0.06 y 0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Aunque los AINE han sido diseñados para que tengan baja toxicidad, su liberación continua de productos farmacéuticos en el medio acuático, resulta en una exposición crónica, y esto combinado con una tendencia, para algunos, a bioacumularse, significa que existe una mayor probabilidad de efectos biológicos adversos.

En Pakistán, el diclofenaco ha sido asociado con la disminución de la población de buitres, debido al descubrimiento de residuos del fármaco en los riñones de las aves, que genera fallas renales y posterior muerte de las aves (Oaks, 2004). En la trucha arco iris, se han demostrado en

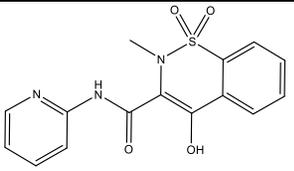
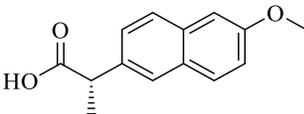
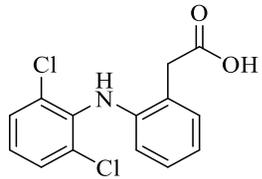
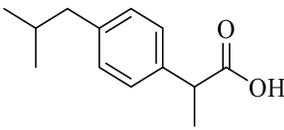
el riñón efectos nocivos del diclofenaco, incluida la inducción de necrosis de las células endoteliales a concentraciones de exposición entre 1 y 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Schwaiger, 2004). La exposición a los AINE también se ha relacionado con anomalías cerebrales y frecuencia cardíaca reducida (David, 2009), disminución del glucógeno en el hígado, teratogenicidad en embriones de pez cebra, alteración de la respuesta al choque térmico en truchas arco iris (Gravel, 2009) e inhibición de la actividad de la enzima CYP2M en carpas (Thibaut, 2006). En plantas acuáticas, se ha investigado la aparición de toxicidad expresada como daño al aparato fotosintético, en el helecho acuático *Azolla filiculoides* y en *Xanthoria parietina*, después de tratamientos con diclofenaco en concentraciones de 0.1 mg L^{-1} a 100 mg L^{-1} . Los daños considerables, se obtuvieron en la concentración más alta (100 mg L^{-1}), acompañados de una reducción del 58% de la cantidad de clorofila en *A. filiculoides* y de un 32% en *X. parietina* (Vannini, 2018).

1.4. Plantas Acuáticas

Las plantas acuáticas se han adaptado a la vida en ambientes marinos o de agua dulce, que ocupan un conjunto de hábitats en aguas subterráneas o superficiales. Las plantas acuáticas solo pueden crecer en el agua o en suelo saturado de agua. Una de las funciones importantes que realizan las plantas acuáticas es la absorción de nutrientes disueltos (N y P) del agua, por ello, se usan ampliamente en humedales construidos en todo el mundo para eliminar el exceso de N y P en aguas contaminadas (Vymazal, 2013).

Tabla 1.

Propiedades fisicoquímicas de los AINE de mayor consumo en Colombia.

Nombre común	Nombre IUPAC	Estructura	Solubilidad en agua, mg L ⁻¹	Peso molecular, g mol ⁻¹	pKa*
Piroxicam	4-Hidroxi-2-metil-1,1-dioxo-N-piridin-2-il-1λ6,2-benzotiazin-3-carboxamida		23	331.34	3.2
Naproxeno	Ácido-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoico		44	230.26	4.15
Diclofenaco	Ácido {2-[(2,6 diclorofenil) amino]fenil}acético		2.4	296.15	4.15
Ibuprofeno	Ácido 2-[4-(2-metilpropil) fenil]propanoico		58	206.28	5.20

Nota: Elaboración propia. ***pKa:** El grado de ionización (pKa) de una sustancia se define como $pK_a = -\log K_a$; siendo K_a = constante de disociación ácida.

1.4.1. *Salvinia Adnata*

Es una especie de helecho acuático flotante que crece en la superficie de las vías fluviales. *Salvinia adnata* (familia Salvinaceae) es originaria de América del Sur y el Caribe; se introdujo en los Estados Unidos en las décadas de 1920 y 1930. Está clasificada internacionalmente como una especie invasora y puede ser perjudicial para los hábitats nativos (Parys, 2013).

Las hojas de *Salvinia adnata* son pequeñas y ovales, cada rizoma del helecho flota cerca de la superficie y tiene un conjunto de hojas unidas que se ramifican horizontalmente, con pelos cubiertos con cristales de cera nanoscópicos (Miranda, 2016). Se ha evaluado su capacidad bioacumuladora de metales como cadmio, níquel, plomo, arsénico, cromo y zinc (Ponce, 2019) (Iha, 2015).

1.5. Interacción de Plantas con Compuestos Xenobióticos

Un xenobiótico es un compuesto que es extraño al organismo (del griego *xenos*, significa extraño). Las principales clases de xenobióticos de importancia médica son fármacos, carcinógenos químicos y diversos compuestos que han entrado al ambiente mediante una vía u otra, como los bifenilos policlorados (PCB) y plaguicidas (Murray RK, 2010).

En los animales, el metabolismo de los compuestos xenobióticos se lleva a cabo en el hígado, donde ellos normalmente se convierten a sustancias más hidrosolubles que, luego, se excretan en la orina. El metabolismo de los compuestos xenobióticos en plantas se puede dividir en tres fases. Según Sandermann, las enzimas de la fase I oxidan, reducen o hidrolizan el sustrato, introduciendo un grupo reactivo que puede servir como un paso para la conjugación posterior con glutatión o glucuronato, catalizados por enzimas de fase II. En la fase III, las reacciones de transformación (fase I) y conjugación (fase II) se acoplan a los procesos internos de compartimentación y almacenamiento (fase III). Los sitios de almacenamiento celular son la

vacuola (para conjugados hidrosolubles) y la pared celular (para conjugados liposolubles) (Jones, 2001) (Sandermann, 1977).

Bartha y colaboradores, usando la técnica LC/MS determinaron la presencia de productos de transformación del diclofenaco en las plantas de *Typha latifolia*, que interactuaron con el fármaco durante siete días. Los autores encontraron 4-hidroxiciclofenaco como principal producto de biotransformación de la fase I (oxidación). En la fase II (conjugación), identificaron al 4-*O*-glucopiranosil oxi-diclofenaco y 4-OH-glutationil diclofenaco. Emhofer y colaboradores detectaron diversos metabolitos en hojas y raíces de la planta acuática *Lepidium sativum* expuesta a los cuatro AINE, en el medio de cultivo, entre ellos figuraban el diclofenaco y el naproxeno. Entre metabolitos del diclofenaco se hallaron diclofenaco hidroxilado, 4-hidroxiciclofenaco glucósido y diclofenaco-glucorónido-malonato; los del naproxeno fueron naproxeno glucósido, naproxeno-glucósido-malonato y naproxeno glucorónido. Los compuestos sin metabolizar encontraron en mayor proporción en las raíces. Los productos conjugados de los AINE metabolizados por la planta, se encontraban principalmente en las hojas, debido a que los metabolitos son moléculas más polares y tienen mayor movilidad en la planta.

1.6. Métodos Analíticos para la Determinación de AINE y sus Metabolitos en Material Vegetal

La elección del método de extracción y de análisis instrumental que permita detectar, identificar y cuantificar los analitos de interés, es un paso fundamental para obtener resultados confiables. Las técnicas más usadas para la extracción de AINE en material vegetal, son extracción en fase sólida (SPE), QuEChERS (por sus siglas en inglés, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) (Loos, 2017), extracción sólido-líquido (ESL) y extracción asistida por ultrasonido (ULE) (Loos, 2017).

Una técnica fundamental para el análisis ambiental ha sido la cromatografía de gases, que ha permitido detectar compuestos orgánicos considerados contaminantes en diversas matrices. Sin embargo, las técnicas convencionales de GC se han restringido principalmente a compuestos termoestables y de alta volatilidad, lo que implica, convertir o derivatizar químicamente compuestos no volátiles o termoinestables a formas más volátiles o estables. El desarrollo de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS), en las últimas décadas, ha permitido el análisis de compuestos más polares y termolábiles sin necesidad de su derivatización. En la **Tabla 2** se muestran las principales técnicas de extracción y de análisis instrumental utilizadas para el estudio y monitoreo de fármacos AINE en material vegetal (Kivilompolo, 2007).

1.7. Dispersión de la Matriz en Fase Sólida

La dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) es una técnica de preparación de muestra, para la extracción de compuestos orgánicos de matrices sólidas o semisólidas. MSPD se basa en la disrupción de la estructura de la matriz con ayuda de agentes dispersantes y un mortero para su homogeneización. El material dispersado es transferido a un cartucho y los analitos se eluyen con un solvente apropiado (Barker, 2000).

Los siguientes factores afectan la MSPD: la naturaleza del soporte sólido, relación de soporte sólido y muestra, la naturaleza del solvente de elución y cantidad de solvente de elución. El soporte sólido actúa como dispersante de la muestra y, eventualmente, ayuda en la retención de impurezas no deseadas en el extracto final.

Tabla 2.

Principales técnicas de extracción y de análisis instrumental utilizadas para el monitoreo de fármacos AINE en material vegetal.

Fármaco	Material vegetal	Extracción/limpieza	Análisis instrumental	Observaciones
Ibuprofeno y naproxeno	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Extracción con MeOH y ACN, SPE: <i>Oasis HLB</i>	HPLC-QqQ/MS ²	Caracterización de los fármacos mediante marcaje con ¹⁴ C.
Ibuprofeno	<i>Typha angustifolia</i>	Material vegetal triturado con arena de mar y extraído con MeOH	HPLC-QqQ/MS ²	Fitoextracción de ibuprofeno en un humedal artificial.
Diclofenaco	<i>Typha latifolia</i>	Material vegetal macerado con nitrógeno líquido; extracción con HCl 0.1 M /ACN (1:1) SPE: <i>Strata-X</i>	HPLC-Orbitrap/MS	Investigación de la actividad de la glutatión-transferasa en función de la concentración del fármaco.
Ibuprofeno	<i>Phragmites australis</i>	Material vegetal macerado con nitrógeno líquido; extracción con HCl 0.1 M /ACN (1:1) SPE: Oasis HLB	HPLC-Orbitrap/MS	Estudio cinético sobre absorción y metabolización en diferentes partes de la planta.
Diclofenaco, naproxeno, ketoprofeno y ácido mefenámico	<i>Lepidum sativum</i>	Extracción <i>Ultra-Turrax</i> con HCl 0.1 M /ACN (1:1) SPE: <i>Strata-X</i>	HPLC-QqQ/MS ²	Estudio cinético sobre absorción y metabolización en diferentes partes de la planta.
Diclofenaco	<i>Hordeum vulgare</i>	Material vegetal macerado con nitrógeno líquido; extracción con HCl 0.1 M /ACN (1:1) SPE: <i>Strata-X</i>	HPLC-IT/MS	Estudio sobre absorción y metabolización en diferentes partes de la planta.

Nota: Elaboración propia. MeOH: metanol. ACN: acetonitrilo. SPE: *Solid-Phase Extraction*.

Comercialmente, se pueden encontrar soportes sólidos de naturaleza diferente, desde polares (*e.g.* gel de sílice y Florisil®) hasta polaridades más bajas (*e.g.* gel de sílice modificada con C₁₈). La elección del soporte sólido para utilizar depende si afecta o no la extracción de los analitos de interés (Barker, 2007). La polaridad del solvente de elución ayuda a extraer los compuestos afines, su elección y la cantidad adecuada, favorece una extracción más selectiva de los compuestos de interés (Barker, 1992).

1.8. Cromatografía Líquida Acoplada a Detectores de Arreglo de Diodos y Espectrometría de Masas

La cromatografía es una técnica que se utiliza para separar componentes que están en una mezcla, mediante un proceso de repartición de analitos entre dos fases, una móvil y otra estacionaria (Lanças, 2009). En cromatografía líquida, cuya fase móvil es un líquido, cada componente de la muestra inyectada, interactúa de manera distinta con la fase estacionaria, causando diferentes velocidades de migración del analito y la separación de los componentes. La fase móvil puede ser mezcla de distintos solventes (*e.g.*, agua, metanol o acetonitrilo) con composición constante (elución isocrática) o variable (modo de gradiente). La mezcla inyectada al cromatógrafo se separa en la columna. Cada sustancia, que eluye, produce una señal en el detector, cuya intensidad se amplifica y se registra en función del tiempo (Skoog, 1980).

Uno de los detectores más utilizados para la detección de analitos en cromatografía líquida es el detector de arreglo de diodos (DAD), que mide la absorbancia del analito y registra su intensidad dependiendo de la concentración de analito presente en la muestra, en un rango de longitudes de onda entre 200 nm y 700 nm. Además, cuenta con un rango lineal y la sensibilidad que permiten el análisis de compuestos en amplio rango de concentraciones (ARDREY, 2003).

La interfaz más usada para LC/MS es la ionización por electronebulización (ESI, por sus siglas en inglés). ESI es una técnica de ionización suave, especialmente adecuada para muestras biológicas como proteínas, complejos de interacción no covalentes, péptidos, fármacos y segmentos de ADN. En la interfaz se mezcla el flujo de la columna con un gas (*e.g.*, nitrógeno), y, a través de la diferencia de potencial, entre el capilar ESI y el tubo de transferencia de iones, se forman los iones y se transfieren al detector de masas. Cuando las fuerzas repulsivas coulómbicas crecientes en las gotas de solvente exceden su tensión superficial, sucede la fisión de las gotas. El solvente se va eliminando mediante un flujo de gas de secado que va en contra corriente, de tal manera, que solo las especies cargadas del analito, libres de moléculas de fase móvil (solvente) entren al detector (Müller, 2006).

1.9. Ciencimetría

La ciencimetría permite analizar, comparar y medir la actividad científica en todo el mundo. El análisis ciencimétrico examina la ciencia como disciplina o actividad económica y permite formular y evaluar el desarrollo de las políticas de países y organizaciones (Vanti, 2000).

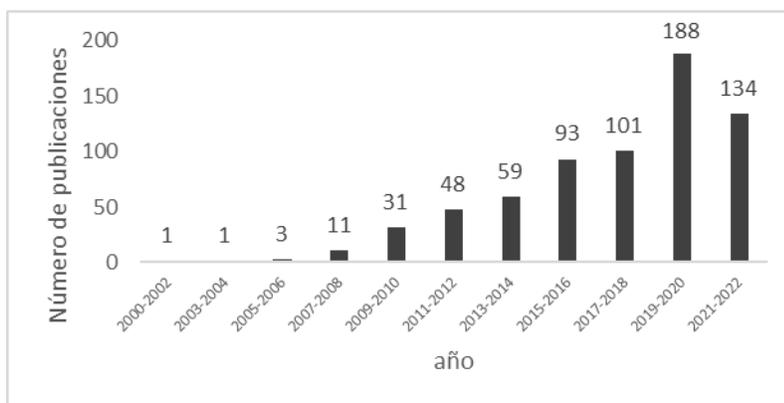
Los contaminantes emergentes se han convertido en un tema de investigación creciente, a causa de la diversa cantidad de CE, y el reto para detectarlos oportunamente en el ecosistema acuático, en el aire y en el suelo.

La revisión del número de publicaciones sobre el tema en estudio, fue realizada usando la base de datos *Scopus (Elsevier)*. La búsqueda se dividió en diferentes temas: (1) productos farmacéuticos como contaminantes emergentes; (2) MSPD como técnica de extracción de productos farmacéuticos y (3) productos farmacéuticos como contaminantes emergentes en plantas acuáticas.

En la **Figura 1**, se puede observar un número creciente de publicaciones a lo largo de los últimos 19 años (no se encontraron publicaciones, con esta ecuación de búsqueda, en años anteriores). Los temas de investigación más concurridos son ciencia del medio ambiente (36.6%), química (16%) y bioquímica (7.1%) de un total de 670 publicaciones encontradas, con una cantidad de artículos de 484, entre el año 2000 y 2022. La mayor cantidad de publicaciones se realizaron en revistas especializadas como *Science of the Total Environment*, *Chemosphere*, *Environmental Science and Pollution Research*, *Journal of Chromatography*, entre otras. Estos estudios se enfocan principalmente en la determinación y cuantificación de productos farmacéuticos en fuentes hídricas.

Figura 1.

Número de publicaciones por año.



Nota: Elaboración propia. Fecha de consulta: 12 de marzo de 2022. Fuente: *Scopus* (Elsevier).

Periodo de observación: 2000-2022. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY ("Emerging pollutants" AND "Pharmaceuticals").

España es uno de los países con mayor número de publicaciones (162) seguido de China (75), los cuales son países con problemas ambientales en muchos de sus ríos debido a la cantidad de desechos industriales que producen diariamente (Calvo-Flores, 2018).

La segunda ecuación, “*Matrix solid phase dispersion*” y “*Pharmaceuticals*”, obtuvo un total de 40 publicaciones (periodo 2009 al 2021, no se encontraron publicaciones, con esta ecuación de búsqueda, en años anteriores a éste periodo) que hayan descrito condiciones experimentales para extraer productos farmacéuticos de diferentes matrices como algas marinas, lodos, matrices vegetales, concha de mejillón dorado y peces, que fueron utilizadas como guía para implementar el método analítico de interés en esta investigación.

Los autores más destacados fueron Alberio y colaboradores y Aznar y colaboradores, que usan MSPD para hacer la extracción de una diversa gama de contaminantes, entre los cuales, se encuentran fármacos antiinflamatorios como ibuprofeno y diclofenacos. Los autores lograron obtener eficiencias de extracción de estos fármacos del 50 y 90% respectivamente. Los autores describen el uso de la técnica MSPD como una forma de extracción rápida para el análisis de compuestos en matrices sólidas y semi-sólidas. Las publicaciones encontradas no registran la extracción simultánea de piroxicam, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno en vegetales.

La búsqueda de productos farmacéuticos en las plantas acuáticas de interés, se realizó con dos ecuaciones “*Pharmaceuticals*” AND “*azolla*” y “*Pharmaceuticals*” AND “*Salvinia*”; entre los artículos encontrados, resalta un estudio hecho por Vannini y colaboradores, quienes hallaron la de toxicidad desde una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ expresada como daño al aparato fotosintético en el helecho acuático *Azolla filiculoides* y en *Xanthoria parietina*.

2. Desarrollo Experimental

2.1. Reactivos y Solventes

En la presente investigación se usaron ácido clorhídrico 37% *Merck* (Darmstadt, Alemania), formiato de amonio *Sigma Aldrich* (Bunchs, Suiza), fosfato monopotásico *Sigma Aldrich* (Bunchs, Suiza), ácido fórmico 99% (Darmstadt, Alemania), metanol grado HPLC y LC-MS *Merck* (Darmstadt, Alemania), acetonitrilo HPLC *Sigma Aldrich* (Bunchs, Suiza), acetato de etilo HPLC *Merck* (Darmstadt, Alemania), isopropanol grado HPLC *Merck* (Darmstadt, Alemania), agua tipo I obtenida en equipo purificador *Synergy UV*, de *Merck Millipore* (Darmstadt, Alemania), gel de sílice modificada con C₁₈ *Sigma Aldrich* (Bunchs, Suiza), los estándares de referencia piroxicam (99.2%), naproxeno (99.6%), diclofenaco (99.2%) e ibuprofeno (98,9%) todos de la empresa *Dr. Ehrenstorfer* (Augsburgo, Alemania), nitrógeno grado industrial (*Messer*, Colombia).

2.2. Material y Equipos del Laboratorio

Se emplearon los siguientes materiales de laboratorio: balanza *Mettler-Toledo PB1502-S* (Nänicon, Suiza), baño de ultrasonido *Elmasonic E30H* (Elma, Alemania), *shaker* *IKA* (Hofheim, Alemania), Liofilizador *Virtis advance plus* (*SP Scientific*, New York, EE. UU.), tubos cónicos de polipropileno de 1.5 mL de *Brand* (Wertheim, Alemania), balones aforados de 1, 2, 10, 25, 1000 mL (Wertheim, Alemania), morteros de cerámica, filtros de membrana de PVDF de 0.22 µL, viales cromatográficos 2 mL de *Agilent Technologies* (Santa Clara, CA, EE. UU.), micropipetas de 2-20, 20-200, 100-1000 µL; de *Brand* (Wertheim, Alemania), jeringas plásticas de 10 mL y algodón.

2.3. Material Vegetal

La planta *Salvinia adnata*, fue adquirida en el mercado local. La planta fue propagadas en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), localizado en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga-Colombia). Las plantas fueron identificadas debidamente por el herbario de la Universidad Industrial de Santander, sede principal en Bucaramanga. (**Tabla 3**).

Tabla 3.

Identificación y número de voucher de la planta Salvinia adnata.

Especie	Numero de voucher
<i>Salvinia adnata</i>	20888

Nota: Elaboración propia.

La propagación de la planta se realizó en pozos acuáticos del complejo CENIVAM, con una solución de nutrientes, que asemeja las condiciones normales para el crecimiento de la planta. Los compuestos de esta solución son óxido de manganeso (MnO_2 , $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$), sulfato de zinc (ZnSO_4 , $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$), sulfato de cobre (CuSO_4 , $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$) óxido de molibdeno (MoO_3), fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 , 0.02% p/v), nitrato de potasio (KNO_3 , 0.06% p/v), nitrato de calcio (CaNO_3 , 0.09% p/v), sulfato de magnesio (MgSO_4 , 0.04% p/v) y ácido bórico (H_3BO_3 , $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Arnon, 1952).

2.4. Análisis por HPLC/DAD de Compuestos AINE

El análisis cromatográfico preliminar se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC 1260 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), véase **Figura 2**, equipado con una bomba cuaternaria de gradiente (G1312A), un inyector automático de muestras

(G1367B), una unidad de desgasificación de disolvente al vacío (G1379B) y un termostato para la columna (G1316A). La separación se llevó a cabo en una columna *Gemini C₁₈* 100 × 4,6 mm d.i., 5 μm de tamaño de partícula. El procesamiento de los datos se realizó a través del sistema de datos *Agilent ChemStation LC*, Version B.04.01,.

Figura 2.

Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Agilent Technologies 1260 series.



Nota: Elaboración propia. Lugar: CENIVAM (UIS). Fecha: 3 de mayo de 2022.

2.5. Determinación de Parámetros de Eficiencia de la Separación Cromatográfica

Para el análisis de compuestos AINE, por HPLC, se calcularon los siguientes parámetros de eficiencia: factor de retención (k'), factor de selectividad (α), número de platos teóricos (N) y resolución (R_s) (**Ecuaciones 1-4**).

$$k' = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{0,5B}} \right)^2 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\alpha = \frac{(t_{RB} - t_M)}{(t_{R\alpha} - t_M)} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$R_s = \frac{1.18 (t_{RB} - t_{RA})}{(W_{0,5A} - W_{0,5B})} \quad \text{Ecuación 4}$$

t_R = tiempo de retención del compuesto de interés (min).

t_M = tiempo muerto (min).

$W_{0,5}$ = ancho del pico a la mitad de su altura máxima (min).

*Los subíndices A y B indican dos picos cromatográficos adyacentes.

2.6. Determinación de las Figuras de Mérito para el Método de Análisis por HPLC/DAD

Las siguientes figuras de mérito se determinaron: precisión (expresada como repetibilidad de los tiempos de retención y áreas cromatográficas); límite de detección (NMD), límite de cuantificación (NMC), sensibilidad y linealidad. Para determinar estos parámetros, se prepararon varias curvas de calibración, la cuantificación se realizó por el método de estandarización externa.

Solución stock: se trabajó con una solución *stock* de AINE ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) en una mezcla de agua:metanol (1:1) v/v.

Curva de calibración: se midieron los volúmenes necesarios de la solución *stock* de AINE para preparar soluciones de 0.1, 0.25, 1, 2.5, 5, 7.5, y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ en un volumen de 1 mL.

La repetibilidad y la reproducibilidad se calcularon para los tiempos de retención y las áreas cromatográficas. Los coeficientes de variación para el tiempo de retención y las áreas de los picos permitieron evaluar la repetibilidad del método mediante la inyección (n=5) de un punto de

la curva de calibración. La reproducibilidad fue medida mediante los coeficientes de variación para el área y tiempos de retención de la inyección de un punto de la curva preparada por dos analistas diferentes.

La determinación de los niveles de detección y cuantificación se determinaron a partir de las curvas de calibración de los compuestos patrón AINE.

2.7. Implementación de la Técnica MSPD para la Extracción de AINE en Material

Vegetal

Los ensayos preliminares y la determinación de los porcentajes de recuperación de los AINE, se realizaron con material vegetal liofilizado (blanco negativo) de una planta colectada en el complejo CENIVAM (UIS) que; se enriqueció con los compuestos AINE en una concentración conocida (blanco positivo), se le adicionó los AINE (200 μL , 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), en ausencia de la luz natural, y se dejó en reposo durante de 6 horas para que el solvente (metanol) se evaporara y los fármacos se incorporaran a la planta, y posteriormente realizar la MSPD.

En la estandarización del método se usaron como dispersantes gel de sílice, gel de sílice modificada con grupos octadecilo, C_{18} y florisil[®]. El solvente de elución fue metanol y acetato de etilo con diferentes proporciones: 100:0, 60:40, 40:60 y 100:0 v/v, y acidulado con ácido fórmico al 3% v/v (Albero, 2017) (Aznar, 2017). Los volúmenes del solvente de elución fueron 8, 10 y 12 mL y, la relación de material de vegetal y soporte sólido también fue evaluada en las siguientes proporciones: 1:6, 1:8 y 1:10.

El proceso de MSPD se realizó en un mortero de porcelana que contenía el material vegetal liofilizado (50 mg) y el soporte sólido seleccionado, se adicionó *iso*-propanol (200 μL) y se maceró durante tres minutos. La mezcla se transfirió a una jeringa de polipropileno que contenía

un algodón como filtro en el fondo (ca. 70 mg). La elución se hizo con el solvente seleccionado y el extracto se llevó a sequedad con corriente de gas nitrógeno; el residuo se reconstituyó con una solución metanol:agua (1:1 v/v) (1 mL), que contenía difenilamina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) como estándar interno. Por último, se pasó por un filtro PVDF ($0,22 \mu\text{m}$) y se analizó por HPLC/DAD.

La exactitud, expresada como el porcentaje de recuperación, se determinó por quintuplicado, en dos niveles de concentración de los AINE. El material vegetal (*Salvinia adnata*) fue liofilizado, molido y homogeneizado, se tomó una porción (50 mg) y se colocó en un mortero, luego se adicionaron los AINE ($200 \mu\text{L}$, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, para el nivel alto, y, $200 \mu\text{L}$, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, para el nivel bajo), y se dejaron alrededor de 6 horas para que el solvente (metanol) se evaporara y los fármacos se incorporaran a la planta y posteriormente, se realizó la MSPD; el extracto final de los AINE fue de una concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (nivel alto) y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (nivel bajo). Por último, los extractos se analizaron por HPLC/DAD. La reproducibilidad del método de extracción fue evaluada mediante la extracción de los AINE en material vegetal enriquecido en el nivel alto ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), en días diferentes

La técnica de MSPD se comparó con la extracción con solvente asistida por sonicación. El material vegetal liofilizado (50 mg), se enriqueció con los AINE en el nivel alto ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y, se transfirió a un tubo falcón (15 mL) y se adicionó HCl, 0.1 M (0.5 mL) y metanol (4 mL). La muestra se agitó (5 min), se sonicó (10 min), luego, se centrifugó (4000 rpm, 15 min) y el sobrenadante se retiró. Este proceso se repitió dos veces más y el sobrenadante se llevó a sequedad con corriente de gas nitrógeno. Por último, el residuo se reconstituyó con una solución metanol:agua (1:1 v/v) (1 mL), que contenía difenilamina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) como estándar interno. Por último, se pasó por un filtro PVDF ($0,22 \mu\text{m}$) y se analizó por HPLC/DAD (Picó, 2018).

2.8. Interacción Planta-Fármacos

En esta etapa, se realizó un experimento preliminar, en donde la planta *Salvinia adnata* se expuso a un medio acuoso que contenía los fármacos AINE ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), durante 35 días, con el fin de determinar en que día ocurría la mayor absorción de los fármacos. Una vez determinado el día con mayor absorción de los fármacos (día 15), la planta *Salvinia adnata* se expuso en un medio acuático con los fármacos AINE ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), y se evaluó su absorción y la distribución (en hojas y raíces) durante 25 días. Cada cinco días, se realizaba un muestreo de la planta, que se lavaba con abundante agua destilada, y se almacenaba a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta el día de análisis. En el día 15, la planta se trasladó a un medio de cultivo sin fármacos AINE. Finalmente, las muestras almacenadas se liofilizaron, y los AINE con sus posibles productos biotransformados se extrajeron con MSPD implementada; y los extractos obtenidos se analizaron por UHPLC-ESI-Orbitrap-HRMS.

El montaje experimental, constó de envases de vidrio con agua del grifo (250 mL), que se cubrieron con una película de polietileno de color negro, para minimizar los efectos de fotodegradación de los compuestos. Cada ensayo de estudio de interacción agua-planta-fármaco se preparó por quintuplicado, y se incluyeron controles: agua y fármacos, con y sin protección de la radiación natural; el ensayo de interacción de agua (sin fármacos) con planta se usó como control negativo, durante los días 5, 15 y 25 (Pi, 2017) (Matamoros, 2012).

2.9. Análisis UHPLC-ESI-Orbitrap-HRMS

Para el análisis de los extractos se usó un cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia (UHPLC) *Dionex™ UltiMate™ 3000* (Thermo Scientific, Germering, Alemania) (Véase **Figura 3**), equipado con un desgasificador (SRD-3400), una bomba binaria de gradiente (HPG-3400RS), un inyector automático (WPS-3000TRS) y una unidad termostatada para la columna (TCC-

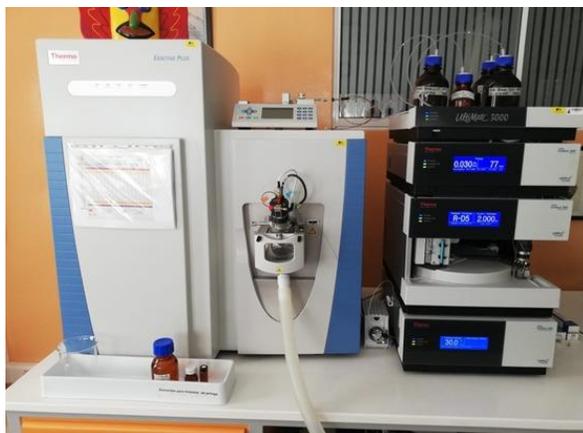
3000RS). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna en un termostato de temperatura controlada (30 °C) *ZORBAX Eclipse XDB-C18* (2.1 mm x 50 mm x 1.8 µm). La fase móvil A constó de una solución de NH_4HCO_2 5 mM y ácido fórmico 0.1% v/v en agua. La fase móvil B NH_4HCO_2 5 mM y ácido fórmico 0.1% v/v en metanol, con un volumen de inyección de 1 µL y un flujo de la fase móvil de 0.3 mL min⁻¹. El UHPLC se conectó a un espectrómetro de masas *Orbitrap Exactive Plus* (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania) con una fuente de ionización por electronebulización con calentamiento (HESI-II), a 350 °C, operada en modo de registro de iones positivos. El gas nitrógeno ($\text{N}_2 > 99\%$), usado como gas nebulizador, gas de cortina, gas auxiliar y gas de colisiones en la celda de disociación por colisiones activadas de alta energía (HCD), se obtuvo en el generador NM32LA (*Peak Scientific*, Escocia, Reino Unido).

La temperatura del capilar fue 320 °C y el voltaje del nebulizador V_{cap} se fijó en +3.5 kV. La resolución del Orbitrap-MS en el modo de adquisición *full scan* se estableció en 70000 (m/z 200 u). Los espectros MS se adquirieron en un intervalo de masas de m/z 80-1000 u. Las moléculas protonadas $[\text{M} + \text{H}]^+$ se fragmentaron en una celda de disociación por colisiones activadas de alta energía (HCD) con diferentes energías : 10, 20 o 30 eV; se usó el nitrógeno N_2 como gas de colisiones. La adquisición de datos se realizó en modos *full MS* y *StepScan*, para cada voltaje en la celda HCD.

El análisis de los datos se llevó a cabo en el *software Xcalibur™ Roadmap*, Versión 3.1.66.10. La identificación de los compuestos presentes en la corriente iónica total se realizó con base en : i) composición elemental ; ii) distribución isotópica ; iii) patrón de fragmentación y iv) usando algunas sustancias de referencia de los fármacos o sus metabolitos bajo estudio.

Figura 3.

Cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia DionexUltiMate® 3000 (Thermo Fischer scientific, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Espectrómetro de masas Orbitrap Exactive Plus (Thermo Scientific, Bremen, Alemania).



Nota: Elaboración propia. Lugar: CENIVAM (UIS). 15 de diciembre de 2021.

2.10. Detección, Identificación y Cuantificación de los AINE y sus Metabolitos en el Material Vegetal

Los AINE y sus metabolitos fueron extraídos de las raíces y las hojas de la planta (*Salvinia Adnata*) por MSPD. Los AINEs fueron identificados usando UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS ; su presencia se determinó mediante la búsqueda de las masas exactas de las especies [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [M+K]⁺, [M+NH₄]⁺ en las corrientes iónicas extraídas, los espectros de masas obtenidos, a diferentes energías en la cámara de colisiones de alta energía (HCD, *High-Energy Collisional Dissociation*), por comparación de los tiempos de retención con los del material de referencia certificado y usando la relación isotópica de las especies cargadas. Los metabolitos y productos de transformación, fueron identificados tentativamente mediante la composición

elemental, distribución isotópica, patrones de fragmentación y algunos iones productos detectados.

3. Análisis de Resultados

3.1. Metodología de Análisis de Compuestos AINE por HPLC/DAD.

Según lo reportado en literatura (Cunha, 2015) (Atto, 2012) (Song, 2012) (Davarani, 2012) (Koves, 1992) (Blagbrough, 1992), la fase móvil empleada para el análisis de compuestos AINE, generalmente está compuesta por sistema binario de solventes: la fase acuosa (solvente A), por soluciones *buffer* de fosfato o medios ácidos (*e.g.*, ácido *o*-fosfórico) y de fase orgánica (solvente B), típicamente por metanol o acetonitrilo.

Los parámetros operacionales del equipo HPLC/DAD siguieron los recomendados por Ascar, L y colaboradores y se aplicaron algunas algunas modificaciones, como se describe en la **Tabla 4.**

Tabla 4.

Parámetros cromatográficos usados para el análisis por HPLC de compuestos AINE.

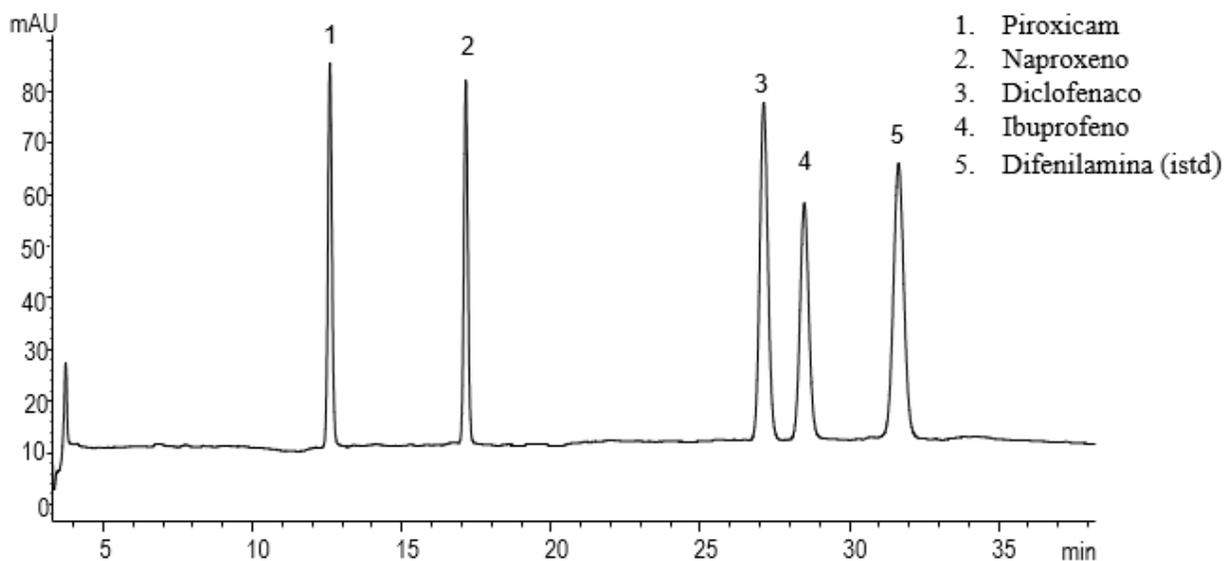
Parámetro	Especificaciones		
Fase móvil	A: KH ₂ PO ₄ 5 mM en agua, pH=4.0 B: Acetonitrilo		
Gradiente de elución	Tiempo, min	A, %	B, %
	0	70	30
	13	55	45
	30	55	45
	35	70	30
	40	70	30
Flujo	1 mL min ⁻¹ .		
Longitud de onda, λ	205 nm		
Longitud de onda de referencia, nm	360 nm		
Volumen de inyección	20 μL		
Columna	<i>Gemini C₁₈</i> (250 mm x 4.6 mm x 5μm)		

Nota: Elaboración propia.

En la **Figura 4**, se muestra el perfil cromatográfico de la mezcla de sustancias de referencia de piroxicam, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco y difenilamina (istd), analizados según los parámetros descritos en la **Tabla 4**.

Figura 4.

Perfil cromatográfico obtenido por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD) 1260 Series AT, de las sustancias de referencia certificadas de fármacos AINE (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y el estándar interno (difenilamina).



Nota: Elaboración propia.

3.2. Parámetros de Eficiencia de la Separación de Compuestos AINE por HPLC/DAD

Se determinaron parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica: resolución, número de platos teóricos, factores de selectividad, retención y simetría (Gupta, 2012) **Tabla 5** de los cuatro compuestos AINE y la difenilamina (istd).

Tabla 5.

Parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica de fármacos AINE por HPLC.

N° de pico (figura 4)	Compuesto	Resolución, R_s	Factor de retención, k'	Factor de selectividad, α	Números de platos teóricos, N	Factor de simetría
1	Piroxicam	-	4,08	-	30378	0,91
2	Naproxeno	17,33 $R_{s\ 2-1}$	5,88	1,44 α_{2-1}	51364	0,88
3	Diclofenaco	28,27 $R_{s\ 3-2}$	10,02	1,70 α_{3-2}	65726	0,85
4	Ibuprofeno	1,76 $R_{s\ 4-3}$	10,34	1,19 α_{4-3}	66664	0,97
5	Difenilamina	4,26 $R_{s\ 5-4}$	11,42	1,20 α_{5-4}	85542	0,97

Nota: Elaboración propia.

Los compuestos AINE se lograron separar con una resolución cromatográfica mayor que 1.5, lo que permitió obtener una adecuada separación de los componentes sobre la línea base. Un valor de resolución cromatográfica $R_s > 1.5$ requiere más de 2000 platos teóricos y el número de platos teóricos del método estuvo fue mayor de 3000 (Snyder, 2012). El factor de retención es una medida del tiempo que un compuesto permanece en la fase estacionaria, en relación con el tiempo que permanece en la fase móvil, un aumento de k' se ve reflejado en un tiempo de análisis más largo.

El factor de selectividad es un parámetro cromatográfico que indica que los picos cromatográficos se se pueden separar, si α es igual a 1, los picos cromatográficos coeluyen; para todos las sustancias de referencia el valor de α fue mayor que 1. Por último, el factor de simetría

de los analitos fue cercano a uno (0.85 - 0.97), esto indica que los picos cromatográficos tienen el fenómeno de *tailing* o *fronting* poco pronunciados: la forma de los picos se acerca a su forma gaussiana ideal (Snyder, 2012).

3.3. Figuras de Mérito Obtenidas para el Método HPLC/DAD Empleado

La repetibilidad de tiempos de retención (t_R) y áreas cromatográficas del método de análisis HPLC se evaluaron mediante la inyección por triplicado en dos niveles de concentración, de los AINE bajo estudio (1 y 7.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), los resultados obtenidos se muestran en las **Tablas 6 y 7**.

Tabla 6.

Repetibilidad de los tiempos de retención de los compuestos (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), analizados por HPLC-DAD (nivel de concentración bajo).

Compuesto	Tiempo de retención, min (n=3)			Áreas cromatográficas, cuentas (n=3)		
	\bar{x}	s	CV, %	\bar{x}	s	CV, %
Piroxicam	12.73	0.01	0.07	700	17	2
Naproxeno	17.20	0.06	0.4	690	20	3
Diclofenaco	27.8	0.2	0.5	1260	28	2
Ibuprofeno	28.57	0.08	0.3	910	27	3

Nota: Elaboración propia.

Los coeficientes de variación (CV) de la medición de los tiempos de retención estuvieron entre 0.07 y 0.5%, mientras que para las áreas cromatográficas entre 0.7% y 3%. El CV no superó los valores recomendados por buenas prácticas de laboratorio (2% para t_R , y 10% para áreas cromatográficas), indicando que el método fue reproducible, para los dos niveles de concentración evaluados.

Tabla 7.

Repetibilidad de los tiempos de retención de los compuestos AINE (7,5 µg mL⁻¹), analizados por HPLC-DAD (nivel de concentración alto).

Compuesto	Tiempo de retención, min (n=3)			Áreas cromatográficas, cuentas (n=3)		
	\bar{x}	s	CV, %	\bar{x}	s	CV, %
Piroxicam	12,69	0.01	0.1	104	4	3
Naproxeno	17.19	0.05	0.3	95,9	0,6	0.7
Diclofenaco	27.7	0.1	0.4	179	4	2
Ibuprofeno	28.63	0.08	0.3	148	3	2

Nota: Elaboración propia.

La linealidad y la sensibilidad del método se evaluó basándose en la curva de calibración para cada uno de los compuestos AINE. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8.

La linealidad y la sensibilidad del método HPLC-DAD para cuantificación de los AINE bajo estudio.

Compuesto	Ecuación	R ²	M	Sm	b	Sb	S _{y/x}
Piroxicam	y=87.8x + 9.29	0.999	87.8	0.1	9.3	0.13	5.9
Naproxeno	y=84.3x + 4.55	0.999	84.3	0.2	4.55	1.26	5.2
Diclofenaco	y=158.4x + 13.38	0.998	158.4	0.1	13.38	1.02	12.2
Ibuprofeno	y=117.7x + 7.16	0.998	117.7	0.1	7.16	0.40	9.8

Nota: Elaboración propia.

El rango de concentraciones evaluado fue de 0,1 a 10 µg mL⁻¹, se obtuvo una adecuada correlación de los datos (coeficiente de determinación R²= 0.998-0.999). La sensibilidad del método, se determinó con base en la pendiente de la curva de calibración de cada compuesto (m= 84.2-158.4). El diclofenaco fue el compuesto con mayor sensibilidad analítica (m=158.4). La

desviación estándar de las pendientes de las curvas de calibración, estuvo en el rango de 0.1 a 0.2.

Los niveles mínimos de detección (NMD) y de cuantificación (NMC), se calcularon con base en la señal mínima distinguible y_L , que pueda ser medida y que no corresponda a una fluctuación estadística de la señal del blanco, se determinó el NMD así:

$$y_l = y_{b\ prom} + kS_b \quad \text{Ecuación 5}$$

$y_{b\ prom}$ = promedio de las lecturas del blanco.

SB = desviación estándar del blanco.

k = valor que se escoja de acuerdo con el nivel de confianza, normalmente es 3 (IUPAC).

El NMD se calculó así:

$$NMD = \frac{y_l - y_{b\ prom}}{m} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde m es la pendiente de la recta, sustituyendo la ecuación 5 en la 6, se obtiene:

$$NMD = \frac{kS_b}{m} \quad NMC = \frac{kS_b}{m} \quad \text{Ecuación 7}$$

El nivel mínimo de cuantificación, se determinó con un valor de k=10.

En la **Tabla 9** se reportan los NMD y NMC para cada compuesto AINE estudiado en este trabajo.

Tabla 9.

Niveles mínimos de detección y cuantificación de los compuestos AINE obtenidos por HPLC/DAD.

Compuesto	NMD, $\mu\text{g mL}^{-1}$	NMC, $\mu\text{g mL}^{-1}$
Piroxicam	0.2	0.7
Naproxeno	0.2	0.6
Diclofenaco	0.2	0.8
Ibuprofeno	0.3	0.8

Nota: Elaboración propia.

3.4. Implementación de la Técnica de Extracción MSPD de los AINE en Material

Vegetal.

Las siguientes fueron las variables principales de la técnica de MSPD implementado en este estudio: tipo de solvente, tipo de dispersante, volumen de elución; la relación de dispersante y la cantidad de muestra. Según literatura (Albero, 2017), hay algunos reportes de extracción MSPD de fármacos en diferentes matrices. Los solventes sugeridos han sido: acetonitrilo, acetato de etilo, metanol, algunas mezclas entre éstos y el uso de modificadores (*e.g.*, ácido fórmico). Los dispersantes de mayor uso han sido el gel de sílice, C₁₈ y el Florisil®. Por último, el volumen de elución típicamente usado ha sido 10 mL (Aznar, 2017). Las extracciones realizadas se hicieron utilizando material enriquecido con los AINE (200 μL , 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) según lo descrito en la **sección 2.7.**

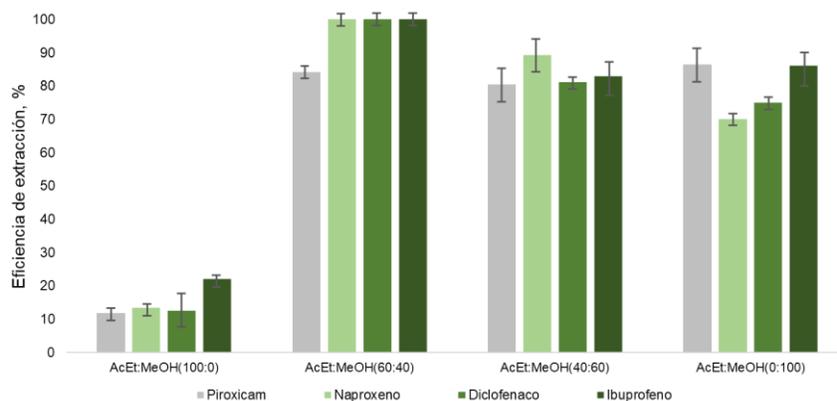
3.4.1. Efecto del Solvente de Extracción sobre la Eficiencia de Extracción de los AINE en Material Vegetal

Se utilizaron como solvente de extracción (10 mL) algunas mezclas entre acetato de etilo y metanol (100:0, 60:40, 40:60 y 100:0 v/v), aciduladas con ácido fórmico (3% v/v). Las extracciones se llevaron a cabo con otras variables fijas: i) el dispersante, gel de sílice modificada C₁₈ (500 mg), ii) el material vegetal (50 mg) y iii) volumen de elución (10 mL). Los extractos se analizaron por HPLC/DAD. El porcentaje de recuperación de cada compuesto se graficó en función de las condiciones de su extracción (Véase **Figura 5**).

La selección del solvente de extracción en la técnica MSPD está relacionada con la similitud de la polaridad del solvente y el analito. Con el acetato de etilo se obtuvieron bajas recuperaciones (menores que 30%), sin embargo, al agregar una cantidad de metanol (40%) la recuperación aumentó, debido a una mayor polaridad del solvente causada por la presencia de metanol. Por el contrario, un aumento en la cantidad de metanol en la mezcla (> 40%), disminuyó la recuperación de los compuestos AINE, debido a que la polaridad del solvente aumentó, pero disminuyó algunas interacciones hidrofóbicas conferidas por el acetato de etilo. Finalmente, se seleccionó como solvente de extracción una solución de ácido fórmico 3% v/v en la mezcla de acetato de etilo: metanol (60:40 v/v).

Figura 5.

Efecto del solvente de elución sobre la recuperación de los AINE del material vegetal, usando la técnica MSPD (n=2).



Nota: Elaboración propia.

3.4.2. Efecto del Agente de Dispersión sobre la Eficiencia de Extracción de los AINE en Material Vegetal

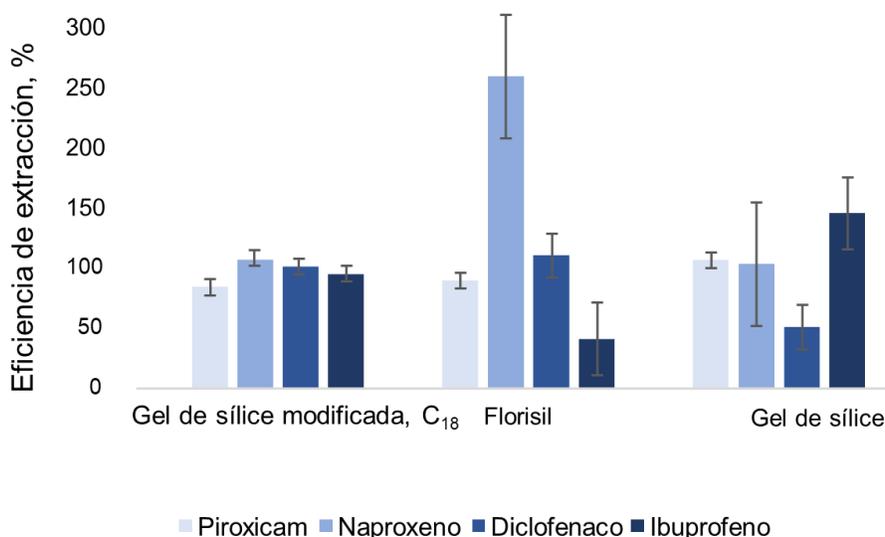
Agentes dispersantes de diferente naturaleza química fueron se probaron en la MSPD de AINE en material vegetal. La gel de sílice modificada, C₁₈, gel de sílice y Florisil[®], se usaron como agentes de dispersión en la técnica MSPD. Las extracciones se llevaron a cabo con otras variables fijas: i) solvente de elución, una solución de ácido fórmico 3% v/v en la mezcla de acetato de etilo:metanol (60:40 v/v), ii) el material vegetal (50 mg) y iii) volumen de elución (10 mL). Los extractos se analizaron por HPLC/DAD. En la **Figura 6**, se observa el efecto de los tres dispersantes usados para la extracción de los AINE del material vegetal, previamente enriquecidas con los fármacos AINE.

Entre los dispersantes evaluados, los valores de eficiencia de extracción más altos (88-105%) se obtuvieron con gel de sílice modificada, C₁₈. Esto se debe a que la naturaleza química del agente de dispersión es menos polar que la de los analitos, lo cual ayuda a retener compuestos

menos polares sin afectar la extracción de los compuestos AINE bastante polares. El Florisil® y la gel de sílice, son dispersantes mucho más polares que la gel de sílice modificada, C₁₈; lo cual puede favorecer a la retención de los AINE por estos dispersantes.

Figura 6.

Efecto del agente de dispersión de la muestra sobre la eficiencia de extracción de los AINE del material vegetal, usando MSPD (n=2).



Nota: Elaboración propia.

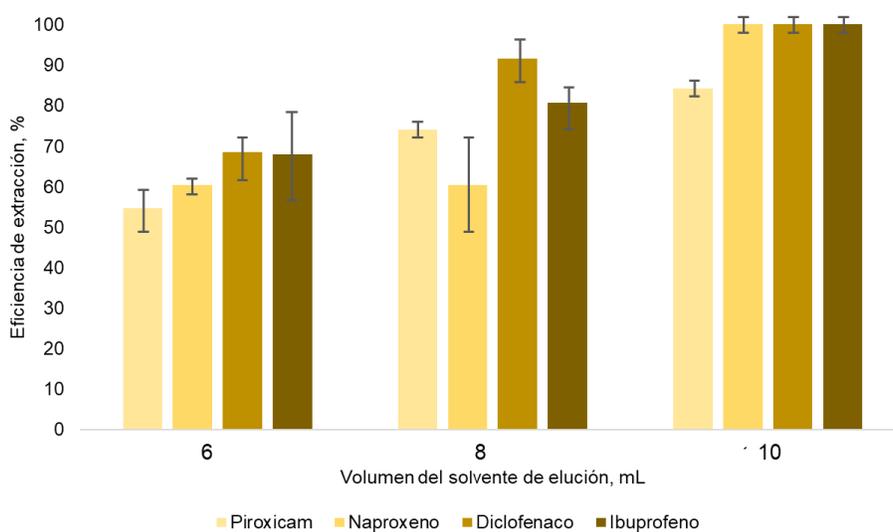
En los casos, cuando la recuperación superó el 100%, por ejemplo, el naproxeno, cuando la matriz fue dispersada con Florisil® y para, el ibuprofeno cuando la matriz fue dispersada con gel de sílice, esto puede deberse a algunas sustancias presentes en la matriz diferentes al los analitos, y que el dispersante no retuvo y, por ello, durante el análisis instrumental podían aparecer con el mismo tiempo de retención que los compuestos de referencia, coeluyendo con ellos.

3.4.3. Efecto del Volumen de Elución sobre la Eficiencia de Extracción de los AINE en Material Vegetal

Se compararon diferentes volúmenes del solvente de extracción: 6, 8, 10 mL. Los demás parámetros se dejaron constantes. Los resultados de la eficiencia de extracción de fármacos AINE en función del volumen de elución se muestran en la **Figura 7**.

Figura 7.

Efecto del volumen de elución del solvente sobre la eficiencia de extracción de los AINE en el material vegetal, usando la técnica MSPD (n=2).



Nota: Elaboración propia.

El propósito de evaluar este parámetro, fue encontrar la menor cantidad de solvente de elución sin afectar la extracción de los analitos. En este caso, el volumen necesario para extraer los compuestos fue de 10 mL, no se evaluó una mayor cantidad de solvente de elución, debido a que los compuestos como el naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno tenían una recuperación cercana al 100% (mayor que 95%) y el piroxicam tenía una recuperación mayor al 80%.

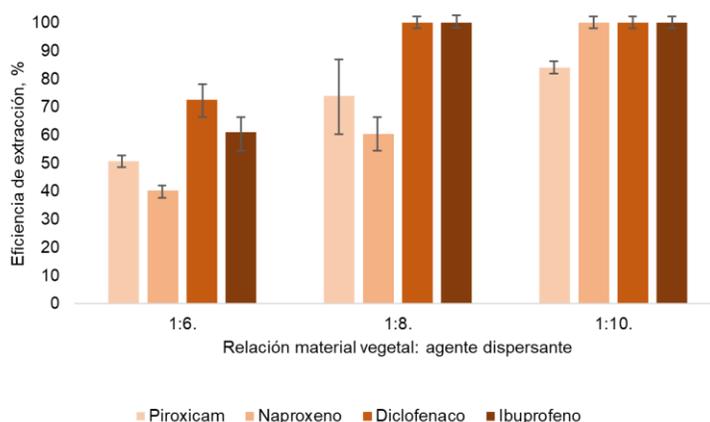
3.4.4. Efecto de la Relación del Material Vegetal y el Dispersante sobre la Eficiencia de Extracción de los AINE en Material Vegetal

Se compararon diferentes relaciones de material vegetal (50 mg) y del agente dispersante: (1:6, 1:8 y 1:10), mientras que los demás parámetros como i) el dispersante (gel de sílice modificada, C₁₈) ii) el solvente de extracción (una solución de ácido fórmico 3% v/v en la mezcla de acetato de etilo:metanol, 60:40 v/v) y iii) volumen de elución (10 mL) se permanecían constantes. Los resultados se muestran en la **Figura 8**.

La cantidad de agente dispersante para la y maceración de la muestra se evaluó para conocer la proporción adecuada que permitiera obtener una matriz vegetal dispersada, con una eficiencia de extracción de los analitos de los compartimentos celulares donde se albergan. Con la relación material vegetal:agente dispersante 1:10, se obtuvo una alta recuperación de los fármacos AINE, con eficiencias de extracción entre el 84 % y 102%.

Figura 8.

Efecto de la relación del material vegetal y el agente dispersante sobre la eficiencia de extracción de los AINE en el material vegetal usando MSPD (n=2).



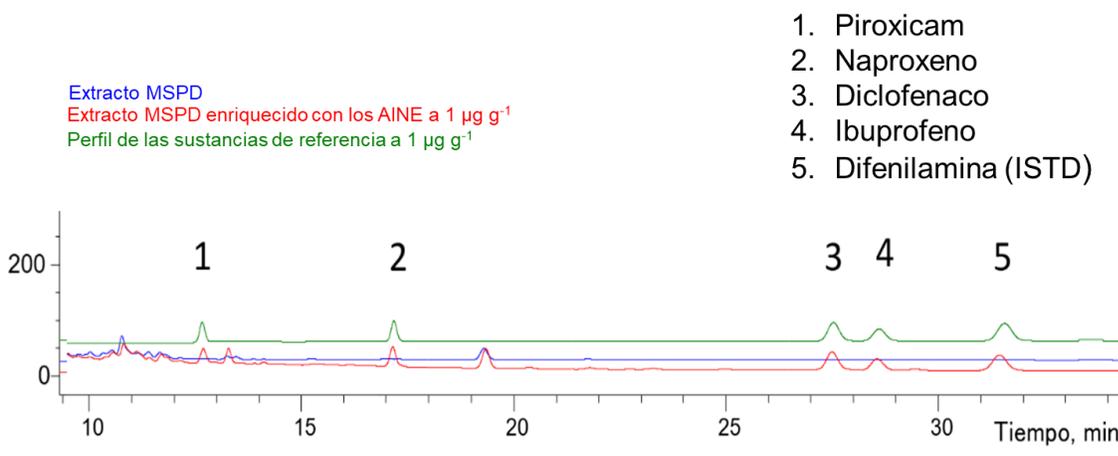
Nota: Elaboración propia.

3.4.5. Figuras de Mérito de la Técnica de Extracción MSPD

La exactitud del método fue medida mediante la eficiencia de extracción de los compuestos AINE del material vegetal enriquecido (Véase **Figura 9**), con base en las mejores condiciones de extracción obtenidas en las **secciones 3.4.1 a 3.4.4**. se determinó la eficiencia de extracción para una planta acuática mas (*Azolla filiculoides*) adquirida comercialmete, para determinar que tan reproducible es la extracción de los AINE por la MSPD en otra planta acuática. Los resultados de eficiencia de extracción se muestran en la **Tabla 10** para *A. filiculoides*, y en la **Tabla 11**, para *S. adnata*, en muestras enriquecidas con los AINE a una concentración final del extracto de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, según lo descrito en la **sección 2.7**.

Figura 9.

Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC-DAD, de los extractos de muestra blanco (azul), extracto del material vegetal enriquecido con AINE (rojo), material de referencia certificado (verde).



Nota: Elaboración propia.

Tabla 10.

Estudio de la repetibilidad de la eficiencia de extracción de fármacos AINE (1 µg g-1) en hoja y raíz de la planta Azolla filiculoides (n=5), usando MSPD.

Compuesto	Hojas			Raíces		
	Rec., %	s	CV, %	Rec., %	s	CV, %
Piroxicam	83	5	6	77	8	10
Naproxeno	83	4	4	85	4	5
Diclofenaco	83	4	5	89	7	8
Ibuprofeno	86	3	3	96	8	9

Nota: Elaboración propia.

Para las dos plantas acuáticas, la eficiencia de extracción de los compuestos estuvo en un rango de 77% al 105%, lo que cumple con lo recomendado por Buenas Prácticas de Laboratorio (70 – 120%), los coeficientes de variación no superaron el 10%; el método de extracción fue aceptable en las plantas *A. filiculoides* y *S. adnata*.

Tabla 11.

Estudio de la repetibilidad de la eficiencia de extracción de fármacos AINE (1 µg g-1) en hoja y raíz de la planta Salvinia adnata (n=5), usando MSPD.

Compuesto	Hojas			Raíces		
	Rec., %	s	CV, %	Rec., %	s	CV, %
Piroxicam	93	5	5	89	3	3
Naproxeno	94	4	4	94	1	1
Diclofenaco	102	4	4	98	2	2
Ibuprofeno	102	3	3	105	3	3

Nota: Elaboración propia.

Para las dos plantas acuáticas, la eficiencia de extracción de los compuestos estuvo en un rango de 77% al 105%, lo que cumple con lo recomendado por Buenas Prácticas de Laboratorio (70 – 120%), los coeficientes de variación no superaron el 10%; el método de extracción fue aceptable en las plantas *A. filiculoides* y *S. adnata*.

La reproducibilidad del método se evaluó calculando la eficiencia de extracción en días diferentes. Se llevaron a cabo extracciones por quintuplicado usando una concentración de AINE de 5 $\mu\text{g g}^{-1}$; se compararon los porcentajes de recuperación del día uno y después de dos semanas. Los resultados se muestran en la **Tabla 12**.

Con la técnica de extracción MSPD evaluada en días diferentes, se obtuvieron eficiencias de extracción de los compuestos AINE en el rango de 87-105 %, para el día 1, y del 94-102%, para el día 15 los coeficientes de variación no superaron el 10% para ninguno de los analitos, lo que demuestra que el método de extracción fue reproducible y los valores obtenidos se mantuvieron en el rango aceptado por Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), para los días diferentes.

Tabla 12.

Reproducibilidad de la eficiencia de extracción de los fármacos AINE (5 $\mu\text{g g}^{-1}$) mediante MSPD en distintos días de la técnica MSPD (n=5) realizada.

Compuesto	Día 1			Día 15		
	Rec., %	s	CV, %	Rec., %	s	CV, %
Piroxicam	87	5	6	94	8	10
Naproxeno	105	4	4	94	4	5
Diclofenaco	99	4	5	102	7	8
Ibuprofeno	93	3	3	102	8	9

Nota: Elaboración propia.

La técnica de extracción MSPD implementada, se comparó con la de la extracción sólido-líquido asistida por sonicación (frecuencia 20 Hz), descrita en la **Sección 2.7**. Los resultados de las eficiencias de extracción se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 13.

Comparación las eficiencias de extracción de la técnica MSPD implementada y de la extracción con solvente asistida con ultrasonido.

Compuesto	MSPD (n=4)		Extracción sólido-líquido asistida por sonicación [0] (n=4)	
	Rec., %	CV, %	Rec., %	CV, %
Piroxicam	87 ± 5	6	20 ± 8	9
Naproxeno	105 ± 4	4	57 ± 8	10
Diclofenaco	99 ± 4	5	90 ± 10	12
Ibuprofeno	93 ± 3	3	90 ± 13	15

Nota: Elaboración propia.

La técnica de extracción asistida por sonicación, Picó *et al.* (2018) , usaron únicamente para la extracción de ibuprofeno y sus metabolitos en plantas acuáticas. Las condiciones de extracción se replicaron y los resultados de eficiencia de extracción para el ibuprofeno (93 ± 3%) fueron similares a los reportados por estos autores; para el diclofenaco se obtuvo una recuperación del 90 %; para naproxeno y piroxicam, las eficiencias de extracción estuvieron por debajo del 70%, lo que no está acorde con el valor recomendado por Buenas Prácticas de Laboratorio. Es decir, el método de extracción asistida por sonicación no es selectivo para naproxeno y piroxicam. Otro factor para comparar fueron los tiempos de extracción. El método MSPD implementado, requiere 30 min por cada muestra. La extracción sólido-líquida asistida por sonicación, demanda 110 min por muestra, debido a un proceso muy largo de concentración de la muestra, durante la etapa de

concentración del extracto. Esta comparación muestra la práctica que fue la técnica MSPD para hacer el análisis de muestras debido a su tiempo de extracción corto y su alta eficiencia (> 87%) para analizar todos los compuestos AINE evaluados en este estudio.

3.5. Análisis de AINE y sus Metabolitos por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS en los

Extractos MSPD de Plantas Acuáticas Expuestas a un Medio de Cultivo con Fármacos

La caracterización de los AINE y alguno de sus metabolitos presentes en los extractos obtenidos por la técnica MSPD, se realizó por cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS). La identificación de los compuestos se realizó determinando fórmulas moleculares calculadas a partir de sus masas exactas, por comparación de los tiempo de retención con las sustancias de referencia certificadas y, estudiando los patrones de fragmentación así como las relaciones isotópicas para los iones diagnóstico, se usó el *software Thermo Xcalibur v3.1 (Thermo Scientific, San José, CA, EE. UU.)*, la exactitud de las masas se calculó por comparación de las masas exactas experimentales y la calculadas (**Ecuación 8**), espectros de masa y la relación isotópica. En la **Tabla 14**, se muestra el listado de los AINE y sus posibles metabolitos detectados en diferentes partes de la planta (hoja y raíz), como resultado del experimento de interacción planta-fármaco.

$$\Delta ppm = \frac{masa_{calculada} - masa_{experimental}}{masa_{calculada}} \times 10^6 \quad \text{Ecuación 8}$$

Tabla 14.

Masas exactas de los AINE y sus posibles metabolitos determinados por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS, en los extractos obtenidos por MSPD de S. adnata. durante el experimento de interacción planta-fármaco.

Compuesto	Fórmula	Masa teórica, u.			Δ ppm
		[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	
Ibuprofeno	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	-	229.1199	-	0.98
Naproxeno (NPX)	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	231.10157	-	-	1
Diclofenaco (DFC)	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296.02396	-	-	1.17
Piroxicam	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	332.06995	-	-	-1.12
NPX-glucósido-malonato	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	-	-	496.18133	-0.68
NPX-glucósido	C ₂₀ H ₂₄ O ₈	-	415.13633	431.11027	-0.95
DCF- glucósido	C ₂₀ H ₂₁ Cl ₂ NO ₇	440.06628	-	-	2.22
DCF- glucósido-malonato	C ₂₃ H ₂₃ Cl ₂ NO ₁₀	-	566.05912	-	0.87
Hidroxi-piroxicam	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₁₀ S	393.15439	-	-	0.91

Nota : Elaboración propia.

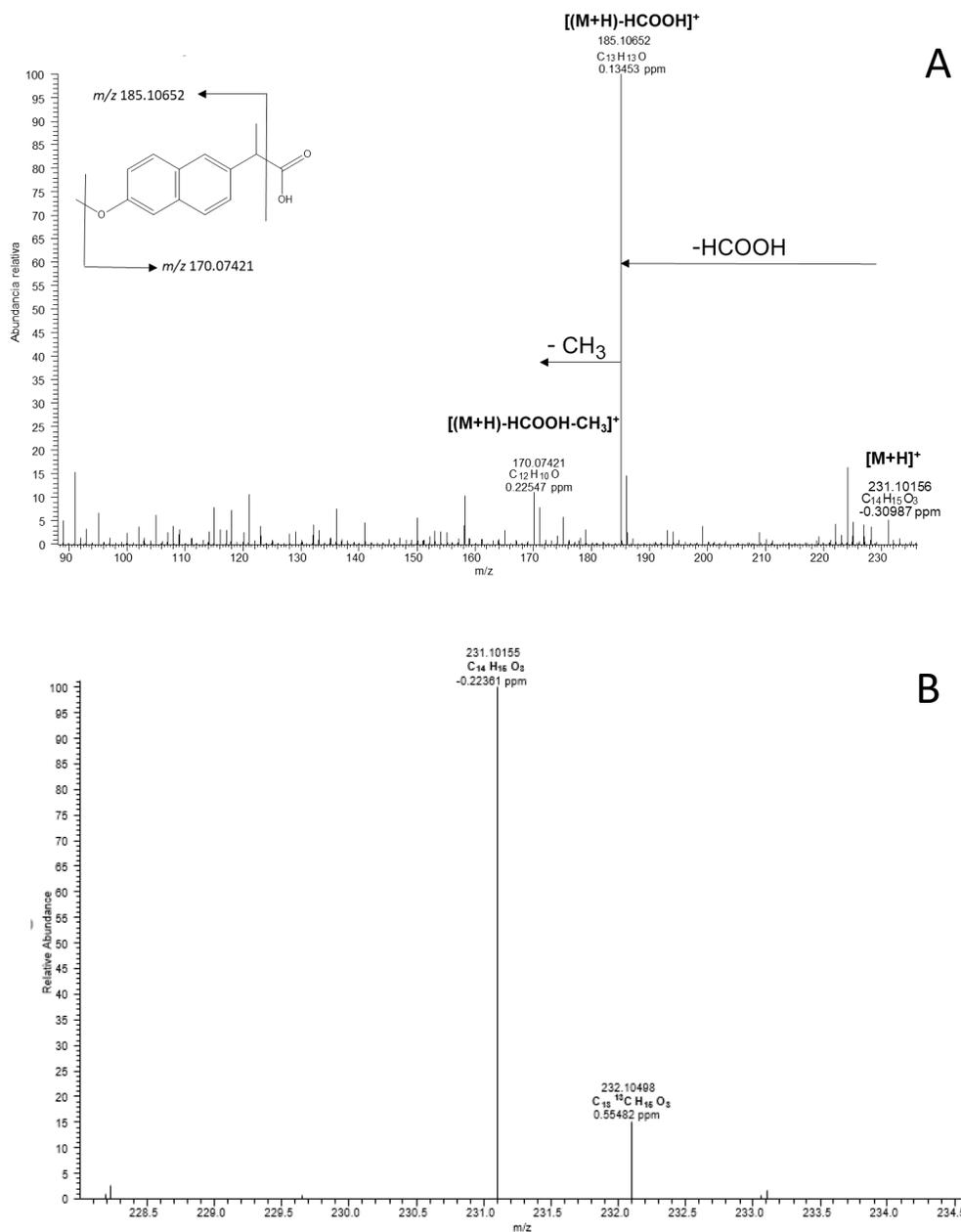
La formación de iones aductos [M+NH₄]⁺ se debe a la presencia del formiato de amonio en la fase móvil, casos específicos para de los metabolitos naproxeno-glucósido-malonato (NPX-glu-mal) y naproxeno-glucosa (NPX-glucósido) que solo se han reportado en la literatura en forma de aductos [M+NH₄]⁺ (Emhofer, 2018). En el espectro de masas del naproxeno (**Figura 10A**) obtenido por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS en modo de adquisición *step scan*, se encontró aquella energía de HCD que permitiera detectar iones-producto sin desaparecer la señal del ion aducto [M+NH₄]⁺, el valor fue 10 eV, con él se logró registrar el ion producto característico del

naproxeno en m/z 185.10662, el cual representa la pérdida de una molécula de ácido fórmico (HCOOH), y confirma la presencia del grupo funcional de este ácido carboxílico (Marchese, 2003) (Farré, 2007) (Shi, 2015), seguida de una pérdida del grupo metilo, para generar el ion fragmento en m/z 170.07421. La relación isotópica (**Figura 10 B**) muestra la consistencia en las abundancia del isótopo de carbono 13 en el ion $[M+H]^+$ del naproxeno.

En el espectro de masas del diclofenaco (**Figura 11**), obtenido por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-MS en modo *step scan*, a una energía de HCD de 10 eV, se registró la señal en m/z 296.02383 que corresponde a la molécula protonada del diclofenaco. La distribución isotópica confirma la presencia de dos átomos de cloro en la estructura (9 :6 :1). Los iones producto en m/z 278.01331, m/z 250.01849 y m/z 215.04933, son producto de las pérdidas sucesivas de H₂O, CO y Cl, respectivamente. En la **Figura 12**, el esquema de fragmentación tomado con modificaciones de los artículos publicados por Galmier *et al.* y Stashenko, E *et al.* (Galmier, 2005) (Stashenko, 2020).

Figura 10.

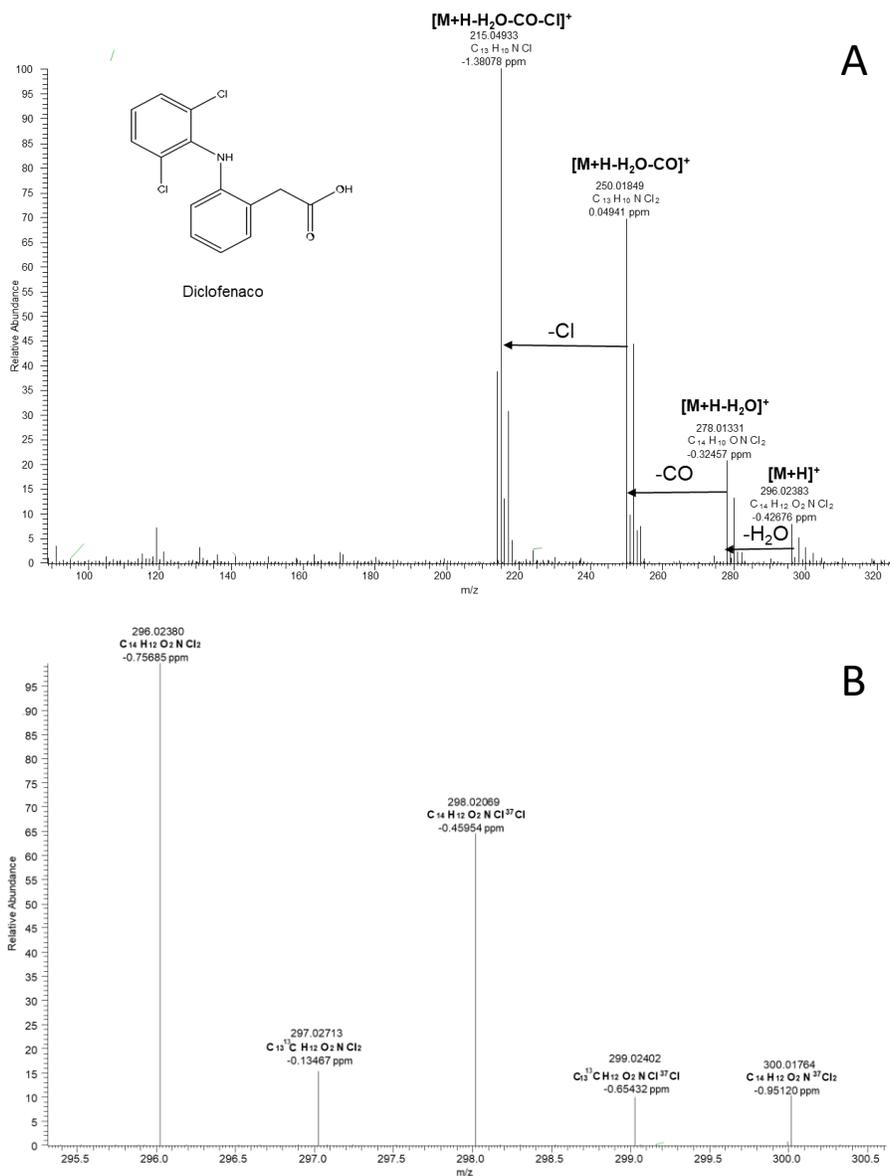
A. Espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS en modo step scan (HCD, 10 eV) del naproxeno presente en el extracto MSPD (día 10, hojas), $[M+H]^+$ $C_{14}H_{14}O_3$, en m/z 231.10157. B. Distribución isotópica del ion $[M+H]^+$ en el espectro de masas.



Nota : Elaboración propia.

Figura 11.

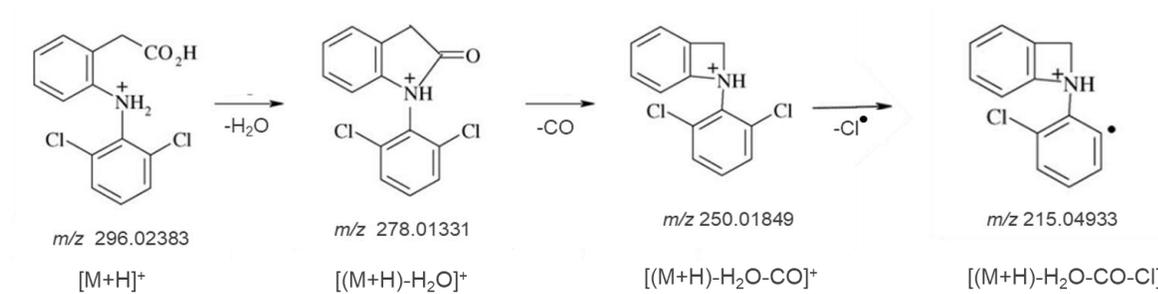
Espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS en modo step scan (HCD, 10 eV) del diclofenaco en el extracto MSPD (hojas, día 10), C₁₄H₁₁Cl₂NO₂ [M+H]⁺ m/z 296.02396. B Distribución isotópica en el espectro de masas del diclofenaco obtenida por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS: Relación isotópica de la señal del ion [M+H]⁺ m/z 296.02383 (35Cl, 100%); m/z 297.02713 (¹³C, 35Cl ; 15,3%); m/z 298.02069 (35Cl, ³⁷Cl ; 59.5%); m/z 299.02402 (¹³C, 35Cl, ³⁷Cl ; 10.7%); ; m/z 300.01764 (³⁷Cl, ³⁷Cl; 10.6%).



Nota: Elaboración propia.

Figura 12.

Esquema de fragmentación del diclofenaco.



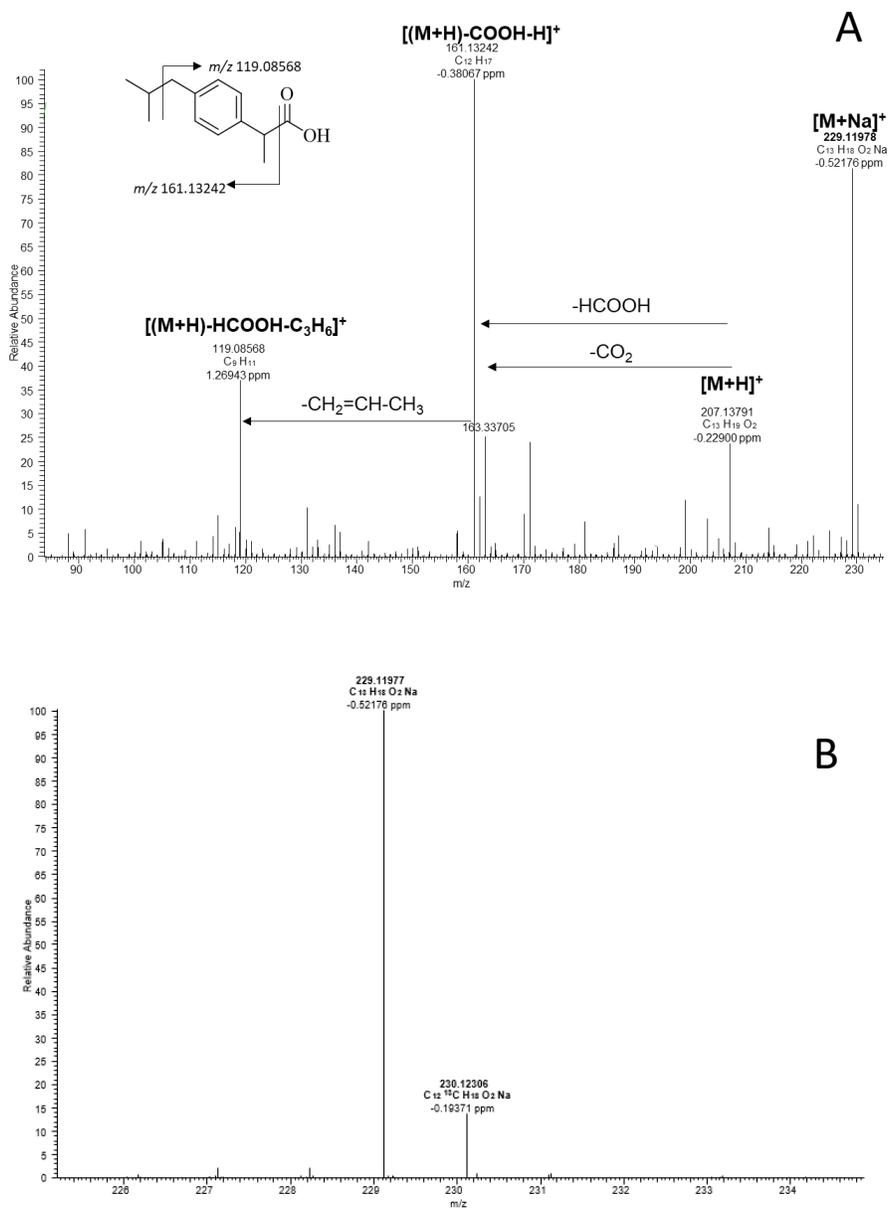
Nota: Elaboración propia.

En el espectro del ibuprofeno **Figura 13 A** aparece ion de la molécula cationizada $[M+\text{Na}]^+$. Un ion característico del ibuprofeno en m/z 161.13242, resultado de la pérdida de una molécula de $-\text{HCOOH}$ que confirma la presencia del grupo funcional de este ácido carboxílico, seguida de una pérdida de $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_3$, que resulta en un ion de m/z 119.08568. La relación isotópica mostrada en la **Figura 13 B** muestra la consistencia en las abundancias del isótopo de carbono 13 en el ion $[M+\text{Na}]^+$ del ibuprofeno.

En el espectro de masas del piroxicam (**Figura 14A**) se observa el ion de la molécula protonada m/z 332.06989. La presencia de los iones-producto en m/z 164.08192 y m/z 121.03979 es debida a la ruptura alfa con respecto al grupo ceto en el grupo amida. La estructura presenta un equilibrio tautomérico ceto-enólico (**Figura 15**), en la forma ceto, en la estructura puede ocurrir una reacción retro Diels-Alder que da lugar a la formación del ion en $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ON}_3$ m/z 164.08192. $[M+H]^+$ en m/z 332.06956 correspondiente a la fórmula elemental $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{S}$ ($\Delta\text{ppm} = -1.16934$) presenta la distribución isotópica m/z 332.06956 (^{12}C ; 100%); m/z 333.07245 (^{13}C ; 16.5%); m/z 334.06537 (^{34}S ; 4.24%) (**Figura. 14 B.**)

Figura 13.

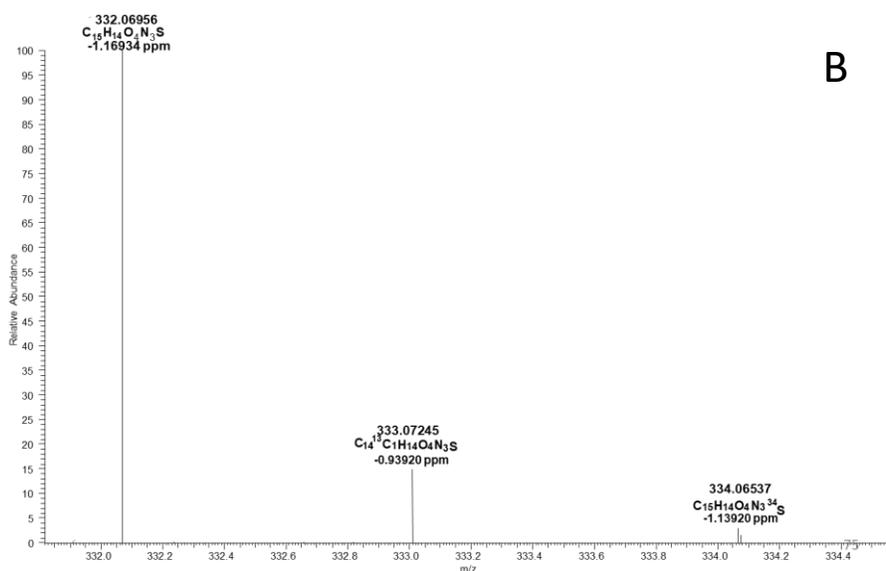
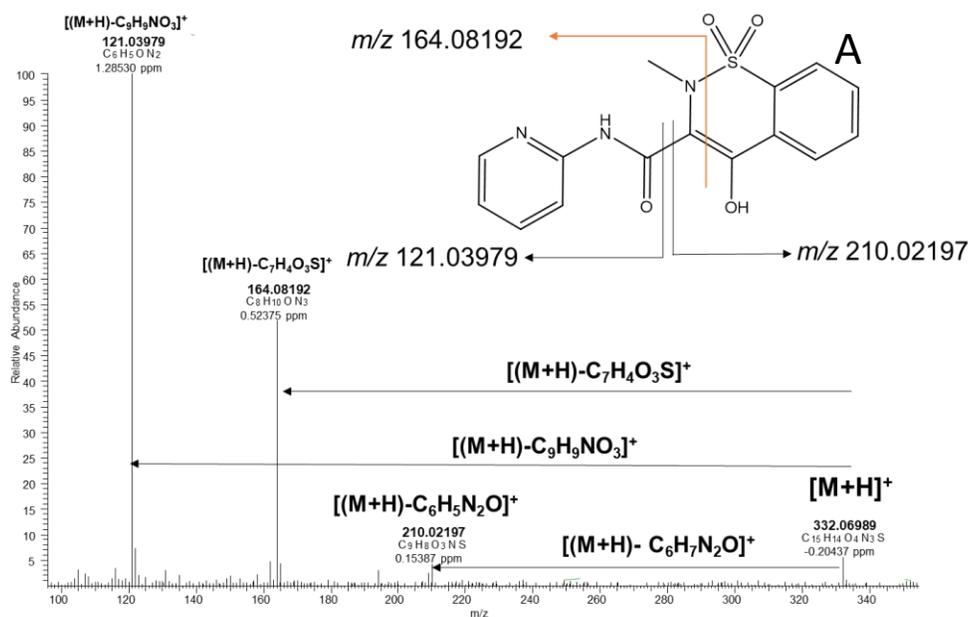
A. Espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS en modo step scan (HCD, 10 eV) del ibuprofeno, presente en el extracto MSPD de una muestra enriquecida con el fármaco ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$), $[M+Na]^+$ $C_{13}H_{18}O_2Na$ m/z 229.11977. B. Distribución isotópica en el espectro de masas de ibuprofeno obtenida por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS: Relación isotópica de la señal del ion $[M+H]^+$ m/z 229.11977 (^{12}C , 100%); m/z 230.12306 (^{13}C , 14.3%).



Nota: Elaboración propia.

Figura 14.

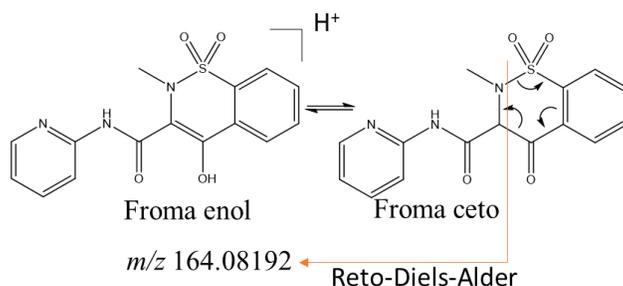
A. Espectro de masas obtenido por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS en modo step scan (HCD, 20 eV) de piroxicam, presente en el extracto MSPD (hojas, día 10) de $[M+H]^+$, $C_{15}H_{14}O_4S$ m/z 332.06989. B. Relación isotópica de la señal del ion $[M+H]^+$ m/z 332.06956 (1 ^{12}C ;100%) ; m/z 333.07245 (^{13}C ;16.5%); m/z 334.06537 (^{34}S ; 4.24%).



Nota: Elaboración propia.

Figura 15.

Ruptura Retro Diels-Alder que se produce apartir de un tautómero en la forma ceto de la molécula piroxicam.



Nota: Elaboración propia.

3.6. Determinación de la Cantidad de los AINE y sus Metabolitos Durante el Tiempo de Interacción Planta-Fármaco.

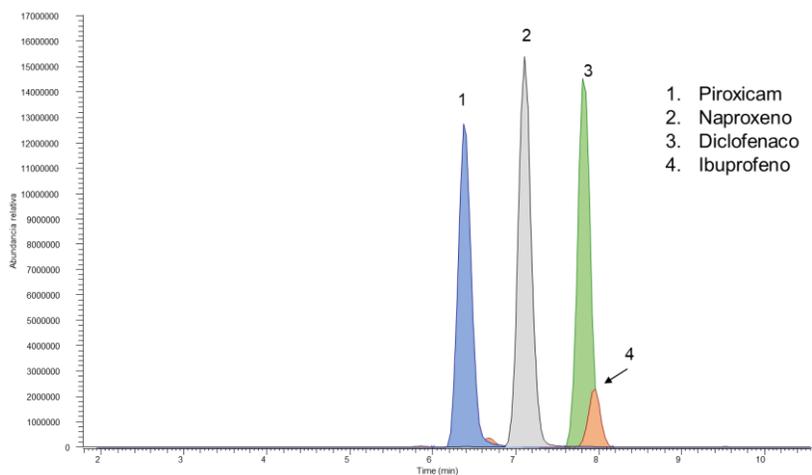
La cuantificación se realizó mediante el método de estandarización interna. Se preparó una curva de calibración utilizando una solución de trabajo de las sustancias de referencia certificadas ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) para preparar los puntos de la curva con los puntos $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$, $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$, $7.5 \mu\text{g L}^{-1}$, $10 \mu\text{g L}^{-1}$, $50 \mu\text{g L}^{-1}$, $75 \mu\text{g L}^{-1}$ y $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (**Figura 16**) y se adicionó difenilamina ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) como estándar interno, a los extractos y cada punto de la curva de calibración.

3.6.1. Figuras de mérito del método de análisis por UHPLC/ESI⁺-Orbitrap-HRMS

La reproducibilidad y la repetibilidad de los tiempos de retención y de las áreas cromatográficas del método analítico LC/MS se evaluaron inyectando por quintuplicado un punto de la curva de calibración ($50 \mu\text{g L}^{-1}$), los resultados se muestran en la **Tabla 15**.

Figura 16.

Corrientes iónicas extraídas (EIC) de iones $[M+H]^+$ obtenidas por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS de las sustancias de referencia de los fármacos AINE ($100 \mu\text{g L}^{-1}$).



Nota: Elaboración propia.

Los coeficientes de variación para los los tiempos de retención no superaron el 1%, y fueron en el rango 0,3-6% para las áreas cromatográficas. Estos valores estuvieron de acuerdo con lo recomendado por las Buenas Practicas de Laboratorio. Mediante la curva de calibración, se evaluó la sensibilidad y los límites de detección y de cuantificación del método. Los resultados se muestran en las **Tablas 16** y **17**.

Tabla 15.

Repetibilidad de los tiempos de retención de los compuestos AINE (50 µg L⁻¹), obtenidos por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS.

Compuesto	Tiempo de retención, min (n=5).			Área cromatográficas (x10 ⁶), cuentas (n=5).		
	\bar{x}	S	CV,%	\bar{x}	s	CV,%
Piroxicam	6,21	0,05	0,9	682	2	0,3
Naproxeno	7,11	0,05	0,7	85	5	6
Diclofenaco	7,8	0,1	1	76.9	0.8	1
Ibuprofeno	7,96	0,08	1	5.9	0.1	2

Nota: Elaboración propia.

Tabla 16.

Linealidad y sensibilidad del método de análisis de fármacos AINE por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS.

Compuesto	Ecuación	R ²	m	Sm	b	Sb	Sy/x
Piroxicam	y=13.38 x + 0.87	0.995	13.38	0.3	0.87	0.01	0.9
Naproxeno	y=1.59 x + 0.15	0.998	1.59	0.02	0.15	0.04	0.1
Diclofenaco	y=1.485 x + 0.02	0.998	1.485	0.02	0.02	0.03	0.1
Ibuprofeno	y=0.11 x + 0.02	0.994	0.11	0.01	0.02	0.008	0.01

Nota: Elaboración propia.

Tabla 17.

Niveles mínimos de detección y cuantificación fármacos AINE del método por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS.

Compuesto	NMD, $\mu\text{g L}^{-1}$	NMC, $\mu\text{g L}^{-1}$
Piroxicam	1	3
Naproxeno	2	8
Diclofenaco	0.6	8
Ibuprofeno	2	7

Nota: Elaboración propia.

En el rango evaluado ($0.5-100 \mu\text{g L}^{-1}$), se observó una buena linealidad para cada uno de los compuestos AINE (coeficientes de determinación $R^2= 0,994-0,998$). La sensibilidad del método para cada compuesto está determinada por la pendiente de la curva de calibración, porque relaciona la variación de la respuesta del detector con la cantidad de analito, en este caso, la mayor sensibilidad fue registrada para el piroxicam, y, el compuesto con menor sensibilidad fue el ibuprofeno.

La exactitud del método se evaluó midiendo la eficiencia de extracción de los fármacos AINE en una concentración más baja ($30 \mu\text{g g}^{-1}$), adicionando AINE ($200 \mu\text{L}$, $150 \mu\text{g L}^{-1}$) con la metodología descrita en la **sección 2.7**, en la que los compuestos y los metabolitos pueden detectarse en plantas acuáticas. La cuantificación se hizo mediante el método de estandarización interna, usando difenilamina como estándar interno ($20 \mu\text{g L}^{-1}$). Los resultados se muestran en la

Tabla 18.

Tabla 18.

*Eficiencia de extracción de los AINE (30 ng g⁻¹) obtenidos mediante la técnica de extracción MSPD de *Salvinia adnata* (hojas y raíces), analizados por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS.*

Compuesto	Hojas (n=3)			Raíces (n=3)		
	Rec., %	s	CV, %	Rec., %	s	CV, %
Piroxicam	77	7	9	75	3	4
Naproxeno	90	9	10	81	5	6
Diclofenaco	77	7	8	71	6	6
Ibuprofeno	75	6	7	72	9	10

Nota: Elaboración propia.

Según las eficiencias de extracción de los AINE por MSPD hojas (75-90%) y en raíces (71-81%), se observa que aún en concentraciones más bajas (30 ng g⁻¹), los resultados son aceptables, según las Buenas Prácticas de Laboratorio, que sugieren un rango de 70-130%.

3.6.2. Análisis por UHPLC-ESI[±]-Orbitrap-HRMS de los AINE en el Experimento de

Interacción Planta-Fármaco en Hojas y Raíces.

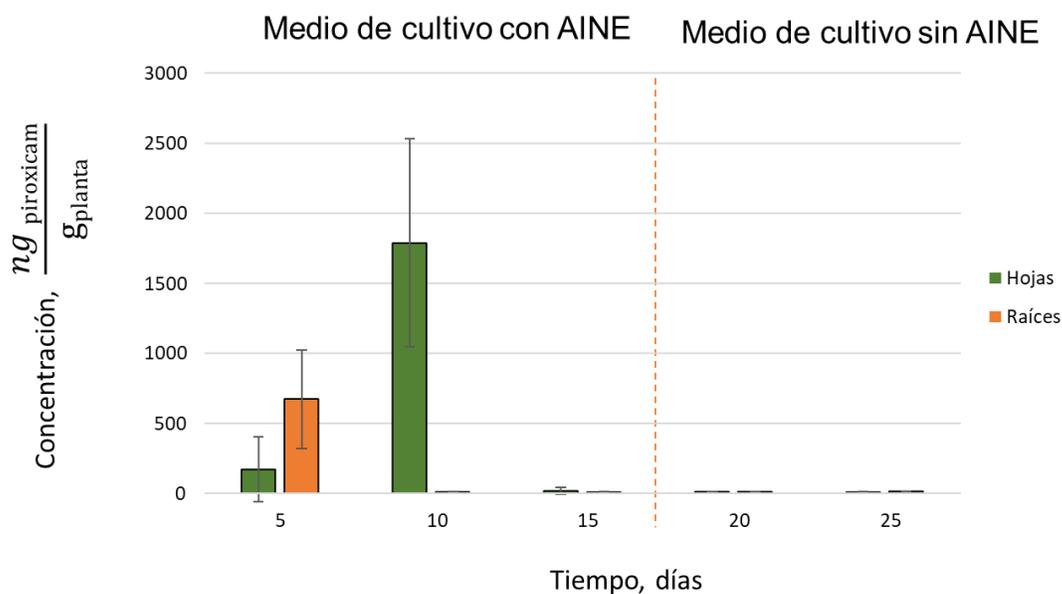
La planta acuosa *S. adnata*, se expuso a cuatro fármacos AINE (100 µg L⁻¹), disueltos en agua previamente. Los detalles del montaje experimental se muestran en la **Sección 2.8**. Las hojas y las raíces se analizaron para determinar los cambios de la concentración de fármacos AINE durante el tiempo del experimento y, eventualmente, encontrar algún metabolito de ellos en la planta.

La planta metaboliza los compuestos xenobióticos, generalmente, produce derivados más polares que el compuesto inicial. El análisis HPLC y LC/MS se efectuó por cromatografía en fase reversa, la fase móvil es más polar que la fase estacionaria, entonces, los compuestos más

polares van a eluir más rápido, presentarán los tiempos de retención menores que los comuestos AINE sin metabolizar (**Anexo F, I, K**).

Figura 17.

*Distribución del piroxicam en la planta *S. adnata* (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta *S. adnata* al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) (n=5).*



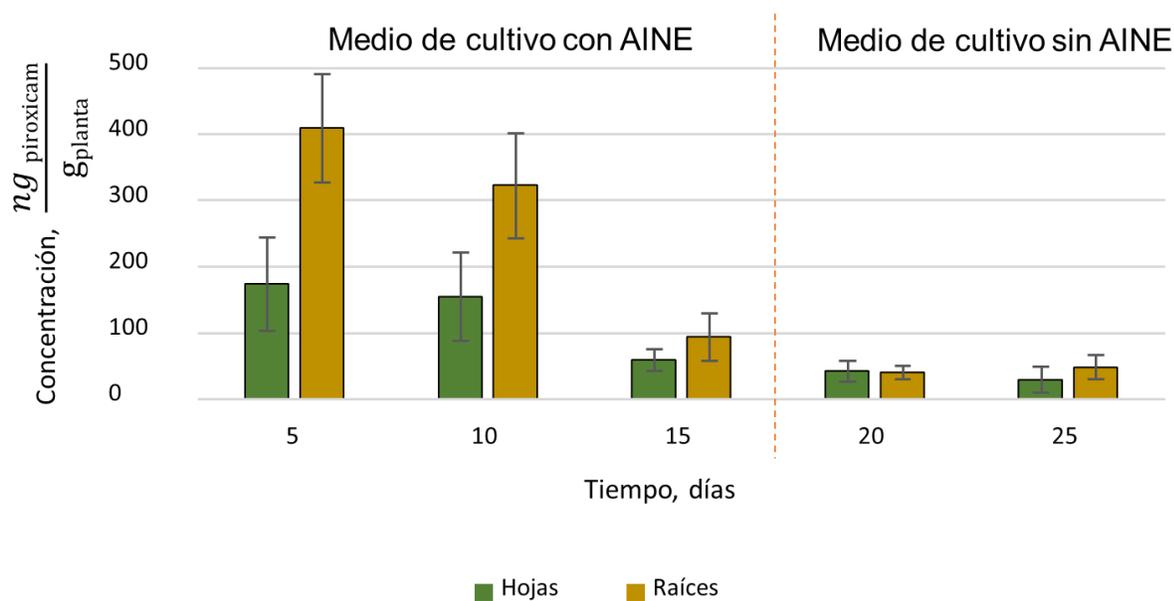
Nota: Elaboración propia.

En el experimento preliminar, en donde la planta *Salvinia adnata* se expuso a los fármacos AINE ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) durante 35 días, se determinó que en el día 15 hubo una mayor cantidad de los fármacos en la planta, y se seleccionó como el día para hacer el cambio del medio de cultivo acuoso con fármacos AINE al medio de cultivo sin fármacos, y así evaluar la cantidad remanente de los fármacos en la planta (Véanse **Anexos L y M**).

En los extractos MSPD fue común encontrar una mayor cantidad en agua de los AINE sin metabolizar en las raíces (Véanse **Figuras 17-19**), porque el compuesto se absorbe principalmente por la raíz y luego se trasloca por la planta, en sus formas transformadas por el metabolismo. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Emhofer y colaboradores (2018) en la planta *Lepidium sativum* (Emhofer, 2018). Luego del día 15, el medio se cambió a un medio de cultivo libre de fármacos AINE, esto llevó a que la cantidad de los AINE disminuyera tanto en hojas como en raíces. se encontraron trazas del naproxeno, piroxicam y diclofenaco que aún quedaban almacenados por diez días mas, es decir, en la planta sin transformación metabólica (Véanse **Figura 17-19**).

Figura 18.

Distribución del naproxeno en la planta S. adnata (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta S. adnata al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) (n=5).



Nota: Elaboración propia.

La capacidad de traslocación de un compuesto en una planta se ha descrito como el cambio de su concentración en la raíz con respecto al otro órgano en el cual se mide (**Ecuación 9**).

$$\text{Factor de traslocación} = \frac{[\text{Órgano de interés (hoja)}]}{[\text{raíz}]} \quad \text{Ecuación 9}$$

Si el factor de traslocación es mayor que 1, el compuesto prefiere migrar a otro órgano de la planta, si el factor es menor que 1, el compuesto no se trasloca. En la **Tabla 19**, se encuentra el factor de traslocación para cada compuesto AINE encontrado durante el experimento de interacción planta-fármaco.

Tabla 19.

*Factor de traslocación de los fármacos AINE encontrados durante el experimento de interacción de la planta *S. adnata* y los fármacos AINE.*

Compuesto	Factor de traslocación, días		
	5	10	15
Piroxicam	0.4	14.6	1.1
Naproxeno	0.4	0.6	0.8
Diclofenaco	0.3	0.9	1.2

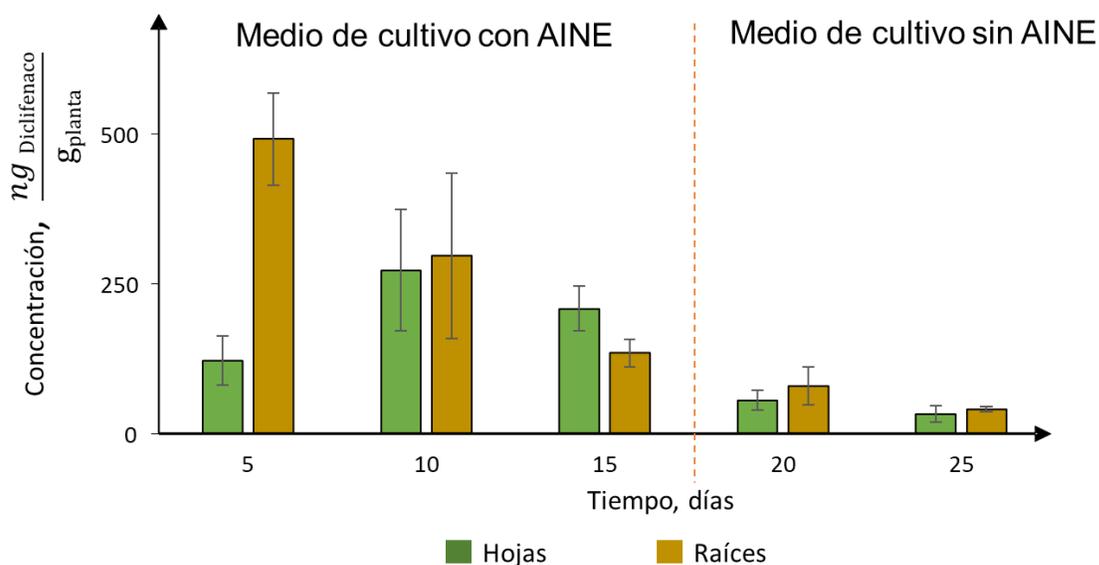
Nota: Elaboración propia.

La capacidad de absorber y bioacumular un compuesto, se ha relacionado con el coeficiente octanol-agua (K_{ow}), véase **Tabla 20**, que mide la solubilidad diferencial de un soluto en esos dos disolventes (Wasik, 1981). Se ha elegido el *n*-octanol por ser un compuesto orgánico que simula el material lipídico de la biota, en partículas o sedimentos orgánicos. Este coeficiente simula el carácter hidrófobo de una sustancia o la afinidad hacia los lípidos, cuando está disuelta en agua. Esta propiedad puede explicar como un compuesto polar puede traspasarse a través de la capa

lipídica de una célula y llegar a bioacumularse. Con un valor bajo de K_{ow} (<3) indica la probable movilidad y transporte de compuesto por su buena solubilidad, es decir, hay que esperar una escasa bioacumulación (Yalkowsky, 1983). Por el contrario, un valor alto de K_{ow} (>3) indica posible absorción en tejidos grasos, suelo y sedimentos. Por lo tanto, es probable la bioconcentración o bioacumulación de estos compuestos y la escasa movilidad de ellos favorece la toxicidad (Yalkowsky, 1980).

Figura 19.

*Distribución del diclofenaco en la planta *S. adnata* (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta *S. adnata* al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) ($n=5$).*



Nota: Elaboración propia.

$$K_{ow} = \frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{agua}}}$$

Ecuación 10

Tabla 20.

Valores de Kow de los fármacos AINE.

Compuesto	Kow
Piroxicam	3.06
Naproxeno	3.18
Diclofenaco	4.51
Ibuprofeno	3.97

Nota: Elaboración propia.

Con respecto al piroxicam, durante el experimento de interacción planta-fármaco, se observó una menor cantidad de compuesto en los días en que se retiró el medio de cultivo con los AINE (días 15 al 25) (**Figura 17**). Esto se puede relacionar con su menor valor de K_{ow} (Yalkowsky, 1980) con respecto a los demás AINE, por tanto es el compuesto con mayor movilidad en la planta y no tiende a almacenarse. Por el contrario, el naproxeno y el diclofenaco (**Figuras 18 y 19**), tuvieron mayor acumulación en raíces y en hojas después de que se retiraron estos AINE del medio (días 20 al 25), estos compuestos tienen mayor K_{ow} que el piroxicam, y permanecieron más tiempo en la planta, debido a que tienen menor capacidad de movilizarse por su mayor afinidad con los tejidos en donde se acumulan.

El piroxicam al tener menor K_{ow} que los demás AINE, tiene mayor afinidad con el agua, lo que lo lleva a tener una mejor movilidad y traslocación en la planta, que se ve reflejado en su factor de traslocación (14.6) que alcanzó durante el día 10. El ibuprofeno y algunos de sus derivados reportados en literatura estuvieron por debajo del nivel de detección (Ferrando-Climent, 2012) (Pietrini, 2015) (Marco-Urrea, 2009), no se determinaron en raíz ni en hoja de la planta, es probable que la absorción se haya dado y, el compuesto se pueda metabolizar en conjugados liposolubles, pero debido al uso de los solventes polares (técnica MSPD) no fueron

extraídos. Sin embargo, el ibuprofeno pudo degradarse por acción de la luz solar o condiciones ambientales, como fue reportado por Goldstein y colaboradores, que al realizar el experimento de interacción planta-ibuprofeno con pepino y tomate, en varios casos, no se pudo determinar su presencia de los productos de su metabolismo y, en algunos casos, el ibuprofeno se degradó en su totalidad en el medio de cultivo antes de terminar el experimento. Sin embargo, el ibuprofeno en el agua fue detectado e identificado mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE) y posterior análisis por LC/MS (los resultados se muestran en el **Anexo N**).

La mayor cantidad de metabolitos, se determinó en las hojas, mientras que en las raíces la cantidad fue menor; debido a que los fármacos mayormente se traslocan y se almacenan en las vacuolas de la planta en sus formas metabolizadas (Sandermann, 1977). La duración del experimento, permitió ver metabolitos principalmente de la fase II (conjugación), como los derivados glucosilados y los conjugados con ácido malónico, como en el caso del naproxeno y el diclofenaco (Fu, 2017). Estos productos derivados del metabolismo se mantuvieron en el tiempo, mayormente en las hojas, aún en los días que la planta previamente expuesta a los fármacos se trasladó a un medio acuoso sin estos, sin embargo, el diclofenaco-glucósido en el día 25 (**Anexo J**), obtuvo un aumento de concentración en raíz a comparación de los demás días, que puede indicar una posible traslocación de este metabolito al medio acuoso. En literatura, no hay reporte de la interacción planta-fármaco del piroxicam, la información que se utilizó para encontrar el hidroxipiroxicam (**Anexos E-F**) fueron de reportes de metabolitos encontrados de piroxicam en animales y en humanos (Woolf, 1989) (McKinney, 2004) (Modhave, 2011), debido a que el metabolismo de estos compuestos en animales y plantas es ejecutado por el mismo grupo de enzimas, generando productos similares en humanos y plantas.

4. Conclusiones

Se implementó la técnica de la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), usando los parámetros de relación material vegetal:gel de sílice modificada con C₁₈ (1:10), como solvente de elución (10 mL) una solución de ácido fórmico al 3% (v/v) en acetato de etilo:metanol (60:40 v/v); para el análisis de fármacos AINE en la planta *Salvinia adnata* (hojas y raíces). Con la técnica MSPD, se obtuvieron eficiencias de recuperación de los AINE en la planta *Salvinia adnata* aceptables (87-105%) y con coeficientes de variación que no superaron el 10%.

La metodología implementada por HPLC/DAD para el análisis de fármacos AINE, cumple los requerimientos establecidos por Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) en cuanto a la reproducibilidad y la repetibilidad de tiempos de retención y áreas cromatográficas, con coeficientes de variación de 0.07 - 0.5% y 0.7 - 3%, respectivamente, utilizando como fase móvil KH₂PO₄ en agua (5 mM, pH=4.0) y acetonitrilo, en modo gradiente y una columna *Gemini C₁₈* (250 mm x 4.6 mm x 5 μm), con una separación cromatográfica aceptable ($R_s > 1.5$).

Se detectaron e identificaron los fármacos AINE y algunos de sus productos de transformación, por UHPLC-ESI⁺-*Orbitrap*-HRMS con los modificadores NH₄HCO₂ (5 mM) y ácido fórmico 0.1% v/v, en agua y metanol, como fase móvil, a 0.3 mL min⁻¹, en una columna *ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈* (50 mm x 2.1 mm x 1.8 μm). Los compuestos AINE se identificaron según los tiempos de retención de los materiales de referencia certificados, composición elemental y distribución isotópica de los iones de las moléculas protonadas o cationizadas, y el análisis de los patrones de fragmentación.

La planta *Salvinia adnata* previamente expuesta a los fármacos AINE, presentó una mayor concentración de los AINE sin transformar principalmente en las raíces, debido a que la absorción primeramente se generó en este órgano de la planta. Por el contrario, los metabolitos como el naproxeno-glucosa-malonato, hidroxipiroxicam y diclofenaco-glucósido, se encontraron más en las hojas que en las raíces, y en mayor concentración, durante los días 10 y 15.

5. Recomendaciones

Evaluar los métodos instrumentales HPLC/DAD y UHPLC-ESI⁺-*Orbitrap*-HRMS y la técnica de extracción MSPD implementada en otras matrices de plantas acuáticas para determinar el efecto matriz en la eficiencia de extracción de los fármacos AINE.

Realizar el experimento de interacción planta-fármaco en intervalos de tiempo más cortos, para favorecer la detección de metabolitos de la fase I y su conversión a derivados conjugados en la fase II del metabolismo.

Referencias Bibliográficas

- Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Miguel, E. and Tadeo, J. L. (2017). Application of matrix solid phase dispersion followed by GC–MS/MS to the analysis of emerging contaminants in vegetables. *Food Chemistry*, 217, 660-667.
- Ardrey, R.E. (2003). Liquid chromatography-mass spectrometry. Huddersfield, Ed. wiley, N.Y, pp. 200-240.
- Arnon, D. J. and Hoagland, D. R. (1952). Nutrient solution. Sand and Water Culture Methods Used is the Study of Plant Nutrition. Ed. EJ Hewitt, 85.
- Ascar, L., Ahumada, I., López, A., Quintanilla, F. and Leiva, K. (2013). Nonsteroidal anti inflammatory drug determination in water samples by HPLC-DAD under isocratic conditions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24, 1160-1166.
- Atto, R. A. (2012). New method for determination of diclofenac sodium by High Performance Liquid Chromatography. *Tikret Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 60-67.
- Aznar, R., Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Martín-Girela, I. and Tadeo, J. L. (2017). Simultaneous determination of multiclass emerging contaminants in aquatic plants by ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersion and GC-MS. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(9), 7911-7920.

- Barker, S. A. (2000). Matrix solid-phase dispersion. *Journal of chromatography A*, 885(1-2), 115-127.
- Barker, S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(2), 151-162.
- Barker, S. A. and Long, A. R. (1992). Tissue drug residue extraction and monitoring by matrix solid phase dispersion (MSPD)-HPLC analysis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 15(12), 2071-2089.
- Bartha, B., Huber, C. and Schröder, P. (2014). Uptake and metabolism of diclofenac in *Typha latifolia*—how plants cope with human pharmaceutical pollution. *Plant Science*, 227, 12-20.
- Bedoya, D., Lara, J., Duque, V., Madera, C., Jimenez, E., and Toro, A. (2018). Study of the occurrence and ecosystem danger of selected endocrine disruptors in the urban water cycle of the city of Bogotá, Colombia. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 53(4), 317-325.
- Blagbrough, I. S., Daykin, M. M., Doherty, M., Patrick, M. and Shaw, P. N. (1992). High performance liquid chromatographic determination of naproxen, ibuprofen and diclofenac in plasma and synovial fluid in man. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 578(2), 251-257.
- Botero, A., Martínez, D., Boix, C., Rincón, R. J., Castillo, N., Arias, L.P., and Hernández, F. (2018). An investigation into the occurrence and removal of pharmaceuticals in Colombian wastewater. *Science of the Total Environment*, 642, 842-853.
- Buer, J. K. (2014). Origins and impact of the term 'NSAID'. *Inflammopharmacology*, 22(5),

263-267.

Calvo, F.G .; Isac, J .; Dobado, J.A. Emerging pollutants: Origin, Structure, and Properties;

Wiley & Sons: Weinheim, Alemania, (2018)

Cerqueira, M. B., Soares, K. L., Caldas, S. S. and Primel, E. G. (2018). Sample as solid support in MSPD: A new possibility for determination of pharmaceuticals, personal care and degradation products in sewage sludge. *Chemosphere*, 211, 875-883.

Chapman, P. M. (2007). Determining when contamination is pollution—weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International*, 33(4), 492-501.

Chen, L., Guo, C., Sun, Z. and Xu, J. (2021). Occurrence, bioaccumulation and toxicological effect of drugs of abuse in aquatic ecosystem: A review. *Environmental Research*, 200, 111362.

Cunha, R. R., Chaves, S. C., Ribeiro, M. M., Torres, L. M., Muñoz, R. A., Santos, W. T. D. and Richter, E. M. (2015). Simultaneous determination of caffeine, paracetamol, and ibuprofen in pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography with UV detection and by capillary electrophoresis with conductivity detection. *Journal of Separation Science*, 38(10), 1657-1662.

David, A. and Pancharatna, K. (2009). Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27(3), 390-395.

Davarani, S. S. H., Pourahadi, A., Nojavan, S., Banitaba, M. H. and Nasiri-Aghdam, M. (2012).

Electro membrane extraction of sodium diclofenac as an acidic compound from wastewater, urine, bovine milk, and plasma samples and quantification by high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 722, 55-62.

Day, R. O. and Graham, G. G. (2004). The vascular effects of COX-2 selective inhibitors. *Australian Prescriber*, 27, 142-145.

Emhofer, L., Himmelsbach, M., Buchberger, W. and Klampfl, C. W. (2018). Insights into the uptake, metabolization, and translocation of four non-steroidal anti-inflammatory drugs in cress (*Lepidium sativum*) by HPLC-MS. *Electrophoresis*, 39(9-10), 1294-1300.

Farré, M. P. M. B. D., Petrovic, M. and Barceló, D. (2007). Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1203-1214.

Ferrando-Climent, L., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodriguez-Roda, I., Rodriguez Mozaz, S. and Barceló, D. (2012). Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 438, 404-413.

Fu, Q., Zhang, J., Borchardt, D., Schlenk, D. and Gan, J. (2017). Direct conjugation of emerging contaminants in Arabidopsis: indication for an overlooked risk in plants?. *Environmental science & technology*, 51(11), 6071-6081.

Galmier, M. J., Bouchon, B., Madelmont, J. C., Mercier, F., Pilotaz, F. and Lartigue, C. (2005). Identification of degradation products of diclofenac by electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 38(4), 790-796.

Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S. and Fava, F. (2015). Emerging

pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New biotechnology*, 32(1), 147-156.

Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., van der Ploeg, M. and Ritsema, C. J.

(2015). Emerging pollutants in the environment: a challenge for water resource management. *International soil and water conservation research*, 3(1), 57-65.

Goldstein, M., Shenker, M., and Chefetz, B. (2014). Insights into the uptake processes of

wastewater-borne pharmaceuticals by vegetables. *Environmental Science & Technology*, 48(10), 5593-5600.

Gómez, M. J., Petrović, M., Fernández-Alba, A. R. y and Barceló, D. (2006). Determination of

pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1114(2), 224-233.

Gravel, A., Wilson, J. M., Pedro, D. F. and Vijayan, M. M. (2009). Non-steroidal anti

inflammatory drugs disturb the osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with seawater exposure in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(4), 481-490.

Gupta, V., Jain, A. D. K. J., Gill, N. S. and Guptan, K. (2012). Development and validation of

HPLC method-a review. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 2(4), 17-25.

Hang, Y., Geißen, S.-U. and Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in

wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73(8), 1151–1161.

- He, Y., Langenhoff, A. A., Sutton, N. B., Rijnaarts, H. H., Blokland, M. H., Chen, F. and Schröder, P. (2017). Metabolism of ibuprofen by *Phragmites australis*: uptake and phytodegradation. *Environmental science & technology*, 51(8), 4576-4584.
- Huber, C., Bartha, B. and Schröder, P. (2012). Metabolism of diclofenac in plants—hydroxylation is followed by glucose conjugation. *Journal of hazardous materials*, 243, 250-256.
- Iha, D. S. and Bianchini Jr, I. (2015). Phytoremediation of Cd, Ni, Pb and Zn by *Salvinia minima*. *International Journal of Phytoremediation*, 17(10), 929-935.
- Jackson, R. B., Carpenter, S. R., Dahm, C. N., McKnight, D. M., Naiman, R. J., Postel, S. L. and Running, S. W. (2001). Water in a changing world. *Ecological applications*, 11(4), 1027-1045.
- Jones, P. and Vogt, T. (2001). Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta*, 213(2), 164-174.
- Kivilompolo, M., Obúrka, V. and Hyötyläinen, T. (2007). Comparison of GC–MS and LC–MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 388(4), 881-887.
- Koves, E. M. and Wells, J. (1992). Evaluation of a photodiode array/HPLC-based system for the detection and quantitation of basic drugs in postmortem blood. *Journal of Forensic Science*, 37(1), 42-60.
- Lanças, F. M. (2009). A Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. *Scientia Chromatographica*, 1(2), 35-61.
- Loos, R., Tavazzi, S., Mariani, G., Suurkuusk, G., Paracchini, B. and Umlauf, G. (2017).

- Analysis of emerging organic contaminants in water, fish and suspended particulate matter (SPM) in the joint danube survey using solid-phase extraction followed by UHPLC-MS-MS and GC-MS analysis. *Science of the Total Environment*, 607, 1201-1212.
- Li, Y., Zhang, J., Zhu, G., Liu, Y., Wu, B., Ng, W. J., and Tan, S. K. (2016). Phytoextraction, phytotransformation and rhizodegradation of ibuprofen associated with *Typha angustifolia* in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *Water research*, 102, 294-304.
- McKinney, A. R., Suann, C. J. y Stenhouse, A. M. (2004). The detection of piroxicam, tenoxicam and their metabolites in equine urine by electrospray ionisation ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(19), 2338-2342.
- Madikizela, L. M., Ncube, S. and Chimuka, L. (2018). Uptake of pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions and natural occurring plant species: a review. *Science of the Total Environment*, 636, 477-486.
- Marchese, S., Perret, D., Gentili, A., Curini, R. and Pastori, F. (2003). Determination of non steroidal anti-inflammatory drugs in surface water and wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, 58(5), 263-269.
- Marchlewicz, A., Guzik, U. and Wojcieszńska, D. (2015). Over-the-counter monocyclic non steroidal anti-inflammatory drugs in environment—sources, risks, biodegradation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(10), 1-13.
- Marco, E., Pérez, M., Vicent, T. and Caminal, G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *trametes versicolor*. *Chemosphere*, 74(6), 765-772.
- Matamoros, V., Nguyen, L. X., Arias, C. A., Salvadó, V. and Brix, H. (2012). Evaluation of

- aquatic plants for removing polar microcontaminants: a microcosm experiment. *Chemosphere*, 88(10), 1257-1264.
- Miranda, C. V. and Schwartsburd, P. B. (2016). Aquatic ferns from Viçosa (MG, Brazil): Salviniaceae (Filicopsida; Tracheophyta). *Brazilian Journal of Botany*, 39(3), 935-942.
- Modhave, D. T., Handa, T., Shah, R. P. and Singh, S. (2011). Successful characterization of degradation products of drugs using LC-MS tools: Application to piroxicam and meloxicam. *Analytical Methods*, 3(12), 2864-2872.
- Müller, E. C. (2006). Mass spectrometry: ESI. *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*, 1020-1022.
- Murray RK, Granner DK, Mayes MA, Rodwell VW. Harper: Bioquímica ilustrada. 30ª Ed. Editorial Manual Moderno. México (México) (2010).
- Oaks, J. L., Gilbert, M., Virani, M. Z., Watson, R. T., Meteyer, C. U., Rideout, B. A. and Khan, A. A. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 427(6975), 630-633.
- Pal, A., Gin, K. Y. H., Lin, A. Y. C. and Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the total environment*, 408(24), 6062-6069.
- Parys, K., Gimmel, M. and Johnson, S. (2013). Checklist of insects associated with *Salvinia minima* Baker in Louisiana, EE.UU. *Check List*, 9, 1488.
- Pi, N., Ng, J. Z. and Kelly, B. C. (2017). Bioaccumulation of pharmaceutically active compounds

and endocrine disrupting chemicals in aquatic macrophytes: Results of hydroponic experiments with *Echinodorus horemanii* and *Eichhornia crassipes*. *Science of the Total Environment*, 601, 812-820.

Picó, Y., Alvarez-Ruiz, R., Wijaya, L., Alfarhan, A., Alyemeni, M. and Barceló, D. (2018).

Analysis of ibuprofen and its main metabolites in roots, shoots, and seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry: uptake, metabolism, and translocation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(3), 1163-1176.

Pietrini, F., Di Baccio, D., Aceña, J., Pérez, S., Barceló, D. and Zacchini, M. (2015). Ibuprofen exposure in *Lemna gibba* L.: Evaluation of growth and phytotoxic indicators, detection of ibuprofen and identification of its metabolites in plant and in the medium. *Journal of Hazardous Materials*, 300, 189-193.

Ponce, S. C., Prado, C., Pagano, E., Prado, F. E. and Rosa, M. (2019). Effect of pH on Cr (III) accumulation, biomass production, and phenolic profile in 2 *Salvinia* species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(1), 167-176.

Sandermann, H., Diesperger, H. y Scheel, D. (1977). Metabolism of xenobiotics by Plant Cell Cultures. *plant tissue culture and Its Bio-Technological Application*, 178–196.

Sandermann, J. H. (1994). Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics*, 4(5), 225-241.

Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H. and Negele, R. D. (2004). Toxic effects

of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic toxicology*, 68(2), 141-150.

Shi, X., Shang, W., Wang, S., Xue, N., Hao, Y., Wang, Y. and Shi, Q. (2015). Simultaneous quantification of naproxen and its active metabolite naproxen in rat plasma using LC-MS/MS: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 978, 157-162.

Skoog, D. A., West, D. M. (1980). Principles of instrumental analysis. (pp. 814-816).

Philadelphia: Saunders College.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., and Glajch, J. L. (2012). Practical HPLC method development.

John Wiley & Sons, N.Y, pp. 50-51.

Solano Roa, M. V. and Garavito Cárdenas, G. (2013). Condición de venta de analgésicos antiinflamatorios no esteroides, legalmente autorizados para su comercialización en Colombia. Estrategias de uso racional. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 42(2), 145-168.

Song, X. Y., Shi, Y. P. and Chen, J. (2012). A novel extraction technique based on carbon nanotubes reinforced hollow fiber solid/liquid microextraction for the measurement of piroxicam and diclofenac combined with high performance liquid chromatography. *Talanta*, 100, 153-161.

Stashenko, E. E., González, A. F., Martínez, J. R., Durán, C., Oliveros, C., Gualteros, L. K. and

- Rojas, D. (2020). Hallazgo de diclofenaco en un producto fitoterapéutico a base de caléndula comercializado en Colombia. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 52(3), 261-284.
- Thibaut, R., Schnell, S. and Porte, C. (2006). The interference of pharmaceuticals with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp liver: an in-vitro study. *Environmental science & technology*, 40(16), 5154-5160.
- Vallack, H. W., Bakker, D. J., Brandt, I., Broström-Lundén, E., Brouwer, A., Bull, K. R. and Koch, R. (1998). Controlling persistent organic pollutants—what next?. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 6(3), 143-175.
- Vannini, A., Paoli, L., Vichi, M., Bačkor, M., Bačkorová, M. and Loppi, S. (2018). Toxicity of Diclofenac in the Fern *Azolla filiculoides* and the Lichen *Xanthoria parietina*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(3), 430-437.
- Vanti, N. (2000). Métodos cuantitativos de evaluación de la ciencia: bibliometría, cienciometría e informetría, *Investigación Bibliotecológica*. 14. 9-23.
- Vidal-Dorsch, D. E., Bay, S. M., Maruya, K., Snyder, S. A., Trenholm, R. A. and Vanderford, B. J. (2012). Contaminants of emerging concern in municipal wastewater effluents and marine receiving water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(12), 2674-2682.
- Vymazal, J. (2013). Emergent plants used in free water surface constructed wetlands: a review. *Ecological Engineering*, 61, 582-592.
- Wang, Q., Kim, D., Dionysiou, D. D., Sorial, G. A. and Timberlake, D. (2004). Sources and

remediation for mercury contamination in aquatic systems a literature review. *Environmental Pollution*, 131(2), 323-336.

Wasik, S. P., Tewari, Y. B., Miller, M. M. and Martire, D. E. (1981). Octanol/water partition coefficients and aqueous solubilities of organic compounds. *Office of Toxic Substances Environmental Protection Agency Washington*, 24-27.

Woolf, T. F. Radulovic, L. L. (1989). Oxicams: metabolic disposition in man and animals. *Drug Metabolism Reviews*, 21(2), 255-276.

Yalkowsky, S. H. and Valvani, S. C. (1980). Solubility and partitioning I: solubility of nonelectrolytes in water. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(8), 912-922.

Yalkowsky, S. H., Valvani, S. C. and Roseman, T. J. (1983). Solubility and partitioning VI: octanol solubility and octanol–water partition coefficients. *Journal of pharmaceutical sciences*, 72(8), 866-870.

Apéndices

Apéndice 1.

Foto de la planta Salvinia Adnata. Familia: Salviniaceae.



Nota: Elaboración propia. Lugar: CENIVAN (UIS), 3 de febrero de 2021.

Apéndice 2.

Foto de la planta Azolla filiculoides.



Nota: Elaboración propia. Lugar: CENIVAN (UIS), 3 de febrero de 2021.

Apéndice 3.

Planta Salvinia adnata liofilizada.



Nota: Elaboración propia. Lugar: CENIVAN (UIS), 8 de marzo de 2021.

Apéndice 4.

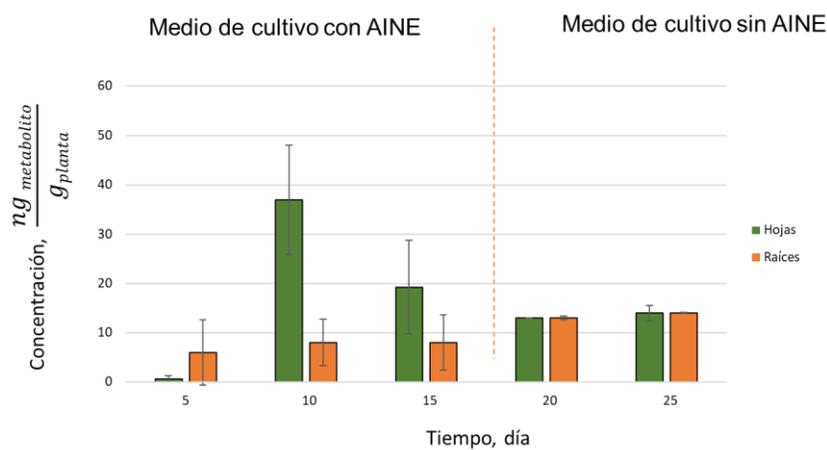
Montaje experimental de los ensayos planta-fármaco.



Nota: Elaboración propia. Lugar: CENIVAN (UIS), 20 de febrero de 2021.

Apéndice 5.

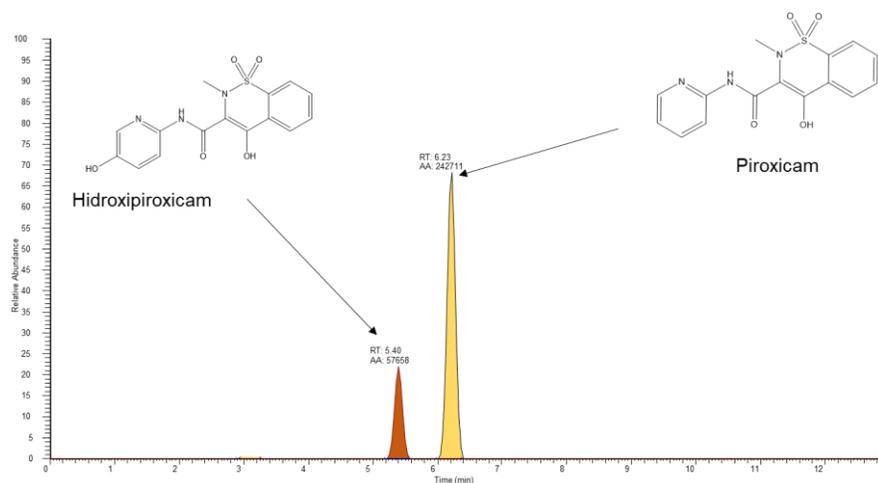
*Distribución del hidroxipiroxicam en la planta *S. adnata* (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta *S. adnata* al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) (n=5).*



Nota: Elaboración propia.

Apéndice 6.

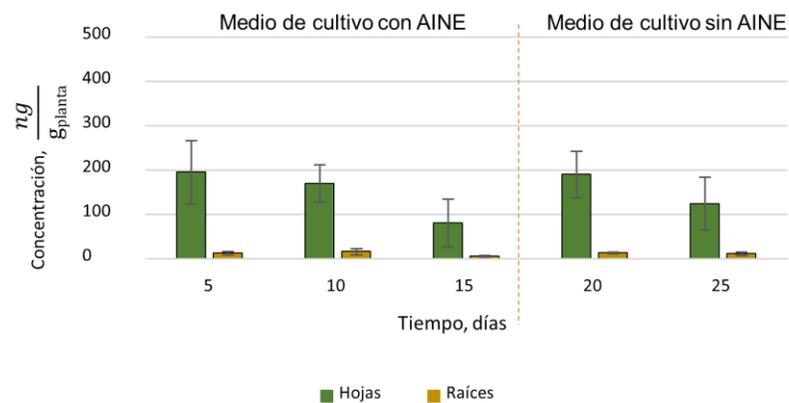
Corrientes iónicas extraídas de moléculas protonadas de piroxicam e hidroxipiroxicam obtenidas por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS. Análisis del extracto MSPD de hojas (*S. adnata*, día 10) (n=5).



Nota: Elaboración propia.

Apéndice 7.

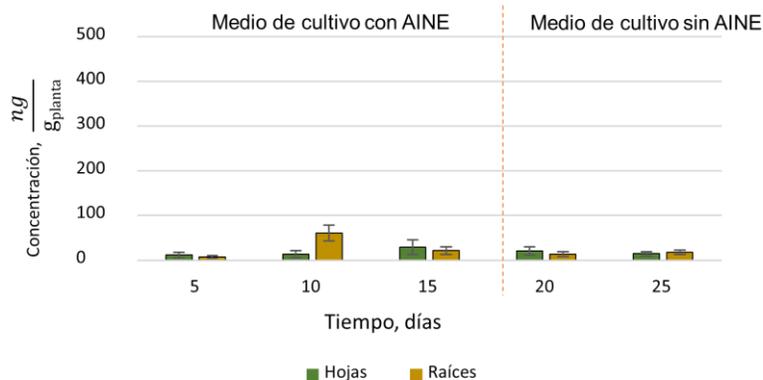
Distribución del naproxeno-glucósido-malonato en la planta *S. adnata* (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta *S. adnata* al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) (n=5).



Nota: Elaboración propia.

Apéndice 8.

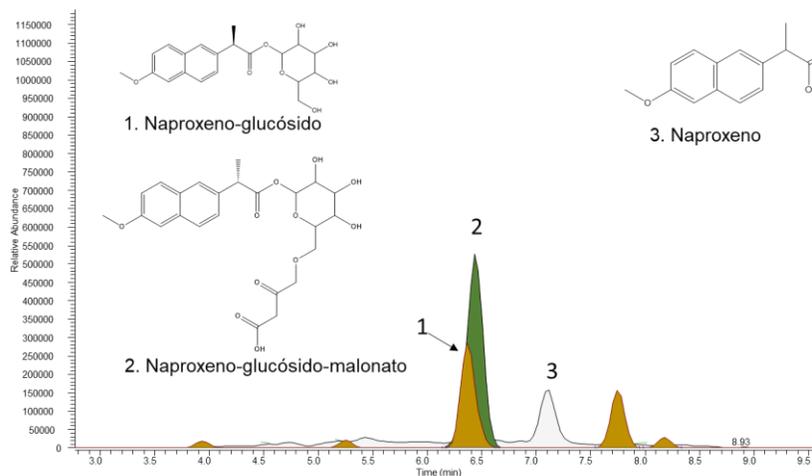
Distribución del naproxeno-glucósido en la planta S. adnata (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta S. adnata al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) (n=5).



Nota: Elaboración propia.

Apéndice 9.

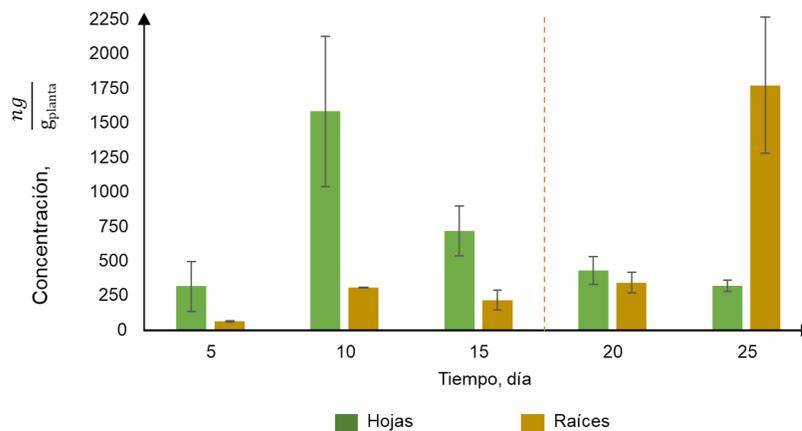
Corrientes iónicas extraídas de moléculas protonadas de naproxeno-glucósido, naproxeno-glucósido-malonato y naproxeno obtenidas por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS. Análisis del extracto MSPD de hojas (S. adnata, día 10) (n=5).



Nota: Elaboración propia.

Apéndice 10.

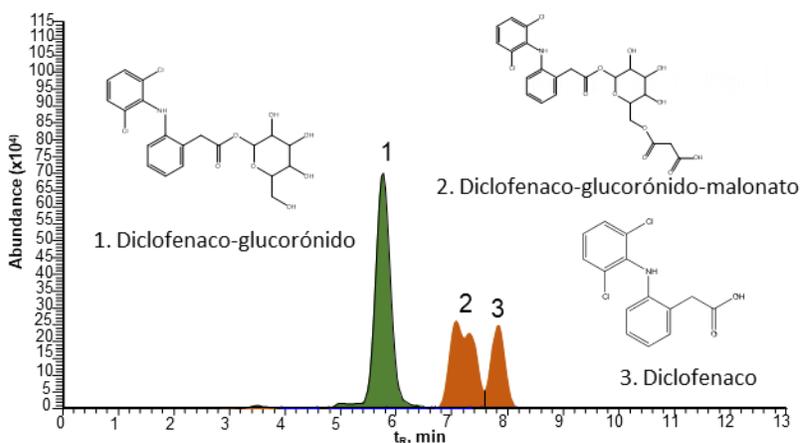
Distribución del diclofenaco-glucósido en la planta *S. adnata* (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta al fármaco disuelto en agua (días 5, 10 y 15) y luego en ausencia del fármaco (días 20 y 25) ($n=5$).



Nota: Elaboración propia.

Apéndice 11.

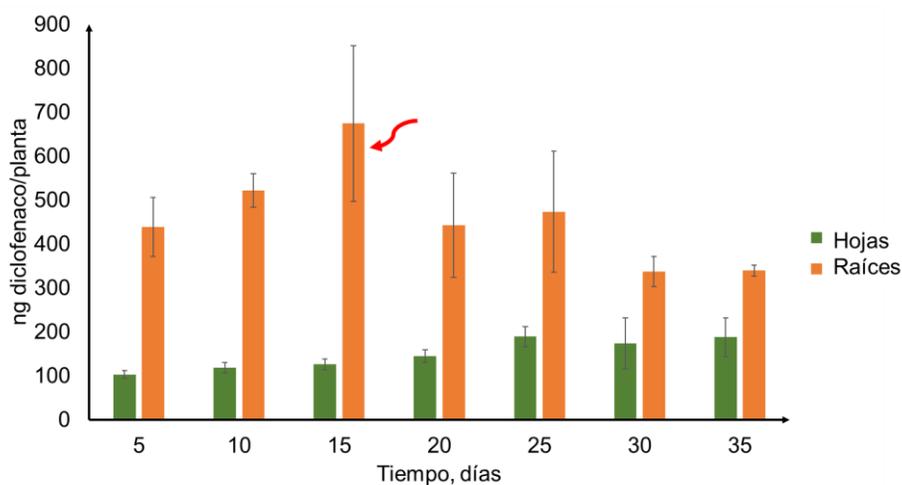
Corrientes iónicas extraídas de moléculas protonadas de diclofenaco, diclofenaco-glucorónido-malonato y diclofenaco-glucósido obtenidas por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS. Análisis del extracto MSPD de hojas (*S. adnata*, día 10) ($n=5$).



Nota: Elaboración propia.

Apéndice 12.

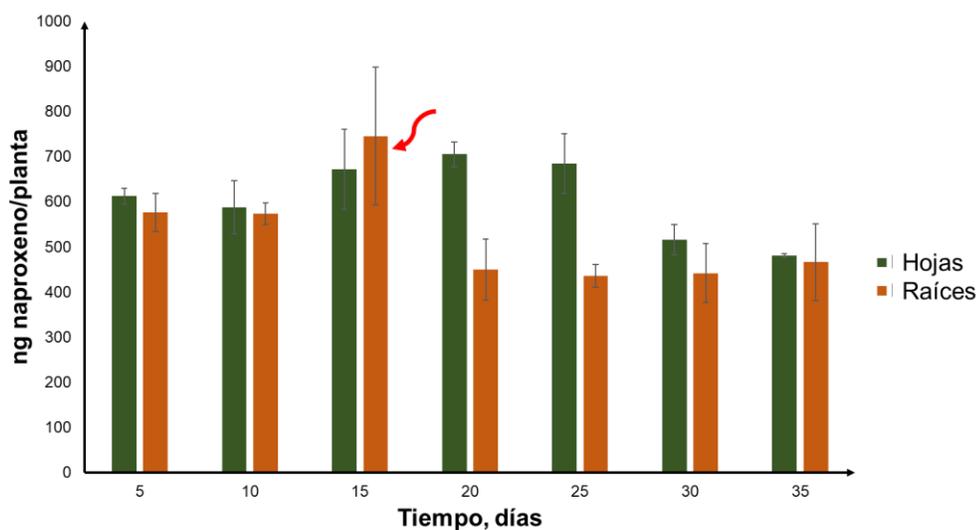
*Distribución del diclofenaco en la planta *Salvinia adnata* (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta al fármaco disuelto en agua durante 35 días.*



Nota: Elaboración propia.

Apéndice 13.

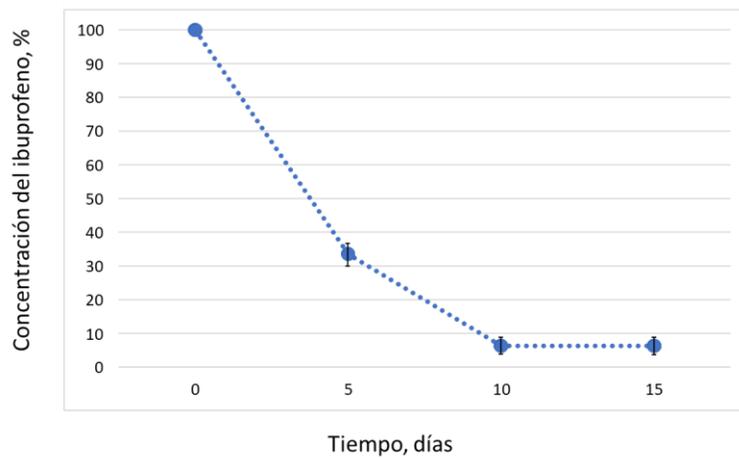
*Distribución del naproxeno en la planta *Salvinia adnata* (hojas y raíces) medido durante la exposición de la planta al fármaco disuelto en agua durante 35 días.*



Nota: Elaboración propia.

Apéndice 14.

*Cambio de concentración del ibuprofeno ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) en el medio acuoso sin la presencia de la platan *Salvinia adnata*, extraído mediante la técnica SPE y analizado por UHPLC-ESI+-Orbitrap-HRMS.*



Nota: Elaboración propia.