



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Efectos da presenza de ibuprofeno na auga de rego para o cultivo da
leituga**

**Efectos de la presencia del ibuprofeno en el agua de riego para el
cultivo de lechuga**

Effects of the ibuprofen on the irrigation water to the cultivate lettuce

Jorge Moro Martínez

Julio, 2018

Director Académico: Federico Pomar Barbeito

ÍNDICE

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	6
3. Objetivo.....	9
4. Material y métodos.....	10
5. Resultados y discusión.....	15
6. Conclusión.....	22
7. Bibliografía.....	23

RESUMEN

El ibuprofeno es uno de los fármacos más consumidos por la población y constituye actualmente uno de los contaminantes emergentes en las corrientes de agua. En este trabajo, se evalúa que efecto tiene, en las aguas de riego, la presencia de este compuesto sobre el cultivo de la lechuga. Para ello se estudió el efecto sobre la germinación de las semillas y sobre el metabolismo primario y secundario de plantas de lechuga.

RESUMO

O ibuprofeno é un dos fármacos máis consumidos pola poboación e constitúe actualmente un dos contaminantes emerxentes nas correntes de auga. Neste traballo, avalíase o efecto que ten, nas augas de rego, a presenza deste composto sobre o cultivo de leituga. Por iso, se estudou o efecto da xerminación das sementes e sobre o metabolismo primario e secundario de plantas de leituga.

SUMMARY

Ibuprofen is one of the drugs most consumed by the population and is currently one of the emerging pollutants in water currents. This research evaluates the effect of this chemical compound on the lettuce crop in irrigation waters. Therefore, the effect on germination of the seeds and on the primary and secondary metabolism of lettuce plants was studied.

PALABRAS CLAVE

Ibuprofeno, lechuga, fotosíntesis, fenólicos, pared celular

1. Introducción

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) pertenece a la familia Asteraceae, que reúne a más de 23.500 especies por lo que es la familia de Angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica (Jeffrey, 2007). La familia se caracteriza por presentar las flores dispuestas en una inflorescencia compuesta, denominada capítulo, la cual se halla rodeada de una o más filas de brácteas (Stevens, 2001). Las hojas pueden ser simples o compuestas y son usualmente alternas. Las flores son pequeñas, hermafroditas o, en ocasiones, funcionalmente unisexuales o estériles. El androceo presenta, normalmente, 5 estambres y el gineceo 2 carpelos connados y ovario ínfero. El fruto se describe como cipsela y presenta un gran parecido a un aquenio (Watson *et al.*, 1992).

El lugar exacto de origen de la lechuga sigue creando gran discusión entre diferentes autores, pero todos coinciden en que su origen surgió en la zona del Mar Mediterráneo. Los primeros indicios de cultivo de lechuga son en Egipto hace 2500 años (De Vries, 1996). La domesticación de la lechuga ha generado que posea caracteres distintos a su antecesor silvestre. La selección humana causó una disminución en el contenido de látex y sabor amargo, aparte de la pérdida de espinas del tallo y hojas, así como al aumento del tamaño de la semilla (Ryder y Whitaker, 1976). También esta selección afectó a la estructura y formas de las hojas, pero el rasgo principal en el que se centraron los estudios de fitomejoramiento ha sido el de las resistencias a enfermedades o patógenos, encontrándose resistencia a insectos en parientes silvestres *L. serriola* L., *L. virosa* L. y *L. saligna* L.. La mejora moderna de la lechuga se concentra aún más en conseguir un corto período de crecimiento y una baja necesidad de energía (De Vries, 1996).

Un estudio realizado entre los años 2005-2015, muestra la evolución en el número de hectáreas dedicadas al cultivo de lechuga en nuestro país, en él se puede observar que hay una disminución de hectáreas dedicadas al cultivo de lechuga (MAPAM, 2017). Esto puede deberse a que el consumo medio de lechuga en España está descendiendo cada año (INE, 2019).

El ibuprofeno (figura 1) es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), que es el más utilizado en analgesia por su alto ratio de eficacia/seguridad (González-Escalada, 2009). El mecanismo de acción de los AINE va ligado a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, inhibiendo la ciclooxigenasa que produce las prostaglandinas, mediadoras del dolor. Estudios recientes demuestran que también ejercen su efecto antinociceptivo actuando sobre el sistema nervioso central, en concreto en la médula espinal. Desde estos descubrimientos los AINE se perfilan como analgésicos de acción mixta, central y periférica (González-Escalada, 2009).

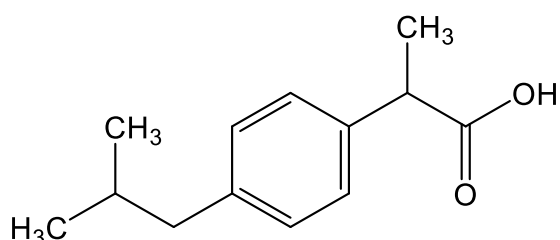


Figura 1: Estructura química del ibuprofeno

En los cada vez más frecuentes análisis de aguas residuales se detecta que muchas de estas aguas están contaminadas por múltiples contaminantes emergentes. Un contaminante emergente es un compuesto considerado peligroso para el medio ambiente y para la salud humana. Se llaman emergentes porque aún no están regulados o se encuentran en proceso de regulación (Patiño *et al.*, 2014). Hay distintos tipos de contaminantes emergentes (retardantes de llama bromados, parafinas cloradas, pesticidas polares, compuestos perfluorados, fármacos y productos de higiene y drogas) (Barceló y López de Alda, 2008). Estos contaminantes no han sido muy investigados porque han pasado desapercibidos por mucho tiempo, por lo que todavía es muy escaso el conocimiento que existe respecto a su impacto ambiental y en la salud humana. Estos contaminantes se encuentran a concentraciones muy bajas, del orden de μgL^{-1} o incluso ngL^{-1} .

El problema no solo reside en que las aguas sean contaminadas con analgésicos antiinflamatorios (donde destaca el ibuprofeno), sino que las EDARs (estaciones depuradoras de aguas residuales) no están preparadas para eliminar estos compuestos a esas concentraciones tan pequeñas, en comparación con los compuestos que sí se eliminan en una planta depuradora. Por lo que al salir las

aguas tratadas aún contienen ibuprofeno y otros fármacos (Postigo *et al.*, 2011), esto puede generar que al utilizar esas aguas con otros fines se puedan tener aguas que pueden ocasionar algún daño en el medio ambiente o en la salud humana.

En este trabajo se va a estudiar el efecto del ibuprofeno sobre el cultivo de la lechuga, a través de un ensayo de germinación, la evaluación del crecimiento de las plantas, el efecto sobre el aparato fotosintético, la cantidad de fenoles y la composición de las paredes vegetales. Complementariamente, se evaluará la posible incorporación del ibuprofeno a los tejidos de la planta, es especialmente interesante este aspecto, al considerar que la lechuga es un producto de huerta que se consume en fresco sin ningún tipo de tratamiento, por lo que, si la planta lo incorpora y lo acumula en las hojas, fácilmente llegaría al consumidor.

2. Objetivo

El objetivo de este trabajo consiste en comprobar el efecto de la presencia de ibuprofeno en el agua de riego sobre el cultivo de la lechuga. Para ello, nos planteamos dos subobjetivos:

- Evaluar el efecto de la presencia de ibuprofeno sobre la germinación de las semillas

- Evaluar el efecto de la presencia de ibuprofeno, sobre el metabolismo de plantas de lechuga

3. Material y métodos

Estudio del efecto del ibuprofeno sobre la germinación

Para este ensayo se utilizan semillas de lechuga, variedad attrazione de la marca vilmorin, que se someten a 4 diferentes tratamientos. Un control con agua y metanol a una concentración (200µl de MeOH en 20ml de agua), los tres siguientes tratamientos son exposiciones de la semilla frente a distintas concentraciones de ibuprofeno 1 ppm, 10 ppm y 100 ppm disuelto previamente en metanol (a la misma concentración que el control).

Todas las semillas se disponen en una placa Petri de 55 mm de diámetro, con un papel de filtro, encargado de retener la humedad. Hay 5 placas por tratamiento que a su vez tienen 5 semillas por placa, a cada placa se le vierten 3 mL de la disolución requerida para cada tratamiento. Se realiza un conteo de las semillas que han germinado a los 4 días, renovando en ese momento las disoluciones, y a los 7 días. Además, se miden la longitud de cada plántula y además el peso del conjunto de las plántulas, en ambos casos solo se consideran las plántulas que germinan.

Estudio del efecto del ibuprofeno sobre el metabolismo de plantas de lechuga

En el resto del trabajo se utilizan plantas de lechuga de al menos 6 hojas, compradas en un vivero local (A Botica do Agro, Cambre), en grupos de 3 plantas. Todas las plantas se mantienen en cultivo hidropónico con una solución nutritiva (abono líquido universal N:P:K al 4% diluido en una proporción de 5 ml por litro de agua), a la que se le añade el ibuprofeno a diferentes concentraciones (1 ppm, 10 ppm y 100 ppm) disuelto en metanol, usando como control un grupo de plantas únicamente en solución nutritiva con la misma proporción de metanol que los tratamientos. Las plantas se mantienen en condiciones controladas en un cámara de cultivo a 25 °C y un fotoperíodo de 16/8 luz/oscuridad y a los 10 días se procede a la medida de los distintos parámetros.

Evaluación de la actividad fotosintética

Se realiza en el segundo par de hojas, usando un fluorímetro Teaching PAM 210 de la marca Walz. Las hojas se someten a unas intensidades de PAR (radiación fotosintéticamente activa) de 10 a 1250 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, durante periodos de 20 segundos tras los cuales se someten a un pulso de saturación, con una intensidad de 3500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, tanto el PAR como el pulso de saturación poseen una longitud de onda de 655 nm. Mediante este proceso se obtienen la ETR (tasa de transferencia de electrones) y el Φ_{PSII} (rendimiento cuántico del fotosistema II). Una vez realizada la medición, se pesan las hojas de cada planta y se congelan para su posterior uso.

Preparación de un extracto orgánico

Con el fin de obtener un extracto orgánico, necesario para las siguientes determinaciones, el tejido recogido en el paso anterior se homogeniza en un mortero con MeOH, El homogeneizado es sometido a continuación a sonicación durante 20 minutos en un baño de ultrasonidos OVAN DH100-3LQ. Tras la sonicación se centrifuga durante 10 minutos a 3220g 5810R. Una vez terminado el centrifugado, se guarda el sobrenadante y el precipitado se resuspende en MeOH En el momento en el que precipitado quede resuspendido, se repite el mismo proceso desde la sonicación. Al conjunto de los dos sobrenadantes se les añade Na_2SO_4 anhidro para eliminar la mayor cantidad de agua posible. Finalmente se lleva a sequedad en el rotavapor, redisolviéndolo finalmente en 1 ml de MeOH y filtrándolo a través de 0,45 μm

Determinación de la cantidad total de compuestos fenólicos

Una pequeña alícuota del sobrenadante de las centrifugaciones anteriores, se utiliza para medir la cantidad de fenoles de las plantas; que es un indicativo de diferentes tipos de estreses ya que, cuanto más estrés sufra la planta, más cantidad de fenoles va a sintetizar (Meloni *et al.*, 2008). Para poder medir los fenoles se mezclan 50 μL del sobrenadante, 750 μL de agua y 50 μL de Folin-

Ciocalteau. Se deja incubando unos 3 minutos a temperatura ambiente; tras lo cual se le añaden 150 μL de Na_2CO_3 al 20%. Posteriormente, se deja incubando a temperatura ambiente durante 2 horas en oscuridad. Finalmente, se mide la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Palomino *et al.*, 2009), usando una recta patrón con ácido ferúlico a unas concentraciones de 0, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Efecto del ibuprofeno sobre las paredes celulares

Se realiza un análisis de paredes celulares mediante espectroscopía de infrarrojos (FTIR). Para ello se usa el precipitado de la obtención del extracto orgánico, y se lava con Triton X-100 al 1% 3 veces con centrifugaciones intermedias; después de eso, se lava y centrifuga con agua otras tres veces para eliminar los restos de detergente. Seguidamente se lava y centrifuga con alcohol (etanol, EtOH) al 50% y posteriormente, con EtOH absoluto, ambos procesos se realizan tres veces. Todas las centrifugaciones intermedias se realizan durante 10 minutos a 3220g en una centrífuga Eppendorf 5810R. Posteriormente, el precipitado se seca con acetona y por último se deja en la estufa a 37°C con el propósito de que se seque por completo (Pomar *et al.*, 2002).

Una vez las muestras estén secas, se trasladan al SAI (Servicios de Apoyo á Investigación) para poder analizarlas mediante FTIR en un espectrómetro Bruker Vector 22 FTIR (Fourier Transformate-Infra Red), equipado con un ATR de reflexión simple con prisma de diamante Golden Gate (Specac), cuyo brazo permite aplicar una presión constante a la muestra sobre el cristal, para conseguir un contacto perfecto entre la muestra y el haz de infrarrojos incidente, evitando la pérdida de radiación incidente. Se registran 3 espectros de infrarrojo entre los 4000 y los 400 cm^{-1} para cada réplica, con una resolución de 4 cm^{-1} . Los datos obtenidos de los espectros de FTIR se analizaron con el programa Opus (Bruker) para su normalización y la corrección de línea base, posteriormente se utiliza el Microsoft Excel para calcular los promedios de los 3 espectros para cada tratamiento.

Determinación de la presencia de ibuprofeno en los tejidos de la planta

Para poder determinar si el ibuprofeno se incorpora a los tejidos de la lechuga, se utiliza la misma alícuota que en el proceso de medición de cantidad de fenoles. La determinación se realiza mediante cromatografía en HPLC: Sistema cromatográfico, Water Alliance con Separation Module 2695 y Photodiode Array Detector 2996, Columna: Waters Cortecs C18 de 4,6x150 mm y 2.7 μ m, Condiciones del detector: 210-400 nm resolución de 1,2, Volumen de inyección: 10 μ l, Flujo: 0.8 ml/min, Tª columna: 30°C y. La cromatografía se desarrolló en gradiente, siendo el programa del mismo:

Minuto 0	90% A, 10% B
Minuto 5	90% A, 10% B
Minuto 30	0% A, 100% B
Minuto 35	0% A, 100% B
Minuto 40	90% A, 10% B
Minuto 45	90% A, 10% B

Fase móvil: A (ácido acético al 2%), B (acetonitrilo)

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utiliza el programa R x64 3.4.0. Se realiza un ANOVA (análisis de las varianzas) para saber si hay diferencias en cantidad de fenoles, germinación, longitud y peso de las semillas y las medidas hechas con el fluorímetro (ϕ_{PSII} y ETR). En el ANOVA se utiliza el test de Welch y si el p-valor es menor que 0.05 se comparan las muestras dos a dos, usando family wise error rate (FWER) y Tukey contrasts, porque si el p-valor da menor que 0.05, puede ocurrir que solo hay diferencias entre 2 tratamientos y en el resto de combinaciones no haya diferencias.

En el caso de los datos de las paredes celulares (FTIR) se promedian y representan los valores mediante Microsoft Excel. Aparte de utilizar los espectros de infrarrojos para cada tratamiento, se decide obtener los espectros

diferenciales de cada tratamiento (restándole los valores del control positivo, agua, a los valores de cada tratamiento).

4. Resultados y Discusión

En las pruebas de germinación llevadas a cabo (Tabla 1), se realiza un conteo de las plántulas germinadas en cada placa y se comparan los porcentajes de germinación.

Tabla 1: Porcentaje de germinación en cada tratamiento en los dos días de conteo

	4 Días	7 Días
Tratamiento	Media \pm SD	Media \pm SD
Control	83,7 \pm 8,9	83,7 \pm 8,9
1 ppm	76,1 \pm 24,5	79,6 \pm 26,1
10 ppm	80,0 \pm 0	87,5 \pm 11,0
100 ppm	51,0 \pm 21,9	76,1 \pm 24,5

Al realizar el ANOVA se comprueba que no hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Por lo que se puede deducir de nuestros resultados que no hay diferencias en el porcentaje germinación. En otros trabajos tampoco aparecen diferencias significativas en la germinación, aunque la variedad utilizada de lechuga sea diferente (Schmidt y Redshaw, 2015).

En las plántulas germinadas se mide la longitud y su peso (Tabla 2). El peso se realiza de todas las plántulas germinadas de la misma placa y luego se efectúa un promedio.

Tabla 2: Longitud y peso de las plántulas en cada tratamiento

	Longitud	Peso
Tratamiento	Media \pm SD	Media \pm SD
Control	1,4 \pm 0,9	0,008 \pm 0,002
1 ppm	1,3 \pm 0,8	0,007 \pm 0,002
10 ppm	1,5 \pm 1,0	0,008 \pm 0,002
100 ppm	1,1 \pm 0,9	0,006 \pm 0,002

Una vez testados los resultados con el ANOVA se prueba que no hay diferencias significativas. En otros trabajos no se mide exactamente la longitud o el peso de las plántulas, pero se compara la tasa de crecimiento relativo y tampoco aparecen diferencias significativas (Pietrini *et al.*, 2015)

Mediante el fluorímetro se miden el rendimiento cuántico (ϕ_{PSII}) y la tasa de transferencia de electrones (ETR) (Figura 2), para ello se utiliza el segundo par de hojas, realizando la medida por duplicado.

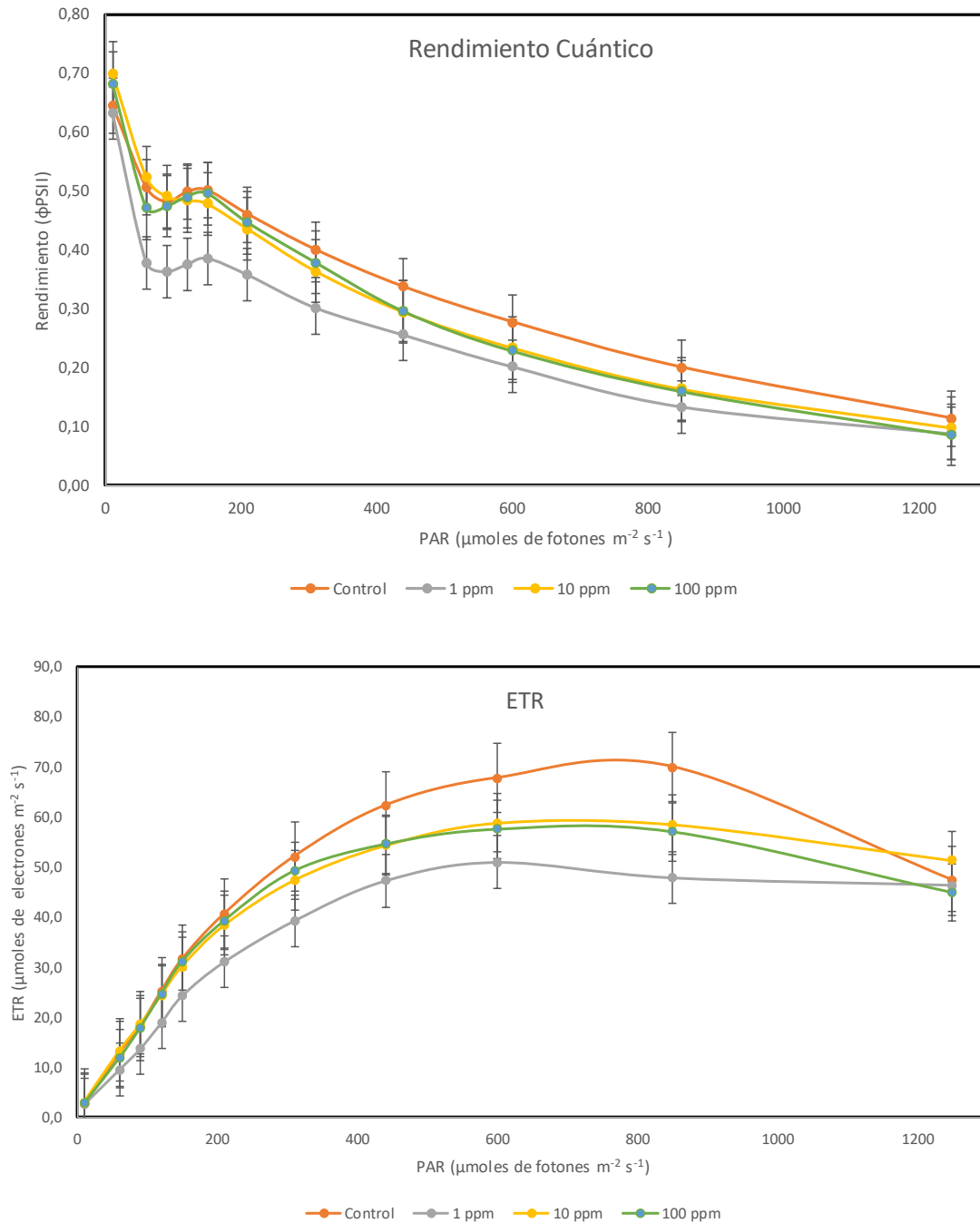


Figura 2: Parámetros de la fotosíntesis medidos con el fluorímetro

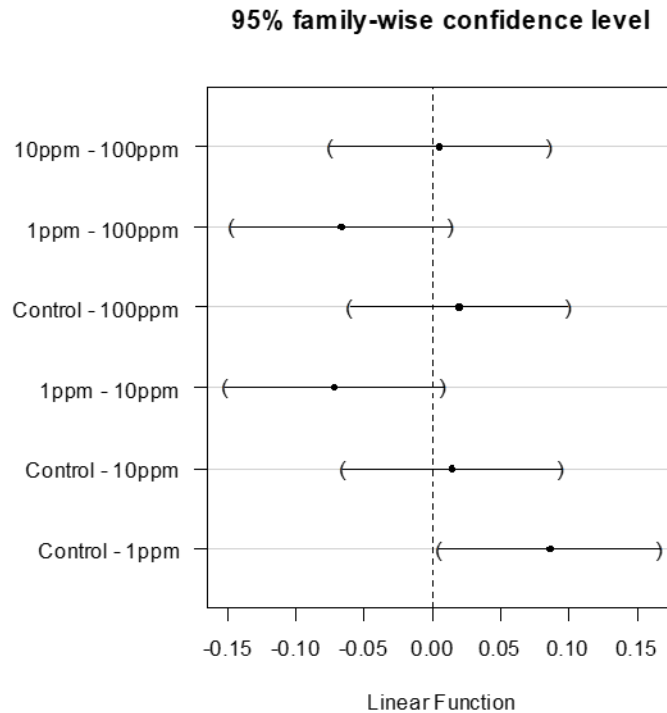


Figura 3: Comparación dos a dos del rendimiento cuántico

Al comprobar si existen diferencias significativas mediante el test ANOVA, se observa que en el ϕ_{PSII} se observa que hay diferencias, gracias a la comparación dos a dos (Figura 3) se puede ver que las diferencias existen solo entre los tratamientos del control y 1 ppm, aunque los valores de los tratamientos con ibuprofeno sean todos menores que el control. Que solo existan diferencias con el tratamiento con menos cantidad de ibuprofeno puede deberse a un error en el proceso de medición. Cabe destacar que en otros trabajos aparecen diferencias significativas en el rendimiento de *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. pero a concentraciones elevadas de ibuprofeno, 1000mg L^{-1} (Pino *et al.*, 2016) aunque también pueden existir diferencias porque se trata de una microalga y tienen otros pigmentos complementarios que pueden afectar a la fotosíntesis. En la ETR no existen diferencias significativas, en otros trabajos tampoco aparecen diferencias significativas en el ETR (Di Baccio *et al.*, 2017), por lo que puede deducirse que el ibuprofeno no afecta a estos dos parámetros, salvo en concentraciones altas.

La cantidad de fenoles es una medida que se toma de referencia para saber si una planta ha estado en condiciones de estrés (Sánchez, 2013). La cantidad de

fenoles (Figura 4) se consigue mediante una recta patrón de ácido ferúlico y se utiliza la alícuota conseguida en la extracción orgánica.

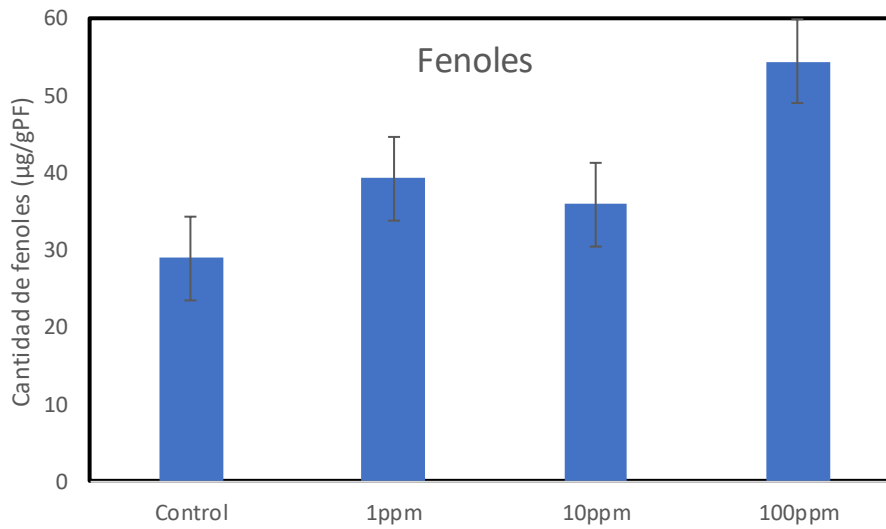


Figura 4: Cantidad de fenoles en las plantas de lechuga

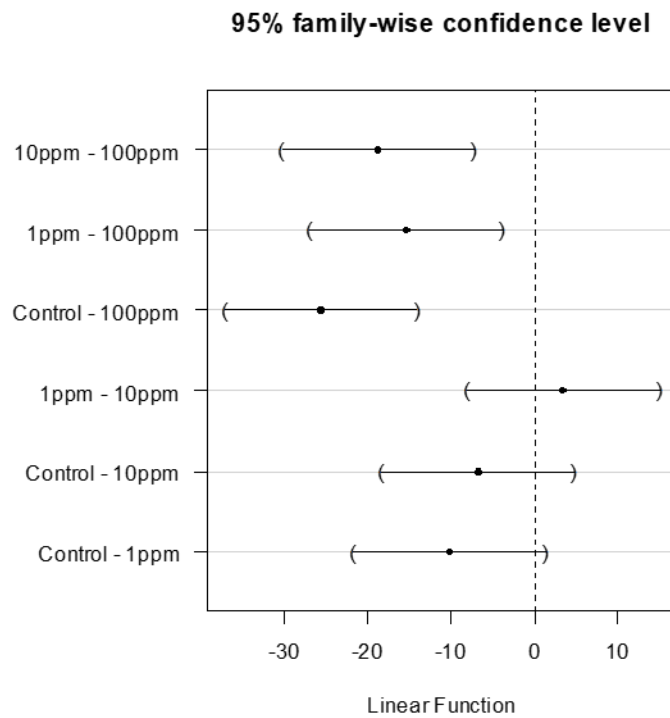


Figura 5: Comparación dos a dos de la cantidad de fenoles

Con los resultados de la cantidad de fenoles se comprueba, mediante el test ANOVA, que existen diferencias significativas. Al realizar la comparación dos a dos (Figura 5), se observa que hay diferencias significativas de todos los tratamientos con el tratamiento con ibuprofeno más concentrado (100 ppm). Esto

puede indicar que a partir de esa concentración la planta presenta un alto estrés y por eso sintetiza una cantidad de fenoles significativa. Relacionando esto con otros trabajos, donde se comprueba si *Lemna gibba* L. sintetiza la hormona del estrés (ácido abscísico), se puede comprobar que la cantidad de ácido abscísico es mayor en disoluciones con concentración de ibuprofeno $\mu\text{g L}^{-1}$ o superiores (Pomati *et al.*, 2004).

Para poder comparar la composición de las paredes se realiza una espectrometría de infrarrojos. Al observar los espectros de infrarrojos (Figura 6) se pueden comparar las absorbancias relativas de los distintos tratamientos llevados a cabo en el trabajo.

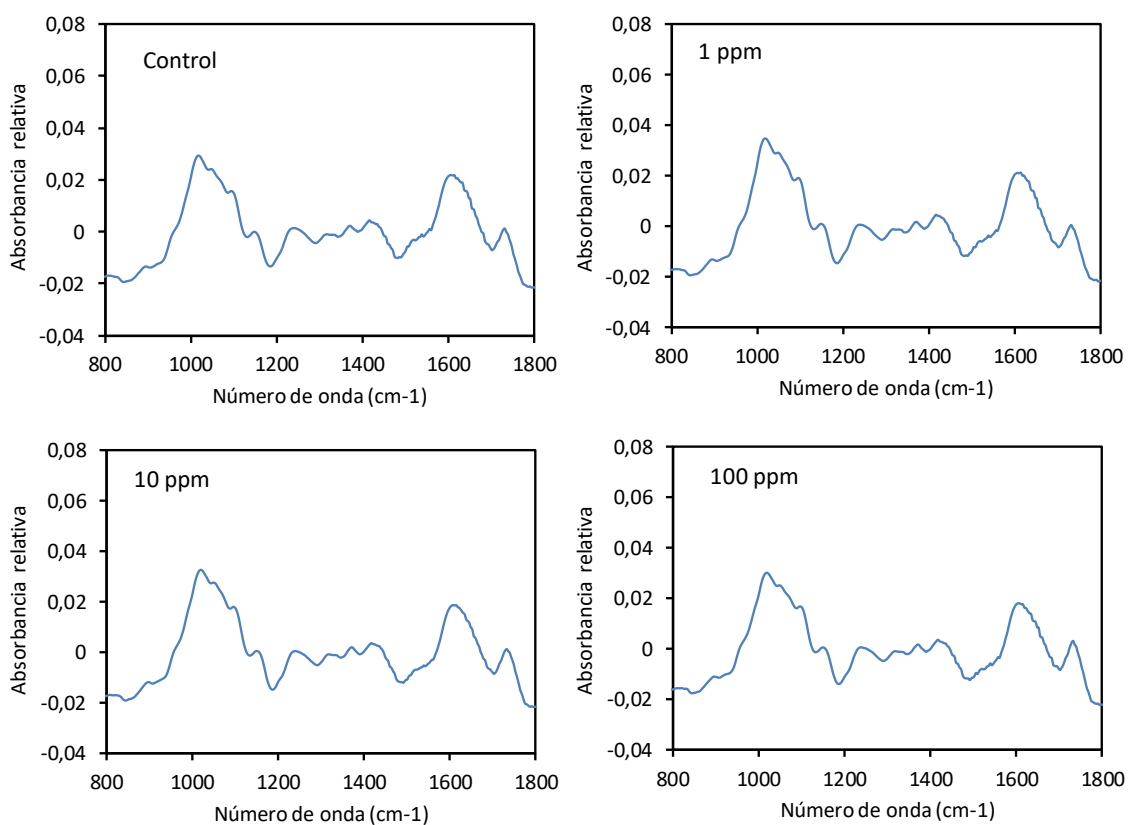


Figura 6: Espectros de absorbancia relativa para nuestras muestras en el rango de números de onda acotado a 1800-800cm⁻¹

En torno al número de onda de 1000 cm⁻¹, zona donde se encuentran los carbohidratos (Fernández-Pérez *et al.*, 2015), se observan diferencias del control con los tratamientos con ibuprofeno, en todos es mayor el valor al del control. En la región que se corresponde con anillos fenólicos y ácidos urónicos no

esterificados (indicadores de presencia de lignina), $1650-1500\text{cm}^{-1}$ (Fernández-Pérez *et al.*, 2014), los tratamientos con ibuprofeno tienen un valor menor que el control. Esto puede indicar que el ibuprofeno puede afectar en la composición de la pared de lechugas adultas.

La forma de visualizar mejor las diferencias entre los distintos tratamientos es mediante los espectros diferenciales (Figura 7). Estos espectros se obtienen restándole los valores de absorción del control a los distintos tratamientos, pudiendo así estimar con mayor precisión si un componente aumenta o disminuye dependiendo del tratamiento.

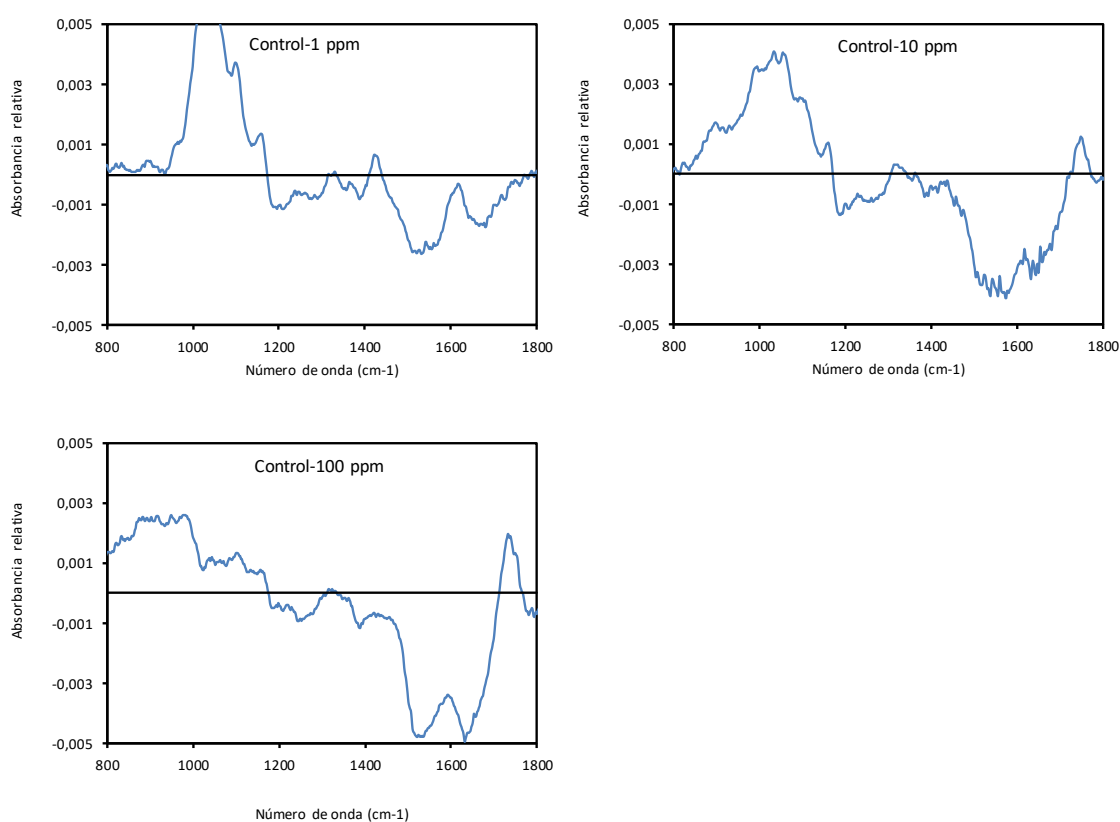


Figura 7: Espectros diferenciales de absorbancia relativa para los distintos tratamientos, acotado al rango de números de onda $1800-800\text{cm}^{-1}$

Como se podía apreciar en los espectros de absorbancia relativa, en todos los tratamientos aumenta la proporción de carbohidratos. Aunque el aumento de carbohidratos es inversamente proporcional a la concentración de ibuprofeno del tratamiento. En el caso de los anillos fenólicos y ácidos urónicos no esterificados, cuanto mayor es la concentración de ibuprofeno, el valor de la absorbancia es

más negativo. Esto quiere decir que la pared de 100 ppm es menos rígida, ya que presenta menos lignina.

Observando estas gráficas podemos deducir que la composición de la pared celular varía con estos tratamientos, aunque sea en valores bajos pueden ser significativos y afectar al crecimiento de la planta.

Para poder comprobar si el ibuprofeno se incorporó en la planta, se realiza una cromatografía en HPLC utilizando la misma alícuota que en la determinación de cantidad de fenoles. Se pincha un patrón de ibuprofeno del cual se obtiene el espectro (Figura 8) que presenta un tiempo de retención de 22.05 min.

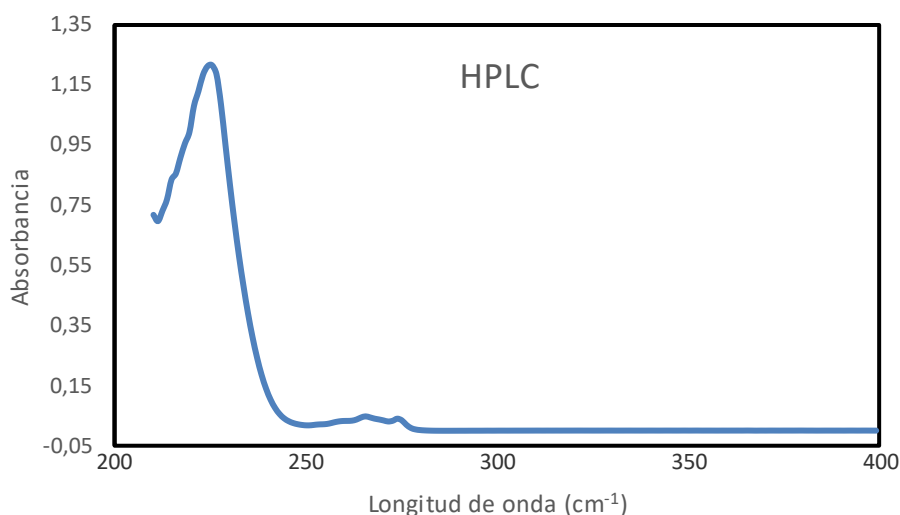


Figura 8: Absorbancias medidas en el rango de 200-400 cm⁻¹ de longitud de onda

Una vez pinchado el patrón, se observa que en los extractos de los diferentes tratamientos no aparece. Esto puede indicarnos que el ibuprofeno no es incorporado por las plantas de lechuga adultas. En cambio, en otros trabajos sí que es incorporado en *Arabidopsis thaliana* L., aunque en proporciones muy bajas y se cree que el ibuprofeno es incorporado en la vacuola (Marsik *et al.*, 2017).

5. Conclusiones

De los resultados de este trabajo se concluye que la presencia de ibuprofeno no influye en la tasa de germinación de las semillas de lechuga.

Sin embargo, esta presencia afecta a varios aspectos del metabolismo de la planta. Así, la fotosíntesis se ve afectada a bajas concentraciones de ibuprofeno, con valores de rendimiento cuántico menores que en el control. Altas concentraciones de ibuprofeno provocan un aumento en el contenido de compuestos fenólicos y se observan también importantes cambios en la composición de la pared celular.

Por otro lado, los análisis realizados no permitieron determinar con seguridad si la planta incorpora o no el ibuprofeno a sus tejidos.

Conclusión

Dos resultados deste traballo conclúese que a presenza de ibuprofeno non inflúe na taxa de xerminación das sementes de leituga.

Sen embargo, esta presenza afecta a varios aspectos do metabolismo da planta. Coma a fotosíntese que vese afectada a baixas concentracións de ibuprofeno, con valores de rendemento cuántico menores ca no control. Altas concentracións de ibuprofeno provocan un aumento no contido de compostos fenólicos e obsérvanse tamén importantes cambios na composición da parede celular.

Por outro lado, os análises realizados non permitiron determinar con seguridade se a planta incorpora ou non o ibuprofeno aos seus tecidos.

Conclusions

Taking into account the results of this research, we conclude that the presence of ibuprofen does not affect the germination of lettuce seeds.

Nevertheless, some parameters in the plant metabolism are affected by the presence of ibuprofen. The photosynthesis can be affected at low concentrations of ibuprofen, with less values in quantum yield than control. High concentrations of ibuprofen can cause increase in phenolic compounds contents so the cell wall composition is changed due to this effect.

On the other hand, the analysis could not clarify whether the plant incorporates ibuprofen into its tissue

6. Bibliografía

- Barceló D and López de Alda MJ (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona.
- De Vries IM (1996). Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. Genetic Resources and Crop Evolution, 44: 165–174
- Di Baccio D, Pietrini F, Bertolotto P, Pérez S, Barceló D, Zacchini M and Donati E (2017). Response of *Lemna gibba* L. to high and environmentally relevant concentrations of ibuprofen: Removal, metabolism and morpho-physiological traits for biomonitoring of emerging contaminants. Science of the Total Environment, 584-585: 363-373
- Fernández-Pérez F, Pomar F, Pedreño M.A and Novo-Uzal E (2015). The suppression of AtPrx52 affects fibers but not xylem lignification in *Arabidopsis* by altering the proportion of syringyl units. Physiologia Plantarum, 154: 395-406
- González-Escalada JR (2009). La sinergia farmacológica aplicada a la analgesia de la combinación de ibuprofeno con codeína. Revista sociedad española del dolor, 17(1):51-60
- Instituto nacional de estadística (2019). Cantidad consumida total de bolsas de lechugas (frescas o refrigeradas). <http://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?t=25168> (Version June 2019)
- Jeffrey C (2007). Compositae: Introduction with Key to Tribes. In: Kadereit JW and Jeffrey C Families and Genera of Vascular Plants, Flowering Plants, Eudicots, Asterales. Berlin, 8: 61-87
- Marsik P, Sisa M, Lacina O, Motkova K, Langhansova L, Rezek J and Vanek T (2017). Metabolism of ibuprofen in higher plants: A model *Arabidopsis thaliana* cell suspension culture system. Environmental Pollution, 220: 383-392
- Meloni AD, Gulotta MR and Oliva Cano MA (2008). El estrés salino incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y la concentración de polifenoles en Vinal (*Prosopis ruscifolia* G.). Quebracho, 15: 27-31
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2017). Anuario de estadística, 2016. Madrid
- Palomino RG, García CMP, Gil JHG, Rojano BA and Durango DLR (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, 16(3): 388-395

- Patiño Y, Díaz E and Ordoñez S (2014). Microcontaminantes emergentes en aguas: tipos y sistemas de tratamiento. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de Oviedo.
- Pietrini F, Di Baccio D, Acenña 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
- Pino MR, Muñiz S, Val J and Navarro E (2016). Phytotoxicity of 15 common pharmaceuticals on the germination of *Lactuca sativa* and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 22530-22541
- Pomar F, Merino F and Ros Barceló A (2002). O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma*, 220: 17-28
- Pomati F, Netting AG, Calamari D and Neilan BA (2004). Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. And *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology*, 67: 387-396
- Postigo C, Gros M, López de Alda MJ, Petrovic M, Ginebreda A and Barceló D (2011). Repercusiones sanitarias de la calidad del agua: los residuos de medicamentos en el agua. Departamento de Química Ambiental, Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudio del Agua. X Congreso español y I iberoamericano de sanidad ambiental
- Ryder EJ and Whitaker T (1976). Lettuce, *Lactuca sativa* (Compositae). N.W Simmonds. *Evolution of Crop Plants*. London, 39–41
- Sánchez Rodríguez E (2013). Efecto de la técnica agrícola del injerto en las respuestas fisiológicas de resistencia ante un estrés hídrico moderado en plantas de tomate cherry. Tesis doctoral, universidad de Granada
- Schmidt W and Redshaw CD (2015). Evaluation of biological endpoints in crop plants after exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Implications for phytotoxicological assessment of novel contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112: 212–222
- Stevens PF (2001). «Asteraceae». *Angiosperm Phylogeny Website*. (Version 12, July 2012)
- Watson L and Dallwitz MJ (1992). *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval*. (Version 15, April 2018)